

**ÉRICA ALESSANDRA ROCHA ALVES**

**Influência do tratamento com inibidores da protease do Vírus  
da Imunodeficiência Humana sobre funções dos macrófagos  
peritoneais murinos incubados *in vitro* com  
*Leishmania (L.) amazonensis***

**BRASÍLIA/DF**

**2013**

**ÉRICA ALESSANDRA ROCHA ALVES**

**Influência do tratamento com inibidores da protease do Vírus da  
Imunodeficiência Humana sobre funções dos macrófagos peritoneais  
murinos incubados *in vitro* com *Leishmania (L.) amazonensis***

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira**

**Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Kelly Grace Magalhães**

**BRASÍLIA/DF**

**2013**

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho ao meu marido Otávio, que me ama independente dos meus defeitos e está comigo em todas as dificuldades, sempre me apoiando e me incentivando a alcançar meus objetivos e à minha filha Ana Beatriz, que desde que nasceu é a luz da minha vida e a força que me impulsiona a sempre buscar novos caminhos.

## Agradecimentos

À Deus, que sempre está ao meu lado guiando os meus passos.

Aos meus pais, Francisca de Assis Rocha Alves e Irany José Alves, pelo amor, carinho e ensinamentos que contribuíram para que eu me tornasse a pessoa que eu sou hoje.

Em especial a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Imaculada Muniz-Junqueira, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pelos anos de conhecimento compartilhado, pelo exemplo que é, tanto como pessoa quanto como professora/pesquisadora e ainda pela amizade e pelo carinho que sempre me dispensou. Vou sentir muitíssimo a sua falta!

Ao prof<sup>o</sup> Dr Carlos Eduardo Tosta pelos ensinamentos passados sempre em um ambiente de incentivo a criatividade dos alunos.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelly Grace Magalhães, por me ensinar novas técnicas e pelos materiais e tempo doados para alguns experimentos.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Selma Kückelhaus pelo apoio que me deu em vários momentos ao longo de todos esses anos em que eu estive na Universidade de Brasília.

À Marthina Gomes de Miranda, uma companheira de experimento, que se tornou uma amiga. Obrigada pela sua ajuda que foi indispensável para a realização desse trabalho. Sem sua colaboração tudo teria sido muito mais difícil! Com certeza sua presença dinâmica e extrovertida tornou as diversas horas de trabalho muito mais suaves!

A amiga, Shirley Claudino Couto, que na hora de contar tantas células e tantas leishmânias sempre esteve disponível para me ajudar.

A amiga, Tatiana Karla Borges, que colaborou para a realização de alguns ensaios e com quem aprendi muitas coisas observando sua forma de trabalhar.

Ao Sr. Nelson Pellet, *in memoriam*, pela confecção do meio RPMI utilizado nos experimentos e pela educação, gentileza e disponibilidade que tinha sempre que eu o procurava.

Aos estagiários Simone Fernandes, Mariângela Souza, Daniela Aquino, Luciana Teixeira, Gleise Amaral, Mayara Oliveira pela ajuda com os camundongos e com o preparo dos materiais utilizados nos experimentos.

Ao Sr. José Siqueira da Silva, pela confecção das lâminas utilizadas nos experimentos.

Aos meus novos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, pelo apoio e amizade demonstrados ao longo dessa jornada, e em especial a Dr<sup>a</sup> Jaqueline Germano de Oliveira, que me ofereceu um ambiente de trabalho que me permitiu concluir com tranquilidade essa pesquisa.

Ao Dr. Rogério Luiz Scapini, Assessor Técnico da Área de Manejo Logístico de Medicamentos, da Unidade de Assistência e Tratamento do Programa Nacional de DST e AIDS, que prontamente atendeu ao pedido para obtenção dos medicamentos utilizados nessa pesquisa.

E a todos àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse sonho.

*‘Ninguém cruza no nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de ninguém sem nenhuma razão.’`*

*Chico Xavier*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	VIII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	XII
<b>RESUMO</b> .....	XIV
<b>ABSTRACT</b> .....	XVII
1. Introdução.....	1
1.1 A infecção pelas leishmânias.....	2
1.2. Aspectos imunológicos das leishmanioses .....	3
1.3. O papel da sinalização mediada pelo NF- $\kappa$ B na infecção pela leishmânias.....	5
1.4. O papel da sinalização mediada pelo PPAR- $\gamma$ na infecção pela leishmânias.....	7
1.5. Os corpúsculos lipídicos na leishmaniose.....	8
1.6. A coinfeção pelo VIH e <i>Leishmania</i> .....	8
1.7. Aspectos imunológicos da coinfeção pelo VIH e <i>Leishmania</i> .....	10
1.8. A terapia antiretroviral de alta eficácia (HAART) e a coinfeção pelo VIH e <i>Leishmania</i> .....	14
1.9. Justificativa.....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1 Delineamento experimental.....	23
3.2. Grupos de estudo.....	24
3.3. Parasitos.....	25
3.4. Obtenção dos macrófagos peritoneais.....	26
3.5 Influência dos meios de cultura e da proporção de parasitos por macrófago sobre o índice de infecção.....	27
3.6 Índice de infecção dos macrófagos após incubação com leishmânias.....	31
3.6.a Em condições subótimas.....	31
3.6.b Em condições ótimas.....	31
3.7. Viabilidade dos macrófagos após incubação com leishmânias em condições ótimas.....	32
3.8. Viabilidade das leishmânias em condições ótimas após incubação com os macrófagos.....	32
3.9. Determinação da produção de óxido nítrico após incubação dos macrófagos com leishmânias em condições subótimas e ótimas.....	33
3.10. Determinação da produção de peróxido de hidrogênio após incubação dos macrófagos com leishmânias em condições ótimas.....	33
3.11. Determinação da produção de IL-1 $\beta$ e IL-6 após incubação dos macrófagos com leishmânias em condições subótimas.....	34
3.12. Determinação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-23 e IL-10 após incubação dos macrófagos com leishmânias em condições ótimas.....	35
3.13. Expressão da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B pelos macrófagos que foram incubados com leishmânias em condições subótimas.....	36

3.14. Expressão da subunidade RelB do NF- $\kappa$ B e do PPAR- $\gamma$ pelos macrófagos que foram incubados com as leishmânias em condições ótimas.....	37
3.15. Quantificação da translocação do citoplasma para o núcleo do NF- $\kappa$ B e do PPAR- $\gamma$ .....	38
3.16. Expressão de corpúsculos lipídicos detectada pela sonda BODIPY quando os macrófagos foram incubados com leishmânias em condições ótimas.....	39
3.17. Expressão de corpúsculos lipídicos detectada pela marcação com <i>Oil Red</i> quando os macrófagos foram incubados com leishmânias em condições ótimas.....	40
3.18. Análise estatística.....	40
<b>4. RESULTADOS</b> .....	41
4.1. Lopinavir/ritonavir e atazanavir diminuem o número de células recuperadas no lavado peritoneal.....	42
4.2. Influência dos antiretrovirais sobre o índice de infecção.....	44
4.2.a Lopinavir/ritonavir aumenta o índice de infecção dos macrófagos após incubação com leishmânias em condições subótimas.....	44
4.2.b. Lopinavir/ritonavir and atazanavir aumentaram o índice de infecção dos macrófagos após incubação com leishmânias em condições ótimas.....	46
4.3. Os antiretrovirais não modificaram a viabilidade dos macrófagos após a incubação das células com leishmânias em condições ótimas.....	48
4.4. Número de células aderidas às lamínulas.....	51
4.4.a. Os antiretrovirais não apresentaram toxicidade para os macrófagos em condições subótimas.....	51
4.4.b Os antiretrovirais não apresentaram toxicidade para os macrófagos em condições ótimas.....	54
4.5. Lopinavir/ritonavir e atazanavir aumentaram a recuperação de leishmânias após a incubação com os macrófagos em condições ótimas.....	56
4.6. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos.....	58
4.6.a Os antiretrovirais recuperam em parte a depressão na produção do NO pelos macrófagos determinada pelas leishmânias em condições subótimas.....	58
4.6.b. Menor produção de óxido nítrico pelos macrófagos de camundongos tratados com atazanavir após incubação com leishmânias em condições ótimas.....	61
4.7. Os antiretrovirais não influenciaram a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos incubados com as leishmânias em condições ótimas.....	63
4.8. Maior produção produção de IL-1 $\beta$ pelos macrófagos tratados com atazanavir e lopinavir/ritonavir (condições subótimas).....	65
4.9 A produção de IL-6 não foi influenciada pelos antiretrovirais (condições subótimas).....	68
4.10. Produção de IL-12p70, TNF- $\alpha$ e IL-23 pelos macrófagos (em condições ótimas).....	70
4.10.a IL-12p70.....	70
4.10.b TNF- $\alpha$ .....	72
4.10.c IL-23.....	74
4.11. Produção de IL-10 pelos macrófagos (em condições ótimas).....	76
4.12. Expressão dos corpúsculos lipídicos em macrófagos (em condições ótimas).....	78



4.13. Imagens representativas da translocação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B para os núcleos de macrófagos (em condições subótimas).....	81
4.14. Imagens representativas e quantificação da expressão da subunidade RelB do NF- $\kappa$ B em macrófagos (condições ótimas).....	89
4.15. Imagens representativas e quantificação da expressão do PPAR- $\gamma$ nos macrófagos (em condições ótimas).....	94
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	99
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	116
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	120
<b>8. ANEXO I: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL DA FACULDADE DE MEDICINA</b> .....	135

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Delineamento experimental.....	24
Figura 2. Efeito do meio de cultura e do número de leishmânias por macrófago sobre o índice de infecção.....	30
Figura 3. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre o número de células recuperadas no lavado peritoneal de camundongos BALB/c.....	43
Figura 4. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre o índice de infecção após incubação dos macrófagos com leishmânias em condições subótimas.....	45
Figura 5. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre o índice de infecção após incubação dos macrófagos com leishmânias em condições ótimas.....	47
Figura 6. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a viabilidade dos macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	49
Figura 7. Microscopia de fluorescência mostrando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com salina, lopinavir/ritonavir e atazanavir incubados ou não com leishmânias em condições ótimas corados com laranja de acridina (5mg/mL).....	50
Figura 8. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre o número de células aderidas às lamínulas quando os macrófagos foram incubados ou não com leishmânias em condições subótimas.....	52
Figura 9. Influência da infecção com leishmânias em condições subótimas sobre o número de células aderidas às lamínulas quando os macrófagos foram obtidos de camundongos BALB/c tratados ou não com lopinavir/ritonavir e atazanavir.....	53
Figura 10. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre o número de células aderidas às lamínulas quando os macrófagos foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	55
Figura 11. Curvas de crescimento de <i>L. (L.) amazonensis</i> que sobreviveram após o co-cultivo com os macrófagos.....	57
Figura 12. Influência da infecção pelas leishmânias em condições subótimas sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos de camundongos BALB/c tratados ou não com lopinavir/ritonavir e atazanavir.....	58
Figura 13. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições subótimas.....	60

Figura 14. Influência da infecção pela leishmânia sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos de camundongos BALB/c tratados ou não com lopinavir/ritonavir e atazanavir que foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	62
Figura 15. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	64
Figura 16. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de IL-1 $\beta$ pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições subótimas.....	66
Figura 17. Influência da infecção pela leishmânia sobre a produção de IL-1 $\beta$ pelos macrófagos de camundongos BALB/c tratados ou não com lopinavir/ritonavir e atazanavir que foram incubados ou não com leishmânias em condições subótimas .....	67
Figura 18. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de IL-6 pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições subótimas.....	69
Figura 19. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de IL-12p70 pelos macrófagos que foram incubados ou não com com leishmânias em condições ótimas.....	71
Figura 20. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de TNF- $\alpha$ pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	73
Figura 21. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de IL-23 pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	75
Figura 22. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de IL-10 pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	77
Figura 23. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a expressão dos corpúsculos lipídicos em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	79
Figura 24. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a translocação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B para os núcleos dos macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições subótimas.....	82
Figura 25. Corte ortogonal de núcleo de macrófago peritoneal de camundongo BALB/c tratado com atazanavir incubado por 1 h com RPMI.....	83
Figura 26. Corte ortogonal de núcleo de macrófago peritoneal de camundongo BALB/c tratado com atazanavir incubado por 1 h com leishmânias em condições subótimas.....	83

Figura 27. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a translocação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B para os núcleos de macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições subótimas.....	84
Figura 28. Corte ortogonal de núcleo de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com atazanavir incubados por 4 h com meio RPMI.....	85
Figura 29. Cortes ortogonais de núcleos de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c tratados com salina, lopinavir/ritonavir e atazanavir e incubados por 4 h com leishmânias em condições subótimas.....	86
Figura 30. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a translocação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B para os núcleos de macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições subótimas.....	87
Figura 31. Corte ortogonal de núcleos de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com salina e lopinavir/ritonavir incubados por 24 h com com leishmânias em condições subótimas.....	88
Figura 32. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a expressão da subunidade RelB do NF- $\kappa$ B em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	90
Figura 33. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a expressão da subunidade RelB do NF- $\kappa$ B em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	91
Figura 34. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a expressão da subunidade RelB do NF- $\kappa$ B em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	93
Figura 35. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a via do PPAR- $\gamma$ em macrófagos incubados ou não por 30 h com leishmânias em condições ótimas.....	95
Figura 36. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a via do PPAR- $\gamma$ em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	96
Figura 37. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a expressão do receptor-gama ativado pelo proliferador do peroxissoma (PPAR- $\gamma$ ) em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	98
Tabela. 1. Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a expressão dos corpúsculos lipídicos em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.....	80

Tabela 2. Sumário dos resultados da influência do tratamento oral com os inibidores da protease do VIH lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre funções dos macrófagos de camundongos BALB/c incubados <i>in vitro</i> com <i>L. (L.) amazonensis</i> em condições de subótimas e ótimas.....	119
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

**SIDA** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**ATV** - Atazanavir

**BODIPY** - Boro-dipirometano

**DAPI** - 4,6-diamidino-2-fenil-indol

**fMLP** - Peptídeos formilados

**VIH** - Vírus da Imunodeficiência Humana

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio

**IFN- $\gamma$**  - Interferon gama

**HAART** - Terapia antiretroviral de alta eficácia

**HEPES** - Ácido hidroxietil piperazinoetanosulfônico

**$\kappa$ B** - Inibidor kapa B

**IL-1 $\beta$**  - Interleucina 1 beta

**IL-5** - Interleucina 5

**IL-6** - Interleucina 6

**IL-8** - Interleucina 8

**IL-12** - Interleucina 12

**IL-10** - Interleucina 10

**IL-13** - Interleucina 13

**IL-17** - Interleucina 17

**IL-23** - Interleucina 23

**iNOS** - Sintase do óxido nítrico

**LCL** - Leishmaniose cutânea localizada

**LCM** - Leishmaniose cutâneo-mucosa

**LDLR** - Receptor para lipoproteína de baixa densidade

**LPS** - Lipopolissacarídeo bacteriano

**LTB<sub>4</sub>** - Leucotrieno B4

**LPV/RTV** - Lopinavir/ritonavir

**MCP-1** - Proteína-1 quimiotática para monócitos

**MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade

**MCP-1** - Proteína 1 quimiotática para monócitos

**MIP-1 $\alpha$**  - Proteína-1 alfa inflamatória de macrófago

**NF- $\kappa$ B** - Fator nuclear kapa B

**NADPH** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NaOH** - Hidróxido de sódio

**NK** - Células natural killer  
**NO** - Óxido nítrico  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Ânion superóxido  
**PAF** - Fator de agregação plaquetário  
**PAMP** - Padrões moleculares de patógenos  
**PGE<sub>2</sub>** - Prostaglandina E2  
**PMA** - Acetato miristato de forbol  
**PPAR-γ** - Fator gama ativado pelo proliferador do peroxissoma  
**ROS** - Espécies reativas de oxigênio  
**STF** - Salina tamponada com fosfato  
**SFB** - Soro fetal bovino  
**Ta1** - T auxiliar tipo 1  
**Ta2** - T auxiliar tipo 2  
**Ta17** - T auxiliar tipo 17  
**TGF-β** - Fator de crescimento e transformação beta  
**TNF-α** - Fator de necrose tumoral alfa

## **RESUMO**



Alguns estudos têm demonstrado que os inibidores da protease do VIH modulam várias funções do sistema imunitário, porém não se sabe ainda se estes medicamentos podem modificar a resposta de defesa contra as leishmânias. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tratamento com os inibidores da protease do VIH lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre funções dos macrófagos durante as primeiras horas de interação com as leishmânias. Utilizamos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, tratados por 10 dias, por via oral, com lopinavir/ritonavir (200/50 mg/Kg) e atazanavir (90 mg/Kg), que foram infectados ou não *in vitro* com um menor (proporção 2:1) e um maior número (proporção 10:1) de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e que denominamos condições subótimas e ótimas, respectivamente. Analisamos o efeito desses medicamentos sobre o índice de infecção, a capacidade de aderência, a viabilidade dos macrófagos, a viabilidade das leishmânias, a produção de moléculas microbicidas, a produção de citocinas, a expressão de corpúsculos lipídicos, e parte das vias de sinalização intracelular do NF- $\kappa$ B e PPAR- $\gamma$ . O índice de infecção e o número de macrófagos aderentes foram avaliados por microscopia ótica, após coloração com Giemsa 10%. O percentual de macrófagos viáveis foi analisado por microscopia de fluorescência, após coloração com laranja de acridina (5 mg/mL). A viabilidade dos parasitos foi estimada contando-se, em câmara de Neubauer, o número de parasitos que proliferaram a partir das amastigotas recuperadas dos macrófagos infectados. A produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi determinada pelos métodos de Griess e Pick, respectivamente. A produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, TNF- $\alpha$  e IL-10 foi analisada pela técnica de ELISA. A influência dos medicamentos sobre a expressão dos corpúsculos lipídicos foi analisada tanto por microscopia ótica, após coloração com *Oil Red O*, quanto por microscopia confocal, após coloração com Bodipy e as vias do NF- $\kappa$ B e PPAR- $\gamma$  foram investigadas por microscopia confocal e quantificadas utilizando o software ImageJ. O número de células recuperadas da cavidade peritoneal dos camundongos BALB/c tratados com LPV/RTV (p=0,003) e ATV (p=0,003) foi menor do que o número recuperado dos animais que foram tratados com salina. O índice de infecção dos macrófagos dos camundongos tratados com LPV/RTV foi maior do que o dos macrófagos dos animais tratados com salina, tanto quando as células foram incubadas com um menor número de parasitos (p=0,0005) como quando foram incubadas com um maior número de leishmânias (p=0,004). Em ambos os casos, esse aumento foi ocasionado por uma elevação do percentual de macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* (p<0,05), porém quando a infecção foi feita com um menor número de parasitos, também deveu-se a uma elevação do número médio de *L.(L.) amazonensis* interiorizada por macrófago (p=0,004). Diferentemente, o índice de infecção dos macrófagos dos camundongos tratados com ATV somente foi maior do que o dos macrófagos dos animais tratados com salina quando as células foram incubadas com um menor número de leishmânias (p=0,04) e esse aumento foi ocasionado por uma elevação do percentual de células infectadas por *L. (L.) amazonensis* (p=0,02). Quando as células foram incubadas com um maior número de parasitos, ambos os medicamentos não influenciaram a viabilidade dos macrófagos, bem como sua capacidade de aderência ao vidro, entretanto tanto o LPV/RTV quanto o ATV aumentaram a capacidade de aderência dos macrófagos que foram incubados com um menor número de leishmânias (p=0,02). Um maior número de parasitos proliferaram a partir dos macrófagos dos animais tratados com LPV/RTV e ATV em todos os dias analisados, sendo que no terceiro dia de cultivo, foram recuperadas 45,1% (p=0,001) e 56,4% (p=0,001) mais promastigotas/mL a partir dos macrófagos dos animais tratados com antiretrovirais do que daqueles provenientes dos animais tratados com salina. Os antiretrovirais não influenciaram a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

pelos macrófagos. Quando os macrófagos foram incubados com um menor número de parasitos, a infecção com pelas leishmânias deprimiu a produção do NO ( $p=0,054$ ), entretanto o tratamento com LPV/RTV ( $p=0,03$ ) aumentou a produção desse reativo de nitrogênio pelos macrófagos incubados com leishmânias em relação aos macrófagos dos animais que foram tratados com salina. Ambos os medicamentos não interferiram na produção de IL-23, IL-6 e na expressão dos corpúsculos lipídicos pelos macrófagos incubados ou não com as leishmânias. A infecção dos macrófagos pela incubação com um maior número de parasitos deprimiu a produção de IL-12p70 pelos macrófagos dos camundongos tratados com ATV ( $p=0,058$ ). A incubação dos macrófagos com um maior número de parasitos acarretou uma diminuição da produção do TNF- $\alpha$  pelos macrófagos dos camundongos tratados com salina ( $p=0,047$ ). O tratamento com ATV deprimiu a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos ( $p<0,0001$ ), entretanto houve um aumento da produção do TNF- $\alpha$  após incubação *in vitro* com as leishmânias ( $p=0,025$ ), porém, sem ultrapassar os níveis máximos observados nos animais não tratados. Ambos os tratamentos reduziram a produção de IL-10 pelas células que foram incubadas apenas com o meio de cultura ( $p=0,01$ ), e essa produção se manteve baixa mesmo quando os macrófagos foram incubados com um maior número de leishmânias. O tratamento com o ATV estimulou a translocação do NF- $\kappa$ B p65 do citoplasma para os núcleos dos macrófagos incubados apenas com o meio de cultura e favoreceu a translocação mais precoce desse fator de transcrição para os núcleos dos macrófagos incubados com um menor número de parasitos. A infecção com um maior número de leishmânias diminuiu a translocação do NF- $\kappa$ B RelB do citoplasma para os núcleos dos macrófagos nos animais tratados com o LPV/RTV ( $p=0,0001$ ) e ainda a expressão citoplasmática do NF- $\kappa$ B RelB nos animais tratados com o atazanavir ( $p=0,0003$ ). A infecção dos macrófagos com uma maior número de leishmânias aumentou a expressão citoplasmática do PPAR- $\gamma$  nos animais tratados com ATV ( $p=0,02$ ), sem modificar a translocação do PPAR- $\gamma$  do citoplasma para os núcleos dos macrófagos. Os nossos resultados mostraram que os inibidores da protease do VIH influenciaram diversos mecanismos de defesa inato que são importantes para a imunidade e imunopatogenia das leishmanioses. Embora esses medicamentos sejam altamente efetivos para controlar a replicação do Vírus da Imunodeficiência Humana, é possível que essas drogas possam influenciar o curso clínico das leishmanioses nos indivíduos coinfectados pelo VIH e *Leishmania*.

## **ABSTRACT**

Some studies have shown that HIV protease inhibitors modulate many functions of the immune system, but it is unknown whether these drugs may influence the defense response against *Leishmania*. Therefore, the aim of this research was to evaluate the influence of the treatment with the HIV protease inhibitors lopinavir/ritonavir and atazanavir on macrophage functions during its first interaction with *Leishmania*. We used peritoneal macrophages from BALB/c mice treated orally, for 10 days, with lopinavir/ritonavir (200/50 mg / kg) and atazanavir (90 mg/kg ), which were infected or not *in vitro* with a low (2:1) or high (10:1) amount of promastigotes of *L. (L.) amazonensis*. We analyzed the effect of these drugs on infection index, viability of macrophages, adhesion capacity, viability of *Leishmania*, production of microbicidal molecules and cytokines production, expression of lipid bodies and NFκB and PPAR-γ intracellular signaling pathways. The infection index and the number of adherent macrophages were evaluated by light microscopy after staining with 10% Giemsa solution. The percentage of viable macrophages were assessed by fluorescence microscopy after staining with acridine orange (5 mg/mL). The viability of the parasites was determined by counting the number of parasites that proliferated in culture after recovered from infected macrophages using a Neubauer chamber. The production of nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was determined by Griess and Pick methods, respectively. The production of IL-1β , IL-6 , IL-12p70, TNF-α and IL-10 was assessed by ELISA. The influence of the drugs on the NF-κB and PPAR-γ signaling pathways was investigated by confocal microscopy, whereas the expression of lipid bodies was studied by optical microscopy, after staining with *Oil Red*, and by confocal microscopy, after staining with Bodipy. The number of cells recovered from peritoneal cavity of LPV/RTV treated-BALB/c mice (p=0.003) and ATV-treated-BALB/c mice (p=0.003) was lower than the number recovered from animals treated with saline. The infection index of macrophages from LPV/RTV-treated animals was higher than that of macrophages from saline-treated animals, both when cells were incubated with a low amount of parasites (p=0.0005) as when they were incubated with a high amount of *Leishmania* (p=0.004). In both cases, this elevation was due to an increase in the percentage of macrophages infected by *L. (L.) amazonensis* (p<0.05), but when infection was performed with a low amount of parasites, was also due to the increase in the average number of *L. (L.) amazonensis* by macrophage (p=0.004). Differently, the infection index of macrophages from ATV-treated mice was only higher than that of macrophages from animals treated with saline when cells were incubated with a high amount of *Leishmania* (p=0.04), and this elevation was due to the increase of the percentage of macrophages infected by *L. (L.) amazonensis* (p=0.02). When cells were incubated with a high amount of parasites, no treatment influenced the viability of macrophages as well as their abilities to adhere to glass slides, however LPV/RTV and ATV increased adhesion capacity of macrophages when they were incubated with a low amount of parasites (p=0.02). An increased number of *Leishmania* proliferated after recovered from macrophages of mice treated with antiretrovirals, and on third day in culture, 45.1% (p=0.001) and 56.4% (p=0.001) more promastigotes/mL were recovered from macrophages of LPV/RTV- and ATV- treated mice than from saline-treated mice. Both drugs did not influence H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by macrophages. *Leishmania* infection decreased NO production by macrophages treated with saline (p=0.054), however, when macrophages were incubated with a low amount of parasites, the NO production by macrophages from LPV/RTV-treated mice (p=0.03) was higher than the NO production by macrophages from saline-treated mice. Both drugs did not influence the production of IL-23, IL-6 and the expression of lipid bodies by macrophages incubated with or without *Leishmania*. The infection of macrophages with a high amount of parasites

decreased the IL-12p70 production by macrophages from ATV-treated mice ( $P=0.058$ ). The infection of macrophages with a high amount of parasites decreased TNF- $\alpha$  production by macrophages from saline-treated mice ( $P=0.047$ ). The ATV treatment decreased the production of TNF- $\alpha$  by macrophages ( $p<0.0001$ ), however, there was an increased production of TNF- $\alpha$  after incubation *in vitro* with a high amount of *Leishmania* ( $p=0.025$ ), however, without exceeding the TNF- $\alpha$  levels observed in macrophages from untreated animals. Both treatments reduced the production of IL-10 when cells were incubated only with culture medium ( $p=0.01$ ) that remained low even when macrophages were incubated with a high amount of *Leishmania*. The treatment with ATV stimulated NF- $\kappa$ B p65 nuclear translocation when macrophages were incubated in medium and favored an earlier nuclear translocation of this transcription factor when macrophages were incubated with a low amount of parasites. Infection with a high amount of parasites decreased the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B RelB in macrophages recovered from LPV/RTV-treated animals ( $p=0.0001$ ) and also the cytoplasmic expression of NF- $\kappa$ B RelB when macrophages were recovered from atazanavir-treated animals ( $p=0.0003$ ). Infection of macrophages with a high amount of *Leishmania* increased cytoplasmic expression of PPAR- $\gamma$  when macrophages were derived from ATV treated-mice ( $p=0.02$ ), without changing the cytoplasm-to-nucleus PPAR- $\gamma$  translocation in macrophages. Our results showed that HIV protease inhibitors were able to influence the innate defense mechanisms, which are important for immunity and immunopathogenesis of leishmaniasis. Although these drugs are highly effective in controlling the HIV replication, it is possible that they may influence the clinical course of leishmaniasis in individuals HIV and *Leishmania* coinfecting.

# **INTRODUÇÃO**

## 1.1 A infecção pelas leishmânias

As leishmanioses estão entre as doenças tropicais mais negligenciadas do mundo. Existem mais de 12 milhões de pessoas infectadas, surgem 2 milhões de novos casos a cada ano e 350 milhões de pessoas estão em risco de adquirir a doença. São endêmicas em 88 países do mundo, porém mais de 90% dos casos mundiais de leishmaniose tegumentar e visceral foram relatados na Índia, Brasil, Nepal, Sudão, Bangladesh, Bolívia, Peru, Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2013).

No Brasil, de 2000 a 2008, foram registrados 238.749 casos de leishmaniose tegumentar, com média anual de 26.528 novos casos. No entanto, observou-se uma redução de 41% dos casos em 2008, quando comparado a 2000. As regiões Norte e Nordeste vêm contribuindo, ao longo dos anos, com os maiores percentuais de casos do país, de modo que, do total confirmado no período de 2000 a 2008, 39,4% (94.169/238.749) ocorreram na região Norte; 31,7% (75.657/238.749), na região Nordeste; 15,9% (37.853/238.749), na região Centro-Oeste; 9,6% (22.903/238.749), no Sudeste; e 2,6% (6.161/238.749), na região Sul. No caso da leishmaniose visceral, em 2008 foram registrados 3.852 casos em 20 unidades federadas de 4 regiões do Brasil, sendo que o maior número de casos ocorreu na região Nordeste. Apesar disso, ao se analisar a série histórica observou-se uma redução dos casos nesta região, que passou de 83% (4.029/4.858) do total de casos confirmados em 2000, para 45% (1.739/3.852) em 2008. Essa doença vem se expandindo, de forma gradativa, para as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, que passaram de 17% (829/4.858) do total de casos em 2000, para 48% (1.863/3.852) em 2008 (SVS/MS, 2010).

Essas doenças são ocasionadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que penetram no organismo do homem quando flebotomíneos infectados inoculam promastigotas metacíclicas na pele durante o repasto sanguíneo. Na derme, as promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e, dentro dessas células se transformam em amastigotas que se multiplicam causando doença. Os parasitos podem ficar na pele, causando a leishmaniose cutânea, porém podem também ser encontrados na mucosa oronasal ou em órgãos como medula óssea, baço, fígado e linfonodos ocasionando, respectivamente, a leishmaniose mucocutânea e a leishmaniose visceral (Chappuis et al., 2007). Nas formas cutânea e mucocutânea observam-se lesões ulceradas, verrucosas ou nodulares que podem ser graves e desfigurantes e na forma visceral ocorre febre, anemia, hepatoesplenomegalia e caquexia, que acarreta o óbito na ausência de diagnóstico e tratamento (Chappuis et al., 2007).

## 1.2. Aspectos imunológicos das leishmanioses

As principais células hospedeiras das leishmânias são os macrófagos, células do sistema imunitário inato que fagocitam microrganismos invasores. O reconhecimento dos patógenos por essas células ocorre por meio de receptores para padrões moleculares de patógenos (PAMP), que reconhecem diretamente os antígenos expressos na superfície dos microrganismos, ou por meio dos receptores para opsoninas, que reconhecem moléculas do hospedeiro que se depositaram na superfície dos patógenos (Underhill & Aderem 1999, Underhill & Ozinsky 2002). Após o reconhecimento, o microrganismo é interiorizado em um vacúolo denominado fagossoma. Então, o lisossoma, contendo as enzimas digestivas, funde-se com o fagossoma, formando o fagolisossoma, criando um ambiente ácido, rico em peptídeos microbicidas e enzimas hidrolíticas, além de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que promovem a morte do microrganismo invasor (Slauch, 2011).

As leishmânias escapam facilmente da destruição pelos macrófagos, pois as promastigotas metacíclicas inoculadas na pele pelo inseto vetor, são interiorizadas, principalmente, por meio dos receptores para o complemento 3 (CR3), e esta via de entrada não dispara os mecanismos microbicidas dos macrófagos (Liu & Uzzona, 2012). Além disso, após a interiorização nos macrófagos, o lipofosfoglicano (LPG) presente na membrana das promastigotas retarda a fusão fagolisossomal, o que propicia que ocorra a diferenciação para amastigotas, que são resistentes a degradação no ambiente ácido dos fagolisossomas (Olivier et al., 2005). Uma vez que o fagolisossoma é formado, as leishmânias impedem a geração de radicais de oxigênio pelos macrófagos, pois bloqueiam a reunião do complexo enzimático NADPH oxidase na membrana fagolisossomal (Moradin & Desconteaux, 2012). Por outro lado, quando radicais livres são gerados, as leishmânias secretam as peroxidoxinas (LcPxn1 e 2) e superóxido dismutase, que neutralizam as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio liberadas no fagolisossoma (Olivier et al., 2005).

Tem sido descrito que uma glicoproteína presente na membrana do parasito denominada gp63 seja capaz de inibir a lise dos parasitos no fagolisossoma, pois lipossomas contendo proteínas envolvidas por gp63 foram protegidas da degradação fagolisossomal pelos macrófagos (Chaudhuri et al., 1989). Ocorre aumento da sobrevivência das leishmânias também pelo fato dos macrófagos infectados produzirem TGF- $\beta$  e IL-10, que são citocinas capazes de inibir ou desativar as funções microbicidas desses fagócitos (Olivier et al., 2005). Portanto, a consequência da supressão dos diversos



mecanismos microbicidas dos macrófagos pelas leishmânias é a proliferação abundante do parasito nessas células.

Modelos murinos têm demonstrado que a capacidade de controlar a multiplicação parasitária está relacionada com a subpopulação linfocitária ativada durante a infecção. Camundongos resistentes à *L. (L.) major* (C57BL/6, C3H e CBA) desenvolvem lesões cutâneas localizadas, que cicatrizam devido a ativação de linfócitos T CD4+ auxiliares tipo 1 (Ta1), que produzem altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Essas citocinas estimulam os macrófagos infectados a expressarem sintase do óxido nítrico (iNOS), uma enzima que cataboliza a L-arginina para gerar óxido nítrico (NO), um metabólito tóxico para as amastigotas intracelulares (Stebut, 2007; Sharma & Singh, 2009).

Diferentemente, camundongos suscetíveis à *L. (L.) major* (BALB/c), desenvolvem-se lesões graves, com disseminação parasitária para as vísceras, devido a ativação de linfócitos T CD4+ auxiliares tipo 2 (Ta2), que produzem IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$ . Essas citocinas estimulam a multiplicação parasitária, pois suprimem o desenvolvimento da resposta Ta1, inibem a função macrofágica (Reis et al., 2006; Roberts, 2006; Stebut, 2007; Sharma & Singh, 2009) e induzem os macrófagos infectados a expressarem arginase, uma enzima que cataboliza a L-arginina para gerar poliaminas, que servem como fonte de nutrientes para os parasitos (Wanasen & Soong, 2008).

Nos seres humanos com leishmaniose tegumentar, embora ainda controverso em relação às várias espécies de leishmânia, para algumas espécies a evolução da infecção parece estar relacionada com o grau de expansão dos linfócitos Ta1 e Ta2 (Reis et al., 2006; Sharma & Singh, 2009). Na leishmaniose cutânea localizada (LCL), determinada pela *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major*, que tende à cura espontânea e apresenta boa resposta ao tratamento, há um predomínio da resposta Ta1 com produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  (Reis et al., 2006; Sharma & Singh, 2009, Carvalho et al., 2012). Diferentemente, em pacientes com a forma cutânea difusa (LD), que pode ser causada pela *L. (L.) amazonensis*, *L.(L.) mexicana* e *L. (L.) aethiopica* (Barral, 2009), observa-se uma resposta Ta2 acentuada com produção de IL-4 e baixa produção de IFN- $\gamma$  e de IL-2 (Reis et al., 2006; Sharma & Singh, 2009, Carvalho et al., 2012), altos níveis de IL-10 e baixa expressão de iNOS nas lesões (Barral, 2009, Carvalho et al., 2012). Já na leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), há intensa resposta Ta1, com altos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , o que acarreta grave destruição tecidual

(Bacellar et al., 2002). Essa resposta é fracamente regulada pela IL-10 e o TGF- $\beta$ , que são citocinas supressoras das funções dos linfócitos e dos macrófagos, fazendo com que uma resposta Ta1, considerada protetora contra as leishmânias, seja patogênica (Bacellar et al., 2002). Ao contrário dos indivíduos que desenvolvem as formas clínicas LCL e LCM, aqueles com infecção subclínica por *L. (V.) braziliensis*, detectada por meio do teste de Montenegro, produzem baixa quantidade de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , são capazes de matar as leishmânias e não desenvolvem doença (Follador et al., 2002).

Diferentemente, na leishmaniose visceral não parece ocorrer polarização da resposta T auxiliar, já que os indivíduos portadores de leishmaniose visceral ativa produzem altos níveis de citocinas tanto Ta1 quanto Ta2 (Goto & Prianti, 2009; Kumar & Nylén, 2012). Entretanto, esses indivíduos apresentam deficiência da imunidade celular, demonstrada pela não responsividade ao teste de Montenegro (Sharma & Singh, 2009; Nylén & Akkufo, 2009) e ainda apresentam baixa resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico e reduzida produção de IFN- $\gamma$  e de IL-12 após estimulação com antígenos de *Leishmania*, sendo que esses parâmetros são restaurados quando a cura é alcançada (Sharma & Singh, 2009; Goto & Prianti, 2009; Kumar & Nylén, 2012). Foi sugerido que a IL-10 colabora para a baixa resposta proliferativa apresentada pelos portadores de leishmaniose visceral, já que o tratamento das células mononucleares do sangue periférico desses indivíduos com anticorpo anti-IL-10 restaurou a capacidade proliferativa de suas células (Sharma & Singh, 2009). Além disso, como foi demonstrado que *L. (L.) chagasi* converte TGF- $\beta$  latente para sua forma ativa (Grantt et al., 2003), foi sugerido que a sobrevivência dos parasitos nos indivíduos com leishmaniose visceral também possa ser favorecida por essa citocina, que é uma potente inibidora das funções microbidas dos macrófagos.

### **1.3. O papel da sinalização mediada pelo NF- $\kappa$ B na infecção pela leishmânias**

Nas células do sistema imunitário, o NF- $\kappa$ B regula positivamente uma ampla variedade de genes envolvidos na resposta antimicrobiana. Essa proteína é um fator de transcrição que é composto por duas subunidades relacionadas oriundas de uma família conhecida como ativadores transcricionais da família Rel (McKay & Cidlowski, 1999). Nos mamíferos foram identificados cinco membros da família Rel que são conhecidos como p65, RelB, c-Rel, p50 e p52, que formam homo ou heterodímeros entre si para originar distintos fatores de transcrição com especificidades por diferentes sequências

do DNA (Ghosn et al., 2008). Na forma inativa, o NF- $\kappa$ B encontra-se sequestrado no citoplasma devido a sua ligação ao inibidor kapa B (I $\kappa$ B) (Ghosn et al., 2008). Quando estímulos extracelulares, tais como TNF- $\alpha$ , proteínas virais, LPS ou um estressor oxidativo ativam a via do NF- $\kappa$ B, o I $\kappa$ B é removido por meio da degradação pelo proteassoma (McKay & Cidlowski, 1999). Isso permite a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo das células para estimular a transcrição de genes que medeiam a resposta antimicrobiana, incluindo citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , moléculas de adesão, proteínas de fase aguda, moléculas anti-apoptóticas e imunorreceptores (McKay & Cidlowski, 1999). O NF- $\kappa$ B também pode funcionar como um regulador negativo da inflamação, pois Calegari-Silva et al. (2009) observaram que a ativação do complexo p50/p50 pela infecção de células RAW 264.7 com *L. (L.) amazonensis* levou a uma diminuição da expressão da sintase do óxido nítrico (iNOS) pelos macrófagos. Além disso, Martucci et al. (2007) também verificaram que a subunidade RelB é necessária para a redução da produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e NO pelos macrófagos e IL-2 e IFN- $\gamma$  por esplenócitos de camundongos C57BL/6 após tratamento com morfina.

Como a via do NF- $\kappa$ B participa da ativação de moléculas com ação microbicida para as leishmânias, esses parasitos desenvolveram a capacidade de modular a via do NF- $\kappa$ B para sobreviver dentro dos macrófagos. Ghosn et al. (2002) observaram que a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. (L.) donovani* inibiu a translocação de p65 do citoplasma para o núcleo dos macrófagos, o que levou a uma diminuição da produção de óxido nítrico e sobrevivência aumentada dos parasitos. Além disso, Calegari-Silva et al. (2009) também verificaram que a infecção de células RAW 264.7 tratadas com LPS com *L. (L.) amazonensis* ocasionou um aumento da ativação do homodímero p50/p50 que levou a uma diminuição da expressão da sintase do óxido nítrico (iNOS), a enzima responsável pela geração do óxido nítrico, que destrói as amastigotas intracelulares (Stebut, 2007; Sharma & Singh, 2009). Além disso, Guizani-Tabbane et al. (2004) demonstraram que a infecção de monócitos humanos com *L. (L.) donovani* acarretou uma inibição da translocação do citoplasma para o núcleo do complexo NF- $\kappa$ B p65/p50 e estimulou a translocação do citoplasma para o núcleo do complexo NF- $\kappa$ B p50/c-Rel, que determinou um aumento da produção de IL-10, que é uma citocina que suprime a produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  pelos macrófagos (Kane & Mosser, 2001) e estimula o desenvolvimento dos linfócitos Ta2 (Liu et al.,

1998), que inibem produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados, favorecendo assim a sobrevivência dos parasitos (Wanassen & Soong, 2008).

#### **1.4. O papel da sinalização mediada pelo PPAR- $\gamma$ na infecção pela leishmânias**

Outra via de sinalização intracelular que regula as funções das células do sistema imunitário é a do PPAR- $\gamma$ , que é um fator de transcrição ativado por ligantes, tais como os ácidos graxos, eicosanóides e drogas anti-diabéticas conhecidas como glitazonas (Delerive et al., 2001). Seu papel é antagônico ao do NF- $\kappa$ B, inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , além da sintase do óxido nítrico, metaloprotease-9 e receptores de limpeza tipo A pelas células do sistema monocítico/macrofágico (Delerive et al., 2001). Além disso, a ativação da via do PPAR- $\gamma$  também estimula a geração de macrófagos alternativamente ativados, que produzem citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10 e o TGF- $\beta$ , que inibem a resposta Ta1 (Bouhleb et al., 2007).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a ativação da via do PPAR- $\gamma$  aumenta a capacidade das leishmânias sobreviverem dentro dos macrófagos. Pinheiro (2007) verificou que o número de parasitos nos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, infectados pela *L. (L.) major*, tratados com o agonista do PPAR- $\gamma$  ciglitazona, foi maior do que nos macrófagos tratados com o antagonista do PPAR- $\gamma$  GW 9662. Isso foi devido a uma produção aumentada das moléculas anti-inflamatórias TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub> pelos macrófagos tratados com ciglitazona e das moléculas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e óxido nítrico pelos macrófagos tratados com GW9662. Gallardo-Soler et al. (2008) também observaram que o tratamento de macrófagos derivados de medula óssea com os agonistas do PPAR- $\gamma$  GW7845 and GW0742 acarretou um aumento do crescimento intracelular de *L.(L.) major* devido ao aumento da ativação de arginase I induzido pelos agonistas do PPAR- $\gamma$ . Além disso, Adapala & Chan (2008) verificaram que camundongos BALB/c e C3H/He infectados por *L. (L.) donovani* tratados com curcumina, apresentaram um aumento na expressão do RNA<sub>m</sub> do PPAR- $\gamma$  no fígado e no baço, que favoreceu um aumento da carga parasitária nesses órgãos em virtude de uma diminuição na expressão do RNA<sub>m</sub> das moléculas pró-inflamatórias INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e iNOS e uma elevação na expressão do RNA<sub>m</sub> da molécula anti-inflamatória IL-10.

### **1.5. Os corpúsculos lipídicos na leishmaniose**

Os corpúsculos lipídicos são pequenas vesículas citoplasmáticas, constituídas por um cerne de lipídios neutros envolvidos por uma monocamada de fosfolipídeos, que servem como locais para a síntese de prostaglandinas e leucotrienos (Melo et al., 2011). Essas moléculas influenciam de maneira antagônica a resposta dos macrófagos contra as leishmânias. Lonardoní et al. (1994) verificaram que as prostaglandinas favoreceram a sobrevivência das leishmânias, pois observaram que o tratamento com indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas, reduziu o índice de infecção dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) amazonensis*. Já, Serezani et al. (2006) demonstraram que o tratamento com leucotrieno B4 de macrófagos peritoneais oriundos de camundongos BALB/c reduziu o índice de infecção por *L. (L.) amazonensis*, que foi devido ao aumento da expressão da sintase do óxido nítrico (iNOS) e da produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Diferentes estímulos promovem o acúmulo dos corpúsculos lipídicos nos fagócitos, entretanto nos macrófagos pode ser disparada por ácidos graxos insaturados, PAF, MCP-1, LPS, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* e vírus Dengue (Melo et al., 2011). Recentemente, foi observado que houve acúmulo de corpúsculos lipídicos em células dendríticas provenientes de camundongos C57BL/6 que foram infectadas *in vitro* por *L. (L.) amazonensis* (Lecoeur et al., 2013), entretanto, ainda não se sabe se a infecção pelas leishmânias é capaz de estimular o acúmulo dessas vesículas nos macrófagos.

### **1.6. A coinfeção pelo VIH e *Leishmania***

As leishmânias são consideradas microrganismos oportunistas para os indivíduos que estão imunossuprimidos, entre os quais encontram-se os infectados pelo VIH. Vários casos de coinfeção entre o VIH e a *Leishmania* ocorreram na Europa, sendo que a maior parte foi registrada na Espanha, Portugal, França e Itália, países em que há uma ampla sobreposição geográfica entre as áreas de infecção pelo VIH e de transmissão da *Leishmania* (Desjeux et al., 2003). Nestes países foi estimado que 1,5 a 9% dos indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) desenvolverão leishmaniose visceral, como resultado de uma nova infecção ou de reativação de uma infecção latente (Cruz et al., 2006). Já no continente americano, a maioria dos casos ocorreu no Brasil (Rabello et al., 2003), um país que registrou 544.846 casos de SIDA até junho de 2009 (Rezende et al., 2010). Na África e na Ásia, o número de casos de

coinfecção entre o VIH e a *Leishmania* vem aumentando devido à migração populacional, guerras, pobreza, fome e resistência aos antimoniais (Paredes et al., 2003; Alvar et al., 2008). Entretanto, é possível que o real impacto da coinfecção entre o VIH e a *Leishmania* seja subestimado devido a problemas relacionados ao sistema de vigilância e de notificação dos casos.

Embora a gravidade de várias doenças infecciosas seja agravada pela coinfecção com o VIH, os indivíduos VIH positivos infectados pelas leishmânias geralmente apresentam os sinais clássicos de leishmaniose observados nos indivíduos imunocompetentes (Paredes et al., 2003; Cruz et al., 2006; Alvar et al., 2008). Na Europa, 94% dos indivíduos coinfectados apresentam a forma visceral e apenas 4% apresentam a forma cutânea (Alvar et al., 2008). Na África e na Índia, grande parte dos indivíduos coinfectados apresenta a forma visceral, mas faltam dados exatos para estas regiões (Alvar et al., 2008). Já no Brasil, 43%, 37% e 20% dos coinfectados apresentam, respectivamente, as formas mucocutânea, visceral e cutânea (Alvar et al., 2008). Entretanto, a deficiência imunológica determinada pelo VIH pode promover a disseminação parasitária para qualquer órgão, fazendo com que os coinfectados possam apresentar sinais clínicos bastante variados e de difícil diferenciação em relação a outras patologias (Rosenthal et al., 2000; Cruz et al., 2006; Alvar et al., 2008).

Além disso, tem sido observado que esses indivíduos apresentam uma resposta menos eficiente ao tratamento anti-*Leishmania* do que os indivíduos imunocompetentes (Alvar et al., 2008). Foi observado que somente 60% dos VIH positivos que desenvolveram leishmaniose visceral apresentaram resposta clínica ou parasitológica ao tratamento com anfotericina B ou com antimoniais (Paredes et al., 2003). A recorrência é um problema frequente (Alvar et al., 2008), ocorrendo em 27% dos indivíduos após os 6 primeiros meses e em 60% dos indivíduos após 12 meses do término do tratamento anti-*Leishmania* (Cruz et al., 2006). A taxa de mortalidade por leishmaniose também é mais elevada nos coinfectados pelo VIH e *Leishmania* do que nos indivíduos imunocompetentes (Paredes et al., 2003; Cruz et al., 2006). Em um estudo conduzido com portadores de leishmaniose visceral, infectados ou não pelo VIH, foi demonstrado que após um ano do término do tratamento anti-*Leishmania*, 53,7% dos indivíduos haviam morrido no grupo VIH positivo, enquanto que apenas 7,5%, no grupo VIH negativo (Alvar et al., 2008).

### **1.7. Aspectos imunológicos da coinfeção pelo VIH e *Leishmania***

Tanto as leishmânias quanto o VIH infectam os macrófagos e a presença simultânea desses microrganismos na mesma célula hospedeira exerce efeitos sinérgicos que favorecem a multiplicação tanto das leishmânias quanto do VIH. A infecção dos macrófagos pelo VIH leva a um aumento da interiorização das leishmânias por essas células. Wolday et al. (1998) observaram que o percentual de macrófagos parasitados por *L. (L.) donovani* foi maior (34,5%) quando as células foram infectadas pelo VIH-1 do que nas culturas que não haviam sido expostas ao vírus (5,5%). Similarmente, Zhao et al. (2006) verificaram que o percentual de células infectadas por *L. (L.) infantum* foi maior (10-20%) quando macrófagos derivados de monócitos humanos foram infectados pelo VIH-1 do que nas células que não haviam sido expostas ao vírus (5%). Recentemente, Lodge et al. (2012) demonstraram que essa elevada capacidade dos macrófagos infectados pelo VIH para interiorizarem as leishmânias deveu-se ao fato do VIH aumentar a expressão dos receptores de limpeza CD91/LRP-1 na superfície dos macrófagos, que reconhecem as moléculas fosfatidilserina expressas na superfície dos parasitos.

Por outro lado, a infecção pelas leishmânias estimula a replicação do VIH nos macrófagos. Zhao et al. (2004) observaram que macrófagos derivados de monócitos humanos infectados com *L. (L.) infantum* aumentaram a expressão gênica do VIH-1. Esse aumento foi ocasionado pela produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , pois a incubação dos macrófagos infectados com anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\alpha$  ocasionou uma redução na expressão de p24 para valores que foram comparáveis aos das células infectadas pelo vírus isoladamente. Similarmente, Bernier et al. (1995) verificaram que linhagens de células monocitóides latentemente infectadas pelo VIH-1 apresentaram um aumento da expressão gênica do VIH-1 quando foram incubadas com *L. (L.) donovani*, assim como com seu componente de membrana lipofosfoglicano. Essa elevação também deveu-se a produção do TNF- $\alpha$ , pois a incubação das células com lipofosfoglicano mais anticorpos anti-TNF- $\alpha$  diminuiu a atividade da transcriptase reversa para valores inferiores aos das células que haviam sido incubadas apenas com lipofosfoglicano.

Além de estimular a replicação viral nos macrófagos, as leishmânias também são capazes de estimular a replicação do VIH nos linfócitos T CD4+ auxiliares, que são as principais células alvo do vírus. Bernier et al. (1998) demonstraram que houve um aumento da expressão gênica do VIH-1 quando linhagens de linfócitos T CD4+

humanos foram estimuladas com lipofosfoglicano de *L. (L.) donovani*. Esse aumento foi devido a ativação de proteínas cinases e calmodulina dependente de  $Ca^{2+}$ , pois a incubação das células estimuladas com LPG com o inibidor de proteína cinase HA10004 e com o inibidor de calmodulina W7 reduziu a expressão do VIH-1 para níveis comparáveis aos das células que não haviam sido estimuladas com LPG. Além disso, também envolveu a participação do NF- $\kappa$ B, pois quando as células estimuladas com LPG foram transfectadas com um gene reporter LTR-VIH1/luciferase que possuía um sítio para ligação do NF- $\kappa$ B mutado, a atividade da luciferase foi comparável a das células que não haviam sido expostas ao LPG.

Por sua vez, a replicação do VIH nos linfócitos T CD4+ auxiliares acarreta uma progressiva depleção daquelas células que são capazes de reconhecer os antígenos de *Leishmania* (Alvar et al., 2008). Isso faz com que os pacientes coinfectados não possam gerar e/ou manter uma resposta imunitária adequada contra os parasitos, pois o controle da infecção pelas leishmânias depende dos linfócitos T CD4+ auxiliares tipo 1, que estimulam os mecanismos leishmanicidas dos macrófagos (Reis et al., 2006; Roberts, 2006; Stebut, 2007; Sharma & Singh, 2009). Foi estimado que 62 a 90% dos indivíduos VIH positivos que desenvolvem leishmaniose visceral apresentam número de linfócitos T CD4+  $\leq$  a 200 células/ $\mu$ L e 42% deles apresentam número  $\leq$  50 células/ $\mu$ L (Cruz et al., 2006). Entretanto, pacientes infectados pelo VIH podem desenvolver manifestações clínicas de leishmaniose visceral ou tegumentar com qualquer número de linfócitos T CD4+ (Borges et al., 1999; Da-Cruz et al., 1999; Horst et al., 2008; Alexandrino-de-Oliveira et al., 2010; Castellano et al., 2011; Rodrigues et al., 2011).

A diminuição dos linfócitos T CD4+ observado na infecção pelo VIH não resulta apenas da replicação viral nos linfócitos, mas também é ocasionada pela apoptose dessas células decorrente da intensa ativação do sistema imunitário que é estimulada pelo VIH (Lawn et al., 2001). Alguns parâmetros têm sido utilizados para investigar o grau de ativação do sistema imunitário nos pacientes VIH positivos, dentre eles o número de linfócitos T CD8+ expressando CD38, que tem demonstrado uma forte correlação negativa com o número de linfócitos T CD4+ (Lawn et al., 2001). A análise desse parâmetro em indivíduos infectados pelo VIH com leishmaniose visceral em remissão revelou que esses indivíduos apresentavam uma maior ativação do sistema imunitário do que os infectados pelo VIH não co-infectados, pois a proporção de linfócitos T CD8+ expressando CD38 foi maior nos coinfectados do que nos infectados



apenas pelo VIH. Além da hiperativação do sistema imunitário, esses pacientes também apresentaram um menor número de linfócitos T CD4+ do que os infectados pelo VIH sem co-infecção (Santos-Oliveira et al., 2010). Esses dados sugerem que a infecção pelas leishmânias aumentou a ativação do sistema imunitário induzida pelos antígenos do VIH e acarretou uma destruição mais acentuada dos linfócitos T CD4+. Tem sido sugerido que as alterações que foram encontradas nesses pacientes podem ajudar a explicar as frequentes recorrências de leishmaniose visceral que podem ser apresentadas pelos pacientes infectados com o VIH.

Além do reduzido número de linfócitos T CD4+, os indivíduos coinfectedos podem produzir citocinas que favorecem a sobrevivência e multiplicação tanto das leishmânias quanto do VIH. Preiser et al. (1996) observaram que indivíduos VIH positivos com leishmaniose visceral apresentaram concentrações séricas de IL-4 e IL-10 mais elevadas do que pacientes infectados apenas pelo VIH. Experimentos *in vitro* também verificaram que, quando estimuladas pela fitohemaglutinina, células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos coinfectedos pelo VIH e *Leishmania* produziram maior quantidade de IL-4 e IL-10 do que a dos infectados apenas pelo VIH (Nigro et al., 1999). Como a IL-4 e a IL-10 suprimem o desenvolvimento dos linfócitos T CD4+ auxiliares tipo 1, inibem a função macrófagica (Stebut, 2007; Sharma & Singh, 2009) e induzem os macrófagos infectados a expressarem a enzima arginase que gera nutrientes para os parasitos (Wanasen & Soong, 2008), é possível que a produção exacerbada dessas citocinas possa dificultar o controle da leishmânia nos indivíduos coinfectedos.

Foi verificado que indivíduos VIH positivos que desenvolveram leishmaniose visceral apresentaram redução dos níveis plasmáticos da IL-12 (Olivier et al., 2003). Wolday et al. (2000) também verificaram que a produção de IL-12 pelas células mononucleares do sangue periférico de indivíduos coinfectedos pelo VIH e *Leishmania* foi menor do que a de indivíduos saudáveis, quando estimuladas *in vitro* com antígenos de *L. (L.) donovani*. Esse dado sugeriu que uma incapacidade dos indivíduos coinfectedos para produzir IL-12 poderia estar colaborando para que esses indivíduos não fossem capazes de controlar a infecção pelas leishmânias, já que é a IL-12 liberada pelas células dendríticas que estimula a diferenciação de linfócitos T CD4+ auxiliares virgens em linfócitos T CD4+ auxiliares tipo 1, que são os responsáveis pelo controle da infecção pelas leishmânias (Stebut, 2007; Sharma & Singh, 2009).

Da-Cruz et al. (1999) também mostraram uma menor produção do IFN- $\gamma$  pelas células mononucleares do sangue periférico de um indivíduo VIH positivo com

leishmaniose mucocutânea quando estimuladas *in vitro* com antígenos de *L. (V.) braziliensis*. Foi sugerido que a baixa capacidade para produzir IFN- $\gamma$  estava colaborando para que esse indivíduo não conseguisse controlar a infecção parasitária, já que essa citocina estimula os macrófagos infectados a expressarem a enzima sintase do óxido nítrico, que cataboliza a L-arginina para gerar óxido nítrico, um metabólito tóxico para as amastigotas intracelulares (Stebut, 2007; Sharma & Singh, 2009). E de fato, foi observado neste indivíduo que após imunoterapia com promastigotas mortas (Leishvacin®) aplicadas a cada dez dias, num total de três doses, as células mononucleares do sangue periférico do indivíduo coinfestado recuperaram a capacidade para produzir IFN- $\gamma$  e houve proliferação de linfócitos T CD8+, que foi acompanhada pela cicatrização das lesões mucocutâneas (Da-Cruz et al., 1999).

Os indivíduos coinfestados também podem produzir grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias. Santos-Oliveira et al. (2013) observaram que indivíduos VIH positivos com leishmaniose visceral apresentaram níveis séricos mais elevados de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  do que indivíduos infectados apenas pelo VIH ou pelas leishmânias. Já foi demonstrado que durante a infecção pelo VIH, o TNF- $\alpha$  estimula a replicação viral, induz a apoptose dos linfócitos T CD4+ auxiliares e causa supressão da hematopoiese, dificultando a regeneração dos linfócitos que foram destruídos pela infecção viral (Lawn et al., 2001). Infere-se que a maior produção do TNF- $\alpha$  pelos macrófagos dos indivíduos coinfestados pelo VIH e *Leishmania* possa colaborar para acelerar a destruição dos linfócitos T CD4+ desses indivíduos, comprometendo ainda mais sua capacidade para manter uma resposta antiparasitária apropriada. De fato, Medrano et al. (1998) verificaram que indivíduos VIH positivos com leishmaniose visceral ativa apresentaram níveis séricos de TNF- $\alpha$  mais elevados do que os infectados somente pelo VIH ou pela *Leishmania*, e os valores permaneceram elevados mesmo após a recuperação clínica da infecção pela *Leishmania* e houve manutenção de números baixos de linfócitos T CD4+, carga viral elevada e soroconversão para o antígeno p24 do VIH-1 mesmo após cinco meses do término do tratamento para a leishmaniose.

Como muitos linfócitos T que são destruídos pelo VIH são células de memória (Lawn et al., 2001), os indivíduos coinfestados podem apresentar a resposta de memória contra as leishmânias alterada. Foi observado que vários indivíduos VIH positivos com leishmaniose mucocutânea associada tiveram resultados negativos quando testados com

o antígeno leishmanina (Olivier et al., 2003). Além disso, quando foi avaliada a resposta linfoproliferativa estimulada com o antígeno solúvel de *Leishmania* em 17 indivíduos coinfectados pelo VIH e *L. (L.) infantum*, a resposta foi positiva em apenas 4 indivíduos, sendo que em dois indivíduos houve proliferação de linfócitos TCD4+ e nos outros dois houve proliferação de linfócitos TCD8+ (Moreno et al., 2000). Entretanto, a maior capacidade dos linfócitos desses indivíduos para proliferarem não conferiu proteção contra os parasitos, pois todos os indivíduos apresentaram recorrência da infecção pela *L. (L.) infantum* (Moreno et al., 2000). Similarmente, indivíduos VIH positivos com leishmaniose tegumentar também apresentaram uma redução da capacidade proliferativa dos linfócitos T CD4+ e TCD8+ quando as células foram estimuladas *in vitro* com o antígeno solúvel de *Leishmania*. Além disso, esses indivíduos apresentaram um menor número de linfócitos T CD4+ de memória central e efetora do que os infectados somente pelas leishmânias. E, após estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania*, o número de linfócitos T CD4+ de memória efetora nos indivíduos coinfectados permaneceu 10 células/mm<sup>3</sup>, enquanto que este número aumentou três vezes nos indivíduos infectados somente pelas leishmânias (Gois et al., 2013). Estes dados sugerem que essa deficiência na resposta celular para os antígenos de *Leishmania* contribuiria para a deficiência da resposta ao tratamento anti-*Leishmania* e pela grande frequência de recorrência das leishmanioses nos indivíduos VIH positivos.

Nos indivíduos imunocompetentes, a leishmaniose visceral é caracterizada por uma forte resposta humoral, com ativação policlonal dos linfócitos B, e uma supressão da resposta celular contra os parasitos, que é restaurada após a terapia anti-*Leishmania* (Olivier et al., 2003). Entretanto, nos indivíduos VIH positivos com leishmaniose visceral são observados baixos títulos de anticorpos contra as leishmânias. Foi observado que apenas 40 a 50% dos indivíduos coinfectados apresentaram sorologia positiva contra as leishmânias (Cruz et al., 2006). Tem sido sugerido que a baixa produção de anticorpos apresentada pelos indivíduos coinfectados seja decorrente de uma resposta oligoclonal dos linfócitos B devido a falta de linfócitos T que reconheçam os antígenos de *Leishmania* apresentados pelos linfócitos B (Alvar et al., 2008).

### **1.8. A terapia antiretroviral de alta eficácia (HAART) e a coinfeção pelo VIH e *Leishmania***

Com a disponibilização da terapia antiretroviral de alta eficácia (HAART) em 1996, a incidência de infecções oportunistas em indivíduos infectados pelo VIH diminuiu

significativamente. Nos Estados Unidos foi observado um decréscimo dos casos de doença oportunista causada por *Pneumocystis carinii*, por micobactérias do complexo avium e por *Candida sp* (Kaplan *et al.*, 2000). Na Europa, o uso da HAART também determinou um decréscimo da infecção oportunista por micobactérias do complexo avium e de retinite por citomegalovírus (Mocroft *et al.*, 2000). Foi demonstrado ainda em uma coorte multinacional envolvendo a Austrália e dez países da Europa, quando comparando os períodos entre 1994-1996 e 1997-2001, que houve um significativo decréscimo induzido pela HAART nas doenças definidoras de SIDA (candidíase de 17,0% para 5,7%; criptosporidiose de 3,1% para 0,2%; citomegalovírus de 3,1% para 0,2%, *Pneumocystis carini* de 17,0% para 4,4%, toxoplasmose de 3,4% para 1,4% e tuberculose de 6,4% para 2,6%) (Pozio *et al.*, 2005). No Brasil, um país onde é garantido o acesso universal aos antiretrovirais (Fagundes *et al.*, 2010), também foi observada uma queda significativa na taxa de mortalidade específica por SIDA na última década, com uma redução anual de 1,3% (SVS/MS, 2012).

Com relação as leishmanioses, um estudo na França estimou que a incidência de leishmaniose visceral caiu de  $11,6 \pm 1,2$  para cada 10.000 pessoas/ano antes de 1996 para  $6,3 \pm 0,7$  para cada 10.000 pessoas/ano após 1996, o ano em que a HAART foi iniciada (del Giudice *et al.*, 2002). Similarmente, outra pesquisa na Espanha demonstrou que houve uma redução na incidência de leishmaniose visceral entre os casos regionais de SIDA de 4,81/100 para 0,8/100, com o primeiro episódio de leishmaniose visceral aparecendo apenas quando houve uma óbvia falha do tratamento antiretroviral (López-Vélez, 2003). Entretanto, verificou-se que a HAART não previniu a recorrência de leishmaniose visceral, pois 24 meses após a terapia anti-*Leishmania*, 70% dos indivíduos VIH positivos que estavam recebendo os antiretrovirais apresentaram um novo episódio de leishmaniose visceral. Contudo, o tempo médio para a recorrência da doença foi maior quando a HAART foi utilizada (20 *versus* 13 meses) do que quando as drogas não foram empregadas (López-Vélez, 2003). Também foi verificado que a terapia antiretroviral não impede a recorrência de leishmaniose tegumentar, pois em um estudo conduzido no Brasil verificou-se que de dezesseis indivíduos que receberam HAART, 53% apresentaram novos episódios da doença, que levou a morte de 40% dos indivíduos que estavam envolvidos no estudo (Lindoso *et al.*, 2009).

Em alguns indivíduos, a causa das frequentes recorrências das leishmanioses tem sido atribuída a ineficácia do tratamento com os antiretrovirais para aumentar o número dos linfócitos T CD4+ e/ou para suprimir a replicação viral (Mira *et al.*, 2004; Lindoso

et al., 2009). Entretanto, em um estudo na Etiópia, foi observado que o primeiro episódio de leishmaniose visceral apresentado por treze pacientes VIH+ foi devido a recuperação imunológica estimulada pela HAART (Horst et al., 2008). Além disso, observou-se que a recuperação imunológica estimulada pelos antiretrovirais também foi relacionada com uma exacerbação e disseminação de lesões cutâneas em indivíduos infectados pelo VIH com leishmaniose tegumentar (Posada-Vergara et al., 2005; Chrusciak-Talhari et al., 2009).

A HAART é composta por múltiplos medicamentos que formam distintos esquemas de tratamento que têm a finalidade de bloquear a multiplicação viral e impedir a queda progressiva do número de linfócitos TCD4+ (MS, 2008). Para alguns indivíduos são indicados protocolos terapêuticos que, além de outros medicamentos, contêm inibidores da protease do VIH, que atuam bloqueando a enzima protease, que processa o polipeptídeo gag-pol e propicia a maturação viral (Richman, 2001). Além dos efeitos inibitórios sobre a replicação viral, foi demonstrado que alguns inibidores da protease do VIH podem influenciar vários aspectos da fisiologia dos seres humanos, induzindo diversas alterações, tais como hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, resistência insulínica, lipodistrofia e hepatotoxicidade (MS, 2008).

O fato desses medicamentos alterarem aspectos importantes para a manutenção da saúde dos seres humanos sugere que estas drogas possam também interferir nas funções das células do sistema imunitário, que são os alvos desses medicamentos, por serem os sítios da replicação do VIH. Poucos trabalhos, no entanto, têm buscado verificar se estas influências existem e quais seriam elas, bem como quais impactos teriam sobre o estado imunológico dos indivíduos que os utilizam. Foi observado que o tratamento com a associação lopinavir/ritonavir (LPV/RTV) diminuiu a fagocitose de *S. cerevisiae* pelos neutrófilos e monócitos de indivíduos saudáveis (Alves, 2008). Além disso, esses medicamentos também ocasionaram uma redução da produção de ânions superóxido pelos neutrófilos e monócitos (Hadad et al., 2007; Alves, 2008) e ainda o decréscimo da quimiotaxia dos neutrófilos (Hadad et al., 2007) de indivíduos saudáveis. O saquinavir (SQV), outro inibidor da protease do VIH, diminuiu a expressão de CD80 e CD86 em células dendríticas (Gruber et al., 2001), que são moléculas coestimulatórias expressas por células apresentadoras de antígenos, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, que são importantes para uma adequada ativação dos linfócitos T (Van Gool, 1996). Outro aspecto também já demonstrado foi a interferência desses medicamentos sobre os mecanismos de defesa antivirais, pois o ritonavir (RTV) inibiu a

apresentação de antígenos pelo complexo principal de histocompatibilidade tipo I e a resposta linfoproliferativa de linfócitos T CD8<sup>+</sup> contra o vírus da coriomeningite linfocitária por meio da inibição do proteossoma 20S (André et al., 1998).

Além da capacidade para modular várias funções celulares, foi observado que os inibidores da protease do VIH são tóxicos para as leishmânias. Foi demonstrado que os inibidores da protease do VIH, indinavir e saquinavir, promoveram uma redução da viabilidade e do crescimento de promastigotas de *L. (L.) major* e tal efeito supressor não foi revertido pela substituição do meio contendo antiretrovirais por meio fresco (Savoia et al., 2005). Já o lopinavir e o nelfinavir foram capazes de reduzir a viabilidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por induzirem a apoptose dos parasitos (Santos et al., 2009). Esses fármacos também mostraram ação sobre amastigotas axênicas de *L. (L.) infantum*, pois quando esses parasitos foram co-cultivados com nelfinavir ou ritonavir houve diminuição da taxa de proliferação das leishmânias (Trudel et al., 2008). Também foram capazes de agir sobre amastigotas localizadas intracelularmente, pois houve diminuição da taxa de infecção de macrófagos de camundongos BALB/c infectados *in vitro* por *L. (L.) amazonensis* quando incubados com lopinavir, amprenavir e nelfinavir (Santos et al., 2009). Redução semelhante após incubação com ritonavir e nelfinavir foi observada em macrófagos infectados *in vitro* por amastigotas de *L. (L.) infantum*, mesmo quando coinfetados pelo vírus da imunodeficiência humana, e por *L. (L.) donovani* resistente ao estibogluconato (Trudel et al., 2008).

Entretanto, pouco se conhece sobre a influência dos inibidores da protease do VIH sobre os mecanismos de defesa contra as leishmânias. Como existem evidências de que esses medicamentos podem modular algumas funções dos fagócitos, tais como quimiotaxia, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (Hadad et al., 2008; Alves, 2008), que são importantes para a defesa do hospedeiro contra as leishmânias, é possível que possam influenciar a resposta dos macrófagos contra esses parasitos, e conseqüentemente possam colaborar para modificar o curso da coinfecção entre o VIH e a *Leishmania*.

### **1.9. Justificativa:**

Os mecanismos imunológicos desempenham um papel importante para conter a evolução da infecção pelas leishmânias, de modo que fatores intervenientes, como o uso de fármacos com propriedades imunomoduladoras, poderiam tornar os indivíduos mais resistentes ou mais suscetíveis aos parasitos. No entanto, o efeito de

medicamentos sobre os mecanismos de defesa contra as leishmânias tem sido pouco explorado, sendo esse conhecimento importante para melhor orientar o tratamento dos portadores de leishmaniose. Já foi observado que o antimoniato de meglumina (Glucantime®), medicamento de primeira linha para o tratamento das leishmanioses no Brasil, acarretou um aumento da capacidade fagocitária, do ânion superóxido, do óxido nítrico e do TNF- $\alpha$ . Tal fato sugere um possível aumento da resistência do hospedeiro contra as leishmânias pelo uso do antimonial, pois os mecanismos positivamente estimulados pelo antimoniato de meglumina estão envolvidos na defesa contra esses parasitos (Muniz-Junqueira *et al.*, 2008). Entretanto, até o momento pouco ainda foi avaliado sobre a influência dos inibidores da protease do VIH sobre a resposta do hospedeiro contra as leishmânias. Esse conhecimento poderá contribuir para uma melhor indicação terapêutica desses medicamentos para os indivíduos VIH positivos que se encontram infectados com esses parasitos.

## **OBJETIVOS**



## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1 Objetivo geral:**

Avaliar a influência do tratamento de camundongos BALB/c com os inibidores da protease do VIH lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre funções de macrófagos peritoneais envolvidas na defesa contra as leishmânias em sua interação inicial *in vitro* com a *Leishmania (L.) amazonensis*.

### **2.2 Objetivos específicos:**

a) Avaliar o número de macrófagos aderidos às lamínulas e índice de infecção dos macrófagos de camundongos BALB/c tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir, incubados ou não, *in vitro*, com *Leishmania (L.) amazonensis* em condições ótimas e subótimas.

b) Quantificar a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir, incubados ou não, *in vitro*, com *Leishmania (L.) amazonensis* em condições ótimas.

c) Mensurar a viabilidade dos parasitos recuperados dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados ou não com lopinavir/ritonavir e atazanavir, incubados *in vitro* com *Leishmania (L.) amazonensis* em condições ótimas.

d) Quantificar a produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir, e incubados ou não, *in vitro*, com *Leishmania (L.) amazonensis* em condições ótimas e subótimas.

e) Quantificar a produção de peróxido de hidrogênio no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir, e incubados ou não, *in vitro*, com *Leishmania (L.) amazonensis* em condições ótimas.

f) Avaliar a produção das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com lopinavir/ritonavir e

atazanavir, incubados ou não, *in vitro*, com *Leishmania (L.) amazonensis* em condições subótimas.

g) Avaliar a produção das citocinas IL-12p70, IL-23, TNF- $\alpha$  e IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir, incubados ou não, *in vitro*, com *Leishmania (L.) amazonensis* em condições ótimas.

h) Quantificar a expressão dos corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir, e incubados ou não, *in vitro*, com *Leishmania (L.) amazonensis* em condições ótimas.

i) Analisar a translocação do NF- $\kappa$ B p65 para os núcleos dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir, e incubados ou não, *in vitro*, com *Leishmania (L.) amazonensis* em condições subótimas.

j) Analisar a translocação e a expressão do NF- $\kappa$ B RelB e do PPAR- $\gamma$  para os núcleos dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir, e incubados ou não, *in vitro*, com *Leishmania (L.) amazonensis* em condições ótimas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Delineamento experimental:**

Este trabalho é um estudo experimental que foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular da área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Foi avaliada a influência do tratamento com os inibidores da protease do VIH lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a capacidade funcional de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c incubados ou não com leishmânias. Os animais foram tratados ou não com lopinavir/ritonavir e atazanavir e os macrófagos peritoneais foram coletados. A seguir, as células foram infectadas ou não com leishmânias para a realização de diversos ensaios imunológicos. O índice de infecção, assim como o número de macrófagos aderentes foram avaliados por microscopia ótica. O percentual de macrófagos viáveis foi analisado por microscopia de fluorescência. O número de parasitos viáveis foi quantificado por meio da contagem em câmara de Neubauer. A produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio foi determinada pelos métodos de Griess e Pick, respectivamente. Já a produção de citocinas foi analisada por ELISA. A expressão dos corpúsculos lipídicos foi investigada por microscopia ótica e confocal. A produção de citocinas foi analisada por ELISA. A influência dos medicamentos sobre as vias do NF- $\kappa$ B e PPAR- $\gamma$  foi avaliada por microscopia confocal e quantificadas utilizando o software ImageJ. O diagrama geral do estudo encontra-se descrito na Figura 1.

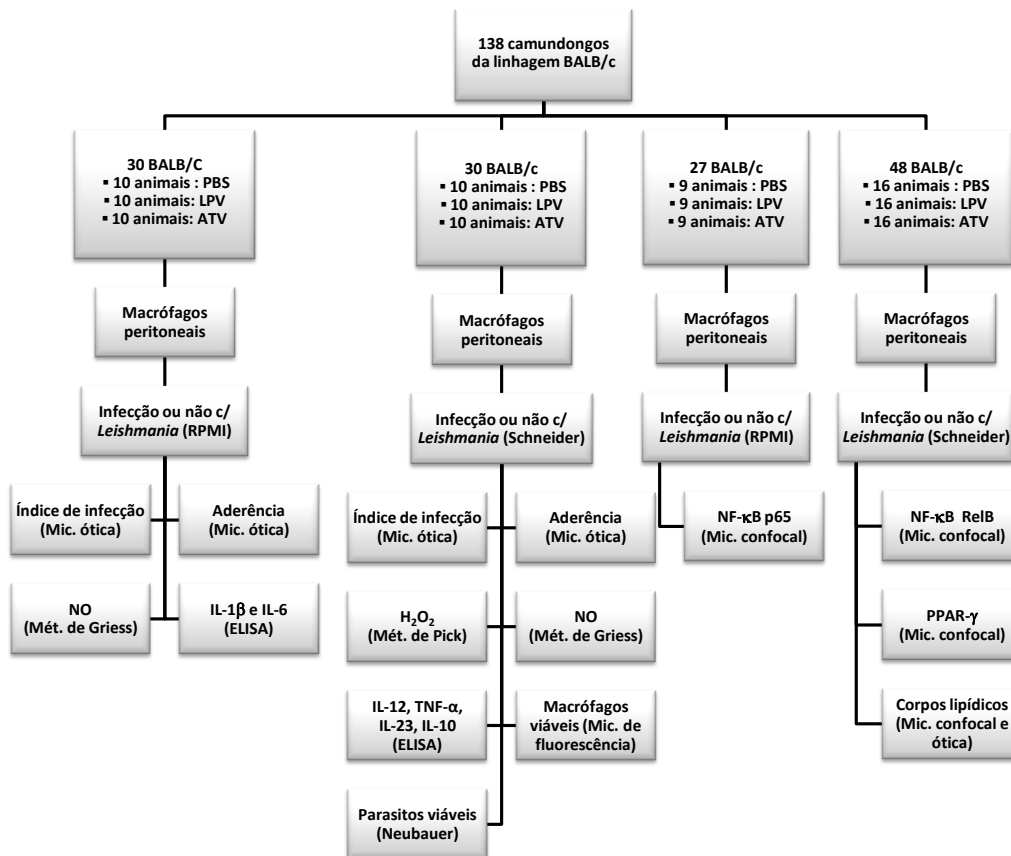


Fig. 1. Delineamento experimental

### 3.2. Grupos de estudo

Para os estudos realizados nessa pesquisa, analisamos o efeito dos medicamentos em camundongos BALB/c, porque essa linhagem é suscetível à infecção por várias espécies de *Leishmania* (Torrentera et al., 2002; Abreu-Silva et al. 2004; Amini et al., 2008; Falú et al., 2009), e assim como o ser humano, desenvolve lesões cutâneas e/ou disseminação parasitária para vários órgãos, tais como baço, fígado e linfonodos (Torrentera et al., 2002; Abreu-Silva et al., 2004; Amini et al., 2008; Falú et al., 2009), servindo, portanto, como modelo para mimetizar tanto a leishmaniose tegumentar quanto a visceral. Além disso, esses animais apresentam uma resposta imunológica que é comparável a de alguns indivíduos coinfectados pelo VIH e *Leishmania* (Preiser et al., 1996), porque quando infectados pelas leishmânias produzem níveis mais elevados de citocinas  $Ta_2$ , que dificulta o controle da multiplicação dos parasitos (Padigel et al., 2003; Rosas et al., 2005).

Foram utilizados camundongos BALB/c, machos e fêmeas, com 8 a 12 semanas de idade, divididos nos seguintes grupos: GRUPO 1: tratado com lopinavir/ritonavir com a

dose de 200mg/50mg/Kg/dia, por via oral, durante 10 dias, GRUPO 2: tratado com atazanavir com a dose de 90 mg/Kg/dia/VO durante 10 dias e GRUPO 3: tratado com salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2, durante 10 dias. O tratamento por via oral foi feito oferecendo delicadamente a droga, em 60 µL, na ponteira de uma pipeta e esperando a ingestão espontânea pelos animais. Para padronização da infecção dos macrófagos pelas leishmânias também foram utilizados camundongos BALB/c saudáveis que não receberam qualquer tipo de tratamento.

As doses dos medicamentos foram baseadas em ensaios prévios que demonstraram que camundongos C57BL/6J somente apresentavam perfis farmacocinéticos semelhantes aos dos seres humanos quando tratados com 200mg/50mg/Kg de lopinavir/ritonavir e 90mg/Kg de atazanavir por dia, que são 15 vezes maiores que as doses terapêutica utilizadas em seres humanos (Prot et al., 2006).

As doses utilizadas em cada animal foram calculadas pela média  $\pm$  DP do peso dos camundongos por grupo. A média  $\pm$  DP do peso do grupo tratado com salina foi de  $24,70 \pm 2,28$  g, para o grupo tratado com lopinavir/ritonavir foi de  $25,66 \pm 2,10$  g e para o grupo tratado com atazanavir foi de  $24,50 \pm 2,46$  g.

Os camundongos foram mantidos no Alojamento de Animais, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, em gaiolas com dois ou três animais em cada uma delas, com água e ração *ad libitum*, em condições de luz e temperatura controladas. As normas éticas para a pesquisa científica com animais de laboratório foram rigorosamente obedecidas, conforme determina a lei número 11.794, de 8 de outubro de 2008, os princípios éticos para experimentação animal, definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991) e pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO, 1978). O protocolo experimental utilizado nesse experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (Anexo 1).

Para a coleta dos macrófagos peritoneais destinados à realização dos ensaios imunológicos, os camundongos foram submetidos à eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>.

### **3.3. Parasitos**

Foram utilizadas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), gentilmente cedida pelo Laboratório de Dermatocologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília. Para manutenção da virulência, 10<sup>7</sup> promastigotas foram inoculadas em Hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*). Após 21 dias de infecção, as

lesões foram intensamente lavadas com álcool a 70% e aspiradas com seringa de 1 mL contendo 200 µL de STF, pH 7,2, gelado, estéril. O material recuperado foi incubado em meio Novy-MacNeal-Nicolle, a 26°C, por 4 dias, para a transformação das amastigotas em promastigotas. Após este período, os microrganismos foram incubados em RPMI 1640 (Sigma), pH 7,2, suplementado com 20 mM de HEPES (Sigma), 2 mM de L-glutamina, 20% de soro fetal bovino (Gibco) e 40 µg/mL de gentamicina, a 26°C, por mais 4 dias. A cultura foi então diluída em igual volume com glicerina a 18% em STF, pH 7,2. A solução resultante foi aliqüotada em tubos de criopreservação e congelada em nitrogênio líquido até sua utilização nos experimentos. Esta metodologia foi adaptada das técnicas descritas por Figueiredo et al., 1999; Urdapilleta, 2006; Silva, 2010 e Khouri et al., 2010.

#### **3.4. Obtenção dos macrófagos peritoneais**

Após a eutanásia com CO<sub>2</sub>, os camundongos foram colocados em câmara de fluxo laminar. A parede abdominal foi higienizada com álcool a 70% e foi feita uma incisão na pele para a exposição da cavidade abdominal. A seguir, com o auxílio de uma seringa, foram injetados 8 mL de salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2, gelado, na cavidade abdominal de cada animal e foi feita uma leve massagem para facilitar a obtenção dos macrófagos peritoneais. Após isto, foi feita uma pequena incisão no peritônio e, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a salina tamponada com fosfato contida na cavidade abdominal foi aspirada. Então, as soluções recuperadas foram transferidas para tubos de centrifuga, tipo Falcon, estéril e centrifugadas a 4°C, em 200 g, por 10 min. Posteriormente, foram anotados os volumes contidos em cada tubo, os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de RPMI 1640, pH 7,2, suplementado com 20 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina e com 40 µg/mL de gentamicina (RPMI incompleto). Os macrófagos peritoneais foram quantificados em câmara de Neubauer e a viabilidade foi simultaneamente avaliada com solução de nigrosina 0,05%, sendo sempre maior que 95%. Os macrófagos peritoneais recuperados foram ressuspensos em RPMI incompleto de modo que a solução final apresentasse o número de células necessário para a realização de cada experimento. O número de células peritoneais por mL de salina tamponada com fosfato foi determinado dividindo-se o número de células recuperadas pelo volume aspirado da cavidade abdominal de cada camundongo (Muniz-Junqueira et al., 1992).

### **3.5 Influência dos meios de cultura e da proporção de parasitos por macrófago sobre o índice de infecção**

Como os dados referentes às condições de cultivo das leishmânias para infecção dos macrófagos mostrou-se muito variável na literatura, realizamos alguns experimentos para verificar se as diferentes condições de cultura interferia na infectividade dos parasitos. Com o objetivo de padronização das condições de cultivo, incubamos as leishmânias na temperatura de 26°C, em meio RPMI 1640, pH 7,2, suplementado com 20 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 10% de soro fetal bovino e 40 µg/mL de gentamicina (RPMI completo) e em meio Schneider (Sigma), pH 6,7, suplementado com 40 µg/mL de gentamicina e 20% de soro fetal bovino. No 4º dia de cultivo, algumas leishmânias que estavam crescendo em RPMI pH 7,2 e Schneider pH 6,7 foram transferidas para meios semelhantes que foram acidificados com HCl 1N para que apresentassem pH igual a 5,4. No 5º dia de cultivo, período em que as culturas já se encontravam na fase estacionária, os meios contendo as leishmânias foram centrifugados a 700 xg, por 20 min, os sobrenadantes das culturas foram desprezados e os parasitos diluídos em RPMI completo para serem utilizados nos ensaios de infecção dos macrófagos.

A infecção dos macrófagos obtidos de camundongos BALB/c foi feita utilizando-se placas de 24 poços estéreis, que continham lamínulas circulares de 13 mm. Foram distribuídos  $2 \times 10^5$  macrófagos peritoneais em 500 µL por poço, em duplicata, em RPMI incompleto. As placas foram incubadas em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 2 h para permitir a aderência dos macrófagos às lamínulas. Após isto, os poços foram lavados duas vezes, com salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2, a 37°C para remover as células não aderentes. Então, foram adicionados 500 µL de RPMI completo, contendo  $4 \times 10^5$  ou  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cultivadas nos diferentes condições citadas acima. As placas foram incubadas em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 24 h para permitir a entrada dos parasitos nos macrófagos. A seguir, os macrófagos aderidos às lamínulas foram lavados três vezes, com STF, pH 7,2, a 37°C, secos com vento quente, fixados com metanol absoluto (Vetec), por 1 min e corados com Giemsa (Dinâmica) a 10% em tampão de coloração, pH 7,2, por 10 min. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro de microscopia com resina sintética (Entellan®, Merck) e avaliadas por microscopia ótica, em aumento de 1000X. Para a determinação do índice de infecção foram contados 200 macrófagos. Este índice de infecção foi calculado multiplicando-se a média de *L. (L.)*



*amazonensis* ingerida por macrófago pelo percentual de macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis*. (Adaptado de Muniz-Junqueira et al., 2008; Alvarez-Rueda et al., 2009; da Luz et al., 2009). As lâminas eram identificadas apenas ao final das leituras.

Portanto, para verificarmos a influencia dos meios de cultura e do número de parasitos por macrófago sobre a infectividade das leishmânias, comparamos o índice de infecção dos macrófagos de camundongos BALB/c quando as células foram incubadas com  $4 \times 10^5$  ou  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, cultivadas a 26°C e nos meios RPMI ou Schneider, com diferentes valores de pH (figura 2).

Observamos que, independente do número de leishmânias que foi empregado na infecção dos macrófagos, o índice de infecção das células incubadas com parasitos cultivados nos meios Schneider pH 6,7 e 5,4 foi maior do que o dos macrófagos incubados com leishmânias cultivadas nos meios RPMI pH 7,2 e 5,4 (figuras 2A e 2D). Essa diferença foi ocasionada pelo aumento do percentual de macrófagos infectados pelas leishmânias (figuras 2B e 2E) e um maior número de parasitos por macrófago (figuras 2C e 2F) nos ensaios de infecção que foram feitos com parasitos cultivados nos meios Schneider pH 6,7 e 5,4 do que nos que foram realizados com leishmânias cultivadas nos meios RPMI pH 7,2 e 5,4.

Demonstramos ainda que, independente do meio de cultura das leishmânias, os macrófagos que foram incubados com um maior número de parasitos apresentaram um índice de infecção mais elevado do que os que haviam sido incubados com um menor número de leishmânias (figuras 2A e 2D). Essa diferença foi devido ao maior percentual de macrófagos infectados pelos parasitos (figuras 2B e 2E) e um maior número de leishmânias por macrófagos (figuras 2C e 2F) nos ensaios de infecção que foram feitos com um maior número de parasitos do que quando foram realizados com um menor número de leishmânias. Contudo, esse efeito foi mais evidente quando os parasitos utilizados na infecção dos macrófagos foram cultivados nos meios Schneider pH 6,7 e 5,4 do que quando foram cultivados nos meios RPMI pH 7,2 e 5,4.

Também observamos que, independente do número de leishmânias utilizado na infecção dos macrófagos, a transferência dos parasitos para meios de cultura que apresentavam pH 5,4 nas 24 horas que antecederam a incubação das leishmânias com os macrófagos, aumentou discretamente o índice de infecção dos macrófagos que foram incubados com leishmânias cultivadas em meio RPMI (figuras 2A e 2D), devido ao aumento do percentual de macrófagos infectados pelos parasitos (figuras 2B e 2E), porém reduziu o índice de infecção dos macrófagos que foram incubados com

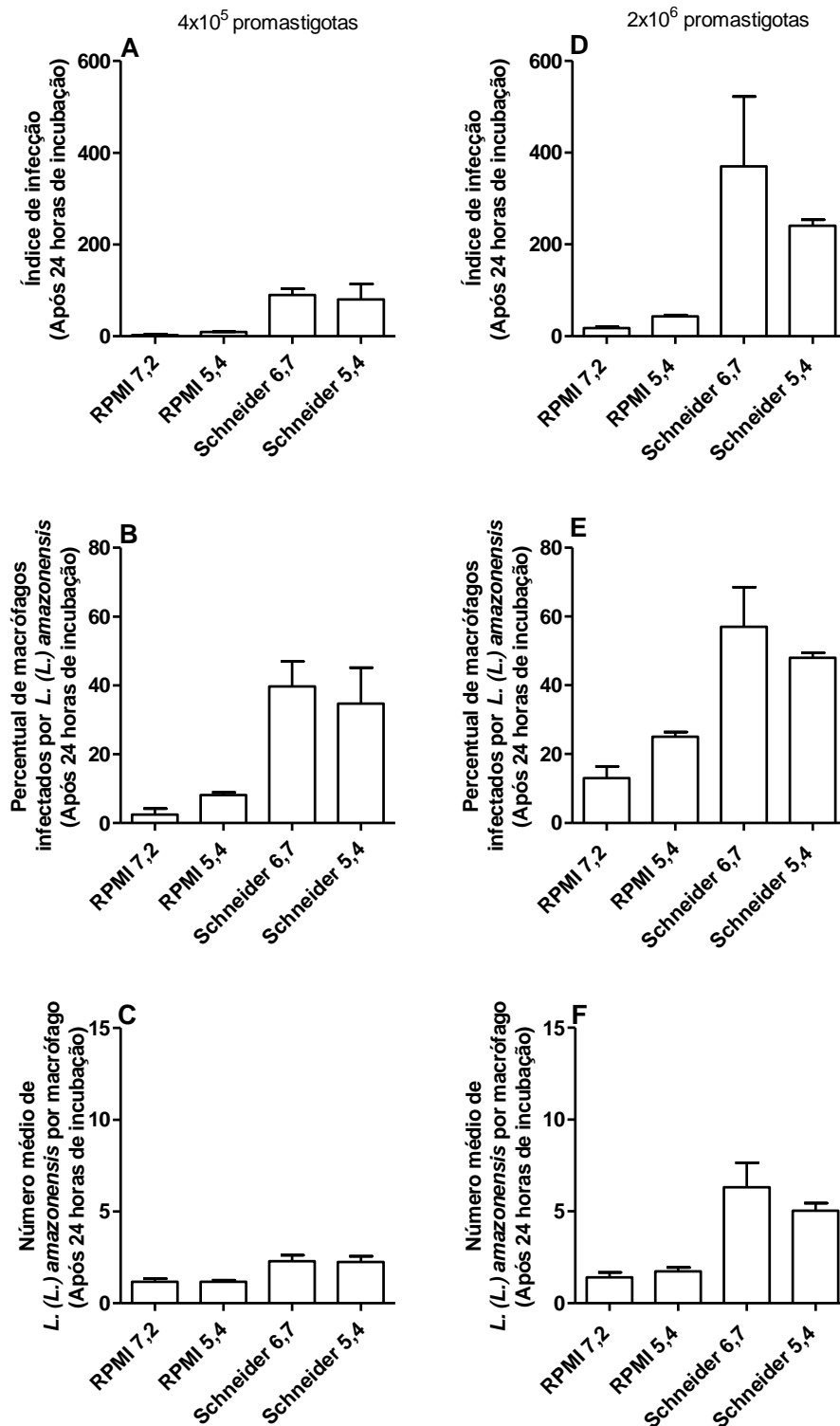
leishmânias cultivadas em meio Schneider (figuras 2A e 2D), devido tanto a uma diminuição do percentual de macrófagos infectados pelas leishmânias (figuras 2B e 2E) quanto a uma diminuição do número de parasitos por macrófago (figuras 2C e 2F).

Concluimos que, independente do pH do meio de cultura, o meio Schneider gera promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com maior capacidade para infectar os macrófagos do que o meio RPMI e que é possível aumentar o parasitismo dessas células com ambos os meios de cultura realizando-se ensaios de infecção com uma maior proporção de parasitos por macrófago. Concluimos também que a mudança das leishmânias para um meio de cultura com pH 5,4 nas 24 horas que antecedem os ensaios de infecção não aumenta substancialmente o índice de infecção dos macrófagos.

Nossas observações mostraram que as condições do meio de cultivo das leishmânias interferiam na capacidade de infecção do macrófago. Como na infecção natural pela leishmânia tem sido descrito que o inóculo é pequeno (Rogers et al., 2004), em alguns experimentos testamos as respostas em condições subótimas (com inóculo menor com leishmânias cultivadas em meio RPMI 1640) e outros em condições ótimas (com inóculo maior com parasitos cultivados em Schneider).

Os experimentos deste trabalho foram portanto separados em três grandes grupos, 1) experimentos que foram realizadas apenas em condições subótimas de cultivo, 2) experimentos que foram realizados apenas em condições ótimas do cultivo, 3) experimentos que foram realizados tanto em condições subótimas quanto ótimas de cultivo. Estes experimentos foram realizados procurando aumentar a possibilidade de compreensão referente às possíveis situações do encontro inicial da leishmânia com os macrófagos do hospedeiro, que poderiam ocorrer em situação ótima, com uma inoculação de maior número de parasitas com maior capacidade infectiva e em condições subótimas, com uma inoculação de menor número de parasitas com menor capacidade infectiva. Considerando, entretanto, que são apenas modificações das situações de cultivo.

Não pudemos realizar todos os experimentos em condições subótimas e ótimas por limitações no número de animais e reagentes, por isso, em alguns experimentos que em nosso julgamento eram mais críticos para a compreensão do fenômeno inicial da interação entre a leishmânia e o macrófago na presença das drogas antiretrovirais os experimentos foram realizados apenas em condições subótimas e outros apenas em condições ótimas.



**Fig. 2.** Efeito do meio de cultura e do número de leishmânias por macrófago sobre o índice de infecção. Cada grupo consistiu de 3 camundongos BALB/c. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Na coluna da esquerda encontram-se os ensaios de infecção feitos com  $4 \times 10^5$  parasitos e na coluna da direita os ensaios de infecção que foram efetuados com  $2 \times 10^6$  parasitos. Em A e D encontra-se o índice de infecção, em B e E o percentual de macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* e em C e F o número médio de *L. (L.) amazonensis* por macrófago.

### **3.6 Índice de infecção dos macrófagos após incubação com leishmânias**

#### **3.6.a Em condições subótimas**

O índice de infecção e o número de macrófagos aderidos às lamínulas foram avaliados após os macrófagos obtidos dos camundongos tratados com antiretrovirais serem incubados ou não *in vitro* com leishmânias na proporção de  $4 \times 10^5$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* para  $2 \times 10^5$  macrófagos peritoneais. Os parasitos utilizados nesses ensaios foram cultivados em meio RPMI completo, a 26°C, durante 5 dias e o ensaio de infecção dos macrófagos, assim como a determinação do índice de infecção foi feito como descrito no tópico 3.5. Para a determinação do número total de macrófagos aderidos em cada lamínula, foi contado o número de macrófagos em 10% da área total da lamínula de 13 mm, e o valor obtido foi multiplicado por 10 (Adaptado de Paula Jr, 2003; Muniz-Junqueira et al., 2008; Alvarez-Rueda et al., 2009).

#### **3.6.b Em condições ótimas**

Para verificar se uma maior proporção de leishmânias por macrófago poderia interferir no índice de infecção ou no número de macrófagos aderidos às lamínulas, avaliamos o índice de infecção e o número de macrófagos aderidos às lamínulas quando  $2 \times 10^5$  macrófagos peritoneais obtidos dos camundongos tratados com antiretrovirais foram incubados ou não *in vitro* com  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Resumidamente, aos macrófagos peritoneais aderidos em lamínulas de 13 mm foram incubados em 500 µL de RPMI completo contendo ou não  $2 \times 10^6$  promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. As leishmânias empregadas nesses ensaios foram cultivadas em meio Schneider (Sigma), pH 6,7, suplementado com 40 µg/mL de gentamicina e 20% de soro fetal bovino, a 26°C, durante 5 dias. As placas foram incubadas em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 6 h para permitir a fagocitose das promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e a infecção dos macrófagos. Decorrido o tempo de incubação, os poços foram lavados com 5 mL de STF, pH 7,2, a 37°C, sob aspiração contínua para remover os parasitos não aderidos ou ingeridos pelos macrófagos e em cada poço foram acrescentados 500 µL de RPMI completo. As placas foram incubadas em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por mais 24 h. Os sobrenadantes das culturas foram coletados para determinação de citocinas e do óxido nítrico e os macrófagos aderidos às lamínulas foram lavados, corados e avaliados como

descrito no tópico 3.4 (Adaptado de Paula Jr, 2003; Muniz-Junqueira et al., 2008; Santos et al., 2009; Macedo-Silva et al., 2011).

### **3.7. Viabilidade dos macrófagos após incubação com leishmânias em condições ótimas**

Com o objetivo de verificar se o tratamento com os antiretrovirais e/ou a infecção por *L. (L.) amazonensis* interferia na sobrevivência dos macrófagos, avaliamos a viabilidade dos macrófagos após serem incubados *in vitro* na ausência ou presença de leishmânias. Para esse experimento utilizamos em cada poço  $2 \times 10^5$  macrófagos peritoneais para  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cultivadas em meio Schneider (Sigma), pH 6,7, suplementado com 40 µg/mL de gentamicina e 20% de soro fetal bovino, a 26°C, durante 5 dias. As placas contendo as lamínulas com os macrófagos aderidos incubados ou não com as leishmânias por 30 h, foram colocadas sobre o gelo e os poços foram lavados três vezes, com STF, pH 7,2. Posteriormente, foram adicionados 250 µL de laranja de acridina (Merck) por poço, diluída em STF, pH 7,2 (5 mg/mL) e aguardou-se 20 min para que o corante pudesse interagir com os macrófagos. Depois disto, os poços foram lavados duas vezes com STF, pH 7,2 e os macrófagos foram fixados por 30 min com paraformaldeído a 4% em STF, pH 7,2. Então, foram realizadas mais duas lavagens com STF, pH 7,2, as lamínulas foram removidas dos poços, montadas sobre lâminas de microscopia contendo STF, pH 7,2 como meio de montagem e suas extremidades foram seladas com esmalte incolor (Risque). O percentual de macrófagos viáveis foi determinado contando-se 100 macrófagos utilizando o microscópio de fluorescência Axiophot (Zeiss, Alemanha), em aumento de 400X. Os macrófagos foram considerados viáveis quando apresentavam citoplasma alaranjado e núcleo verde e não viáveis quando estavam apoptóticos, que foram caracterizados por apresentarem cromatina condensada e/ou fragmentada e com citoplasma sem coloração. (Adaptado de Laufs et al., 2002; Prado, 2005).

### **3.8. Viabilidade das leishmânias em condições ótimas após incubação com os macrófagos**

Este experimento foi realizado com o intuito de analisar se o tratamento de camundongos BALB/c com antiretrovirais influenciava a sobrevivência dos parasitos co-cultivados com os macrófagos. Para esse ensaio utilizamos por poço  $2 \times 10^5$  macrófagos peritoneais para  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* que foram

cultivadas em meio Schneider (Sigma), pH 6,7, suplementado com 40 µg/mL de gentamicina e 20% de soro fetal bovino, a 26°C, durante 5 dias. Os poços contendo macrófagos aderidos incubados com as leishmânias por 30 h foram lavados três vezes, com STF, pH 7,2 e o meio foi substituído por 1 mL de meio Schneider, pH 6,7, suplementado com 40 µg/mL de gentamicina e 20% de soro fetal bovino. A seguir as placas foram incubadas a 26°C durante 5 dias. Este meio é adequado para a sobrevivência das leishmânias, mas o pH baixo e a temperatura são incompatíveis com a sobrevivência dos macrófagos. Diariamente foi feita a quantificação, em câmara de Neubauer, das promastigotas geradas a partir dos parasitos contidos nos macrófagos. O resultado foi expresso como número de promastigotas por mL de meio Schneider. Esta técnica foi realizada conforme descrito por Khouri et al., 2010.

### **3.9. Determinação da produção de óxido nítrico após incubação dos macrófagos com leishmânias em condições subótimas e ótimas**

A produção do óxido nítrico foi avaliada pela quantificação do nitrito contido nos sobrenadantes das mesmas culturas utilizadas para a avaliação do índice de infecção. Para efetuarmos essa dosagem, 100 µL dos sobrenadantes foram distribuídos em duplicata, em placas de 96 poços, e acrescentado, em volume igual, o reagente de Griess (Green et al., 1981). Após 10 min foi feita leitura em espectrofotômetro (Spectramax® Plus 384, Molecular Devices) em comprimento de onda de 540 nm. Para determinação da concentração de nitrito contida em cada poço, foi feita, paralelamente, uma curva padrão com nitrito diluído em RPMI completo nas concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,12 µM e 1,56 µM.

### **3.10. Determinação da produção de peróxido de hidrogênio após incubação dos macrófagos com leishmânias em condições ótimas**

Esse experimento foi realizado para verificar a influência de uma maior proporção de leishmânias por macrófago sobre a produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos de camundongos BALB/c tratados com antiretrovirais. Resumidamente, macrófagos peritoneais ( $1,5 \times 10^5$  células por 200 µL de RPMI incompleto) de camundongos tratados com salina, lopinavir/ritonavir e atazanavir foram distribuídos, em duplicata, em placas de 96 poços. As placas foram incubadas em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 2 h para permitir a aderência dos macrófagos.

Os poços foram lavados uma vez, com STF, pH 7,2, a 37°C para remover as células não aderentes e o meio foi repostado com RPMI completo contendo ou não  $1,5 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, cultivadas em meio Schneider, pH 6,7, com 40 µg/mL de gentamicina e 20% de soro fetal bovino, a 26°C, durante 5 dias. Em seguida, as placas foram incubadas, em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 6 h. Decorrido o tempo de incubação, os poços foram lavados duas vezes, com STF, pH 7,2, a 37°C para remover os parasitos não aderidos ou ingeridos pelos macrófagos, foram adicionados 200 µL de RPMI completo e as placas foram novamente incubadas em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por mais 24 h. Posteriormente, foram feitas mais duas lavagens com STF, pH 7,2, a 37°C, seguida pela adição de 140 µL de tampão fosfato suplementado com 5,5 mM de dextrose, 0,5 mM de vermelho de fenol e 19 unidades por mL de peroxidase tipo II (Sigma) e as placas foram novamente incubadas por 1 h, em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, foram adicionados 10 µL de NaOH para interromper a reação catalisada pela peroxidase tipo II. A placa foi homogeneizada suavemente e foi feita a leitura em espectrofotômetro (Spectramax® Plus 384, Molecular Devices) em comprimento de onda de 620 nm. Para determinação da concentração de peróxido de hidrogênio contida em cada poço foi feita, paralelamente, uma curva padrão com peróxido de hidrogênio diluído em tampão fosfato suplementado com 5,5 mM de dextrose, 0,5 mM de vermelho de fenol e 19 unidades por mL de peroxidase tipo II nas concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,12 µM, 1,56 µM (Pick & Mizel, 1981).

### **3.11. Determinação da produção de IL-1β e IL-6 após incubação dos macrófagos com leishmânias em condições subótimas**

A produção das citocinas IL-1β e IL-6 pelos macrófagos de camundongos tratados com os antiretrovirais foi determinada após incubação *in vitro* na ausência ou presença de  $4 \times 10^5$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* para  $2 \times 10^5$  macrófagos peritoneais. As leishmânias utilizadas nesse experimento foram cultivadas em meio RPMI 1640, pH 7,2, suplementado com 20 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 20% de soro fetal bovino e 40 µg/mL de gentamicina, a 26°C, durante 5 dias.

As dosagens das citocinas IL-1β e IL-6 foram realizadas nos sobrenadantes das culturas utilizadas para a determinação do índice de infecção e da taxa de aderência. Os

sobrenadantes foram mantidos a - 80°C até a determinação e descongelados apenas uma vez. Empregou-se o kit comercial Ready-Set-Go ELISA kits (eBioscience) e seguiu-se as instruções do fabricante. Resumidamente, 100 µL por poço de anticorpo de captura diluído em STF, pH 7,2, foram aderidos em placas de 96 poços (Coat Corning Costar 9018, Corning, NY, USA) pela incubação por 24 h, a 4°C. A seguir, os poços foram lavados 5 vezes com 250 µL de STF, pH 7,2, com 0,05% de Tween-20. Foram acrescentados em cada poço 200 µL de STF, pH 7,2, suplementado com soro fetal bovino para bloquear a ligação inespecífica de anticorpos aos poços e as placas foram incubadas em temperatura ambiente, por 1 h. Após isto, os poços foram lavados 5 vezes com 250 µL de STF, pH 7,2, com 0,05% de Tween-20. Posteriormente, foram adicionados 100 µL por poço de solução padrão e de sobrenadante de cultura e as placas foram incubadas por mais 24 h, a 4°C. Depois disto, os poços foram lavados 5 vezes com 250 µL de STF, pH 7,2, com 0,05% de Tween-20 e foram adicionados 100 µL por poço de anticorpo de detecção conjugado com biotina diluído em STF, pH 7,2, com soro fetal bovino. Novamente, os poços foram lavados, 5 vezes, com 250 µL de STF, pH 7,2, com 0,05% de Tween-20 e foram adicionados 100 µL por poço de avidina-peroxidase. Então, as placas foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente e lavadas 5 vezes, com 250 µL de STF, pH 7,2, com 0,05% de Tween-20. A seguir, foram adicionados 100 µL por poço de tetrametilbenzidina e as placas foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de ácido fosfórico (1M) e realizada a leitura em espectrofotômetro (Spectramax® Plus 384, Molecular Devices) em comprimento de onda de 450 nm (Mattos et al., 2010; Magalhães et al., 2010).

### **3.12. Determinação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-23 e IL-10 após incubação dos macrófagos com leishmânias em condições ótimas**

A produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-23 e IL-10 pelos macrófagos de camundongos tratados com os antiretrovirais foi determinada nos sobrenadantes das culturas após incubação *in vitro* na ausência ou presença  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* para  $2 \times 10^5$  macrófagos peritoneais. As leishmânias utilizadas nesses experimentos foram cultivadas em meio Schneider, pH 6,7, com 40 µg/mL de gentamicina e 20% de soro fetal bovino, a 26°C, durante 5 dias.



As dosagens das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-23 e IL-10 foram realizadas nos sobrenadantes das culturas utilizadas para a determinação do índice de infecção e da taxa de aderência que foram mantidos a - 80°C até a determinação e descongelados apenas uma vez. Empregou-se o kit comercial Ready-Set-Go ELISA kits (eBioscience) e seguiu-se a metodologia descrita no tópico 3.11.

### **3.13. Expressão da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B pelos macrófagos que foram incubados com leishmânias em condições subótimas**

Realizamos esse experimento para investigar se o tratamento com antiretrovirais interferia nas vias de sinalização intracelular envolvidas na resposta inflamatória. A imunomarcação da subunidade p65 do fator nuclear kapa B (NF- $\kappa$ B) nos macrófagos dos camundongos tratados com os antiretrovirais foi feita após incubação *in vitro* na ausência ou presença de  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* para  $1 \times 10^6$  macrófagos peritoneais.

Foi feito um *pool* dos macrófagos peritoneais de seis camundongos e  $1 \times 10^6$  células por mL foram distribuídas em duplicata, em placas de 24 poços. As placas foram incubadas em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 2 h para permitir a aderência dos macrófagos. Os poços foram lavados duas vezes, com STF, pH 7,2, a 37°C para remover as células não aderentes e a foram adicionados em cada poço 1000  $\mu$ L de RPMI completo contendo ou não  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, cultivadas em meio RPMI 1640, pH 7,2, suplementado com 20 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 20% de soro fetal bovino e 40  $\mu$ g/mL de gentamicina, a 26°C, durante 5 dias. Depois disto, as placas foram incubadas, em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 1 h, 4 h e 24 h para a interação dos macrófagos com as leishmânias. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes, com STF, pH 7,2, 37°C e os macrófagos foram fixados às lamínulas com paraformaldeído 4% em STF, pH 7,2, por 10 min, em temperatura ambiente. Foram realizadas mais três lavagens com STF, pH 7,2, e os macrófagos foram permeabilizados pela incubação com Triton a 0,2% em STF, pH 7,2, por 20 min. A seguir, foram realizadas três lavagens com STF, pH 7,2, e, para bloquear a ligações inespecíficas de anticorpos aos macrófagos, foi colocada albumina sérica bovina a 2% em STF, pH 7,2, por 20 min, a temperatura ambiente. Então, foram adicionados os anticorpos primários (IgGs policlonais produzidas em coelho) diluídos na proporção de 1:200 em albumina sérica bovina a 2% em STF, pH 7,2 contra a

subunidade p65 do fator nuclear kapa b (NF- $\kappa$ B) (Santa Cruz Biotechnology) e as lamínulas foram incubadas por uma noite, à 4°C. Cada poço foi lavado mais três vezes com STF, pH 7,2 e em seguida foram colocados os anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 546 (Invitrogen) diluídos em STF, pH 7,2 e feita incubação por mais 1 h, em temperatura ambiente. Foram realizadas mais três lavagens com STF, pH 7,2 e os macrófagos foram incubados com 500  $\mu$ L de 4,6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) (Sigma) diluído na proporção de 1:5000 em STF, pH 7,2, por 5 min. As lamínulas foram lavadas mais três vezes com STF, pH 7,2 e montadas em lâminas de vidro com meio de montagem (Prolong Gold®, Invitrogen, Eugene, OR, USA). As imagens foram capturadas utilizando o microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha). Pinhole de 95,5  $\mu$ m, velocidade de digitalização de 100 Hz, média de três linhas e um quadro foram utilizados. O ganho e a compensação do fotomultiplicador foi ajustado para dar sub-saturação da intensidade de fluorescência com sinal ideal de ruído. As imagens foram processadas utilizando o software ImageJ 1.47q (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) (Magalhães et al., 2010).

### **3.14. Expressão da subunidade RelB do NF- $\kappa$ B e do PPAR- $\gamma$ pelos macrófagos que foram incubados com as leishmânias em condições ótimas**

A imunomarcação subunidade RelB do NF- $\kappa$ B e do receptor gama ativado pelo proliferador do peroxissoma (PPAR- $\gamma$ ) nos macrófagos de camundongos tratados com os antiretrovirais foi feita após incubação *in vitro* na ausência ou presença de  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* para  $5 \times 10^5$  macrófagos peritoneais.

Foi feito um pool com as células peritoneais de seis animais e  $5 \times 10^5$  células por mL foram distribuídas em duplicata em placas de 24 poços. As placas foram incubadas em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 2 h para permitir a aderência dos macrófagos. Então, os poços foram lavados duas vezes, com STF, pH 7,2, a 37°C para remover as células não aderentes e a seguir cada poço foi preenchido com 1000  $\mu$ L de RPMI completo contendo ou não  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cultivadas em meio Schneider, pH 6,7, com 40  $\mu$ g/mL de gentamicina e 20% de soro fetal bovino, a 26°C, durante 5 dias. Em seguida, as placas foram incubadas, em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 6 h. Decorrido o tempo de incubação, os poços foram lavados duas vezes, com STF, pH 7,2, a 37°C para remover os parasitos não aderidos ou ingeridos pelos macrófagos, foram adicionados 1000  $\mu$ L de RPMI

completo e as placas foram novamente incubadas em ambiente umidificado, com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por mais 24 h. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes, com STF, pH 7,2, 37°C e os macrófagos foram fixados às lamínulas com paraformaldeído 4% em STF, pH 7,2, por 10 min, em temperatura ambiente. Foram realizadas mais três lavagens com STF, pH 7,2, e os macrófagos foram permeabilizados pela incubação com Triton a 0,2% em STF, pH 7,2, por 20 min. A seguir, foram realizadas mais três lavagens com STF, pH 7,2, e, para bloquear ligações inespecíficas de anticorpos aos macrófagos, foi colocada albumina sérica bovina a 2% em STF, pH 7,2, por 20 min, a temperatura ambiente. Então, foram adicionados os anticorpos primários (IgGs policlonais produzidas em coelho) diluídos na proporção de 1:200 em albumina sérica bovina a 2% em STF, pH 7,2 contra a subunidade RelB do fator nuclear kapa b (NF-κB) (Santa Cruz Biotechnology) e contra o fator gama ativado pelo proliferador do peroxissoma (PPAR-γ) e as lamínulas foram incubadas por uma noite, à 4°C. Cada poço foi lavado mais três vezes com STF, pH 7,2 e em seguida foram colocados os anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 546 (Invitrogen) diluídos em STF, pH 7,2 e feita incubação por mais 1 h, em temperatura ambiente. Foram realizadas mais três lavagens com STF, pH 7,2 e os macrófagos foram incubados com 500 μL de 4,6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) (Sigma) diluído na proporção de 1:5000 em STF, pH 7,2, por 5 min. As lamínulas foram lavadas mais três vezes com STF, pH 7,2 e montadas em lâminas de vidro com meio de montagem (Prolong Gold®, Invitrogen, Eugene, OR, USA). As imagens foram capturadas por microscopia confocal e processadas utilizando o software ImageJ 1.47q (Magalhães et al., 2010).

### **3.15. Quantificação da translocação do citoplasma para o núcleo do NF- κB e do PPAR-γ**

Esta técnica foi adaptada do trabalho descrito por Noursadeghi et al (2008) e foi executada utilizando-se o software ImageJ 1.47q (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Resumidamente, foram obtidas cinco imagens DAPI e NF-κB de cada grupo estudado. Na imagem DAPI foi aplicado um filtro mediano com 3x3 pixels para remover o ruído e para aproximar a intensidade da coloração de um valor mediano. A seguir, por meio do algoritmo Isodata, a imagem DAPI foi convertida em uma máscara binária que foi aplicada sobre a imagem NF-κB original para a obtenção da intensidade média de fluorescência nuclear do NF-κB. Posteriormente, foi obtida a intensidade média de

fluorescência total do NF- $\kappa$ B pela análise da imagem NF- $\kappa$ B original. Os dados foram exportados para o Excel e, a seguir foi subtraída a intensidade média de fluorescência nuclear da intensidade média de fluorescência total para a obtenção da intensidade média de fluorescência citoplasmática do NF- $\kappa$ B. Para excluir a possibilidade de ligação inespecífica, cinco imagens de macrófagos controle corados apenas com o anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 546 foram analisadas de maneira semelhante e os valores obtidos foram descontados dos valores das imagens previamente analisadas. Para evitar desvios nos resultados ocasionados por diferenças no número de células analisadas, a intensidade média de fluorescência total, nuclear e citoplasmática de cada imagem foi expressa por 100 células. A quantificação da translocação nuclear do PPAR- $\gamma$  foi feita empregando-se a mesma metodologia utilizada para o estudo da translocação nuclear do NF- $\kappa$ B.

### **3.16. Expressão de corpúsculos lipídicos detectada pela sonda BODIPY quando os macrófagos foram incubados com leishmânias em condições ótimas**

Realizamos este experimento para verificar se o tratamento com os antiretrovirais ou a infecção pela *Leishmania* influenciava a expressão dos corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais.

A marcação dos corpúsculos lipídicos dos macrófagos de camundongos tratados com os antiretrovirais foi feita após incubação *in vitro* na ausência ou presença de  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* para  $5 \times 10^5$  macrófagos peritoneais. As leishmânias empregadas foram cultivadas em meio Schneider, pH 6,7, com 40  $\mu$ g/mL de gentamicina e 20% de soro fetal bovino, a 26°C, durante 5 dias. Resumidamente, macrófagos peritoneais incubados ou não com leishmânias por 30 h, como descrito no tópico 3.15, foram fixados às lamínulas com paraformaldeído a 4% em STF, pH 7,2, por 10 min, em temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas três vezes, com STF, pH 7,2 e incubadas com a sonda fluorescente BODIPY (Invitrogen) diluída na proporção de 1:400 em STF, pH 7,2. Depois disto, as células foram novamente lavadas com STF, pH 7,2 e a seguir incubadas com 500  $\mu$ L de DAPI diluído na proporção de 1:5000 em STF, pH 7,2, por 5 min. Então, foram realizadas mais três lavagens com STF, pH 7,2 e as lamínulas montadas sobre lâminas de vidro contendo meio de montagem. As imagens foram capturadas por microscopia confocal e processadas utilizando o software ImageJ 1.47q (Magalhães et al., 2010).

### **3.17. Expressão de corpúsculos lipídicos detectada pela marcação com *Oil Red* quando os macrófagos foram incubados com leishmânias em condições ótimas**

A quantificação dos corpúsculos lipídicos expressos pelos macrófagos de camundongos tratados com os antiretrovirais foi feita após incubação *in vitro* na ausência ou presença de  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* para  $5 \times 10^5$  células peritoneais. As leishmânias empregadas foram cultivadas em meio Schneider, pH 6,7, com 40 µg/mL de gentamicina e 20% de soro fetal bovino, a 26°C, durante 5 dias. Brevemente, macrófagos infectados ou não com *L. (L.) amazonensis* como descrito no tópico 3.15 foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS, pH 7,2, por 30 min, lavados duas vezes com PBS, pH 7,2 e uma vez com álcool isopropílico 60% em água destilada. Posteriormente, foram corados por 15 min com uma solução de *Oil Red O* 0,5% em álcool isopropílico 80%, lavados uma vez com álcool isopropílico 60% e duas vezes com água destilada. Então, as células foram coradas com hematoxilina de Mayer durante 5 min, lavadas duas vezes com água destilada e as lamínulas foram montadas sobre lâminas de microscopia utilizando-se resina sintética (Entellan®, Merck). As células foram analisadas por microscopia ótica em aumento de 1000X e as que foram positivas apresentaram corpúsculos corados em vermelho no citoplasma. Foram contados 200 macrófagos para a obtenção do índice de corpúsculo lipídico que foi calculado multiplicando-se o número médio de corpúsculos lipídicos por macrófago pelo percentual de macrófagos que expressaram corpúsculos lipídicos (Adaptado de Muniz-Junqueira, 2008).

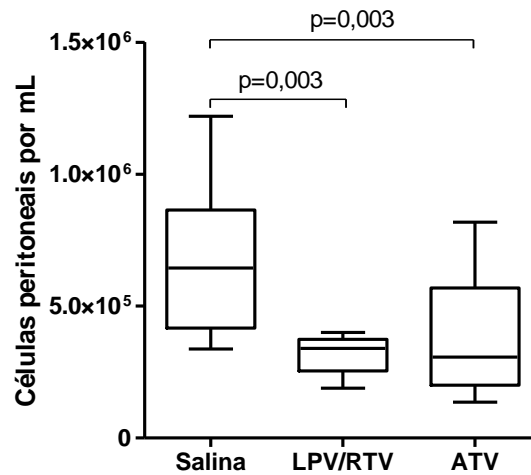
### **3.18. Análise estatística**

Após a avaliação da normalidade e das variâncias das amostras foram aplicados testes estatísticos paramétricos para os grupos com distribuição normal ou não paramétricos para os grupos com distribuição não normal para análise comparativa entre os grupos. Para dois grupos independentes foram aplicados o teste t ou Mann-Whitney. Para os dados pareados foram utilizados os testes t pareado ou Wilcoxon. Para comparação de mais do que dois grupos foram utilizados os testes ANOVA para os grupos com distribuição normal e o Kruskal-Wallis para as que não tiveram distribuição normal. Os dados foram avaliados pelo software Prism® (Graphpad, USA, 2005).

## **RESULTADOS**

#### **4.1. Lopinavir/ritonavir e atazanavir diminuíram o número de células recuperadas no lavado peritoneal**

Observamos que nos grupos tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir o número de células recuperadas no lavado peritoneal foi, respectivamente, 54% e 45% menor do que o número de células recuperadas do lavado peritoneal do grupo tratado com salina ( $p=0,003$ , Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn), sendo que a mediana do número de células recuperadas por mL de salina tamponada com fostato (STF) foi de  $6,4 \times 10^5$ /mL, no grupo tratado com salina, de  $3,4 \times 10^5$ /mL, no grupo tratado com lopinavir/ritonavir e de  $3,1 \times 10^5$ , no grupo tratado com atazanavir (figura 3).



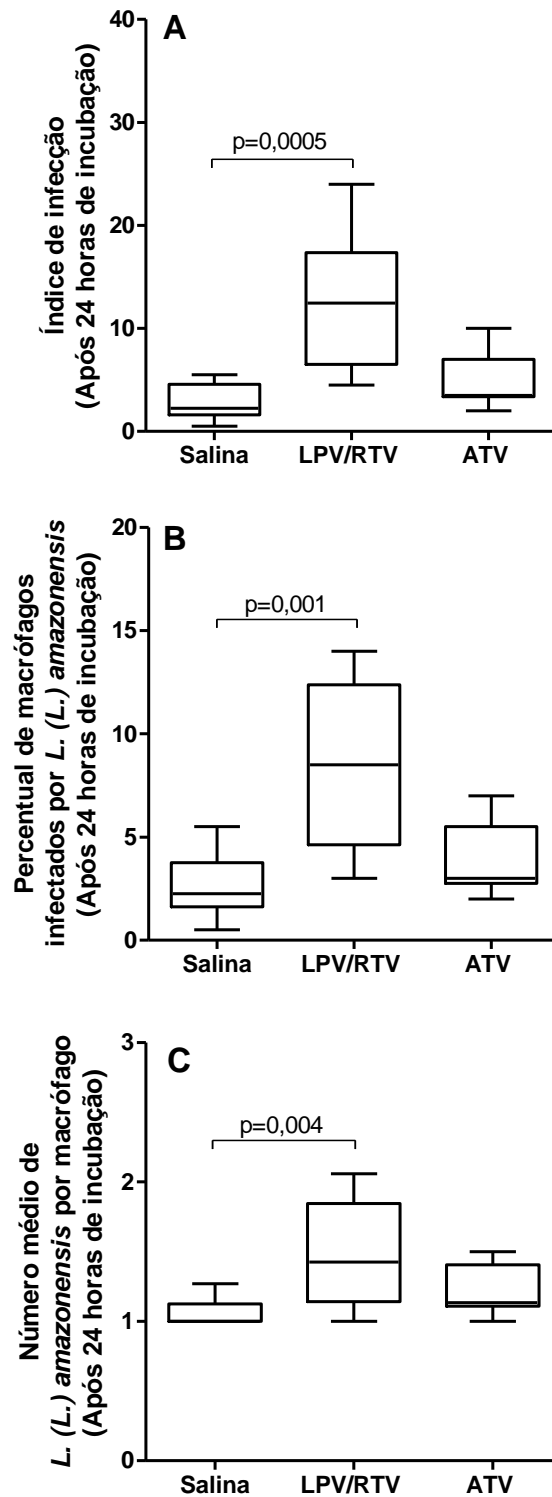
**Fig. 3.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre o número de células recuperadas no lavado peritoneal de camundongos BALB/c. O grupo controle consistiu de 10 camundongos tratados com salina tamponada com fosfato, o grupo LPV/RTV consistiu de 10 animais tratados com lopinavir/ritonavir (200mg/50mg/kg/dia) e o grupo ATV foi formado por 10 animais tratados com atazanavir (90mg/kg/dia). Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos do número de células recuperadas por mL de salina tamponada com fosfato. O número de células recuperadas no lavado peritoneal nos grupos tratados com lopinavir/ritonavir ( $p=0,003$ , Kruskal-Wallis+Dunn) e com atazanavir ( $p=0,003$ , Kruskal-Wallis+Dunn) foi menor do que o número de células recuperadas no grupo tratado com salina.



## **4.2. Influência dos antiretrovirais sobre o índice de infecção**

### **4.2.a Lopinavir/ritonavir aumentou o índice de infecção dos macrófagos após incubação com leishmânias em condições subótimas**

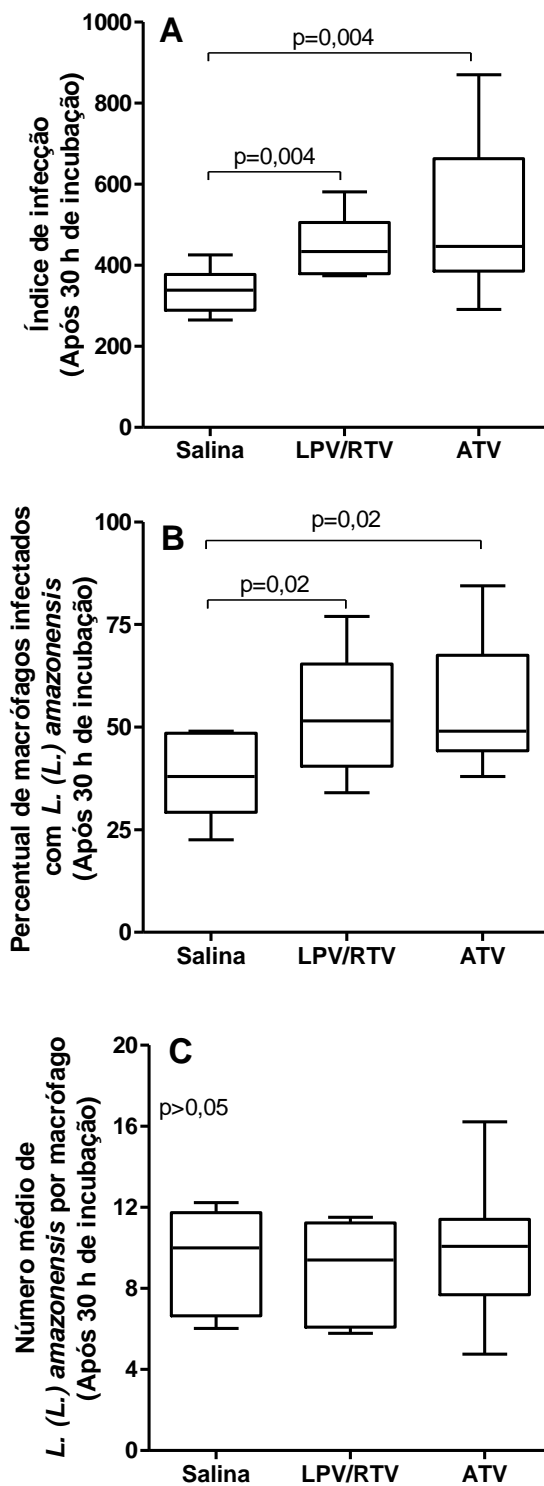
Numa menor proporção de leishmânias por macrófago, o grupo tratado com lopinavir/ritonavir apresentou um maior índice de infecção, do que o controle tratado com salina (figura 4), sendo a mediana do índice de infecção do grupo tratado com lopinavir/ritonavir 5,5 vezes maior do que o grupo controle tratado com salina ( $p=0,0005$ , Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn). Essa diferença foi ocasionada tanto pelo aumento do percentual de macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis*, sendo de 2,25 para o grupo tratado com salina e de 8,5 para o grupo tratado com lopinavir/ritonavir ( $p=0,001$ , Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn), quanto pelo aumento do número médio de *L. (L.) amazonensis* por macrófago, que foi de 1,0 para o grupo tratado com salina e de 1,42 para o grupo tratado com lopinavir/ritonavir ( $p=0,004$ , Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn).



**Fig. 4.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre o índice de infecção após incubação dos macrófagos com leishmânias em condições subótimas. Cada grupo consistiu de 10 camundongos. Os dados estão representados como a mediana, quartis e extremos. Em (A) encontra-se o índice de infecção, em (B) o percentual de macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* e em (C) o número médio de *L. (L.) amazonensis* por macrófago. Em (A), (B) e (C) LPV/RTV > Salina ( $p>0,05$ , Kruskal-Wallis+Dunn).

#### **4.2.b. Lopinavir/ritonavir and atazanavir aumentaram o índice de infecção dos macrófagos após incubação com leishmânias em condições ótimas**

Observamos que em uma maior proporção de leishmânias por macrófago, tanto o grupo tratado com lopinavir/ritonavir ( $p=0,004$ , Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn), quanto com o atazanavir ( $p=0,004$ , Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn), apresentaram um maior índice de infecção do que o grupo tratado com salina, sendo a mediana do índice de infecção de 338,0, no grupo tratado com salina, de 434,3, no grupo tratado com lopinavir/ritonavir e de 446,8, no grupo tratado com atazanavir (figura 5). Esse aumento foi ocasionado pela elevação do percentual de macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* (figura 5), sendo a mediana do percentual de macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* de 38,0, no grupo tratado com salina, de 51,5, no grupo tratado com lopinavir/ritonavir ( $p=0,02$ , ANOVA seguido do teste de Student-Newman-Keuls) e de 49,0, no grupo tratado com atazanavir ( $p=0,02$ , ANOVA seguido do teste de Student-Newman-Keuls). Diferentemente, os antiretrovirais não influenciaram o número médio de *L. (L.) amazonensis* por macrófago.

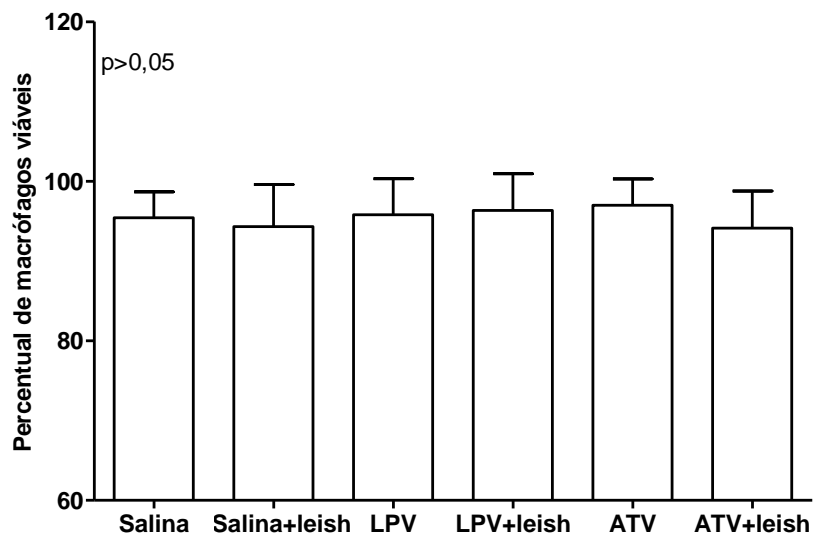


**Fig. 5.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre o índice de infecção após incubação dos macrófagos com leishmânias em condições ótimas. Cada grupo consistiu de 10 animais. Os dados estão representados como a mediana, quartis e extremos. Em (A) encontra-se o índice de infecção, em (B) o percentual de macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* e em (C) a média de *L. (L.) amazonensis* por macrófago. Em (A) LPV/RTV e ATV > Salina ( $p=0,004$ , Kruskal-Wallis+Dunn). Em (B): LPV/RTV e ATV > Salina ( $p=0,02$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls). Em (C) LPV/RTV=ATV=Salina ( $p>0,05$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls).

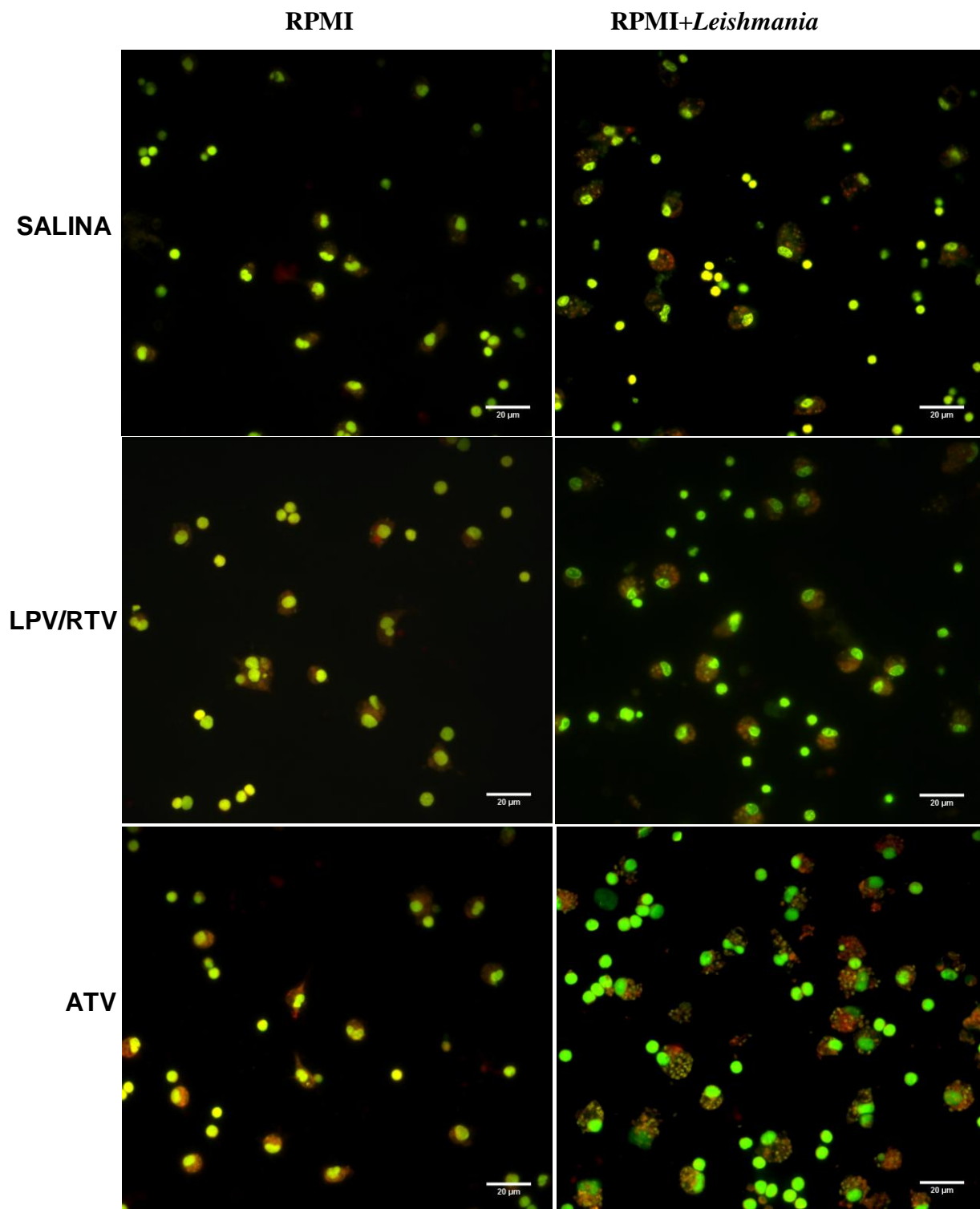
Portanto, concluímos que apenas os macrófagos de camundongos tratados com lopinavir/ritonavir aumentaram o índice de infecção dos macrófagos pelas leishmânias quando testado em condições subótimas, enquanto que em condições ótimas, ambas as drogas foram capazes de aumentar o índice de infecção dos macrófagos pelas leishmânias

#### **4.3. Os antiretrovirais não modificaram a viabilidade dos macrófagos após a incubação das células com leishmânias em condições ótimas**

Para verificarmos se o tratamento com as drogas influenciava a viabilidade dos macrófagos em cultura, quantificamos o número de macrófagos vivos ou mortos após 30 h de incubação na presença ou ausência das leishmânias após coloração com laranja de acridina. Pela análise ao microscópio de fluorescência, os macrófagos viáveis apresentavam citoplasma alaranjado e núcleo verde e as células apoptóticas apresentavam cromatina condensada e/ou fragmentada e citoplasma sem coloração. Tanto na ausência quanto na presença de *L. (L.) amazonensis*, não observamos diferenças ( $p > 0,05$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls) na viabilidade dos macrófagos dos camundongos BALB/c entre os grupos tratados com salina, lopinavir/ritonavir ou atazanavir (figuras 6 e 7). A infecção pelas leishmânias não modificou a viabilidade dos macrófagos em nenhum dos grupos estudados ( $p > 0,05$ , teste t pareado).



**Fig. 6.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a viabilidade dos macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Cada grupo foi composto por 10 animais. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão do percentual de macrófagos viáveis após coloração com laranja de acridina (5mg/mL). Verificamos que nenhum dos tratamentos empregados influenciou a viabilidade dos macrófagos incubados na ausência ou presença de *L. (L.) amazonensis* ( $p > 0,05$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls). A infecção pelas leishmânias não modificou a viabilidade dos macrófagos em nenhum dos grupos estudados ( $p > 0,05$ , teste t pareado).



**Fig. 7.** Microscopia de fluorescência mostrando macrófagos peritoneais de camundongos tratados com salina, lopinavir/ritonavir e atazanavir incubados ou não com leishmânias em condições ótimas corados com laranja de acridina (5mg/mL). À esquerda da figura encontram-se os macrófagos na ausência dos parasitos e no lado direito, na presença das leishmânias. Foram consideradas células viáveis aquelas que apresentaram citoplasma alaranjado e núcleo verde e células apoptóticas aquelas com cromatina condensada e/ou fragmentada e com citoplasma sem coloração. Aumento de 400X.

#### 4.4. Número de células aderidas às lamínulas

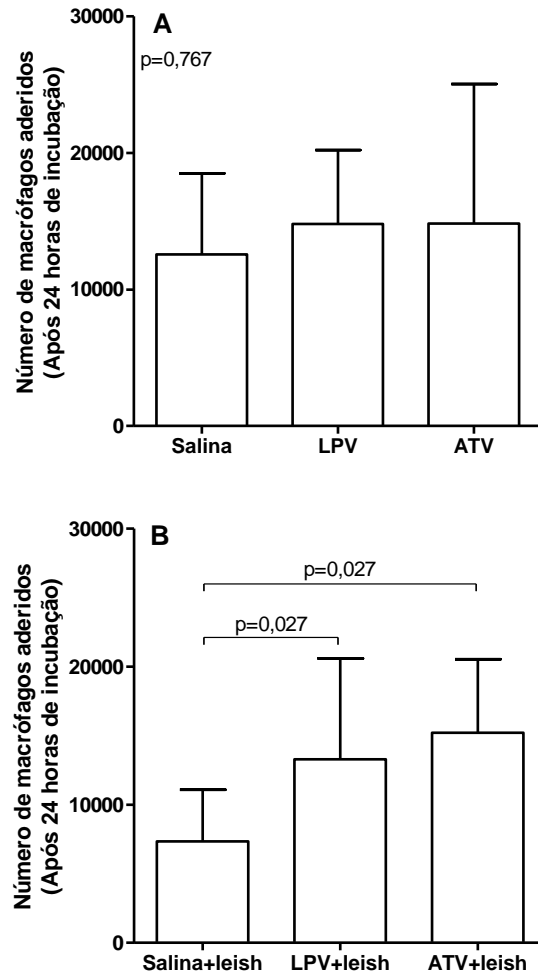
##### 4.4.a. Os antiretrovirais não apresentaram toxicidade para os macrófagos em condições subótimas

Para verificar se havia toxicidade para os macrófagos pela infecção pelas leishmânias ou pelo tratamento com as drogas antiretrovirais quantificamos o número de macrófagos que permaneceram aderidos às lamínulas na ausência ou presença da infecção pela leishmânia, após 24 h de incubação com os parasitos.

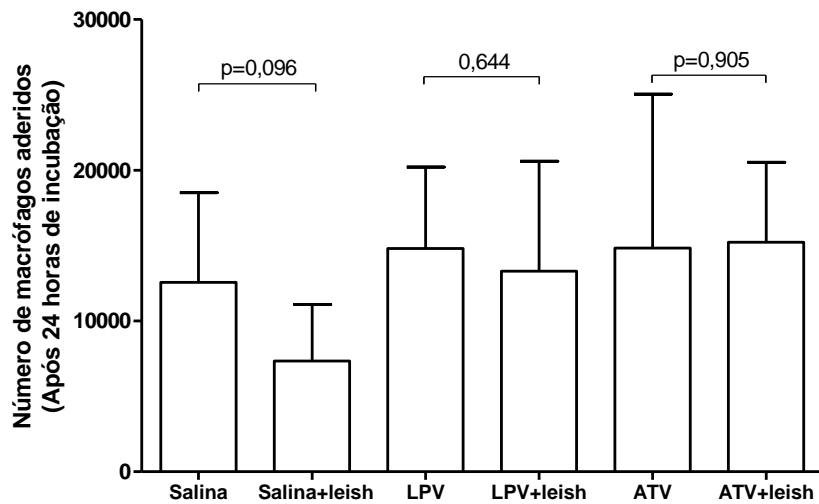
Quando avaliamos o número de macrófagos aderidos após a infecção pela leishmânia, observamos que os grupos tratados com lopinavir/ritonavir ( $p=0,02$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls) e com atazanavir ( $p=0,02$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls) apresentaram um maior número de macrófagos aderidos às lamínulas do que o grupo tratado com salina (figura 8B), sendo a média  $\pm$  DP de  $7.352 \pm 3.739$  macrófagos, no grupo tratado com salina, de  $13.300 \pm 7.303$  macrófagos, no grupo tratado com lopinavir/ritonavir e de  $15222 \pm 5312$  macrófagos, no grupo tratado com atazanavir. Diferentemente, não houve diferença no número de macrófagos aderidos às lamínulas, entre os grupos estudados, na ausência dos parasitos (figura 8A).

Ao compararmos o número de macrófagos aderidos às lamínulas, na ausência e presença de *L. (L) amazonensis* (figura 9), observamos que houve uma tendência a uma diminuição do número de macrófagos aderidos às lamínulas na presença dos parasitos no grupo tratado com salina ( $12.563 \pm 5.941$  versus  $7.352 \pm 3.739$ ) ( $p=0,096$ , teste t pareado), mas não nos grupos tratados com lopinavir/ritonavir ( $p=0,644$ , teste t pareado) e atazanavir ( $p=0,905$ , teste t pareado).





**Fig. 8.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre o número de células aderidas às lamínulas quando os macrófagos foram incubados ou não com leishmânias em condições subótimas. Cada grupo consistiu de 10 animais. Nos gráficos estão representados a média  $\pm$  desvio padrão do número de macrófagos aderidos às lamínulas. Em (A): Na ausência das leishmânias LPV/RTV=ATV=Salina ( $p=0,767$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls). Em (B): Na presença dos parasitos, LPV/RTV e ATV > Salina ( $p=0,027$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls).



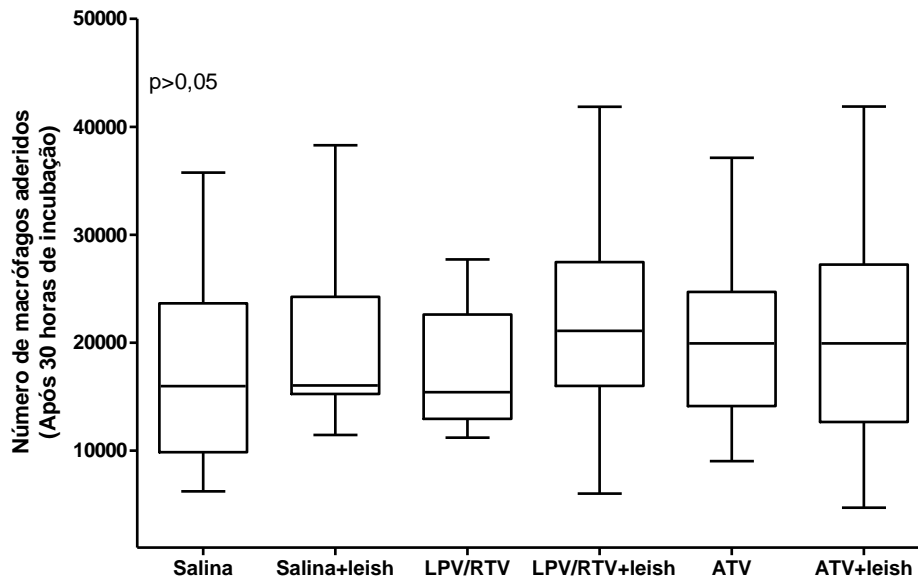
**Fig. 9.** Influência da infecção com leishmânias em condições subótimas sobre o número de células aderidas às lamínulas quando os macrófagos foram obtidos camundongos BALB/c tratados ou não com lopinavir/ritonavir e atazanavir. Cada grupo estudado consistiu de 10 animais. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão do número de macrófagos aderidos às lamínulas. Houve uma tendência a diminuição do número de macrófagos aderidos às lamínulas na presença das leishmânias no grupo tratado com Salina ( $p=0,096$ , teste t pareado), mas não nos grupos tratados com LPV/RTV ( $p=0,644$ , teste t pareado) e ATV ( $p=0,905$ , teste t pareado).

#### **4.4.b Os antiretrovirais não apresentaram toxicidade para os macrófagos em condições ótimas**

Para verificarmos se uma maior proporção de leishmânias por macrófago também influenciava o número de macrófagos aderidos às lamínulas, incubamos  $2 \times 10^5$  macrófagos com  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Diferentemente do que aconteceu quando os ensaios de aderência foram feitos com uma menor proporção de parasitos por macrófago, não foram observadas diferenças ( $p > 0,05$ , ANOVA ou Kruskal-Wallis) no número de macrófagos aderidos às lamínulas entre os grupos tratados com salina, lopinavir/ritonavir ou atazanavir quando os macrófagos foram incubados na ausência e/ou na presença de uma maior proporção de leishmânias por macrófago (figura 10). A infecção dos macrófagos pelas leishmânias não modificou o número de macrófagos aderidos em nenhum dos grupos estudados ( $p > 0,05$ , teste t pareado ou teste de Wilcoxon).

Em conclusão, o tratamento com lopinavir/ritonavir e atazanavir levou a um aumento do número de macrófagos aderidos às lamínulas apenas quando as células foram incubadas com leishmânias em condições subótimas, porém não alterou a capacidade de aderência das células incubadas apenas com o meio de cultura ou com leishmânias em condições ótimas.

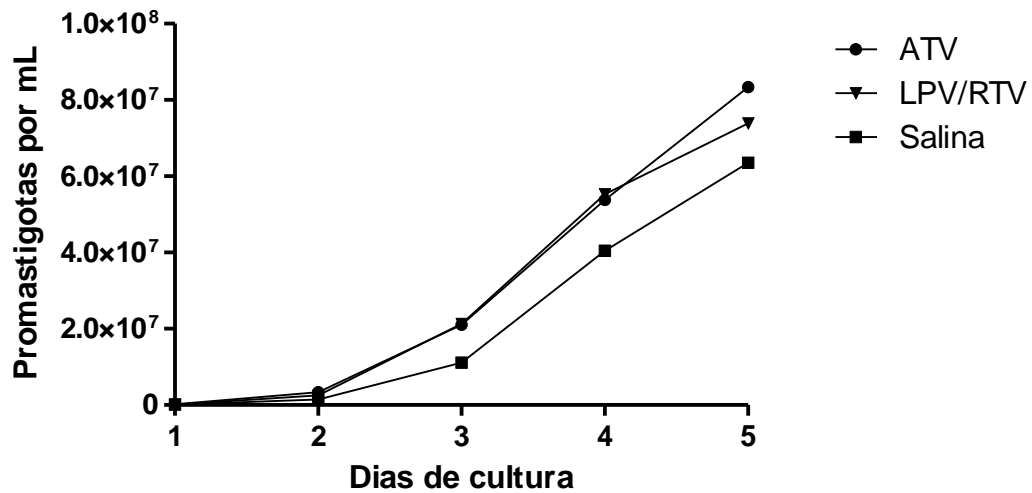


**Fig. 10.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre o número de células aderidas às lamínulas quando os macrófagos foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Cada grupo consistiu de 10 animais. Os dados foram apresentados como mediana, quartis e extremos do número de macrófagos aderidos às lamínulas. Quando analisamos o número de macrófagos aderidos às lamínulas entre os grupos estudados, na ausência e/ou presença das leishmânias, verificamos que LPV/RTV=ATV=Salina ( $p>0,05$ , ANOVA ou Kruskal-Wallis). A infecção pelas leishmânias não alterou o número de macrófagos aderidos às lamínulas em nenhum dos grupos de estudo ( $p>0,05$ , teste t pareado e teste de Wilcoxon).

#### **4.5. Lopinavir/ritonavir e atazanavir aumentaram a recuperação de leishmânias após a incubação com os macrófagos em condições ótimas**

Para verificarmos se o tratamento com os antiretrovirais influenciava a sobrevivência das leishmânias após o co-cultivo com os macrófagos, recuperamos os parasitos intracelulares que sobreviveram após 30 horas de incubação com os macrófagos e avaliamos o seu crescimento diariamente durante cinco dias.

Ao sobrepormos as curvas de crescimento, verificamos que nos grupos tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir houve um maior crescimento parasitário em todos os dias analisados (figura 11). No terceiro dia de cultivo, houve 45,1% ( $p=0,001$ , Kruskal-Wallis+método de Dunn) e 56,4% ( $p=0,001$ , Kruskal-Wallis+Dunn) mais promastigotas/mL, respectivamente, nos grupos tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir que no grupo tratado com salina.



**Fig. 11.** Curvas de crescimento de *L. (L.) amazonensis* que sobreviveram após o co-cultivo com os macrófagos. O grupo controle consistiu de 10 camundongos tratados com salina tamponada com fosfato, o grupo LPV/RTV consistiu de 10 animais tratados com lopinavir/ritonavir e o grupo ATV foi formado por 10 animais tratados com atazanavir. Cada ponto expressa a mediana do número de promastigotas por mL de meio Schneider por dia de cultura. Os grupos tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir apresentaram um maior crescimento parasitário do que o grupo tratado com salina em todos os dias analisados.

## **4.6. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos**

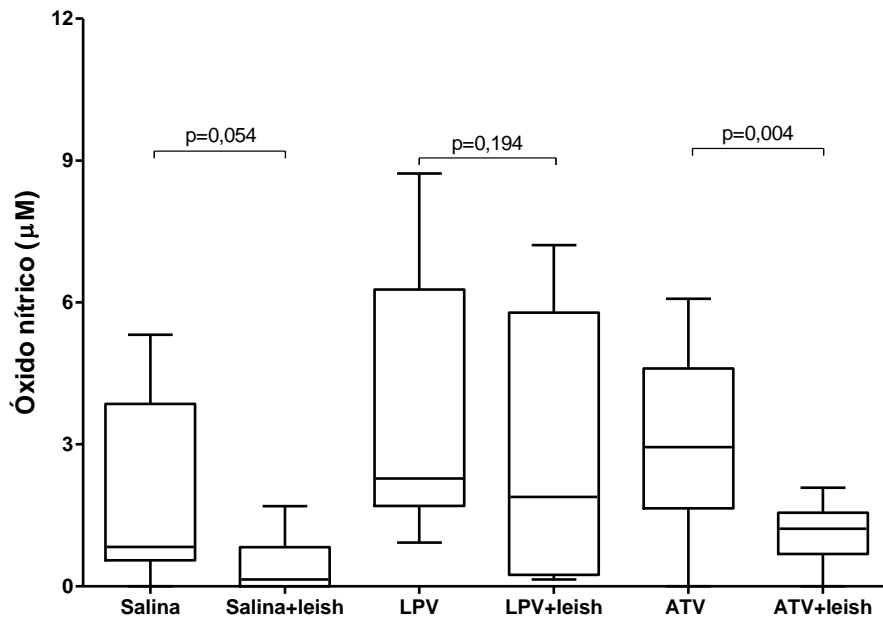
### **4.6.a O lopinavir/ritonavir recuperou em parte a depressão na produção do NO pelos macrófagos determinada pelas leishmânias em condições subótimas**

Avaliamos a produção do óxido nítrico pelos macrófagos nas primeiras 24 h em cultura, na ausência ou presença de uma menor proporção de parasitos por macrófago, para analisarmos a influência das drogas antiretrovirais sobre a capacidade de produção de moléculas leishmanicidas.

Observamos que as leishmânias diminuíram a produção de óxido nítrico pelos macrófagos do grupo tratado com salina (figura 12), sendo que a mediana da produção de óxido nítrico basal foi de 0,830  $\mu\text{M}$  e a mediana da produção de óxido nítrico estimulada pelos parasitos foi de 0,145  $\mu\text{M}$  ( $p=0,054$ , teste de Wilcoxon).

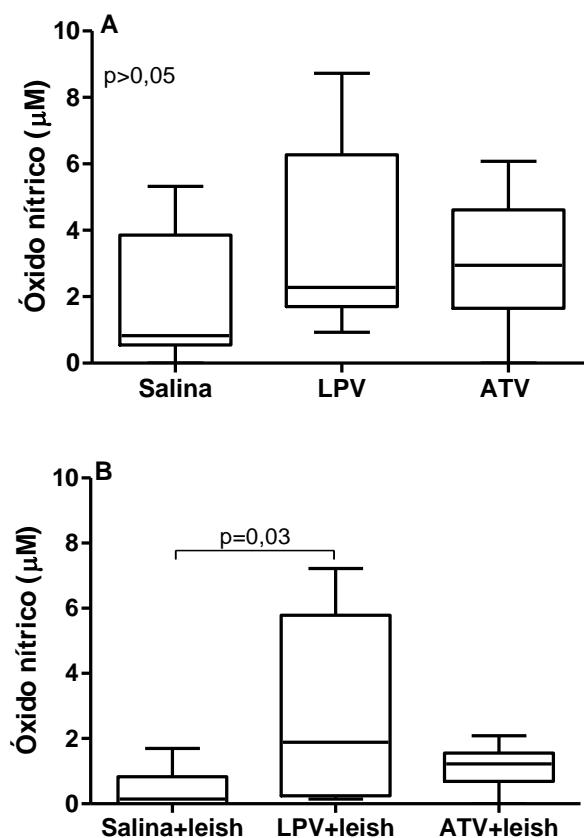
Quando analisamos a produção de óxido nítrico pelos macrófagos tratados com antiretrovirais verificamos que as leishmânias também reduziram a produção de óxido nítrico, no grupo tratado com o atazanavir (figura 12), sendo a mediana da produção basal de 2,94  $\mu\text{M}$ , enquanto que a mediana da produção estimulada foi de 1,21  $\mu\text{M}$  ( $p=0,004$ , teste t pareado). Diferentemente, não observamos modificações entre a produção basal e estimulada do óxido nítrico, no grupo tratado com lopinavir/ritonavir (figura 12), sendo que a mediana da produção de óxido nítrico sob a ação exclusiva da droga foi de 2,27  $\mu\text{M}$ , enquanto que a mediana da produção estimulada pelas leishmânias foi de 1,88  $\mu\text{M}$  ( $p=0,194$ , teste t pareado).

Ao compararmos a produção estimulada pelas leishmânias nos três grupos estudados, verificamos que o grupo tratado com lopinavir/ritonavir produziu mais óxido nítrico do que o grupo tratado com salina, sendo que a mediana do grupo tratado com lopinavir/ritonavir foi de 1,89  $\mu\text{M}$  ( $p=0,03$ , Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn) enquanto que a do grupo tratado com salina foi de 0,145  $\mu\text{M}$  (figura 13B). Não observamos diferenças na produção basal do óxido nítrico entre os três grupos estudados (figura 13A).



**Fig. 12.** Influência da infecção pelas leishmânias em condições subótimas sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos de camundongos BALB/c tratados ou não com lopinavir/ritonavir e atazanavir. Cada grupo de estudo consistiu de 10 animais. Os dados estão representados como mediana, quartis e extremos da produção de óxido nítrico. Nos grupos tratados com salina ( $p=0,054$ , teste de Wilcoxon) e ATV ( $p=0,004$ , teste t pareado) a produção de óxido nítrico estimulada pelas leishmânias foi menor do que a produção basal. Diferentemente, no grupo tratado com LPV/RTV a produção de óxido nítrico estimulada pelos parasitos foi semelhante à produção basal ( $p=0,194$ , teste t pareado).



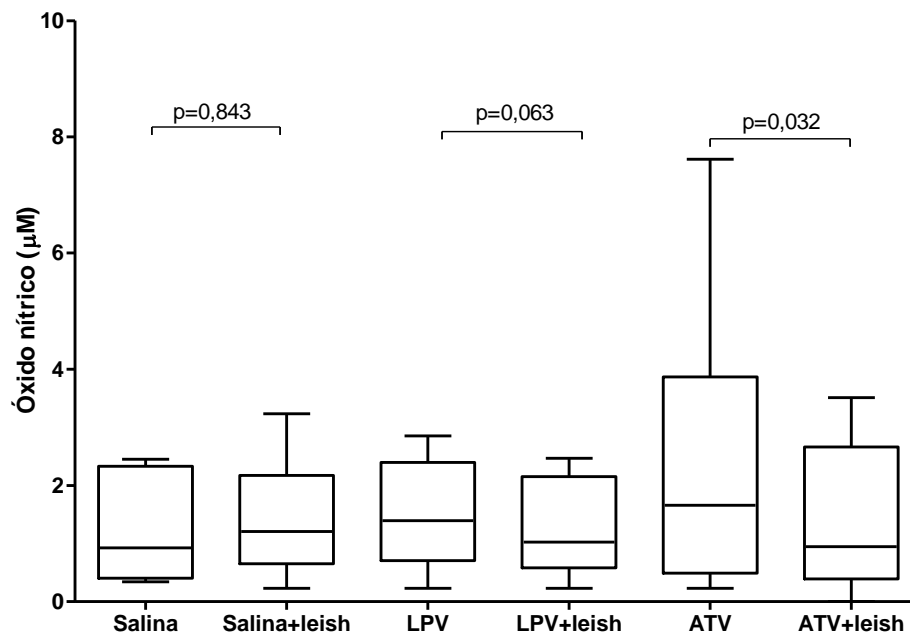


**Fig. 13.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições subótimas. Cada grupo de estudo consistiu de 10 animais. Os dados estão representados como mediana, quartis e extremos da produção de óxido nítrico. Em (A): Na ausência das leishmânias LPV/RTV=ATV=Salina ( $p > 0,05$ , Kruskal-Wallis+Dunn). Em (B): Na presença dos parasitos LPV/RTV > Salina ( $p = 0,03$ , Kruskal-Wallis+Dunn).

#### **4.6.b. Menor produção de óxido nítrico pelos macrófagos de camundongos tratados com atazanavir após incubação com leishmânias em condições ótimas**

Numa maior proporção de leishmânias, os macrófagos do grupo tratado com atazanavir produziram menos óxido nítrico quando incubados com as leishmânias, sendo que a mediana da produção basal foi de 1,656  $\mu\text{M}$ , enquanto a mediana da produção estimulada pela leishmânia foi de 0,947  $\mu\text{M}$  ( $p=0,032$ , teste t pareado). Já no grupo tratado com lopinavir/ritonavir (figura 14) houve apenas uma tendência à menor produção de óxido nítrico na presença dos parasitos, sendo que a mediana da produção basal foi de 1,394  $\mu\text{M}$ , enquanto a mediana da produção estimulada foi de 1,028  $\mu\text{M}$  ( $p=0,063$ , teste t pareado). Não foram observadas diferenças ao compararmos a produção basal e a produção estimulada pelas leishmânias entre os grupos estudados ( $p>0,05$ , Kruskal-Wallis+Dunn).

Não verificamos diferença entre a produção de óxido nítrico basal e estimulada pela leishmânia no grupo controle tratado com salina (figura 14), sendo que a mediana da produção basal foi de 0,923  $\mu\text{M}$ , enquanto que a mediana da produção estimulada foi de 1,209  $\mu\text{M}$  ( $p=0,843$ , teste de Wilcoxon).



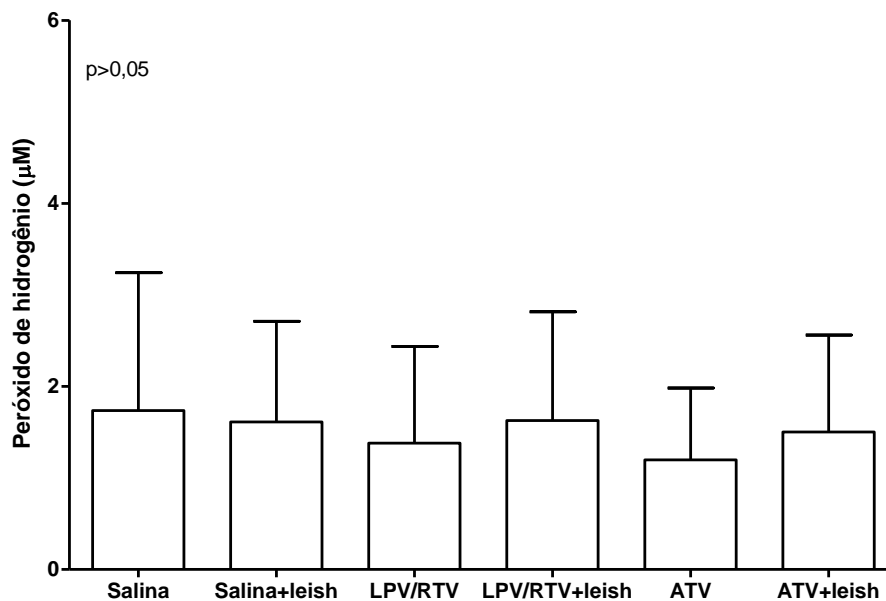
**Fig. 14.** Influência da infecção pelas leishmânias em condições ótimas sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos de camundongos BALB/c tratados ou não com lopinavir/ritonavir e atazanavir. Cada grupo foi composto por 10 animais. Os dados estão representados como mediana, quartis e extremos da produção de óxido nítrico. Verificamos que não houve diferença entre a produção basal e estimulada do óxido nítrico, no grupo tratado com salina ( $p=0,843$ , teste de Wilcoxon). Diferentemente, no grupo tratado com ATV, ocorreu uma redução da produção do óxido nítrico na presença das leishmânias ( $p=0,032$ , teste t pareado). Já no grupo tratado com LPV/RTV ocorreu uma tendência à diminuição da produção estimulada pelas leishmânias de óxido nítrico ( $p=0,063$ , teste t pareado). Não foram observadas diferenças na produção de óxido nítrico basal e estimulada pelas leishmânias entre os grupos estudados ( $p>0,05$ , Kruskal-Wallis+Dunn).

Concluimos que o tratamento com lopinavir/ritonavir e o atazanavir não influenciou a produção de óxido nítrico pelos macrófagos incubados apenas com o meio de cultura. Esses medicamentos, também não estimularam a produção de óxido nítrico pelos macrófagos incubados com leishmânias em condições ótimas, e embora a produção de óxido nítrico dos macrófagos dos animais tratados com os antiretrovirais incubados com parasitos em condições subótimas tenha sido mais elevada, a quantidade produzida ou foi semelhante ou foi menor do que a dos macrófagos incubados apenas com o meio de cultura.

#### **4.7. Os antiretrovirais não influenciaram a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos incubados com as leishmânias em condições ótimas**

Para verificarmos se uma maior proporção de leishmânias por macrófago também influenciava a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos, incubamos  $2 \times 10^5$  macrófagos com  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Observamos que não houve diferença entre a produção de peróxido de hidrogênio basal e estimulada pelas leishmânias (figura 15) nos grupos tratados com salina, lopinavir/ritonavir e atazanavir ( $p > 0,05$ , teste t pareado). Também não observamos diferenças entre os grupos estudados tanto na presença quanto na ausência de *L. (L.) amazonensis* ( $p > 0,05$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls).

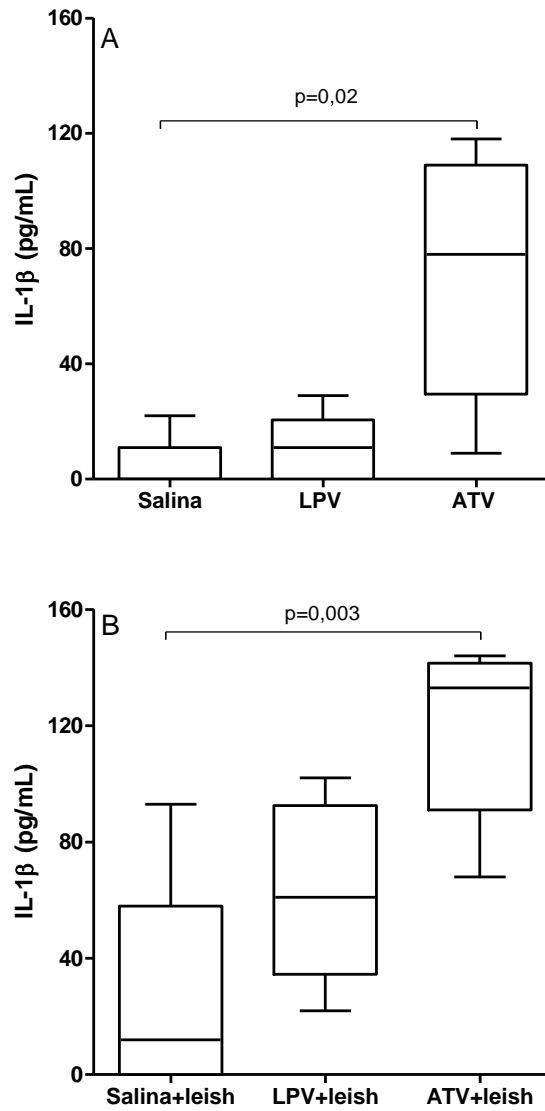


**Fig. 15.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Cada grupo foi constituído por 10 animais. Os dados estão representados como a média  $\pm$  desvio padrão da produção de peróxido de hidrogênio. Não observamos diferenças entre a produção de peróxido de hidrogênio basal e estimulada pelas leishmânias ( $p > 0,05$ , teste t pareado) em nenhum dos tratamentos empregados. Não observamos diferenças entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls).

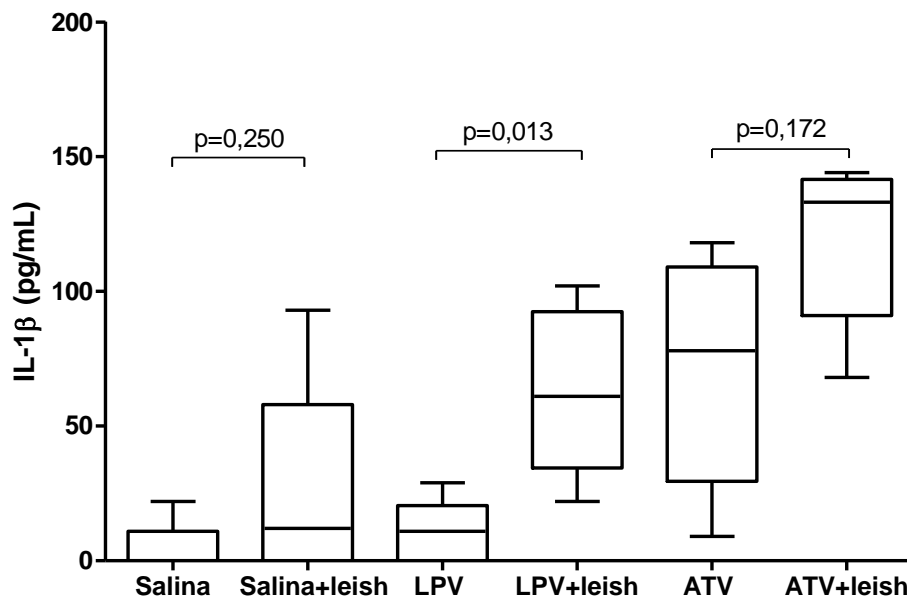
#### **4.8. Maior produção produção de IL-1 $\beta$ pelos macrófagos tratados com atazanavir e lopinavir/ritonavir (condições subótimas)**

Verificamos que o grupo tratado com atazanavir produziu maior quantidade IL-1 $\beta$  do que o grupo tratado com salina, sendo que a mediana da produção basal (figura 16A), no grupo tratado com atazanavir, foi de 78,0 pg/mL, enquanto que no grupo tratado com salina foi de 0,0 pg/mL ( $p=0,02$ , Kruskal-Wallis+Dunn). O mesmo ocorreu quando a produção foi avaliada após o estímulo com as leishmânias, sendo que a mediana foi de 133,0 pg/mL de IL-1 $\beta$ , no grupo tratado com atazanavir, enquanto que no grupo tratado com salina foi de 12,0 pg/mL de IL-1 $\beta$  ( $p=0,003$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls) (figura 16B).

Não observamos diferenças entre a produção de IL-1 $\beta$  basal ou estimulada pelas leishmânias, no grupo tratado com salina (figura 17), sendo que a mediana da produção basal foi de 0,0 pg/mL, enquanto que a da produção estimulada foi de 12,0 pg/mL ( $p=0,250$ , teste de Wilcoxon). O mesmo ocorreu com o grupo tratado com atazanavir (figura 17), sendo que a mediana da produção basal foi de 78,0 pg/mL, enquanto que a da produção estimulada pela leishmânia foi de 133,0 pg/mL ( $p=0,172$ , teste t pareado). Diferentemente, no grupo tratado com lopinavir/ritonavir (figura 17), houve um aumento da produção de IL-1 $\beta$  na presença das leishmânias, sendo que a mediana da produção basal foi de 11,0 pg/mL, enquanto que a da produção estimulada pela leishmânia foi de 61,0 pg/mL ( $p=0,013$ , teste t pareado).



**Fig. 16.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de IL-1 $\beta$  pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições subótimas. Cada grupo foi composto por 5 animais. Os dados estão representados como mediana, quartis e extremos da produção de IL-1 $\beta$ . Ao compararmos os resultados entre os grupos estudados, verificamos que o grupo tratado com ATV apresentou uma maior produção de IL-1  $\beta$  basal ( $p=0,02$ , Kruskal-Wallis+Dunn) e estimulada pela leishmânia ( $p=0,003$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls) do que o grupo tratado com salina.

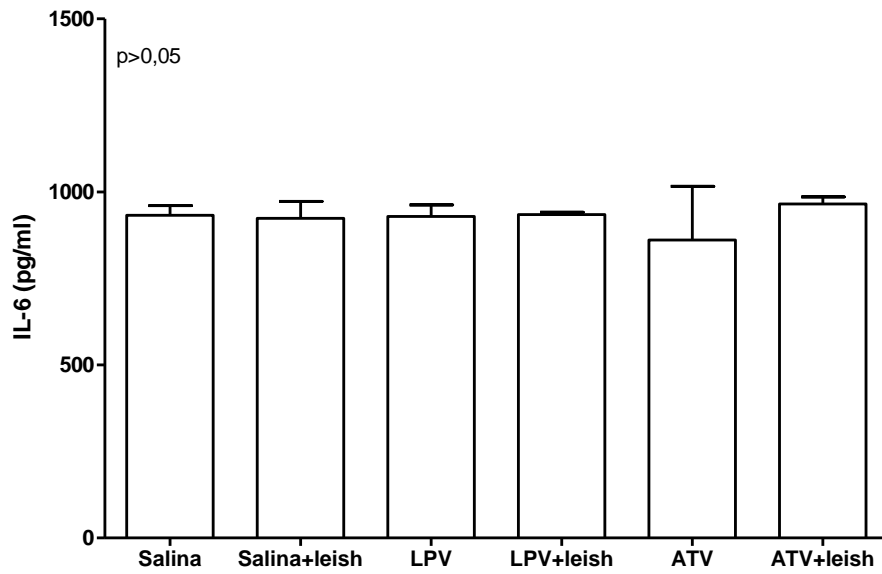


**Fig. 17.** Influência da infecção pelas leishmânias em condições subótimas sobre a produção de IL-1 $\beta$  pelos macrófagos de camundongos BALB/c tratados ou não com lopinavir/ritonavir e atazanavir. Cada grupo foi composto por 5 animais. Os dados estão representados como mediana, quartis e extremos da produção de IL-1 $\beta$ . Não observamos diferenças entre a produção de IL-1 $\beta$ , basal e estimulada pelas leishmânias, no grupo tratado com salina ( $p=0,250$ , teste de Wilcoxon) e ATV ( $p=0,172$ , teste t pareado). Diferentemente, houve um aumento da produção de IL-1 $\beta$  na presença das leishmânias, no grupo tratado com LPV/RTV ( $p=0,013$ , teste t pareado).



#### **4.9 A produção de IL-6 não foi influenciada pelos antiretrovirais (condições subótimas)**

A produção de interleucina-6 (figura 18) não foi influenciada pelo tratamento com salina, lopinavir/ritonavir e atazanavir ( $p=0,862$ , ANOVA seguido do teste de Student-Newman-Keuls).



**Fig. 18.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de IL-6 pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições subótimas. Cada grupo foi composto por 5 animais. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da produção de IL-6. A produção de IL-6 não foi influenciada pelo tratamento com salina, LPV/RTV e ATV ( $p > 0,05$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls).

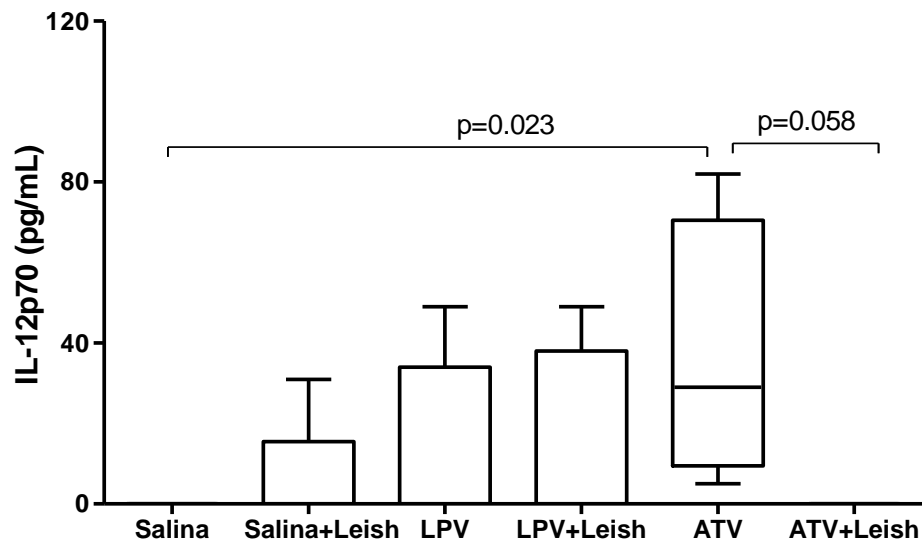
Concluimos que ambos os antiretrovirais não influenciaram a produção de IL-6 tanto na ausência quanto na presença das leishmânias, porém o tratamento com atazanavir aumentou a produção de IL-1 $\beta$  pelos macrófagos na ausência dos parasitos e, tanto o lopinavir/ritonavir quanto o atazanavir aumentaram a produção de IL-1 $\beta$  pelos macrófagos incubados com as leishmânias em condições subótimas.

#### **4.10. Produção de IL-12p70, TNF- $\alpha$ e IL-23 pelos macrófagos (em condições ótimas)**

##### **4.10.a IL-12p70**

Ao avaliarmos a influência do tratamento com os antiretrovirais sobre a produção de IL-12, observamos que na ausência de parasitos, o tratamento com atazanavir aumentou significativamente a produção de IL-12 em relação ao grupo controle tratado com salina ( $p=0,023$ , Kruskal-Wallis+Dunn), sendo que a mediana da produção de IL-12 foi de 0,0 pg/mL no grupo tratado com salina e de 29,0 pg/mL no grupo tratado com ATV (figura 19). Diferentemente, nenhum dos tratamentos empregados alterou a produção de IL-12 pelos macrófagos peritoneais na presença das leishmânias ( $p=0,630$ ,Kruskal-Wallis+Dunn).

Quando comparamos a produção de IL-12 basal e estimulada pelas leishmânias, observamos que, no grupo tratado com atazanavir, a infecção dos macrófagos pelas leishmânias determinou um decréscimo da produção de IL-12 ( $p=0,058$ , teste t pareado), sendo que a mediana da produção basal foi de 29,0 pg/mL e a da produção estimulada pelos parasitos foi de 0,0 pg/mL (figura 19). Diferentemente, a infecção dos macrófagos pelos leishmânias, não alterou a produção de IL-12 nos grupos tratados com salina e LPV/RTV ( $p>0,05$ , teste de Wilcoxon).

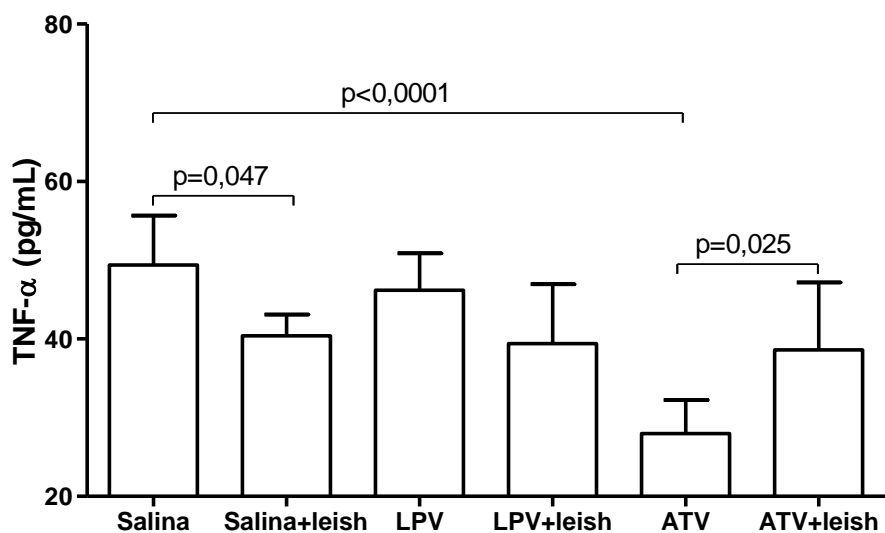


**Fig. 19.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de IL-12p70 pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Cada grupo foi composto por 5 animais. Os dados estão representados como mediana, quartis e extremos da produção de IL-12.  $ATV > Salina$  ( $p=0,023$ , Kruskal-Wallis+Dunn) e  $ATV > ATV+leish$  ( $p=0,058$ , teste t pareado).

#### 4.10.b TNF- $\alpha$

Quando o grupo tratado com salina foi comparado com o grupo tratado com atazanavir, observamos que o tratamento com o antiretroviral diminui a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos que não estavam infectados pelas leishmânias ( $p < 0,0001$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls), sendo que a média  $\pm$  DP foi de  $49,4 \pm 6,26$  pg/mL no grupo tratado com salina e de  $28,0 \pm 4,24$  pg/mL no grupo tratado com atazanavir (figura 20). Diferentemente, nenhum dos inibidores da protease do VIH alterou a produção de TNF- $\alpha$  na presença das leishmânias ( $p > 0,05$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls).

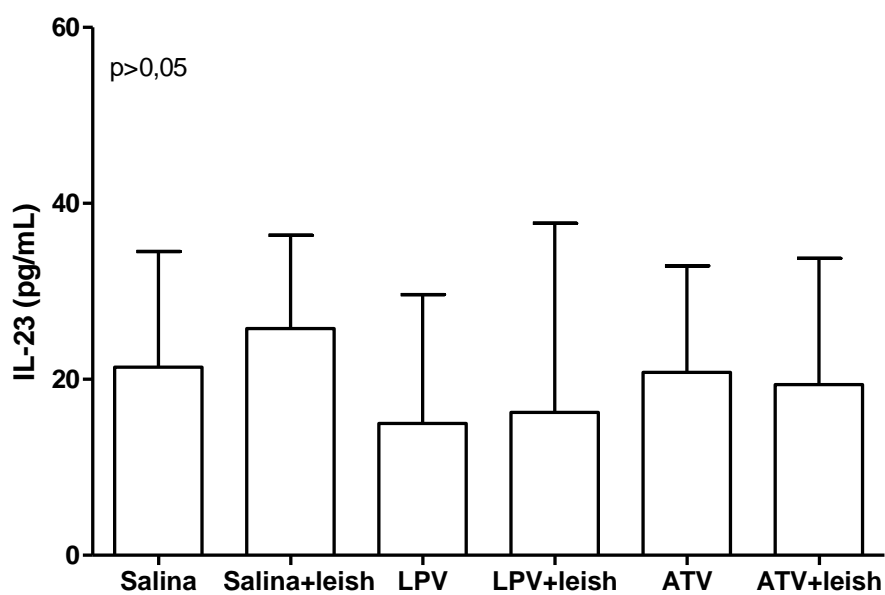
Ao analisarmos as diferenças entre a produção de TNF- $\alpha$  basal e estimulada pelas leishmânias, observamos que a infecção dos macrófagos pelos parasitos promoveu uma diminuição na produção de TNF- $\alpha$  no grupo tratado com salina ( $p = 0,047$ , teste t pareado), sendo que a média  $\pm$  DP da produção basal foi de  $49,4 \pm 6,26$  pg/mL e da produção estimulada pelas leishmânias foi de  $40,4 \pm 2,7$  pg/mL (figura 20). De maneira oposta, no grupo tratado com atazanavir, a infecção dos macrófagos pelas leishmânias ocasionou uma elevação da produção de TNF- $\alpha$  ( $p = 0,025$ , teste t pareado), sendo que a média  $\pm$  desvio padrão da produção basal foi de  $28,0 \pm 4,24$  pg/mL e a da produção estimulada pelos parasitos foi de  $38,6 \pm 8,5$  pg/mL (figura 20). Diferentemente, a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos do grupo tratado com LPV/RTV não foi afetada pela infecção com *L. (L.) amazonensis* ( $p = 0,167$ , teste t pareado).



**Fig. 20.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Cada grupo foi composto por 5 animais. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da produção de TNF- $\alpha$ . ATV < Salina ( $p < 0,0001$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls), Salina > Salina+leish ( $p = 0,047$ , teste t pareado) e ATV < ATV+leish ( $p = 0,025$ , teste t pareado).

#### **4.10.c IL-23**

A produção de IL-23 (figura 21) não foi influenciada nem pelo tratamento com os antiretrovirais nem pela infecção com os parasitos ( $p > 0,05$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls). Também não houve diferença entre a produção de IL-23 basal e estimulada pelas leishmânias em nenhum dos grupos estudados ( $p > 0,05$ , teste t pareado).



**Fig. 21.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de IL-23 pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Cada grupo foi composto por 5 animais. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão da produção de IL-23. Salina=LPV/RTV=ATV ( $p>0,05$ , ANOVA+Student-Newman-Keuls). Não houve diferença entre a produção basal e estimulada pelas leishmânias em nenhum dos grupos estudados ( $p>0,05$ , teste t pareado).

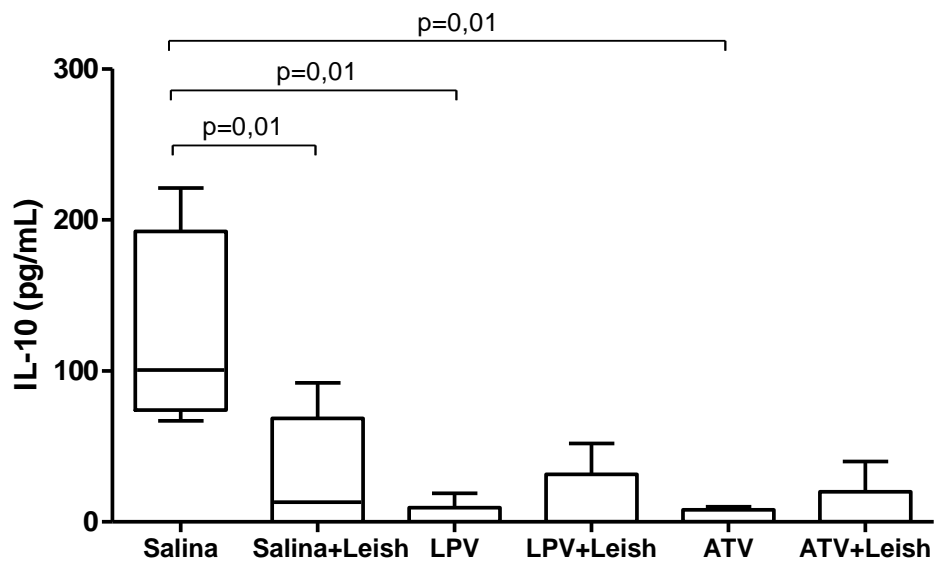


Em conclusão, não houve influência dos antiretrovirais sobre a produção de IL-23, na ausência e na presença dos parasitos. Porém, o tratamento com atazanavir aumentou a produção de IL-12p70 e reduziu a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos incubados apenas com o meio de cultura. Contudo, a infecção com leishmânias em condições ótimas suprimiu a produção de IL-12p70 e aumentou a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos dos animais tratados com atazanavir.

#### **4.11. Produção de IL-10 pelos macrófagos (em condições ótimas)**

Quando avaliamos a influência do tratamento com os antiretrovirais sobre a produção de IL-10, observamos que na ausência de parasitos, o tratamento com lopinavir/ritonavir e atazanavir diminuíram significativamente a produção de IL-10 em relação ao grupo controle tratado com salina ( $p=0,01$ , Kruskal-Wallis+Dunn), sendo que a mediana da produção de IL-10 foi de 100,5 pg/mL no grupo tratado com salina, de 0,0 pg/mL no grupo tratado com lopinavir/ritonavir e de 0,0 pg/mL no grupo tratado com ATV (figura 22). Diferentemente, nenhum dos tratamentos empregados alterou a produção de IL-10 pelos macrófagos peritoneais na presença das leishmânias ( $p=0,39$ ,Kruskal-Wallis+Dunn).

Quando comparamos a produção de IL-10 basal e estimulada pelas leishmânias, observamos que, no grupo tratado com salina, a infecção dos macrófagos pelas leishmânias determinou um decréscimo da produção de IL-10 ( $p=0,01$ , teste t pareado), sendo que a mediana da produção basal foi de 100,5 pg/mL e a da produção estimulada pelos parasitos foi de 13,0 pg/mL (figura 22). Diferentemente, a infecção dos macrófagos pelas leishmânias, não alterou a produção de IL-10 nos grupos tratados com LPV/RTV e ATV ( $p>0,05$ , teste de Wilcoxon).



**Fig. 22.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a produção de IL-10 pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Cada grupo foi composto por 5 animais. Os dados estão representados como mediana, quartis e extremos da produção de IL-10.  $ATV$  e  $LPV/RTV < Salina$  ( $p=0,01$ , Kruskal-Wallis+Dunn).

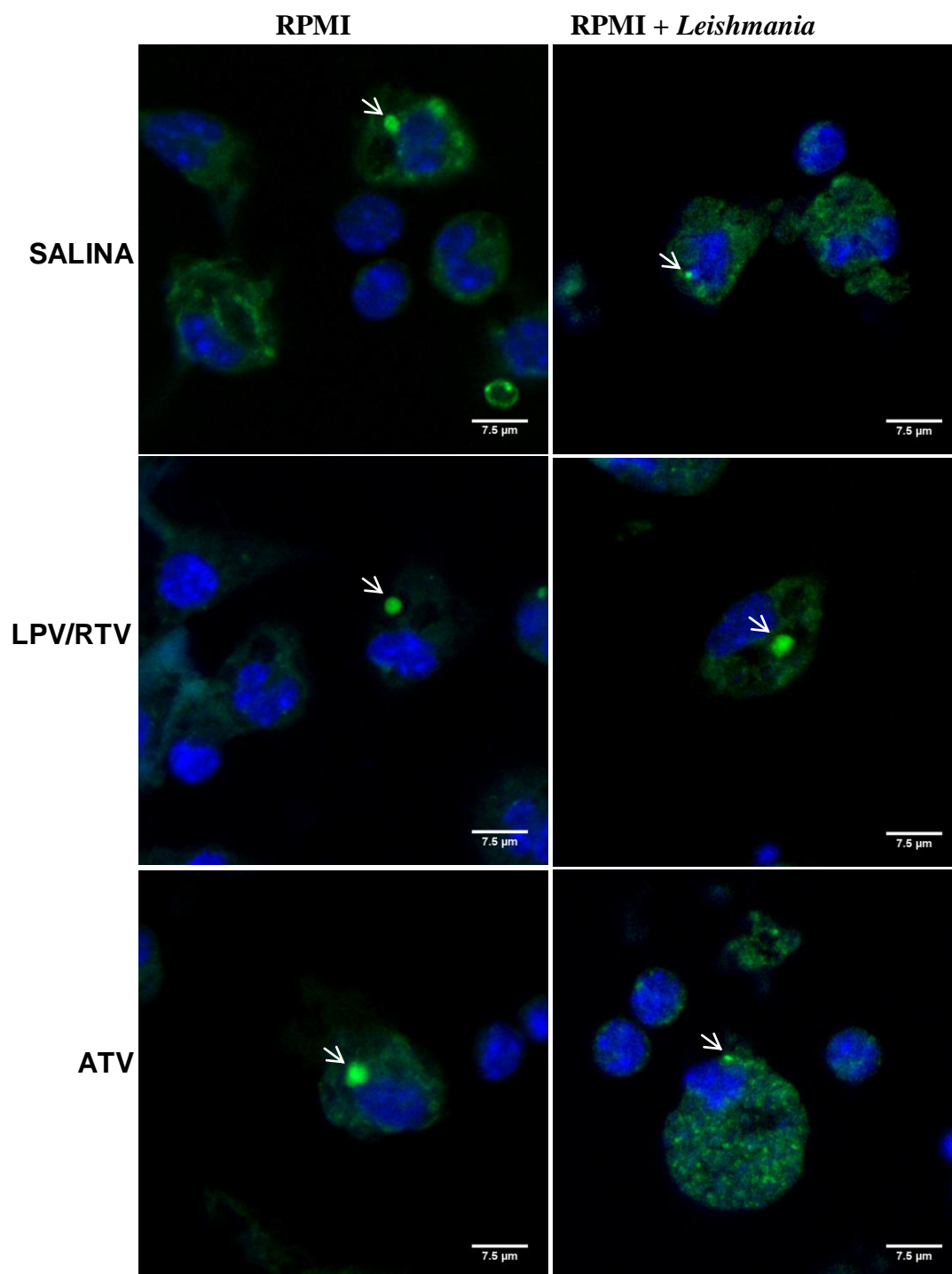
Portanto, concluímos que o tratamento com ambos os antiretrovirais reduziu a produção de IL-10 pelos macrófagos incubados com o meio de cultura, que se manteve baixa mesmo quando os macrófagos foram incubados com leishmânias em condições ótimas.

#### **4.12. Expressão dos corpúsculos lipídicos em macrófagos (em condições ótimas)**

Para verificarmos a influencia das drogas antiretrovirais ou das leishmânias sobre a expressão dos corpúsculos lipídicos, analisamos a expressão dos corpúsculos após 30 h de incubação dos macrófagos, na ausência ou presença dos parasitos.

As imagens obtidas por microscopia confocal após a coloração dos macrófagos com a sonda fluorescente Bodipy (figura 23) e a quantificação dos corpúsculos lipídicos por microscopia ótica após a coloração dos macrófagos com *Oil Red* (Tabela 1;  $p > 0,05$ , Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn) mostraram que não houve diferença entre a expressão dos corpúsculos lipídicos dos grupos tratados com antiretrovirais quando comparada a do grupo tratado com salina, tanto na ausência quanto na presença das leishmânias ( $p > 0,05$ , Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn).

Tempo de incubação: 30 horas



**Fig. 23.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a expressão dos corpúsculos lipídicos em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Macrófagos peritoneais incubados ou não por 30 h com  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram fixados com PFA 4%. A seguir, as células foram sequencialmente incubadas com sonda fluorescente Bodipy (1:400) e DAPI (1:5000) para análise por microscopia confocal. À esquerda da figura estão os macrófagos na ausência dos parasitos e no lado direito, na presença das leishmânias. Após 30 h de incubação, não observamos diferenças na expressão dos corpúsculos lipídicos entre os grupos estudados, tanto na ausência quanto na presença das leishmânias. Velocidade: 100 Hz. Pinhole: 95,5 μm. Zoom 4.5x.

**Tabela. 1.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a expressão dos corpúsculos lipídicos em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas

<b>Índice de corpúsculos lipídicos</b>					
Salina (n=6)	LPV (n=6)	ATV (n=6)	Salina+Leish (n=6)	LPV+Leish (n=6)	ATV+leish (n=6)
3,6 (1,5 - 7,1)	2,5 (0,5 - 6,5)	3,9 ( 2,5 - 5,5)	0,0 (0,0 - 7,1)	1,0 (0,0 - 1,5)	3,0 (0,0 - 12,01)
p>0,05, Kruskal-Wallis+Dunn			p>0,05, Kruskal-Wallis+Dunn		
<b>Número médio de corpúsculos lipídicos por macrófago</b>					
Salina (n=6)	LPV (n=6)	ATV (n=6)	Salina+Leish (n=6)	LPV+Leish (n=6)	ATV+leish (n=6)
1,2 ( 1,0 - 4,7)	1,0 (1,0 - 1,6)	1,5 (1,3 - 1,6)	0,0 (0,0 - 4,7)	1,5 (0,0 - 3,0)	1,5 (0,0 - 3,43)
p>0,05, Kruskal-Wallis+Dunn			p>0,05, Kruskal-Wallis+Dunn		
<b>Percentual de macrófagos expressando corpúsculos lipídicos</b>					
Salina (n=6)	LPV (n=6)	ATV (n=6)	Salina+Leish (n=6)	LPV+Leish (n=6)	ATV+leish (n=6)
1,5 (1,5 - 3,0)	2,5 (0,5 - 4,0)	3,0 (1,5 - 3,5)	0,0 (0,0 - 1,5)	0,0 (0,0 - 0,5)	2,0 (0,0 - 3,5)
p>0,05, Kruskal-Wallis+Dunn			p>0,05, Kruskal-Wallis+Dunn		

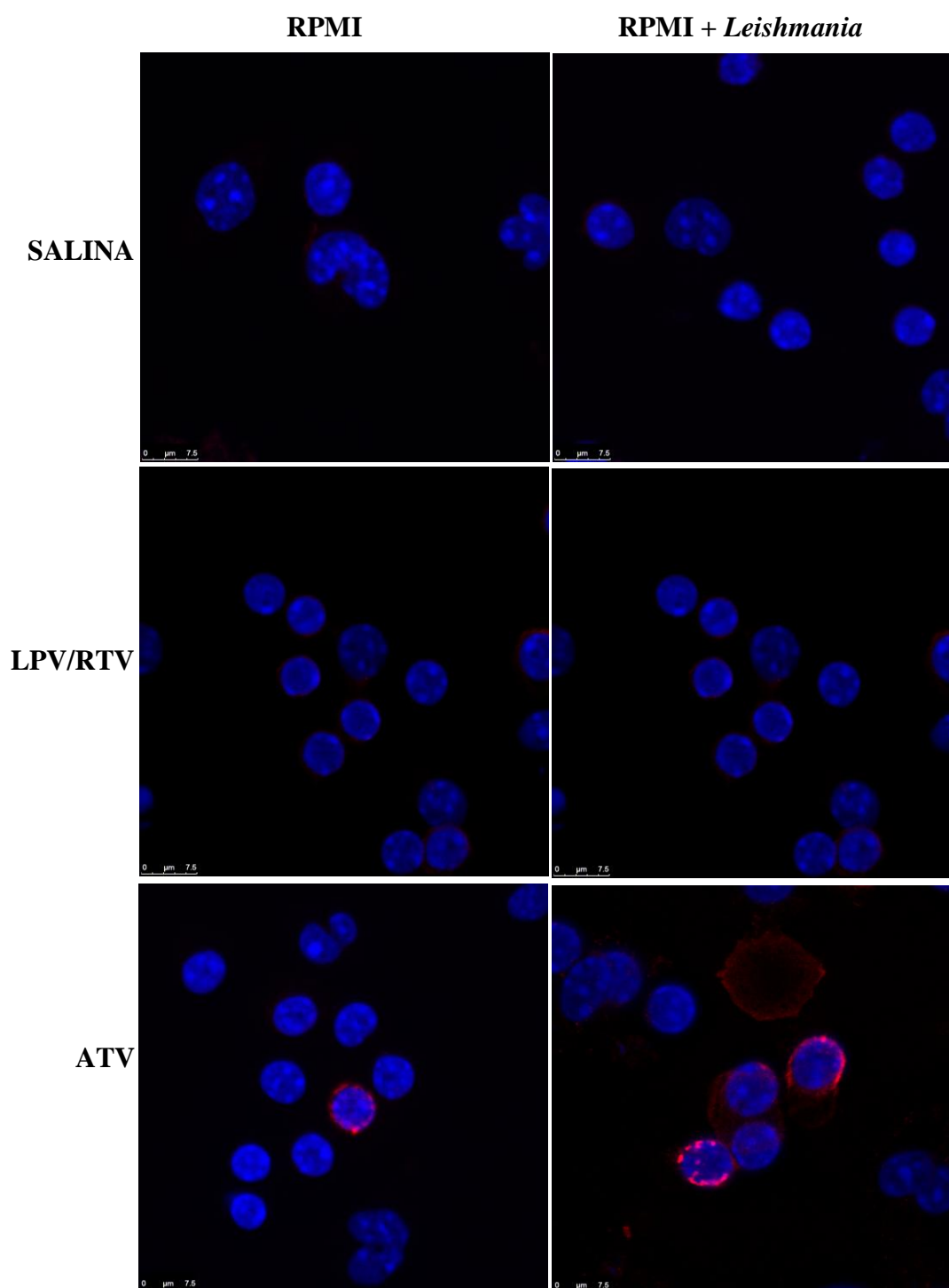
#### **4.13. Imagens representativas da translocação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B para os núcleos de macrófagos (em condições subótimas)**

Para avaliarmos se o tratamento com lopinavir/ritonavir e atazanavir influenciava as vias de sinalização dos macrófagos envolvidas na defesa contra as leishmânias, analisamos por microscopia confocal a translocação NF- $\kappa$ B (p65) para os núcleos dos macrófagos incubados por 1 h, 4 h e 24 h, na ausência ou presença das leishmânias. Realizamos também cortes ortogonais dos núcleos, para obtenção das imagens considerando o eixo Z, que marca a profundidade do corte, para confirmar que o fator de transcrição NF- $\kappa$ B p65 encontrava-se no interior do núcleo.

Observamos que, tanto o grupo tratado com salina quanto o grupo tratado com lopinavir/ritonavir, apresentaram translocação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B para os núcleos dos macrófagos após 4 horas (figuras 27 e 29) e 24 horas (figuras 30 e 31) de incubação com os parasitos. Entretanto, o tratamento com atazanavir promoveu a translocação do NF- $\kappa$ B (p65) para os núcleos dos macrófagos mais precocemente, já ocorrendo após 1 hora (figuras 24 e 26) e 4 horas (figuras 27 e 29) de incubação dos macrófagos com as leishmânias.

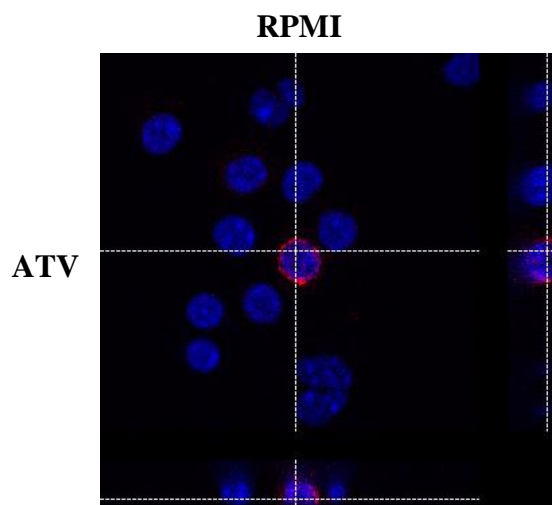
Diferentemente, não houve translocação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B para os núcleos dos macrófagos dos camundongos não incubados com as leishmânias que foram tratados apenas com salina e lopinavir/ritonavir em qualquer tempo avaliado (figuras 24, 27 e 30). Entretanto, nos animais tratados com o atazanavir, a translocação do NF- $\kappa$ B (p65) já foi detectada após 1 hora (figuras 24 e 25) e 4 horas (figuras 27 e 28) de incubação dos macrófagos em meio de cultura.

Tempo de incubação: 1 hora

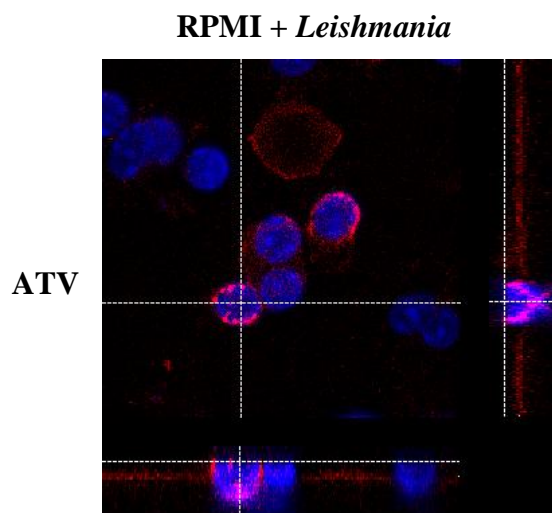


**Fig. 24.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a translocação da subunidade p53 do NF- $\kappa$ B para os núcleos dos macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições subótimas. Macrófagos foram fixados com PFA 4%. A seguir, foram sequencialmente incubados com anticorpos primários anti-p53 (1:200), anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 546 (1:3000) e DAPI (1:5000) para análise por microscopia confocal. Marcação em vermelho indica positividade para o alexa fluor e em azul marca o núcleo pelo DAPI. À esquerda da figura estão os macrófagos na ausência dos parasitos e no lado direito na presença das leishmânias. Os macrófagos do grupo tratado com ATV apresentaram translocação do NF- $\kappa$ B (p53) para os núcleos, tanto na ausência quanto na presença das leishmânias. Velocidade: 100Hz. Pinhole: 95,5  $\mu$ m. Zoom 4x.

**Tempo de incubação: 1 hora**



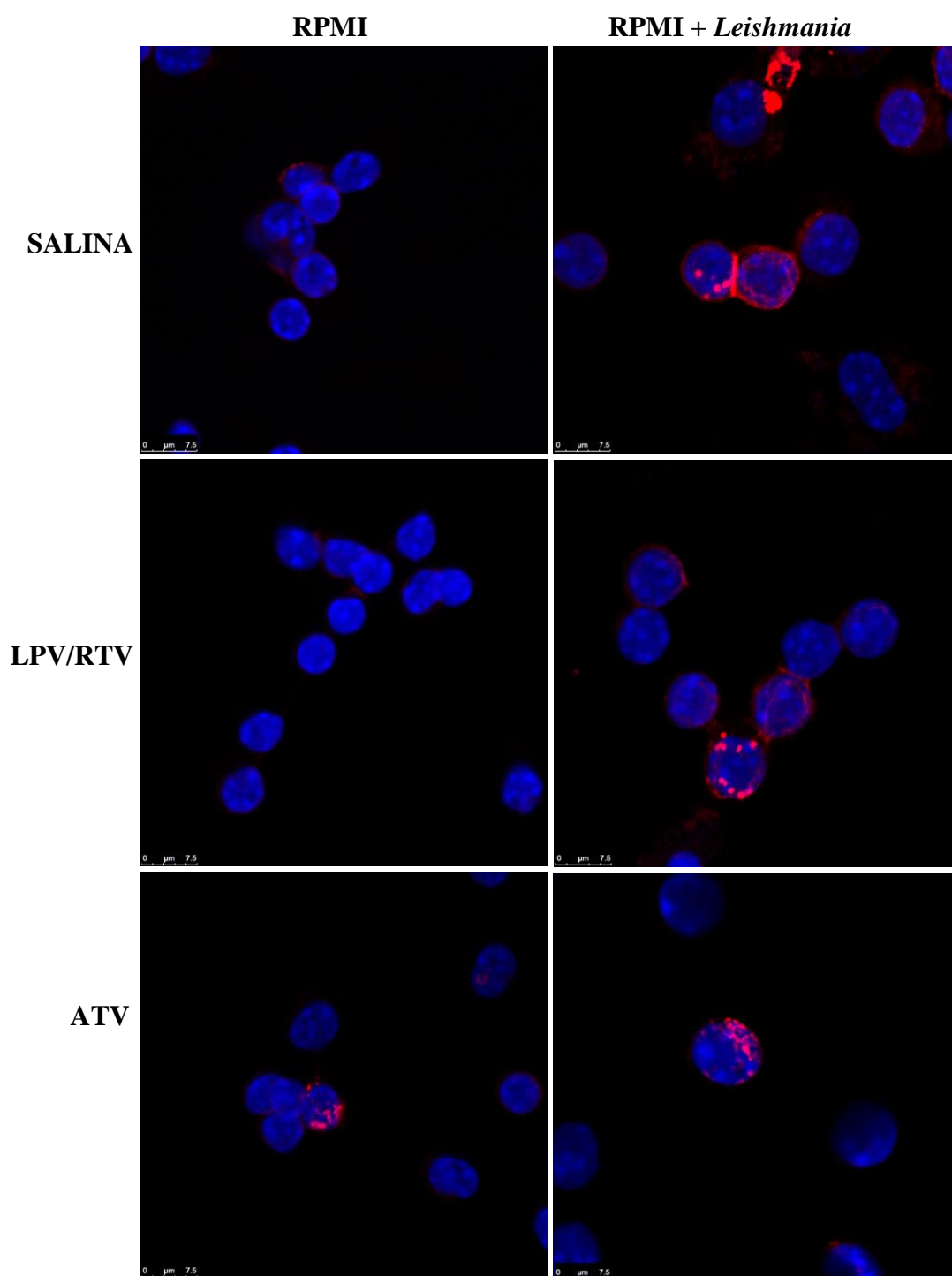
**Fig. 25.** Corte ortogonal de núcleo de macrófago peritoneal de camundongo BALB/c tratado com atazanavir incubado por 1 h com RPMI. Marcação em vermelho indica positividade para o alexa fluor e em azul indica a marcação do núcleo pelo DAPI. Observamos a presença de marcação para o alexa fluor (vermelho) no interior do núcleo, confirmando a presença do do NF- $\kappa$ B (p65) no interior do núcleo do macrófago. Velocidade: 400Hz. Pinhole: 246  $\mu$ m. Zoom 4x.



**Fig. 26.** Corte ortogonal de núcleo de macrófago peritoneal de camundongo BALB/c tratado com atazanavir incubado por 1 h com leishmânias em condições subótimas. Marcação em vermelho indica positividade para o alexa fluor e em azul indica a marcação do núcleo pelo DAPI. Observamos a presença de marcação para o alexa fluor (vermelho) no interior do núcleo, confirmando a presença do NF- $\kappa$ B (p65) no interior do núcleo do macrófago. Velocidade: 400Hz. Pinhole: 95,5  $\mu$ m. Zoom 4x.

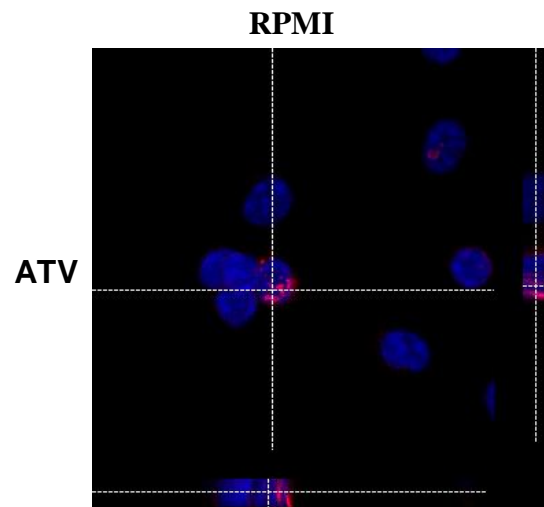


Tempo de incubação: 4 horas



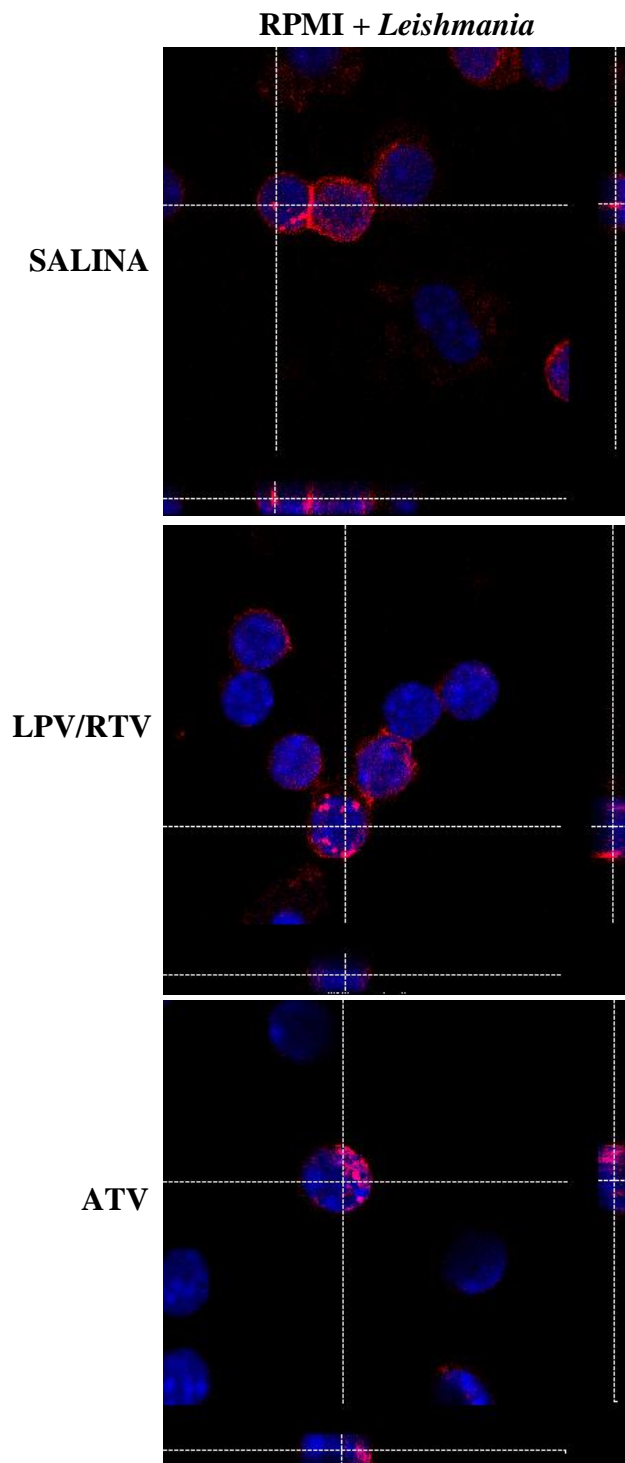
**Fig. 27.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a translocação da subunidade p50 do NF- $\kappa$ B para os núcleos de macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições subótimas. Macrófagos peritoneais incubados ou não por 4 h com leishmânias foram fixados com PFA 4%. A seguir, foram sequencialmente incubados com anticorpos primários anti-p50 (1:200), anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 546 (1:3000) e DAPI (1:5000) para análise por microscopia confocal. Marcação em vermelho indica positividade para o alexa fluor e em azul indica a marcação do núcleo pelo DAPI. À esquerda da figura estão os macrófagos na ausência dos parasitos e no lado direito, na presença das leishmânias. Na presença das leishmânias, houve translocação do NF- $\kappa$ B (p50) para os núcleos dos macrófagos em todos os grupos analisados, entretanto, na ausência dos parasitos, só ocorreu translocação do NF- $\kappa$ B (p50) para os núcleos dos macrófagos no grupo tratado com o atazanavir. Velocidade: 100Hz. Pinhole: 95,5  $\mu$ m. Zoom 4x.

**Tempo de incubação: 4 horas**



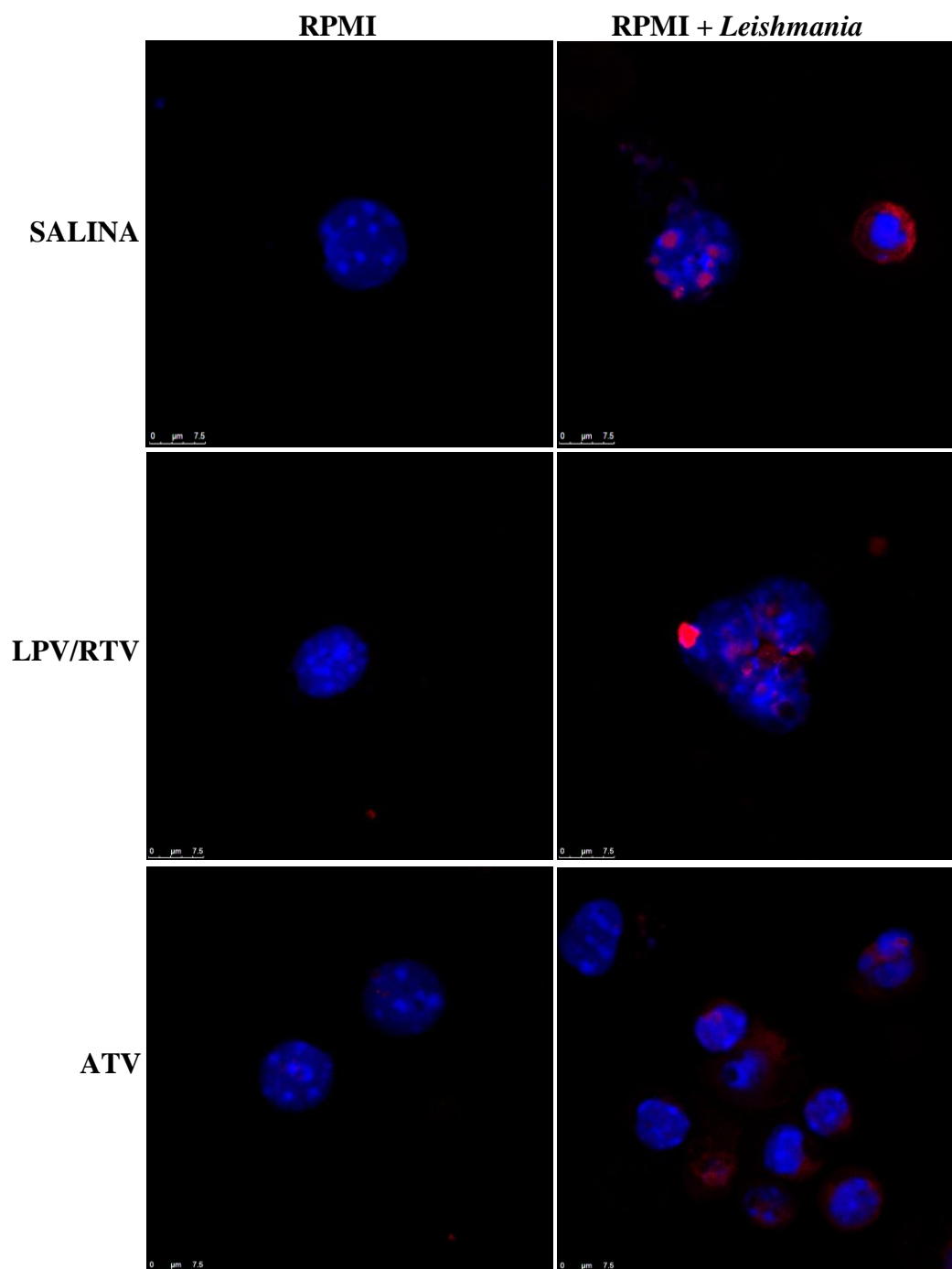
**Fig. 28.** Corte ortogonal de núcleo de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com atazanavir incubados por 4 h com meio RPMI. Marcação em vermelho indica positividade para o alexa fluor e em azul indica a marcação do núcleo pelo DAPI. Observamos a presença de marcação para o alexa fluor (vermelho) no interior do núcleo, confirmando a presença do NF- $\kappa$ B (p65) no interior do núcleo do macrófago. Velocidade: 400Hz. Pinhole: 95,5  $\mu$ m. Zoom 4x.

Tempo de incubação: 4 horas



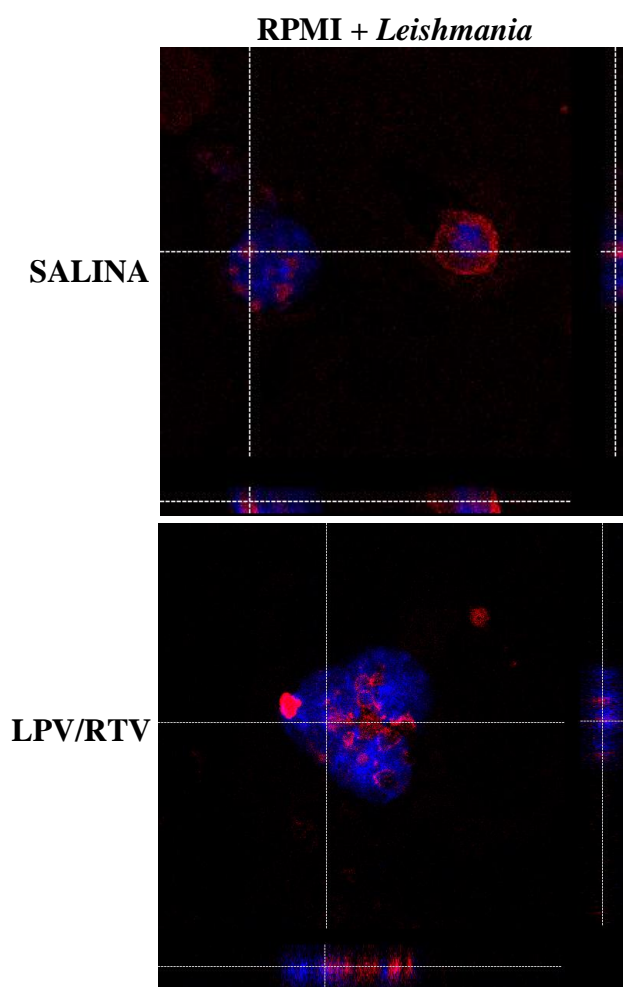
**Fig. 29.** Cortes ortogonais de núcleos de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c tratado com salina, lopinavir/ritonavir e atazanavir e incubados por 4 h com leishmânias em condições subótimas. Marcação em vermelho indica positividade para o alexa fluor e em azul indica a marcação do núcleo pelo DAPI. Observamos a presença de marcação para o alexa fluor (vermelho) no interior do núcleo, confirmando a presença do NF- $\kappa$ B (p65) no interior do núcleo do macrófago. Velocidade: 400Hz. Pinhole: 95,5  $\mu$ m. Zoom 4x.

Tempo de incubação: 24 horas



**Fig. 30.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a translocação da subunidade p55 do NF- $\kappa$ B para os núcleos de macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições subótimas. Macrófagos peritoneais incubados ou não por 24 h com leishmânias foram fixados com PFA 4%. A seguir, foram sequencialmente incubados com anticorpos primários anti-p65 (1:200), anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 546 (1:3000) e DAPI (1:5000) para análise por microscopia confocal. Marcação em vermelho indica positividade para o alexa fluor e em azul indica a marcação do núcleo pelo DAPI. À esquerda da figura estão os macrófagos na ausência dos parasitos e no lado direito, na presença das leishmânias. Após 24 horas de incubação com as leishmânias, observamos a translocação do NF- $\kappa$ B (p65) para os núcleos de macrófagos do grupo tratado com salina e LPV/RTV, mas não nos macrófagos do grupo tratado com ATV. Não encontramos o fator de transcrição nos núcleos dos macrófagos incubados apenas com o meio de cultura. Velocidade: 100Hz. Pinhole: 95,5 μm. Zoom 4x.

Tempo de incubação: 24 horas



**Fig. 31.** Corte ortogonal de núcleos de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com salina e lopinavir/ritonavir incubados por 24 h com leishmânias em condições subótimas. Marcação em vermelho indica positividade para o alexa fluor e em azul indica a marcação do núcleo pelo DAPI. Observamos a presença de marcação para o alexa fluor (vermelho) no interior do núcleo, confirmando a presença do NF- $\kappa$ B (p65) no interior do núcleo do macrófago. Velocidade: 400Hz. Pinhole: 95,5  $\mu$ m. Zoom 4x.

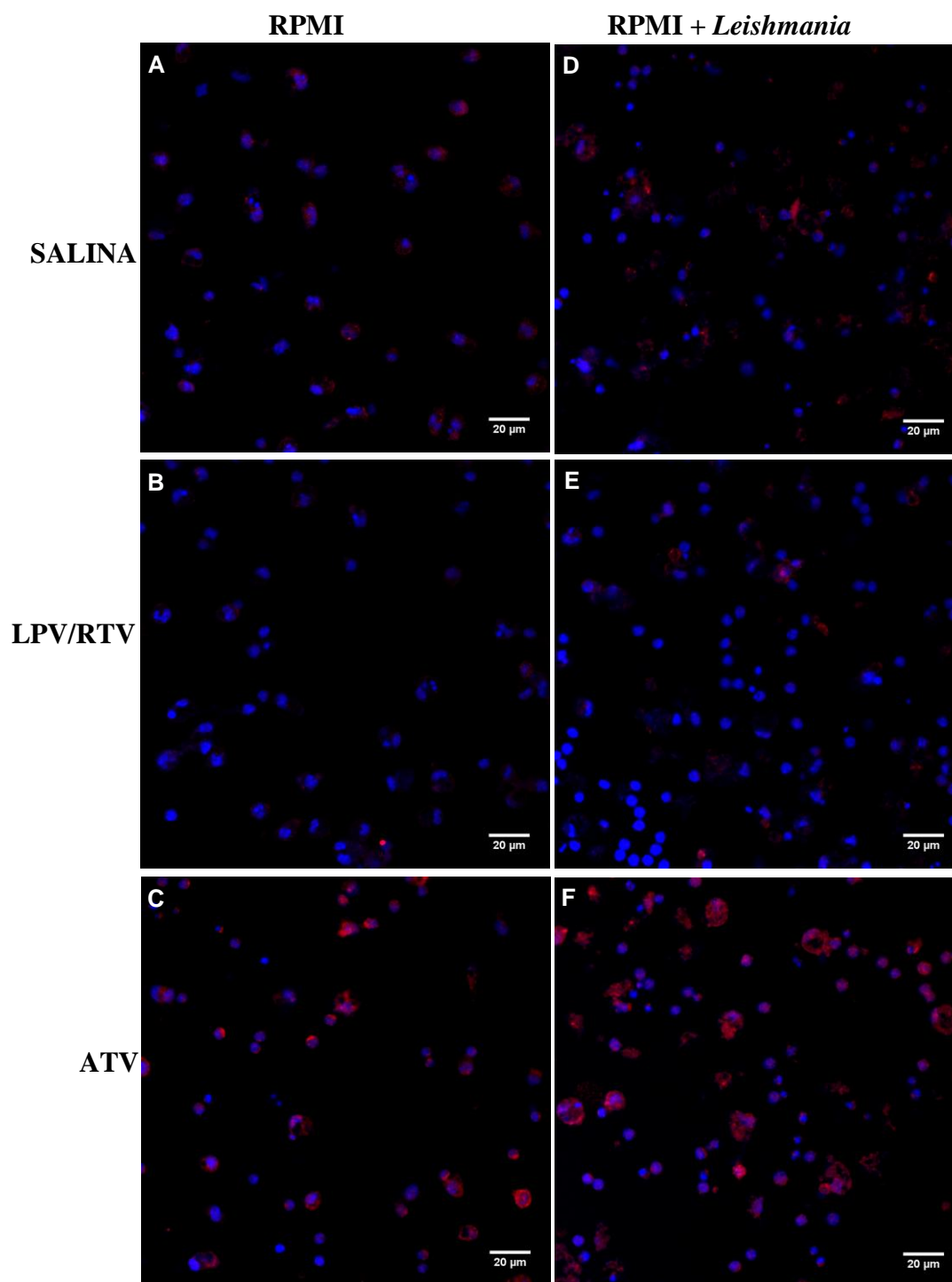
Em conclusão, apenas o tratamento com o atazanavir estimulou a translocação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B do citoplasma para os núcleos dos macrófagos incubados com o meio de cultura e favoreceu a translocação mais precoce desse fator de transcrição para os núcleos dos macrófagos incubados com leishmânias em condições subótimas.

#### **4.14. Imagens representativas e quantificação da expressão da subunidade RelB do NF- $\kappa$ B em macrófagos (condições ótimas)**

Para verificarmos a influencia das drogas antiretrovirais ou das leishmânias sobre a expressão da subunidade RelB do NF- $\kappa$ B, analisamos a expressão do RelB após 30 h de incubação dos macrófagos, na ausência ou presença dos parasitos por microscopia confocal e quantificamos utilizando o software ImageJ.

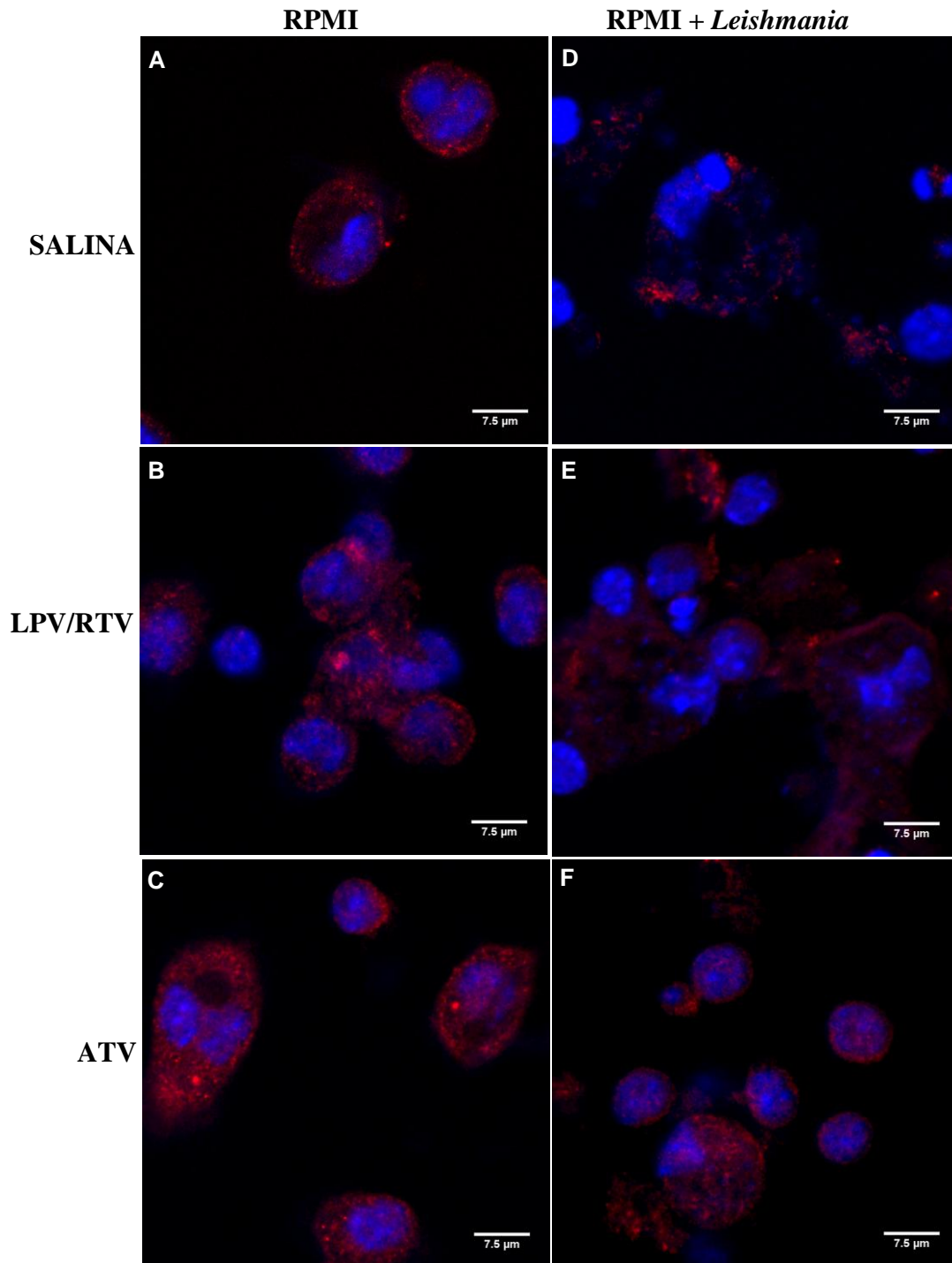
As imagens obtidas por microscopia confocal mostraram que houve uma diminuição na expressão total de RelB nos macrófagos do grupo tratado com lopinavir/ritonavir em relação ao grupo tratado com salina, tanto na ausência (figura 32A *versus* B) quanto na presença das leishmânias (figura 32D *versus* E). Já os macrófagos do grupo tratado com atazanavir, tanto na ausência (figuras 32A e B *versus* C), quanto na presença das leishmânias (figuras 32D e E *versus* F), exibiram expressão total aumentada de RelB, tanto em relação aos macrófagos do grupo tratado com salina, quanto em relação as células do grupo tratado com lopinavir/ritonavir. Nas imagens ampliadas (Figura 33), observamos que, na presença das leishmânias, houve ainda uma diminuição da expressão nuclear de RelB nos macrófagos dos camundongos tratados com salina (figura 33D) e lopinavir/ritonavir (figura 33E), mas não nos macrófagos dos camundongos tratados com atazanavir (figura 33F).

Tempo de incubação: 30 horas



**Fig. 32.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a expressão da subunidade RelB do NF- $\kappa$ B em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Macrófagos peritoneais incubados ou não por 30 h com leishmânias foram fixados com PFA 4%. A seguir, foram sequencialmente incubados com anticorpos primários anti-RelB (1:200), anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 546 (1:3000) e DAPI (1:5000) para análise por microscopia confocal. Marcação em vermelho indica positividade para o alexa fluor e em azul indica a marcação do núcleo pelo DAPI. À esquerda da figura estão os macrófagos na ausência dos parasitos e no lado direito, na presença das leishmânias. Houve diminuição da expressão total do NF- $\kappa$ B (RelB) no grupo tratado com LPV/RTV, na ausência de parasitos, e um aumento da expressão total do RelB, no grupo tratado com ATV, na presença dos parasitos, em relação ao grupo tratado com salina. Velocidade: 100 Hz. Pinhole: 95,5  $\mu$ m. Zoom 1x.

Tempo de incubação: 30 horas



**Fig. 33.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a expressão da subunidade RelB do NF- $\kappa$ B em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Macrófagos peritoneais incubados ou não por 30 h com leishmânias foram fixados com PFA 4%. A seguir, foram sequencialmente incubados com anticorpos primários anti-RelB (1:200), anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 546 (1:3000) e DAPI (1:5000) para análise por microscopia confocal. Marcação em vermelho indica positividade para o alexa fluor e em azul indica a marcação do núcleo pelo DAPI. À esquerda da figura estão os macrófagos na ausência dos parasitos e no lado direito, na presença das leishmânias. Foi observado que na presença dos parasitos houve diminuição da expressão nuclear do NF- $\kappa$ B (RelB) nos macrófagos nos grupos tratados com salina e LPV/RTV, mas não no grupo tratado com ATV. Velocidade: 100 Hz. Pinhole: 95,5 μm. Zoom 4,5x.

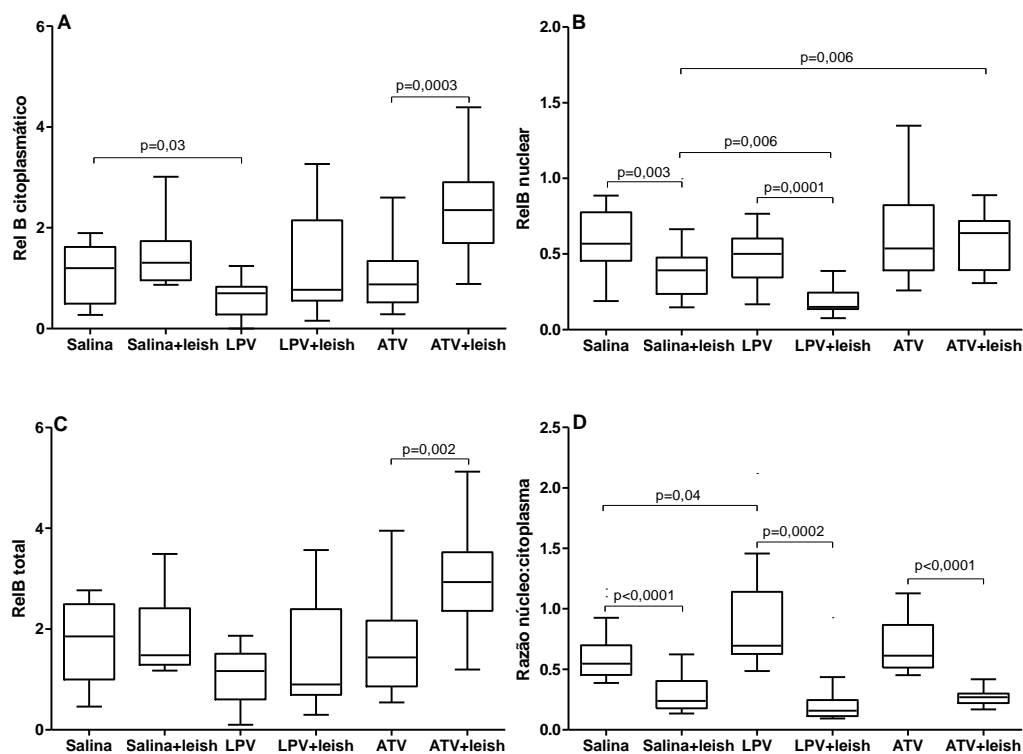


Ao quantificarmos a expressão do RelB utilizando o software ImageJ 1.47q, verificamos que a infecção com a leishmânia dos macrófagos do grupo tratado com salina acarretou uma diminuição da expressão nuclear do RelB (0,56 *versus* 0,39,  $p=0,003$ , teste t pareado, figura 34B) sem modificar sua expressão citoplasmática, o que foi confirmado pela diminuição da razão núcleo:citoplasma do fator de transcrição nos macrófagos infectados do grupo tratado com salina (0,54 *versus* 0,23;  $p<0,0001$ , teste de Wilcoxon; figura 34D).

Similarmente, no grupo tratado com lopinavir/ritonavir, a infecção pelas leishmânias acarretou a diminuição da expressão nuclear do RelB (0,50 *versus* 0,15;  $p=0,0001$ , teste t pareado; figura 34B) sem modificar sua expressão citoplasmática, o que foi confirmado pela redução da razão núcleo:citoplasma do fator de transcrição nas células infectadas do grupo tratado com lopinavir/ritonavir (0,69 *versus* 0,15;  $p=0,0002$ , teste de Wilcoxon; figura 34D).

Diferentemente, no grupo tratado com atazanavir, a infecção pelos parasitos aumentou a expressão citoplasmática do RelB (0,87 *versus* 2,35;  $p=0,0003$ , teste t pareado; figura 34A), entretanto sem promover a translocação da molécula do citoplasma para o núcleo, o que foi confirmado pela diminuição da razão núcleo:citoplasma do fator de transcrição nas células parasitadas do grupo tratado com atazanavir (0,61 *versus* 0,27;  $p<0,0001$ , teste t pareado; figura 34D).

Quando analisamos o efeito dos diferentes tratamentos sobre a expressão de RelB, observamos que os macrófagos dos animais tratados com o lopinavir/ritonavir apresentavam constitutivamente uma menor expressão citoplasmática deste fator nuclear do que o grupo controle tratado com salina (1,19 *versus* 0,70;  $p=0,03$ , ANOVA seguido do teste de Student-Newman-Keuls, figura 34A), mas isto não foi verificado no núcleo do macrófago, o que foi confirmado pela maior relação núcleo/citoplasma observado nestes animais (1,85 *versus* 1,16;  $p=0,04$ , ANOVA seguido do teste de Student-Newman-Keuls; figura 34D).



**Fig. 34.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a expressão da subunidade RelB do NF-κB em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Macrófagos peritoneais incubados ou não por 30 h com leishmânias foram fixados com PFA 4%. A seguir, foram sequencialmente incubados com anticorpos primários anti-RelB (1:200), anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 546 (1:3000) e DAPI (1:5000) para análise por microscopia confocal. Imagens foram adquiridas utilizando um microscópio Leica SP5 com um pinhole de 246 μm e uma velocidade de varredura de 100Hz. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ 1.47q. Os dados estão representados como mediana, quartis e extremos de 5 imagens adquiridas com um amplo campo de visão. As diferenças na expressão total, citoplasmática e nuclear de RelB, assim como na razão núcleo:citoplasma entre os tratamentos empregados foram analisadas utilizando os testes ANOVA ou Kruskal-Wallis e o efeito da infecção pelas leishmânias em cada grupo estudado foi investigado utilizando os testes t pareado e de Wilcoxon. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

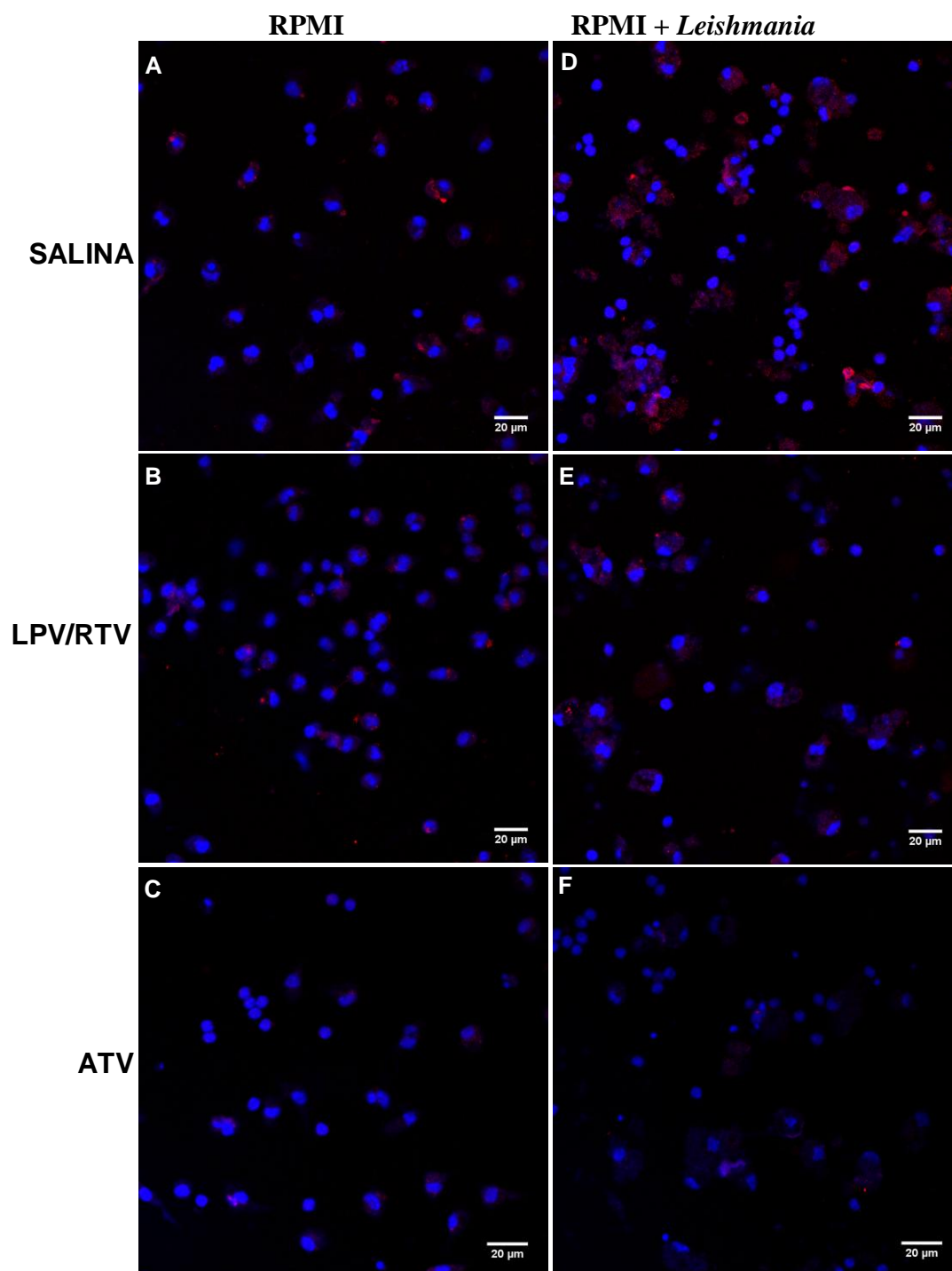
Portanto, o tratamento com lopinavir/ritonavir diminuiu a expressão citoplasmática de RelB nos macrófagos que foram incubados com o meio de cultura, sem no entanto afetar a translocação do RelB para os núcleos dos macrófagos. Contudo, a infecção dos macrófagos dos camundongos tratados com lopinavir/ritonavir com leishmânias em condições ótimas determinou uma redução da translocação de RelB para os núcleos dessas células, o que não aconteceu com os macrófagos dos animais tratados com atazanavir.

#### **4.15. Imagens representativas e quantificação da expressão do PPAR- $\gamma$ nos macrófagos (em condições ótimas)**

Para verificarmos a influencia das drogas antiretrovirais ou das leishmânias sobre a expressão do PPAR- $\gamma$ , analisamos a expressão do PPAR- $\gamma$  após 30 h de incubação dos macrófagos, na ausência ou presença dos parasitos.

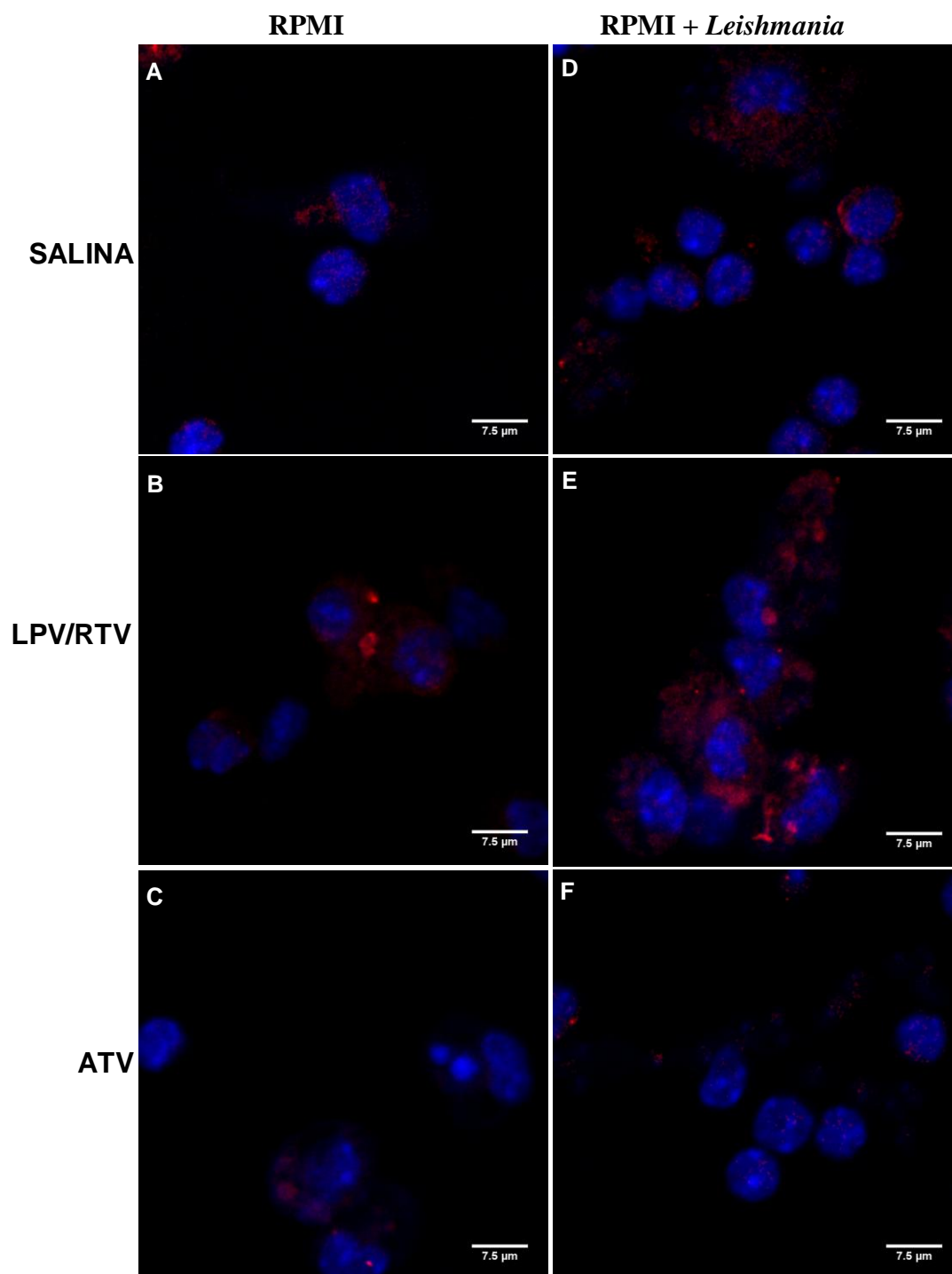
As imagens obtidas por microscopia confocal mostraram que, tanto na ausência quanto na presença das leishmânias, houve uma diminuição da expressão total (figura 35) e nuclear (Figura 36) do PPAR- $\gamma$  no grupo tratado com atazanavir em relação aos grupos tratados com salina e lopinavir/ritonavir.

Tempo de incubação: 30 horas



**Fig. 35.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a via do PPAR- $\gamma$  em macrófagos incubados ou não por 30 h com leishmânias em condições ótimas. Macrófagos peritoneais incubados ou não por 30 h com leishmânias foram fixados com PFA 4%. A seguir, foram sequencialmente incubados com anticorpos primários anti-PPAR- $\gamma$  (1:200), anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 546 (1:3000) e DAPI (1:5000) para análise por microscopia confocal. Marcação em vermelho indica positividade para o alexa fluor e em azul indica a marcação do núcleo pelo DAPI. À esquerda da figura estão os macrófagos na ausência dos parasitos e no lado direito, na presença das leishmânias. Após 30 h de incubação, observamos uma diminuição da expressão do PPAR- $\gamma$  no grupo tratado com ATV, tanto na ausência quanto na presença das leishmânias. Velocidade: 100 Hz. Pinhole: 95,5  $\mu$ m. Zoom 1x.

Tempo de incubação: 30 horas

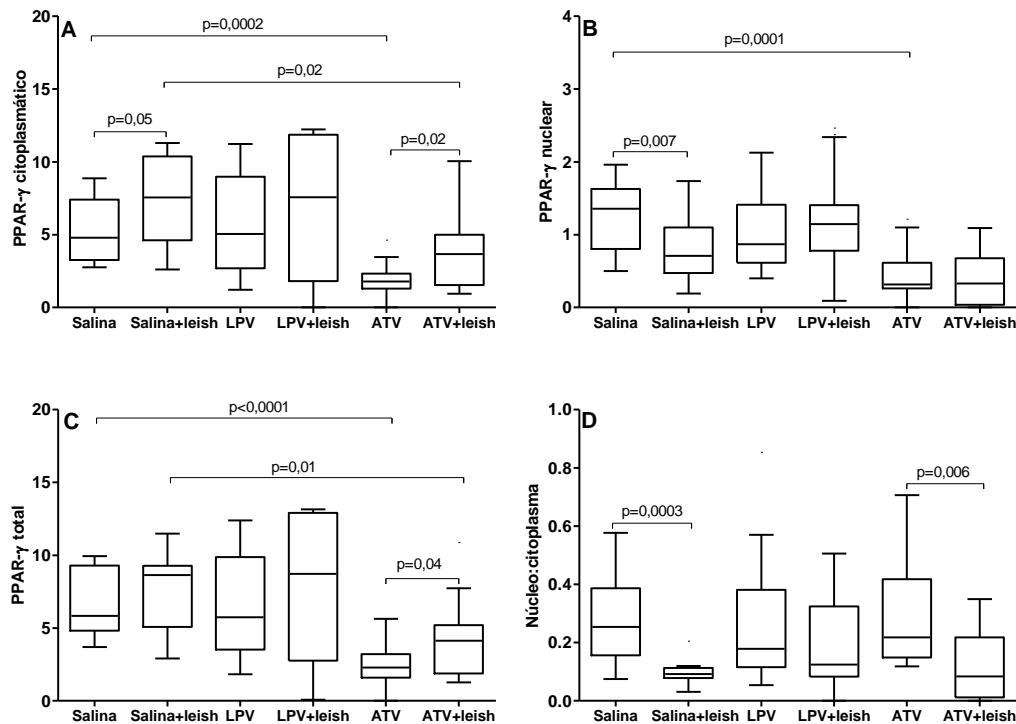


**Fig. 36.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a via do PPAR- $\gamma$  em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Macrófagos peritoneais incubados ou não por 30 h com leishmânias foram fixados com PFA 4%. A seguir, foram sequencialmente incubados com anticorpos primários anti-PPAR- $\gamma$  (1:200), anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 546 (1:3000) e DAPI (1:5000) para análise por microscopia confocal. Marcação em vermelho indica positividade para o alexa fluor e em azul indica a marcação do núcleo pelo DAPI. À esquerda da figura estão os macrófagos na ausência dos parasitos e no lado direito, na presença das leishmânias. Após 30 h de incubação, observamos uma diminuição da expressão nuclear do PPAR- $\gamma$  no grupo tratado com ATV, tanto na ausência quanto na presença das leishmânias. Velocidade: 100 Hz. Pinhole: 95,5  $\mu$ m. Zoom 4,5x.

Ao quantificarmos a expressão do PPAR- $\gamma$  utilizando o software ImageJ 1.47q, observamos que, a infecção dos macrófagos dos animais tratados com salina pelas leishmânias aumentou a expressão citoplasmática do PPAR- $\gamma$  (4,78 *versus* 7,55;  $p=0,05$ , teste t pareado; figura 37A), entretanto, houve uma redução concomitante na expressão nuclear (1,35 *versus* 0,70;  $p = 0,007$ , teste t pareado; figura 37B), que foi confirmada pela redução da razão núcleo:citoplasma do fator de transcrição nos macrófagos infectados do grupo tratado com salina (0,25 *versus* 0,09;  $p=0,0003$ , teste t pareado; figura 37D). Isto indica que não houve translocação do citoplasma para o núcleo do PPAR- $\gamma$ .

A infecção pelas leishmânias não influenciou a expressão do PPAR- $\gamma$  nos macrófagos do grupo tratado com lopinavir/ritonavir, porém, diferentemente, nos macrófagos do grupo tratado com atazanavir, a infecção pelos parasitos aumentou a expressão total (2,29 *versus* 4,13;  $p=0,04$ , teste t pareado; figura 37C) e citoplasmática (1,78 *versus* 3,66;  $p=0,02$ , teste t pareado; figura 37A) do PPAR- $\gamma$ , entretanto não alterou sua expressão nuclear (0,31 *versus* 0,33;  $p=0,39$ , teste de Wilcoxon; figura 37B), o que foi confirmado pela redução da razão núcleo:citoplasma do PPAR- $\gamma$  nos macrófagos infectados do grupo tratado com atazanavir (0,21 *versus* 0,08;  $p=0,006$ , teste de Wilcoxon; figura 37D). O aumento do PPAR- $\gamma$  citoplasmático não foi acompanhado de translocação paralela da molécula para o núcleo da célula.

Quando comparamos o efeito dos diferentes tratamentos sobre a expressão de PPAR- $\gamma$ , observamos que o tratamento dos animais com o atazanavir induziu uma redução na expressão total (5,84 *versus* 2,29;  $p<0,0001$ , ANOVA seguido do teste de Student-Newman-Keuls; figura 37C), citoplasmática (4,78 *versus* 2,32,  $p=0,0002$ ; ANOVA seguido do teste de Student-Newman-Keuls, figura 39A) e nuclear (1,35 *versus* 0,31,  $p=0,0001$ ; Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn; figura 37B) constitutiva do PPAR- $\gamma$  em relação aos macrófagos do grupo tratado com salina, que não foi observada pelo tratamento com o lopinavir/ritonavir.



**Fig. 37.** Influência do tratamento de camundongos BALB/c com lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre a expressão do receptor-gama ativado pelo proliferador do peroxissoma (PPAR- $\gamma$ ) em macrófagos incubados ou não com leishmânias em condições ótimas. Macrófagos peritoneais incubados ou não por 30 h com leishmânias foram fixados com PFA 4%. A seguir, foram sequencialmente incubados com anticorpos primários anti-PPAR- $\gamma$  (1:200), anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 546 (1:3000) e DAPI (1:5000) para análise por microscopia confocal. Imagens foram adquiridas utilizando um microscópio Leica SP5, com um pinhole de 246  $\mu$ m e uma velocidade de varredura de 100Hz. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ 1.47q. Os dados estão representados como mediana, quartis e extremos de 5 imagens adquiridas com um amplo campo de visão. As diferenças na expressão total, citoplasmática e nuclear de RelB, assim como na razão núcleo:citoplasma entre os tratamentos empregados foram analisadas utilizando os testes ANOVA ou Kruskal-Wallis e o efeito da infecção pelas leishmânias em cada grupo estudado foi investigado utilizando os testes t pareado e de Wilcoxon. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

Portanto, o tratamento com lopinavir/ritonavir não alterou a expressão ou a translocação do PPAR- $\gamma$  para os núcleos dos macrófagos, tanto na ausência quanto na presença das leishmânias. Entretanto, o tratamento com atazanavir reduziu a expressão e a translocação do PPAR- $\gamma$  para os núcleos dos macrófagos que foram incubados com o meio de cultura e diminuiu a expressão citoplasmática do PPAR- $\gamma$  nas células que foram incubadas com as leishmânias em condições ótimas.

## **DISCUSSÃO**



Analisamos neste trabalho se o tratamento de camundongos BALB/c com os inibidores da protease do VIH lopinavir/ritonavir e atazanavir poderia influenciar os mecanismos de imunidade inata envolvidos na primeira interação entre os macrófagos e os parasitos *L. (L.) amazonensis*, para aumentar a compreensão das possíveis influências desses medicamentos sobre o controle da *Leishmania*, considerando que indivíduos co-infectados pelo VIH e as leishmânias necessariamente utilizarão estes medicamentos. Nossos resultados mostraram pela primeira vez que o tratamento oral prévio com lopinavir/ritonavir e atazanavir influenciou os mecanismos de defesa dos macrófagos contra as leishmânias em sua primeira interação com os parasitos.

Avaliamos alguns parâmetros da imunidade inata utilizando leishmânias cultivadas em meio Schneider pH 6,7, que quando mantidos a 26°C, geraram parasitos capazes de infectar um percentual maior de macrófagos, como também utilizando leishmânias cultivadas com RPMI pH 7,2, que quando mantidas a 26°C, geraram parasitos capazes de infectar um percentual menor de macrófagos. Esta segunda situação poderia mimetizar mais adequadamente o curso natural da infecção, pois tem sido demonstrado que os flebotomíneos liberam menos do que 1000 promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo (Rogers et al., 2004), sendo, portanto, esperado que na fase inicial da infecção apenas uma pequena parte dos macrófagos cutâneos seja inicialmente infectada pelos parasitos.

Nossos resultados mostraram que o tratamento oral prévio de camundongos BALB/c tanto com lopinavir/ritonavir quanto com atazanavir diminuiu o número de macrófagos recuperados da cavidade peritoneal (figura 3). Não está ainda esclarecido por quais mecanismos esses fármacos induziram essa alteração, porém é possível que tenham ocasionado uma redução do influxo de novas células para a cavidade peritoneal, pois o indinavir, um dos inibidores da protease do VIH, quando adicionado ao meio de cultura, promoveu uma redução da migração transendotelial de células dendríticas imaturas derivadas de monócitos humanos por meio da diminuição da expressão de DC-SIGN, uma lectina tipo C, que se liga a ICAM-2 presente na superfície das células endoteliais (Whelan et al., 2003). Esse fármaco também alterou a capacidade das células dendríticas interagirem com a matriz extracelular, pois diminuiu sua ligação com a fibronectina, que é uma glicoproteína que medeia a migração transendotelial por meio da ligação com as integrinas, VLA-4 e VLA-5, expressas na superfície das células dendríticas (Whelan et al., 2003). E ainda Ruggieri et al. (2011) verificaram que, o indinavir e o ritonavir determinaram uma redução da quimiotaxia de monócitos

humanos direcionada pela proteína-1 quimiotática para monócitos (MCP-1), após o tratamento *ex vivo* com os inibidores da protease do VIH.

A capacidade dos macrófagos responderem a estímulos quimiotáticos é importante para o controle das leishmânias. Foi demonstrado que a estimulação *in vitro* dos macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L.(L.) donovani* com proteína-1 quimiotática para monócitos (MCP-1) e proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1 $\alpha$ ) promoveu um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Dey et al., 2005). Quando essas quimiocinas foram administradas *in vivo* aos camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) donovani* houve controle da carga parasitária tanto no fígado quanto no baço (Dey et al., 2005). Similarmente, macrófagos humanos infectados *in vitro* com *L. (L.) infantum* produziram maior quantidade de óxido nítrico quando foram ativados por MIP-1 $\alpha$  e MCP-1 (Brandionisio et al., 2002). Esse aumento elevou o controle parasitário nos macrófagos estimulados com as quimiocinas para níveis comparáveis aos dos macrófagos humanos estimulados com IFN- $\gamma$  (Brandionisio et al., 2002). Portanto, a possibilidade de que os inibidores da protease do VIH possam modular a capacidade de resposta dos macrófagos aos estímulos migratórios, faz com que haja a possibilidade de que possam colaborar para a manutenção de parasitos viáveis no organismo dos indivíduos coinfectados pelo VIH e *Leishmania*.

Nossos dados mostraram que o lopinavir/ritonavir aumentou o índice de infecção dos macrófagos, tanto quando as células foram incubadas *in vitro* com um menor número de parasitos como quando foram incubadas com um maior número de leishmânias (figuras 4 e 5). Em ambos os casos, essa diferença foi ocasionada por um aumento do percentual de macrófagos infectados, porém quando a infecção foi feita com um menor número de parasitos, também deveu-se a uma elevação do número médio de parasitos interiorizados pelos macrófagos. Diferentemente, o atazanavir somente aumentou o índice de infecção dos macrófagos que foram incubados com um maior número de leishmânias (figura 5) e esse aumento foi ocasionado por uma elevação do percentual de células infectadas pelos parasitos.

Não está esclarecido ainda os mecanismos pelos quais esses antiretrovirais aumentaram o índice de infecção dos macrófagos, mas é possível que possam ter modificado a expressão dos receptores dos macrófagos envolvidos na fagocitose e colaborado para o aumento do percentual de macrófagos infectados por *L. (L.)*

*amazonensis*. De fato, já foi demonstrado que os inibidores da protease do VIH são capazes de influenciar a interiorização de partículas pelos fagócitos, pois aumentou a endocitose do colesterol por macrófagos peritoneais de camundongos sem LDLR, macrófagos THP-1 e células mononucleares do sangue periférico humano devido ao aumento da expressão de CD36 (Dressman et al., 2003). O CD36 é um receptor expresso pelos fagócitos que medeia a fagocitose de componentes próprios alterados, tais como fosfolipídeos oxidados, células apoptóticas e proteínas amilóides (Stewart et al., 2009). Um dos ligantes reconhecidos pelo CD36 é a fosfatidilserina, um fosfolipídeo encontrado na superfície externa de células apoptóticas (Kawasaki et al., 2002). Os macrófagos são capazes de interiorizar *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, através do reconhecimento da fosfatidilserina expressa na superfície dos parasitos (Farias et al., 2013). Os receptores dos macrófagos que reconhecem a fosfatidilserina expressa pelas leishmânias precisam ainda ser melhor caracterizados, mas, dada a natureza do ligante, é possível que envolva a participação de CD36, cuja expressão pode ser modulada pelos inibidores da protease do VIH. Assim, é possível que, nos nossos experimentos, o tratamento com os antiretrovirais possa ter alterado o número de macrófagos que expressavam o receptor CD36 ou outro receptor fagocítico na cavidade peritoneal dos camundongos BALB/c. Isto pode ter contribuído para que uma maior proporção de macrófagos dos animais tratados com os inibidores da protease do VIH tenham sido capazes de interiorizar os parasitos durante a incubação dos macrófagos com as leishmânias.

Outra possibilidade para explicar o aumento no índice de infecção é que o tratamento com os antiretrovirais possa ter alterado as subpopulações de macrófagos residentes capazes de interiorizar os parasitos. Tem sido demonstrado a presença de duas subpopulações de macrófagos na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. Uma é composta por células maiores que expressam níveis elevados de CD11b e F4/80 e a outra é composta por células menores que expressam níveis elevados do complexo principal de histocompatibilidade da classe II (Ghosn et al., 2010). Essas subpopulações apresentaram capacidade diferenciada para fagocitar *E. coli* e para produzir óxido nítrico após estimulação com lipopolissacarídeos (LPS) (Ghosn et al., 2010). Enquanto a subpopulação de células menores é derivada dos monócitos sanguíneos, a origem das células maiores é ainda desconhecida (Ghosn et al., 2010). Portanto, como o lopinavir/ritonavir e atazanavir podem ter reduzido o influxo de células para a cavidade peritoneal, é possível que possam ter reduzido a migração dos

monócitos, que são células mais jovens, para essa região, aumentando relativamente a subpopulação de macrófagos capazes de reconhecer e interiorizar a *Leishmania* mais eficientemente, ocasionado assim o aumento do índice de infecção que foi observado em nossos ensaios.

O fato de termos encontrado um maior número de macrófagos infectados pelas leishmânias nos grupos tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir do que no grupo tratado com salina poderia estar relacionado com uma alteração na viabilidade dos macrófagos ou no número de macrófagos aderidos às lamínulas. E de fato, quando utilizamos uma menor quantidade de leishmânias por macrófago (figura 9), houve um maior número de células aderidas nos grupos tratados com os antiretrovirais do que no grupo tratado com salina (figura 8). Entretanto, quando incubamos os macrófagos com um maior número de leishmânias (figura 10), que poderiam ser citotóxicas para os macrófagos, ainda observamos um aumento no índice de infecção, sem, no entanto, encontrarmos diferenças na viabilidade após coloração com laranja de acridina (figuras 6 e 7) e no número de macrófagos aderidos às lamínulas (figura 10). Portanto, a alteração da viabilidade e do número de macrófagos aderidos às lamínulas não foram responsáveis pelo aumento do índice de infecção.

Não estão esclarecidos ainda os mecanismos pelos quais houve uma diferença na aderência apenas quando os macrófagos foram incubados com uma menor quantidade de parasitos, entretanto é possível que as diferentes metodologias empregadas para a infecção dos macrófagos tenham ocasionado esses resultados, pois quando incubamos os macrófagos com uma menor quantidade de parasitos, cultivamos as leishmânias em meio RPMI, pH 7,2 e os parasitos permaneceram em contato com os macrófagos durante 24 horas, enquanto que quando incubamos os macrófagos com uma maior quantidade de parasitos, cultivamos as leishmânias em meio Schneider, pH 6,7, deixamos os parasitos em contato com os macrófagos por 6 horas, aspiramos o meio de cultura contendo os parasitos que não foram fagocitados, preenchemos os poços das placas com meio RPMI fresco e, então, as células foram incubadas por mais 24 horas.

Ao compararmos os percentuais de macrófagos infectados obtidos utilizando-se os diferentes meios de cultivo e as diferentes condições de infecção, verificamos que o uso do RPMI levou a um menor percentual de macrófagos infectados (salina: 2,25% *versus* 38%; LPV/RTV: 8,5% *versus* 51,5%; ATV: 3% *versus* 49%), o que pode ter colaborado para a manutenção de um maior número de parasitos livres no meio de cultura que podem ter produzido metabólitos tóxicos para os macrófagos e induzindo a perda dessas

células. Outra possibilidade que pode ter colaborado para a diferença observada nos ensaios em que o meio RPMI foi empregado é que talvez tenha ocorrido uma menor perda das células que haviam sido expostas aos antiretrovirais, pois os inibidores da protease do VIH em concentrações terapêuticas apresentam propriedades anti-apoptóticas (Rizza & Badley, 2008), podendo, assim, ter protegido os macrófagos da morte induzida pelos metabólitos liberados pelos parasitos no meio de cultura.

Os nossos resultados também mostraram que os inibidores da protease do VIH recuperaram em parte a depressão da produção de NO ocasionada pelas leishmânias em condições subótimas (figura 13), porém ao compararmos a produção de NO dos macrófagos infectados com a produção de NO das células incubadas apenas com o meio de cultura, verificamos que a produção desse reativo de nitrogênio pelos macrófagos infectados em nenhum momento foi maior do que a produção de NO das células incubadas apenas com o meio de cultura, tanto nos macrófagos infectados com leishmânias cultivadas em condições subótimas (figura 12) como naqueles infectados com leishmânias cultivadas em condições ótimas (figura 14). Além disso, observamos uma redução da produção de óxido nítrico pelos macrófagos dos animais tratados com atazanavir tanto quando os macrófagos foram infectados por leishmânias cultivadas em condições subótimas quanto ótimas (figuras 12 e 14). Nossos dados foram semelhantes aos publicados por Petersen et al. (2012) que mostraram que a infecção de macrófagos de camundongos CBA por 24 a 48 h com *L. (L.) amazonensis* não disparou a produção de NO pelos macrófagos. Também foram semelhantes aos observados por Balestieri et al. (2002) que mostraram que a produção NO estimulada pelo LPS em macrófagos J774 foi suprimida pela infecção com *L. (L.) amazonensis*. Porém, não foi possível saber se o aumento ou a diminuição da produção do NO determinada pelas drogas antiretrovirais tenha tido um papel fisiológico significativo nem na defesa nem na toxicidade determinada por este radical.

O tratamento com os inibidores da protease do VIH não influenciou a produção de  $H_2O_2$  pelos macrófagos infectados ou não pelas leishmânias em condições ótimas (figura 15). Nossos dados foram similares aos previamente observados por Almeida et al. (2012), que mostraram que macrófagos peritoneais de camundongos CBA não produziram  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  quando infectados pela *L. (L.) amazonensis*. Entretanto, houve produção de grande quantidade desses reativos quando essas células foram infectadas pela *L. (L.) major*. Portanto, nossos resultados mostraram que apesar do tratamento com

os antiretrovirais terem aumentado a interiorização dos parasitos pelos macrófagos, não ficou claro sua influência sobre a produção dos radicais microbicidas por essas células.

Os mecanismos microbicidas para as leishmânias são estimulados quando os macrófagos são ativados por citocinas oriundas do ramo de linfócitos Ta1, tais como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que estimulam a produção da sintase do óxido nítrico (iNOS), enzima que cataboliza L-arginina para gerar o óxido nítrico (NO) que é tóxico para as amastigotas intracelulares (Stebut, 2007; Sharma & Singh, 2009). Por outro lado, facilitação da multiplicação desses parasitos ocorre quando os macrófagos são ativados por citocinas oriundas do ramo de linfócitos Ta2, tais como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que induzem a expressão e atividade da arginase-1, uma enzima que cataboliza a L-arginina para gerar poliaminas, que são nutrientes utilizados para o crescimento intracelular dos parasitos (Wanasen & Soong, 2008). Além do NO, espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), também estão envolvidos na defesa contra as leishmânias. Foi observado por Sousa-Franco et al. (2006) que amastigotas de *L.(V.) guyanensis* morrem dentro de macrófagos de camundongos BALB/c através de um processo semelhante a apoptose que é mediado por ROS induzidas pelos parasitos. Da mesma forma, foi demonstrado que a morte de *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis* é dependente de  $O_2^-$  (Khouri et al., 2010) e que a inibição da liberação de  $O_2^-$  induzida pelo IFN- $\beta$  aumentou a carga parasitária dos macrófagos humanos (Khouri et al., 2009). Foi observado também que camundongos que são incapazes de ativar o metabolismo oxidativo pela administração regular da apocinina, um inibidor da NADPH-oxidase, não controlam a infecção por *L.(V.) guyanensis* como os animais não tratados (Horta et al., 2012).

Nossos dados sugerem que como a capacidade leishmanicida dos macrófagos não foi estimulada pela infecção ou pelo tratamento com os antiretrovirais, os parasitos sobreviveram após 30 h de co-cultivo com os macrófagos e parasitos vivos foram recuperados dos macrófagos dos camundongos tratados tanto com salina como com lopinavir/ritonavir e atazanavir (figura 11). Entretanto, como o tratamento com os inibidores da protease do VIH aumentou o percentual de células infectadas, é possível que isto tenha refletido no maior número de parasitos que foram recuperados dos macrófagos dos grupos tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir. Portanto, esta maior recuperação de leishmânia pode ter sido devido tanto à incapacidade dos mecanismos microbicidas, como também pelo maior índice de infecção dos macrófagos.

Diferentemente, alguns estudos têm mostrado uma ação leishmanicida dos inibidores da protease do VIH, utilizando *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) donovani*, *L.(L.) mexicana* e *L. (V.) braziliensis* (Savoia et al., 2005; Trudel et al., 2008; Santos et al., 2009; Demarchi et al., 2012; Santos et al, 2013). Também já foram detectadas alterações estruturais por microscopia eletrônica em *L. (L.) amazonensis* após o tratamento direto dos parasitos com lopinavir e nelvinavir (Santos et al, 2009). Um dos fatores que pode ter colaborado para as diferenças nos resultados foi o fato destes pesquisadores abordarem a influência dos antiretrovirais de maneira oposta à nossa. Enquanto que em nosso trabalho os macrófagos foram submetidos por dez dias às concentrações terapêuticas das drogas pelo tratamento por via oral dos animais e incubados *in vitro* com as leishmânias, estes pesquisadores trataram os parasitos *in vitro* com as drogas e em seguida incubaram com macrófagos normais, ou então permitiram a interação entre as leishmânias e os macrófagos e em seguida incubaram as células infectadas com os antiretrovirais. Outro aspecto a ser considerado é que, como inibidores da protease do VIH que apresentaram efeito inibitório acentuado sobre as leishmânias foram utilizados em concentrações elevadas (Savoia et al., 2005; Trudel et al., 2008; Santos et al., 2009; Demarchi et al., 2012), é possível que em nossos ensaios não tenhamos observado ação antiparasitária com nenhum dos inibidores da protease do VIH testados pelo fato de os medicamentos estarem em concentrações intracelulares inadequadas para exercerem ação direta sobre as leishmânias, pois os camundongos BALB/c receberam as medicações apenas uma vez ao dia.

Por outro lado, como estudos farmacocinéticos têm indicado que as concentrações plasmáticas máximas de alguns inibidores da protease do VIH são baixas nos indivíduos em utilização de terapia antiretroviral (Taylor et al., 2000; Burger et al., 2003; Ribera et al., 2004; Cressey et al., 2005; Hentig et al., 2008; Pawinski et al., 2008; Haberl et al., 2010; Jackson et al., 2010), não atingindo os níveis necessários para que possam exercer a ação antiparasitária direta, é possível que uma modulação da resposta imunitária por exposição continuada a baixas concentrações de inibidores da protease do VIH possa ser o principal mecanismo pelo qual esses medicamentos poderiam modificar o curso da coinfeção entre o VIH e a *Leishmania*.

A recorrência das leishmanioses é um problema frequente nos pacientes infectados pelo VIH (Alvar et al., 2008), ocorrendo em 27% dos indivíduos após os 6 primeiros meses e em 60% dos indivíduos após 12 meses do término do tratamento anti-

*Leishmania* (Cruz et al., 2006). Portanto, a possibilidade de que os inibidores da protease do VIH possam aumentar a interiorização das leishmânias pelos macrófagos sem que haja um aumento concomitante dos mecanismos microbicidas dessas células poderia colaborar para a manutenção de parasitos viáveis nos tecidos dos indivíduos coinfectados, favorecendo assim a recorrência das leishmanioses após a interrupção da terapia anti-*Leishmania*.

Diferentemente, o tratamento com os inibidores da protease do VIH influenciou substancialmente a produção de citocinas pelos macrófagos. Observamos que as células dos animais tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir produziram maior quantidade de IL-1 $\beta$  na presença das leishmânias (figura 17). E que a produção de IL-1 $\beta$  do grupo tratado com atazanavir foi superior a do grupo tratado com lopinavir/ritonavir e já se encontrava elevada mesmo na ausência das leishmânias (figura 16). Os nossos dados foram semelhantes aos de Lagathu et al. (2007) que demonstraram que o tratamento de macrófagos THP-1 estimulados com PMA e com lopinavir e nelfinavir estimulou a liberação de IL-1 $\beta$  por essas células. A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória que apresenta diversas funções biológicas, dentre elas a de estimular a produção do NO pelos macrófagos (Cunha et al., 1994). Entretanto, apesar dos macrófagos dos animais tratados com o atazanavir estarem produzindo uma quantidade mais elevada de IL-1 $\beta$  do que a dos macrófagos tratados com salina, tanto na presença quanto na ausência das leishmânias, o tratamento com esses medicamentos não foi capaz de aumentar significativamente a produção de NO pelos macrófagos. O mesmo ocorreu com os macrófagos dos animais tratados com lopinavir/ritonavir quando incubados com as leishmânias. Ainda não estão esclarecidos os mecanismos pelos quais isso aconteceu. Já foi demonstrado que é necessário uma cooperação entre TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IFN- $\gamma$  para aumentar a atividade da sintase do óxido nítrico em células endoteliais de veia umbilical humana (Rosenkranz-Weiss, 1994). Sendo assim, é possível que nos nossos ensaios as concentrações mais elevadas de IL- $\beta$  produzidas pelos macrófagos dos animais tratados com os atiretrovirais não tenham funcionado como um sinal potente o suficiente para estimular a produção de NO, entretanto essa produção mais elevada de IL-1 $\beta$  pode ter colaborado para aumentar a ativação dos macrófagos, que por sua vez pode ter contribuído para o aumento da interiorização dos parasitos por essas células.

Foi demonstrado que pacientes coinfectados pelo VIH e *Leishmania* podem produzir níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  do que os pacientes infectados pelo VIH ou pela



*Leishmania* isoladamente (Santos-Oliveira et al., 2013). Não está ainda esclarecido se a produção aumentada de IL-1 $\beta$  pelos coinfectados pelo VIH e *Leishmania* poderia contribuir para manifestações clínicas mais graves de leishmaniose nesses indivíduos. Em camundongos BALB/c já foi demonstrado que a IL-1 $\beta$  é importante para o desenvolvimento de lesões cutâneas e para a ocorrência de respostas inflamatórias sistêmicas em camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) major* (Voronov et al., 2010). Como o lopinavir/ritonavir e o atazanavir, aumentaram a produção de IL-1 $\beta$  pelos macrófagos dos animais tratados com os inibidores da protease do VIH, é possível que possam colaborar para aumentar a produção dessa citocina nos indivíduos coinfectados pelo HIV e *Leishmania* e, portanto, para exacerbar a resposta inflamatória responsável pelas manifestações clínicas de leishmaniose tegumentar e visceral nos portadores dessa coinfeção.

O tratamento com o atazanavir reduziu a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos incubados com o meio de cultura, enquanto que na presença dos parasitos houve um aumento da produção dessa citocina pelos macrófagos. Contudo, a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos do grupo tratado com atazanavir na presença das leishmânias não foi maior que a dos macrófagos infectados do grupo controle tratado com salina (figura 20), que por sua vez apresentou uma produção de TNF- $\alpha$  reduzida após a incubação com os parasitos. Os nossos resultados foram diferentes dos observados por Lagathu et al. (2007) que mostraram que o tratamento de macrófagos THP-1 estimulados com PMA com lopinavir e nelfinavir estimulou a liberação de TNF- $\alpha$  por essas células. Entretanto, a metodologia empregada por esses pesquisadores foi diferente da que utilizamos. Enquanto, eles utilizaram macrófagos THP-1 que foram incubados *in vitro* com os antiretrovirais por 24 a 48 h, nós utilizamos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c que foram tratados durante 10 dias com o medicamento por via oral. Possivelmente, diferenças nas concentrações das drogas a que os macrófagos foram submetidos possam ser responsáveis por estas diferenças que foram observadas.

No modelo murino, o TNF- $\alpha$  é uma citocina considerada indispensável para o controle das leishmânias, pois camundongos C57BL/6, que são resistentes a infecção por *L. (L.) major*, desenvolvem infecção fatal por este parasito na ausência de TNF- $\alpha$  (Wilhelm et al., 2001). Nos seres humanos, o TNF- $\alpha$  também é importante para a conferir proteção contra os parasitos, pois a ausência de expressão de RNA<sub>m</sub> de TNF- $\alpha$  em lesões cutâneas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea difusa parece estar

relacionada com o estado de não responsividade desses indivíduos contra os parasitos (Caceres-Dittmar et al., 1993). Uma das funções biológicas do TNF- $\alpha$  é estimular a produção de NO (Liew et al., 1990, Guerrero et al., 2012) pelos macrófagos que é tóxico para as amastigotas intracelulares. Portanto, é provável que a incapacidade dos macrófagos dos distintos grupos de tratamento para produzir NO quando infectados pelas leishmânias tenha sido ocasionada pelo fato dessas células não terem sido capazes de produzir quantidades substanciais de TNF- $\alpha$  na presença dos parasitos. Isso pode ter colaborado para a sobrevivência dos microrganismos no interior dos macrófagos.

Diferentemente, o tratamento com os antiretrovirais não alterou a produção de IL-6 (figura 18), tanto na ausência quanto na presença das leishmânias. Chen et al. (2009) observaram um efeito oposto, e mostraram que o tratamento com lopinavir aumentou a produção de IL-6 por linhagem de macrófagos J774 A.1 tratados *in vitro* com os medicamentos, enquanto que os nossos resultados foram obtidos com macrófagos peritoneais coletados após tratamento oral com os fármacos durante 10 dias. É possível que as diferenças no tipo de macrófago analisado tenham sido responsáveis pelos distintos resultados observados.

Assim como o TNF- $\alpha$ , a IL-6 é essencial para o controle da infecção pelas leishmânias, pois camundongos C57BL/6 que não produzem IL-6 desenvolvem lesões cutâneas maiores com elevada carga parasitária após inoculação de *L.(L.) major* na pele dos pavilhões auriculares (Wu et al., 2009). Nos seres humanos, a IL-6 também é importante para a defesa contra os parasitos, pois foi observado uma ausência de expressão de RNA<sub>m</sub> de IL-6 em lesões cutâneas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea difusa que parece estar relacionada com a não responsividade desses indivíduos contra os parasitos (Caceres-Dittmar et al., 1993). O fato da infecção pelas leishmânias não ter estimulado a produção de IL-6 pelos macrófagos dos camundongos tratados ou não com os antiretrovirais pode ter colaborado para sobrevivência dos parasitos observada em nossos ensaios, pois assim como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , a IL-6 estimula a produção de NO pelos macrófagos (Guerrero et al., 2012), auxiliando também na defesa contra os parasitos.

Já foi demonstrado que indivíduos infectados pelo VIH com leishmaniose visceral apresentam níveis séricos mais elevados de TNF- $\alpha$  e IL-6 do que os infectados pelo VIH e/ou pela *Leishmania* isoladamente (Santos-Oliveira et al., 2013). É possível que este aumento na produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 nos indivíduos coinfectados pelo HIV e

*Leishmania* não tenha sido ocasionado pelo tratamento com os antiretrovirais, desde que não observamos modificações destas citocinas por essas drogas.

Os inibidores da protease do VIH também não influenciaram a produção de IL-23 (figura 21), tanto na ausência quanto na presença dos parasitos. Até o momento, não era conhecido se esses medicamentos influenciavam a produção de IL-23 pelos macrófagos. Em camundongos, foi demonstrado que a ausência de IL-23 pode facilitar o crescimento das leishmânias, pois foi observado que animais que não produzem essa citocina apresentaram um aumento da carga parasitária no fígado quando infectados por *L. (L.) donovani* (Murray et al., 2003). Similarmente, em seres humanos a IL-23 também parece estar relacionada com a cura das leishmanioses, pois foi observada uma maior produção dessa citocina pelos macrófagos dos pacientes que evoluíram para a cicatrização das lesões cutâneas causadas por *L. (L.) major* do que naqueles que não cicatrizaram suas lesões (Tolouei et al., 2012). Embora tenha sido demonstrado que a IL-23 auxilia no controle das leishmânias, os mecanismos pelos quais exerce esse efeito ainda não foi elucidado (Murray et al., 2003). No entanto, sabe-se que a IL-23 estimula a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, estimula a resposta de células T de memória e o desenvolvimento de células Ta17 (Langrish et al., 2004). ), assim, a ausência do estímulo pela IL-23 pode ter colaborado para a menor produção do TNF- $\alpha$  que observamos neste trabalho.

Embora os medicamentos não tenham alterado a produção de IL-23, houve um aumento substancial da produção de IL-12p70 pelos macrófagos provenientes do grupo tratado com atazanavir na ausência das leishmânias (figura 19), que, entretanto foi completamente bloqueada pela interação dos parasitos com os macrófagos. Até onde conseguimos verificar, até o momento, ainda não era conhecido se os inibidores da protease do VIH apresentavam algum efeito sobre a produção de IL-12p70 pelos macrófagos. A IL-12p70 deve participar da defesa contra as leishmânias porque estimula o desenvolvimento dos linfócitos Ta1 que secretam IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e induzem macrófagos infectados a produzirem NO, que é tóxico para as amastigotas intracelulares (Stebut, 2007; Sharma & Singh, 2009). Nossos dados mostraram que mesmo nos macrófagos previamente ativados pelo atazanavir, os parasitos inibiram a produção de IL-12p70 para níveis comparáveis aos do controle tratado com salina. Pelo fato das células dos camundongos tratados com os inibidores da protease do VIH terem apresentado uma capacidade aumentada para interiorizar as leishmânias, sem que houvesse uma elevação em sua capacidade para produzir IL-12p70, é possível que esses

fármacos possam favorecer a sobrevivência dos parasitos, pois apesar de mais parasitadas, essas células não serão boas indutoras da resposta Ta1, que é a responsável pelo controle das leishmânias, passando desse modo a servir, na ausência de outras fontes de IL-12 que favoreçam a aquisição de uma resposta anti-*Leishmania*, como reservatórios dos parasitos.

Raros trabalhos abordaram a influência da coinfeção pelo VIH e *Leishmania* sobre a produção de IL-12. Foi verificado que indivíduos VIH positivos que desenvolveram leishmaniose visceral apresentaram redução dos níveis plasmáticos de IL-12 (Olivier et al., 2003). Wolday et al (2000) também observaram que, após estimulação *in vitro* com antígenos de *Leishmania*, a produção de IL-12 e IL-18 por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com leishmaniose visceral, VIH ou ambas as infecções foi menor do que a de doadores saudáveis. Portanto, como os nossos dados mostraram que o tratamento com os inibidores da protease do VIH aumentaram a interiorização dos parasitos sem estimular a produção de IL-12p70 pelos macrófagos murinos infectados, é possível que também possam elevar a interiorização dos parasitos sem que haja estimulação da produção de IL-12p70 pelos macrófagos dos pacientes coinfectados pelo VIH e *Leishmania*.

Ambos os inibidores da protease do VIH promoveram um decréscimo da produção de IL-10 pelos macrófagos, que permaneceu baixa mesmo na presença das leishmânias (figura 22). Até onde conseguimos verificar, nenhum trabalho avaliou a influência destes antiretrovirais sobre a produção de IL-10, que é uma citocina que modula negativamente várias funções dos macrófagos (Couper et al., 2008). Portanto, o fato de o tratamento com os antiretrovirais ter reduzido substancialmente a produção de IL-10 pelos macrófagos, tanto na ausência quanto na presença das leishmânias, pode ter sido um dos fatores que colaborou para o aumento da capacidade pró-inflamatória dos macrófagos dos camundongos BALB/c, que foi evidenciada, no caso do tratamento com lopinavir/ritonavir, pelo aumento da interiorização das leishmânias e pela produção aumentada de IL-1 $\beta$  na presença dos parasitos, e no caso do tratamento com o atazanavir, pelo aumento da produção de IL-1 $\beta$  e de IL-12p70, na ausência dos parasitos, e pelo aumento da interiorização dos parasitos e pela produção aumentada de IL-1 $\beta$ , na presença das leishmânias. Como a diminuição da produção de IL-10 pelos macrófagos tratados com os antiretrovirais não foi seguida do aumento dos mecanismos microbicidas dos macrófagos, pode ter ocorrido ingresso seguro dos parasitos nos

macrófagos, que resultou na recuperação de uma grande quantidade de parasitos viáveis a partir dos macrófagos dos animais tratados com os antiretrovirais durante os ensaios que realizamos avaliando a viabilidade das leishmânias. Se este fenômeno se repetir nas células dos seres humanos, é possível que esse mecanismo possa favorecer a sobrevivência das leishmânias nos macrófagos dos pacientes coinfectados pelo VIH e *Leishmania* e possa possibilitar a recorrência da doença, assim que o tratamento antiparasitário for interrompido. Além disso, como a IL-10 auxilia a reduzir os danos teciduais durante a resposta imunitária contra os agentes infecciosos, por modular negativamente as funções dos linfócitos Ta1, células NK e macrófagos (Couper et al., 2008), um aumento da capacidade pró-inflamatória dos macrófagos devido a uma redução da produção de IL-10 pelos macrófagos em função do tratamento com os inibidores da protease do VIH poderia também colaborar para o aumento das lesões apresentadas pelos pacientes coinfectados pelo VIH e *Leishmania*. E de fato, Posada-Vergara et al. (2005) relataram que, após o início da HAART, um paciente apresentou lesões tegumentares disseminadas, enquanto que em outro as lesões pré-existentes se agravaram e tornaram-se mais amplas. Chrusciak-Talhari et al (2009) também observaram, que após o início da terapia antiretroviral, um paciente desenvolveu diversas lesões cutâneas que foram detectadas na face, tórax, dorso, membros superiores e inferiores e na bolsa escrotal.

Embora tenham influenciado substancialmente a produção de citocinas, verificamos que os antiretrovirais não influenciaram a expressão dos corpúsculos lipídicos pelos macrófagos, tanto na presença quanto na ausência das leishmânias (figura 25). Essas organelas são responsáveis pela produção das prostaglandinas e leucotrienos e se acumulam no citoplasma dos macrófagos quando essas células são ativadas por diversos estímulos, tais como ácidos graxos insaturados, PAF, MCP-1, LPS, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. tuberculosis* e *Dengue virus* (Melo et al., 2011). Recentemente, foi observado que houve acúmulo de corpúsculos lipídicos em células dendríticas provenientes de camundongos C57BL/6 que foram infectadas *in vitro* por *L. (L.) amazonensis* (Lecoeur et al., 2013), entretanto, ainda não está esclarecido se a infecção pelas leishmânias é capaz de estimular o acúmulo dessas vesículas nos macrófagos. Embora já tenha sido observado que monócitos humanos e linhagem de células monocíticas humanas produzem mais prostaglandina E2 quando infectados pelo VIH ou por *L. (L.) donovani* (Foley et al., 1992; Matte et al., 2000), ainda não foi avaliada a expressão dos corpúsculos lipídicos nos macrófagos dos pacientes coinfectados pelo VIH e

*Leishmania*. Porém, como não observamos diferenças na expressão dos corpúsculos lipídicos pelos macrófagos dos camundongos tratados com os antiretrovirais, é possível que esses medicamentos não influenciem a expressão dessas organelas pelos macrófagos dos pacientes coinfectados pelo VIH e *Leishmania*.

Os inibidores da protease do VIH também influenciaram as vias de sinalização intracelular dos macrófagos. Enquanto o atazanavir estimulou a translocação do NF- $\kappa$ B p65 do citoplasma para os núcleos dos macrófagos incubados ou não com um menor número de parasitos (figuras 24 e 27), o lopinavir/ritonavir diminuiu a translocação do NF- $\kappa$ B RelB do citoplasma para os núcleos dos macrófagos e a expressão citoplasmática do NF- $\kappa$ B RelB apenas nas células incubadas com um maior número de leishmânias (figura 34). O atazanavir também reduziu a translocação do PPAR- $\gamma$  do citoplasma para o núcleo dos macrófagos incubados apenas com o meio de cultura e diminuiu a expressão do PPAR- $\gamma$  no citoplasma dos macrófagos incubados ou não com um maior número de parasitos (figura 37).

Essas vias de sinalização intracelular são antagônicas, pois enquanto o NF- $\kappa$ B p65 estimula diversas funções dos macrófagos, tais como fagocitose, produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-12), quimiocinas, espécies reativas de nitrogênio e apresentação de antígenos (Hayden et al., 2006; Han et al., 2009; Park & Kim, 2009), o PPAR- $\gamma$  inibe essas mesmas funções (Chung et al., 2000; Delerive et al., 2001; Bouhrel et al., 2007), sendo auxiliado em algumas delas pelo NF- $\kappa$ B RelB (Martucci et al., 2007). Portanto, considerando as funções biológicas destes fatores de transcrição, podemos supor que os inibidores da protease do VIH aumentaram a capacidade pró-inflamatória dos macrófagos, só que por mecanismos distintos. Enquanto o tratamento com o atazanavir aumentou a sinalização pró-inflamatória mediada pelo NF- $\kappa$ B p65 e reduziu a sinalização anti-inflamatória mediada pelo PPAR- $\gamma$ , o tratamento com lopinavir/ritonavir apenas diminuiu a sinalização anti-inflamatória mediada pelo NF- $\kappa$ B RelB. É possível que a ativação da via estimulatória do NF- $\kappa$ B p65 e a inibição da via reguladora do PPAR- $\gamma$  pelo tratamento com atazanavir possa ter colaborado para que, na ausência dos parasitos, os macrófagos tenham produzido uma maior quantidade de IL-12p70 e IL-1 $\beta$  e uma menor quantidade de IL-10. Essas mudanças nas vias de sinalização dos macrófagos tratados com atazanavir podem ainda ter colaborado para que um maior percentual de células tenha interiorizado as leishmânias, que ao ingressarem nos macrófagos inibiram a produção de IL-12p70,

porém não alteraram a produção de IL-1 $\beta$  e de IL-10 por essas células. Similarmente, é possível que a inibição da via do NF- $\kappa$ B RelB pelo tratamento com lopinavir/ritonavir possa ter colaborado para que um maior percentual de macrófagos tenha interiorizado os parasitos e ainda para que essas células tenham produzido uma maior quantidade de IL-1 $\beta$  e uma baixa quantidade de IL-10, mesmo na presença das leishmânias. Por outro lado, essas mudanças nas vias de sinalização dos macrófagos que foram induzidas pelo tratamento com ambos os antiretrovirais não conseguiram disparar uma produção elevada de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos infectados pelas leishmânias. É possível que em função disso, não tenha ocorrido uma elevação da produção de NO pelos macrófagos dos camundongos tratados com os inibidores da protease do VIH, o que pode ter favorecido a sobrevivência dos parasitos que estavam no interior dessas células.

Portanto, os nossos resultados mostraram que o tratamento oral com os inibidores da protease do VIH lopinavir/ritonavir e atazanavir influenciou várias funções dos macrófagos de camundongos BALB/c em seu primeiro contato com as leishmânias. Não ocorreram diferenças na resposta dos macrófagos dos animais tratados com os antiretrovirais que foram incubados com os diferentes inóculos de leishmânias, pois independentemente do número de parasitos, o tratamento com lopinavir/ritonavir e atazanavir, embora por mecanismos distintos, ocasionou um aumento do índice de infecção e da capacidade pró-inflamatória dos macrófagos, sem aumentar os mecanismos microbicidas dessas células. Portanto, nossos dados sugerem que nas primeiras interações entre os macrófagos e as leishmânias, o tratamento com esses medicamentos favorece a entrada e a sobrevivência dos parasitos nos macrófagos. Como as células dos seres humanos apresentam características que se assemelham com a dos camundongos, é possível que essas mesmas modificações que observamos no modelo murino, possam ocorrer nos indivíduos coinfectados pelo VIH e *Leishmania* que utilizam esses medicamentos. Entretanto, é preciso considerar que estas possibilidades são apenas inferências, pois estudamos apenas o modelo murino. Mas como nossos resultados sugerem uma influência dos antiretrovirais sobre funções importantes na defesa antiparasitária, esses dados precisam ser reavaliados em seres humanos. Além disso, como avaliamos o efeito dos inibidores da protease do VIH sobre as funções dos macrófagos apenas na presença das leishmânias, e nos indivíduos coinfectados os macrófagos estão sofrendo tanto as influências das leishmânias como também do VIH, é preciso considerar que estas interações possam ocorrer de modo

diferenciado do que observamos neste trabalho, o que é uma limitação do nosso trabalho. Entretanto, fez-se necessário analisar inicialmente a influência dos inibidores da protease do VIH na ausência do vírus para esclarecermos, sem tendenciosidade, as modificações ocasionadas apenas pelo uso dos inibidores da protease do VIH, pois na presença do vírus não poderíamos excluir as influências sobre o sistema imunitário determinadas pela própria infecção viral. Também não está ainda esclarecido se as modificações que observamos foram o resultado da ação direta dos inibidores da protease do VIH sobre os macrófagos ou se resultaram indiretamente de uma translocação de microrganismos provenientes da microbiota intestinal para a cavidade peritoneal, já que foi demonstrado que o tratamento oral com os inibidores da protease do VIH pode romper a integridade da barreira epitelial intestinal (Wu et al., 2007).

Novos estudos precisarão ser conduzidos para esclarecer essas questões, no entanto o nosso trabalho demonstrou que os inibidores da protease do VIH lopinavir/ritonavir e atazanavir foram capazes de influenciar diversos mecanismos envolvidos na defesa inata contra as leishmânias e, portanto, sugere que o tratamento com esses antiretrovirais pode influenciar o curso clínico das leishmanioses nos indivíduos coinfectados pelo VIH e *Leishmania*.



## **CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos com esse trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. Os antiretrovirais reduziram o número de células recuperadas da cavidade peritoneal dos camundongos BALB/c.
2. O tratamento com lopinavir/ritonavir aumentou o índice de infecção dos macrófagos que foram incubados com leishmânias em condições subótimas e ótimas, porém o tratamento com atazanavir somente aumentou o índice de infecção das células que foram incubadas com leishmânias em condições ótimas.
3. Ambos os antiretrovirais aumentaram o número de células aderidas às lamínulas quando os macrófagos foram incubados com leishmânias em condições subótimas, porém não alteraram o número de células aderidas às lamínulas quando os macrófagos foram incubados com leishmânias em condições ótimas.
4. A viabilidade das leishmânias não foi alterada pelo tratamento com os antiretrovirais. Foi recuperado um maior número de leishmânias dos macrófagos dos grupos tratados com lopinavir/ritonavir e atazanavir do que dos macrófagos do grupo tratado com salina, quando analisado em condições ótimas.
5. A infecção com as leishmânias deprimiu a produção do NO. O tratamento com lopinavir/ritonavir aumentou a produção de óxido nítrico pelos macrófagos incubados com leishmânias em relação aos macrófagos dos animais incubados com as leishmânias mas que foram tratados com salina.
6. Os antiretrovirais não influenciaram a produção de peróxido de hidrogênio e a expressão dos corpúsculos lipídicos pelos macrófagos que foram incubados ou não com leishmânias em condições ótimas.
7. Houve aumento da produção da IL-1 $\beta$  quando os macrófagos dos camundongos tratados com o lopinavir/ritonavir foram incubados com as leishmânias em condições subótimas. Os antiretrovirais não influenciaram a produção de IL-6.

8. Houve depressão da produção da IL-12 p70 quando os macrófagos dos camundongos tratados com o atazanavir foram incubados com as leishmânias em condições ótimas.

9. A infecção pelas leishmânias de macrófagos de camundongos tratados com salina deprimiu a produção do TNF- $\alpha$ . O tratamento dos camundongos com o atazanavir deprimiu a produção do TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, entretanto houve aumento da produção do TNF- $\alpha$  após incubação *in vitro* com as leishmânias, porém, sem ultrapassar os níveis máximos observados nos animais não tratados. Os antiretrovirais não influenciaram a produção de IL-23.

10. Tanto a incubação com as leishmânias, como o tratamento com os antiretrovirais diminuíram a produção da IL-10 pelos macrófagos.

11. O tratamento com o atazanavir estimulou a translocação do NF- $\kappa$ B p65 do citoplasma para os núcleos dos macrófagos incubados apenas com o meio de cultura e favoreceu a translocação mais precoce desse fator de transcrição para os núcleos dos macrófagos incubados com leishmânias em condições subótimas.

12. A infecção com a leishmânia diminuiu a expressão nuclear do RelB nos animais tratados com o lopinavir/ritonavir. A infecção com a leishmânia aumentou a expressão citoplasmática do RelB nos animais tratados com o atazanavir, mas não influenciou a expressão nuclear desta molécula.

13. A infecção com a leishmânia aumentou a expressão citoplasmática do PPAR- $\gamma$  nos animais tratados com o atazanavir, sem modificar a expressão nuclear.

14. O nosso trabalho demonstrou que os inibidores da protease do VIH lopinavir/ritonavir e atazanavir foram capazes de influenciar diversos mecanismos envolvidos na defesa inata contra as leishmânias e, portanto, sugere que o tratamento com esses antiretrovirais pode influenciar o curso clínico das leishmanioses nos indivíduos coinfectados pelo VIH e *Leishmania*.

15. As conclusões estão resumidas na tabela 2.

**Tabela 2.** Sumário dos resultados da influência do tratamento oral com os inibidores da protease do VIH lopinavir/ritonavir e atazanavir sobre funções dos macrófagos de camundongos BALB/c incubados *in vitro* com *L. (L.) amazonensis* em condições de subótimas e ótimas.

Condições da infecção	Subótimas			Ótimas		
	Salina	LPV/RTV	ATV	Salina	LPV/RTV	ATV
Índice de infecção	NP	↑	NA	NP	↑	↑
Aderência	↓	NA	NA	NA	NA	NA
Viabilidade dos macrófagos	↓	NA	NA	NA	NA	NA
Recuperação das leishmânias	-	-	-	NP	↑	↑
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	NA	NA	NA
NO	↓	NA	↓	NA	NA	↓
IL-1b	NA	↑	NA	-	-	-
IL-6	NA	NA	NA	-	-	-
IL-12p70	-	-	-	NA	NA	↓
IL-23	-	-	-	NA	NA	NA
TNF- $\alpha$	-	-	-	↓	NA	↑
IL-10	-	-	-	↓	NA	NA
NF-kB p65 1h	NA	NA	↑	-	-	-
NF-kB p65 4h	↑	↑	↑	-	-	-
NF-kB p65 24h	↑	↑	NA	-	-	-
NF-kB RelB	-	-	-	↓	↓	NA
PPAR- $\gamma$	-	-	-	↓	NA	NA
Corpúsculos lipídicos	-	-	-	NA	NA	NA

NA=Não alterou ↑=Aumentou ↓=Diminuiu NP=Não pertinente (-)=Não avaliado

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SM, Cardoso FO, Souza CS, et al. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Veterinary Parasitology*, 2004; 121(3-4): 179-187.

Adapala N, Chan MM. Long-term use of an antiinflammatory, curcumin, suppressed type 1 immunity and exacerbated visceral leishmaniasis in a chronic experimental model. *Laboratory Investigation*, 2008; 88(12): 1329-1339.

Alexandrino-de-Oliveira P, Santos-Oliveira JR, Dorval MEC, Da-Costa F das CB, Pereira GROL, et al. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in central-west Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2010; 105(5):692-7.

Almeida TF, Palma IC, Mendez IC, Noronha-Dutra AA, Veras PST. *Leishmania amazonensis* fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. *Parasite Immunology*, 2012; 34: 492-498.

Alvar J, Aparício P, Aseffa A, Boer MD, Cañavate C, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008; 21(2): 334-359.

Alvarez-Rueda N, Biron M, Le Pape P. Infectivity of *Leishmania mexicana* is associated with differential expression of protein kinase c-like triggered during a cell-cell contact. *PLoS One*, 2009; 4 (10): e7581.

Alves EAR. Avaliação, *in vitro*, da influência dos antiretrovirais zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a função fagocitária e produção de radicais de oxigênio por neutrófilos e monócitos de indivíduos normais. 2008. 172 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Distrito Federal.

Amini M, Nahrevanian H, Farahmand M. Pathogenicity variations of susceptibility and resistance to *Leishmania major* MRHO/IR/ER strain in BALB/c and C57BL/6 mice. *Iranian Journal of Parasitology*, 2008; 3(4): 51-59.

André P, Groettrup M, Klenerman P, de Giuli R, Booth BL Jr, et al. An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasoma activity, antigen presentation and cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998; 95: 13120-13124.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, et al. Upregulation of Th-1 type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity*, 2002; 70 (12): 6734-6740.

Balestieri FMP, Queiroz ARP, Scavone C, Costa VMA, Barra-Neto M, et al. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes and Infection*, 2002; 4: 23-29.

Barral A, Barral-Neto M. Aspectos imunológicos da leishmaniose cutânea difusa (LCD). *Gazeta Médica da Bahia*, 2009; 79 (3): 35-39.

Bernier R, Barbeau B, Tremblay MJ, Olivier M. The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T Cells through the nuclear factor- $\kappa$ B elements. *Journal of Immunology*, 1998; 160: 2881-2888.

Bernier R, Turco SJ, Olivier M, Tremblay M. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoid cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Journal of Virology*, 1995; 69(11): 7282-5.

Borges AS, Machado AA, Ferreira MS, Figueiredo JF de C, Silva GF, et al. Concomitância de leishmanioses e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV): estudo de quatro casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1999; 32(6): 713-719.

Bouhleb MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, John Brozek, et al. PPAR $\gamma$  activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metabolism*, 2007; 6: 137-143.

Brandonisio O, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, et al. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clinical and Experimental Medicine*, 2002; 2(3): 125-129.

Burger D, Boyd M, Duncombe C, Felderhof M, Mahanontharit A, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of indinavir with or without low-dose ritonavir in HIV-infected Thai patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003; 51: 1231-1238.

Cáceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sánchez MA, Yamamura M, Uyemura K, et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clinical & Experimental Immunology*, 1993; 91(3): 500-5.

Calegari-Silva TC, Pereira RM, De-Melo LD, Saraiva EM, Soares DC, et al. NF-kappa B-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunology Letters*, 2009; 127(1): 19-26.

Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 2012; 3 (301): 1-6.

Castellano LC, Llaguno M, Silva MV, Machado JR, Correia D, et al. Immunophenotyping of circulating T cells in a mucosal leishmaniasis patient coinfecting with HIV. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2011; 44 (4): 520-521.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 2007; 5: 873-882.

Chaudhuri G, Chaudhuri M, Pan A, Chang K. Surface Acid Proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989; 264 (13): 7483-7489.

Chen L, Jarujaron S, Wu X, Sun L, Zha W, et al. HIV Protease inhibitor Lopinavir-induced TNF- $\alpha$  and IL-6 expression is coupled to the unfolded protein response and ERK signaling pathways in macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 2009; 78(1): 70-77.

Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, et al. Oxidized Low Density Lipoprotein Inhibits Interleukin-12 Production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and nuclear factor- $\kappa$ B. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275 (42): 32681-32687.

Chrusciak-Talhari A, Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C, Silva RM Jr, Ferreira LC, et al. Case Report: Tegumentary Leishmaniasis as the cause of immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient co-infected with human immunodeficiency virus and *Leishmania guyanensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2009; 81(4): 559-564.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master regulator of immunity to infection. *The Journal of Immunology*, 2008; 180: 5771-5777.

Cressey TR, Leenasirimakul P, Jourdain G, Tod M, Sukrakanchana P. Low-doses of indinavir boosted with ritonavir in HIV-infected Thai patients: pharmacokinetics, efficacy and tolerability. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005; 55: 1041-1044.

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, et al. *Leishmania*/HIV coinfections in the second decade. *Indian Journal of Medical Research*, 2006; 123: 357-388.

Cunha FQ, Assreuy J, Moss DW, Rees D, Leal LMC, et al. Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF- $\alpha$  and IL-1- $\beta$ . *Immunology*, 1994; 81:211-215.

Da-Cruz AM, Filgueiras DV, Coutinho Z, Mayrink W, Grimaldi Jr G, et al. Atypical mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an acquired immunodeficiency syndrome patient: T-cell responses and remission of lesions associated with antigen immunotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1999; 94 (4): 537-542.

da Luz RI, Vermeersch M, Dujardin J, Cos P, Maes L. *In vitro* sensitivity testing of *Leishmania* clinical field isolates: Preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2009; 53(12): 5197.

Dawit Wolday D, Berheb N, Brittona S, Akuffo H. HIV-1 alters T helper cytokines, interleukin-12 and interleukin-18 responses to the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *AIDS*, 2000; 4(8): 921-929.



Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *Journal of Endocrinology*, 2001; 169: 45-459.

del Giudice P, Mary-Krause M, Pradier C, Grabar S, Dellamonica P, et al. Impact of highly active antiretroviral therapy on the incidence of visceral leishmaniasis in a French cohort of patients infected with human immunodeficiency virus. *The Journal of Infectious Disease*, 2002; 186(9):1366-70.

Demarchi IG, Silveira TG, Ferreira IC, Lonardoni MV. Effect of HIV protease inhibitors on New World *Leishmania*. *Parasitology International*, 2012; 61(4):538-44.

Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: Epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2003; 97(1): 3-15.

Dey R, Sarkar A, Majumder N, Bhattacharyya Majumdar S, Roychoudhury K, et al. Regulation of Impaired Protein Kinase C Signaling by chemokines in murine macrophages during visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 2005; 73(12): 8334 - 8344.

Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *Journal of Endocrinology*, 2001; 169: 453-459.

Dressman J, Kincer J, Matveev SV, Guo L, Greenberg NR, et al. HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation independent of dyslipidemia by increasing CD36-dependent cholesteryl ester accumulation in macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003; 111(3): 389-397.

Fagundes VHV, Oliveira JHT, Vieira S, Spack Jr M, Pupulin ART. Infecções oportunistas em indivíduos com infecção pelo HIV e relação com uso de terapia antirretroviral. *Acta Scientiarum Health Sciences*, 2010; 32 (2): 141-145.

Falú MA, Bustos MFG, Ramoneda CMP, Raspi EM de, Cardozo RM et al. Susceptibility of different mouse strains to *Leishmania amazonensis* infection. *Revista Argentina de Dermatologia* 2009, 15(5):334 -339.

Farias LHS, Rodrigues APD, Silveira FT, Seabra SH, Da Matta RA, et al. Phosphatidylserine exposure and surface sugars in two *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *The Journal Infectious Diseases*, 2013; 207: 537-543.

Figueiredo EM de, Costa e Silva J, Brazil RP. Experimental treatment with sodium stibogluconate of hamsters infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1999; 32 (2): 191-93.

Foley P, Kazazi F, Biti R, Sorrell TC, Cunningham AL. HIV infection of monocytes inhibits the T-lymphocyte proliferative response to recall antigens, via production of eicosanoids. *Immunology*, 1992; 75(3): 391-7.

Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 2002; 34: 54-8.

Gallardo-Soler A, Gómez-Nieto C, Campo ML, Marathe C, Tontonoz P, et al. Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Molecular Endocrinology*, 2008; 22(6): 1394-402.

Goto H, Prianti MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2009; 51(5): 241-246.

Ghosh S, Bhattacharyya S, Sirkar M, Sa GS, Das T, et al. *Leishmania donovani* suppresses activated protein 1 and NF-kappaB activation in host macrophages via ceramide generation: involvement of extracellular signal-regulated kinase. *Infection and Immunity*, 2002; 70(12): 6828-38.

Ghosn EEB, Cassado AA, Govoni GR, Fukura T, Yang Y, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 2010; 107(6): 2568-2573.

Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of National Academy of Science*, 1981; 78: 7764-7768.

Gois LL, Mehta S, Rodrigues MZA, Schooley RT, Badaró R, et al. Decreased memory T-cell response and function in human immunodeficiency virus-infected patients with tegumentary leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2013; 1-6.

Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N, Jeronimo SMB, Nascimento ET, et al. Activation of TGF- $\beta$  by *Leishmania chagasi*: Importance for parasite survival in macrophages. *The Journal of Immunology*, 2003; 170: 2613-2620.

Gruber A, Wheat JC, Kuhlen KL, Looney DJ, Wong-Staal F, et al. Differential effects of HIV-1 protease inhibitors on dendritic cell immunophenotype and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001; 276: 47840 - 47843.

Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Nakamura M, et al. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 2012; 9:40.

Guizani-Tabbane L, Ben-Aissa K, Belghith M, Sassi A, Dellagi K. *Leishmania major* amastigotes induce p50/c-Rel NF- $\kappa$ B transcription factor in human macrophages: Involvement in cytokine synthesis. *Infection and immunity*, 2004; 72(5): 2582-2589.

Hadad N, Levy R, Schlaeffer F, Riesenberger K. Direct effect of human immunodeficiency virus protease inhibitors on neutrophil function and apoptosis via calpain inhibition. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007; 14 (1): 1515 - 1521.

Haberl A, Moesch M, Nisius G, Stephan C, Bickel M, et al. Atazanavir plasma concentrations are impaired in HIV-1-infected adults simultaneously taking a methadone oral solution in a once-daily observed therapy setting. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2010; 66:375-381.

Han I, Goo SY, Park S, Hwang S, Kim Y, et al. Proinflammatory cytokine and nitric oxide production by human macrophages stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Korean Journal of Parasitology*, 2009; 47(3): 205-212.

Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF- $\kappa$ B and the immune response. *Oncogene*, 2006; 25: 6758-6780.

Hentig N von, Kaykhin P, Stephan C, Babacan E, Stürmer M, et al. Decrease of atazanavir and lopinavir plasma concentrations in a boosted double human immunodeficiency virus protease inhibitor salvage regimen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008; 52(6): 2273 - 2275.

Horst R ter, Collin SM, Ritmeijer K, Bogale A, Davidson RN. Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: The influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. *Clinical Infectious Diseases*, 2008; 46:1702-9.

Horta MF, Mendes BP, Roma EH, Noronha FSM, Macêdo JP, Oliveira SL. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research*, 2012; 1-11.

Jackson A, Hill A, Puls R, Else L, Amin J, et al. Pharmacokinetics of plasma lopinavir/ritonavir following the administration of 400/100 mg, 200/150 mg and 200/50 mg twice daily in HIV-negative volunteers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010; 1-6.

Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *Journal of Immunology*, 2001; 166(2): 1141 - 7.

Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, Frederick T, Bertolli J, et al. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 2000; 30: 5-14.

Kawasaki U, Nakagawa A, Nagaosa K, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. Phosphatidylserine binding of class B scavenger receptor Type I, a phagocytosis receptor of testicular Sertoli cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277(30): 7559-7566.

Khouri R, Bafica A, Silva M da P, Noronha A, Kolb J et al. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 2009; 182: 2525-2531.

Khouri R, Novais F, Santana G, Oliveira CI de, Santos MAV dos, et al. DETC induces *Leishmania* parasites killing in human *in vitro* and murine *in vivo* models: A promising therapeutic alternative in leishmaniasis. *Plos One*, 2010; 5(12): e14394.

- Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 2012; 3(251): 1-10.
- Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, et al. Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antiviral Therapy*, 2007;12(4): 489-500.
- Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, Malefyt RW, Kastelein RA, et al. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 2004; 202: 96-105.
- Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection and immunity*, 2002; 70(2):826-35.
- Lawn SD, Butera ST, Folks TM. Contribution of Immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001; 14(4): 753-777.
- Lecoeur H, Giraud E, Prévost MC, Milon G, Lang T. Reprogramming Neutral lipid metabolism in mouse dendritic leucocytes hosting live *Leishmania amazonensis* amastigotes. *PLOS Neglected Tropical Disease*, 2013; 7(6): e2276.
- Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *British Journal of Dermatology*, 2009; 2: 311-318.
- Liew FY, Li Y, Millot S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  synergizes with IFN- $\gamma$  in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *The Journal of Immunology*, 1990; 145: 4305-4310.
- Liu L, Rich BE, Inobe J, Chen W and Weiner HL. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4 T cells to secrete IL-4. *International Immunology*, 1998; 10(8): 1017-1026.
- Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012; 2(83): 1-8.
- Lodge R, Ouellet M, Barat C, Andreani G, Kumar P, et al. HIV-1 promotes intake of *Leishmania* parasites by enhancing phosphatidylserine-mediated, CD91/LRP-1-dependent phagocytosis in human macrophages. *Plos One*, 2012; 7(3): e32761.
- Lonardonì MVC, Barbieri CL, Russo M, and Jancar S. Modulation of *Leishmania (L.) amazonensis* growth in cultured mouse macrophages by prostaglandins and platelet activating factor. *Mediators of Inflammation*, 1994; 3(2): 137-141.

Lopéz-Vélez R. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 2003; 97 (1): S143-S147.

Macedo-Silva ST de, Silva TLA de O, Urbina JA, Souza W de, Rodrigues JCF, et al. Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Molecular Biology International*, 2011; p.1-12.

Magalhães K, Almeida PE, Atella G, Maya-Monteiro CM, Castro-Faria-Neto H, et al. Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through toll-like receptor-2-dependent mechanisms. *The Journal of Infectious Diseases* 2010, 202 (9): 1369-1379.

Martucci C, Franchi S, Lattuada D, Panerai AE, Sacerdote P. Differential involvement of RelB in morphine-induced modulation of chemotaxis, NO, and cytokine production in murine macrophages and lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007; 81(1): 344-54.

Matte C, Maion G, Mourad W, Olivier M. *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite Immunology*, 2001; 23(4):177-84.

Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *The Journal of Leukocytes Biology*, 2010; 87: 371-384.

McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: Interactions between nuclear factor- $\kappa$ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrine Reviews*, 1999; 20(4): 435-459.

Medrano FJ, Rey C, Leal M, Cañavate C, Rubio A, et al. Dynamics of serum cytokines in patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection. *Clinical & Experimental Immunology*, 1998; 114(3): 403-7.

Melo RCN, D'Avila H, Wan H, Bozza PT, Dvorak AM, et al. Lipid Bodies in inflammatory cells: Structure, function, and current imaging techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2011; 59: 540-556.

Mira JA, Corzo JE, Rivero A, Macias J, De Leon FL, et al. Frequency of visceral leishmaniasis relapses in Human Immunodeficiency Virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004 70(3): 298-301.

MS, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana - 2ª. ed. (atual). – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

MS, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil. Programa Nacional de DST E AIDS. Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos infectados pelo HIV- 7ª. ed. (atual). – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.

Mocroft A, Katlama C, Johnson AM, Pradier C, Antunes F, et al. AIDS across Europe, 1994-98: the EuroSIDA study. *Lancet*, 2000; 356(9226):291-6.

Moradin N, Desconteaux A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2012; 2 (121): 1-7.

Moreno J, Cañavate C, Chamizo C, Laguna F, Alvar J. HIV-*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2000; 94(3):328-32.

Muniz-Junqueira MI, Prata A, Tosta CE. Phagocytic and bactericidal function of mouse macrophages to *Salmonella typhimurium* in schistosomiasis mansoni. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1992; 46: 132-136.

Muniz-Junqueira MI, de Paula-Coelho VN. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *International Immunopharmacology*, 2008; 8 (12): 1633-1638.

Murray HW, Tsai CW, Liu J, Ma X. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18. *Infection and Immunity*, 2006; 74(7): 4370-4374.

Nigro L, Cacopardo B, Preiser W, Braner J, Cinatl J, et al. *In vitro* production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania infantum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999; 60(1): 142-145.

Noursadeghi M, Tsang J, Hausteiner T, Miller RF, Chain BM. Quantitative imaging assay for NF- $\kappa$ B nuclear translocation in primary human macrophages. *Journal of Immunological Methods*, 2008; 329(1-2): 194-200.

Nylén S, Akkufó H. Tracing immunity to leishmaniasis. *Future Microbiology*, 2009; 4 (2): 241-254.

Olivier M, Badaró R, Medrano FJ, Moreno J. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2003; 97(1): 79-98.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion Mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005; 18 (2): 293-305.

Padigel UM, Alexander J, Farrell JP. The role of Interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *The Journal of Immunology*, 2003; 171: 3705-3710.

Paredes R, Munoz J, Diaz I, Domingo P, Gurgui M, et al. Leishmaniasis in HIV infection. *J Postgrad Med* 2003, 49(1): 39-49.

Park SY, Kim Y. Surfactin inhibits immunostimulatory function of macrophages through blocking NK- $\kappa$ B, MAPK and Akt pathway. *International Immunopharmacology*, 2009; 9: 886-893

Paula Jr MR. Influência do tratamento de camundongos CBA infectados com *Plasmodium berghei* ANKA com pentoxifilina sobre a capacidade fagocitária, produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico por macrófagos peritoneais in vitro. 2003. 96 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Distrito Federal.

Pawiński T, Pulik P, Gralak B, Horban A. Pharmacokinetic monitoring of HIV-1 protease inhibitors in the antiretroviral therapy. *Acta Polonie Pharmaceutica*, 2008; 65(1): 93-1000.

Petersen AL de OA, Guedes CES, Versoza CL, Lima JGB, Freitas JAR de, et al. 17-AAG kills intracellular *Leishmania amazonensis* while reducing inflammatory responses in infected macrophages. *PLOS One*, 2012; 7(11): e49496.

Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic immunoassay reader. *Journal Immunological Methods*, 1981; 46: 211-226.

Pinheiro, C da S. Avaliação do papel imunomodulador do receptor de peroxissomo ativado- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) no modelo de infecção experimental com *Leishmania major*. 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Prado SRT. Efeitos de imidas cíclicas sobre o metabolismo mitocondrial e atividade antimelanoma. 2005. 256f. Tese (Doutorado em Ciências) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

Preiser W, Cacopardo B, Nigro L, Braner J, Nunnari A, et al. Immunological findings in HIV-*Leishmania* coinfection. *Intervirology*, 1996; 39(4): 285-8.

Prot M, Heripret L, Cardot-Leccia N, Perrin C, Aouadi M, et al. Long-term treatment with lopinavir-ritonavir induces a reduction in peripheral adipose depots in mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2006; 50(12): 3998 - 4004.

Posada-Vergara MP, Lindoso JA, Tolezano JE, Pereira-Chioccia VL, Silva MV, et al. Tegumentary leishmaniasis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome in 2 patients with AIDS. *The Journal of Infectious Diseases*, 2005; 192: 1819-1822.

- Pozio E, Morales MAG. The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends in Parasitology*, 2005; 21(2): 58-62.
- Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2003; 97(1): 17-28.
- Reis L de C, Brito MEF de, Souza M de A, Pereira VRA. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. *Revista de Patologia Tropical*, 2006; 35 (2): 103-115.
- Rezende ELLF, Vasconcelos AMN, Pereira MG. Causes of death among people living with HIV/AIDS in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2010; 14(6):558 - 563.
- Ribera E, Lopez RM, Diaz M, Pou L, Ruiz L, et al. Steady-State pharmacokinetics of a double-boosting regimen of saquinavir soft gel plus lopinavir plus minidose ritonavir in Human Immunodeficiency Virus-infected adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004; 48 (11): 4256-4262.
- Richman D. HIV Chemotherapy. *Nature Reviews*, 2001; 410: 995-1000.
- Rizza SA, Badeley AD. HIV Protease Inhibitors Impact on Apoptosis. *Journal of Medical Chemistry*, 2008; 4(1): 75-79.
- Rodrigues MZA, Grassi MFR, Mehta S, Zhang X, Gois LL, et al. Th1/Th2 cytokine profile in patients coinfecting with HIV and *Leishmania* in Brazil. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011; 18 (10): 1765-1769.
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MAJ, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, 2004; 430(6998): 463-467.
- Rosenthal E, Marty P, del Giudice P, Pradier C, Ceppi C, et al. HIV and *Leishmania* coinfection: A review of 91 cases with focus on atypical locations of *Leishmania*. *Clinical Infectious Disease*, 2000; 31: 1093-5.
- Roberts MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British Medical Bulletin*, 2006; 75: 115-130.
- Rosas LE, Keiser T, Barbi J, Satoskar AA, Septer A, et al. Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *International Immunology*, 2005; 10 (17): 1347-1357.
- Rosenkranz-Weiss P, Sessa WC, Milstien S, Kaufman S, Watson CA, et al. Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells: Elevations in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity. *The Journal of Clinical Investigation*, 1994, 93: 2236-2243.



Ruggieri A, Matarrese P, Gambardella L, Malorni W. Impairment of monocyte migration upon ex vivo treatment with HIV protease inhibitors. 6<sup>th</sup> Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Fonte: <http://pag.ias2011.org/Abstracts.aspx?AID=2590>.

Santos LO, Marinho FA, Altoé EF, Vitória BS, Alves CR, et al. HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. PLOS One, 2009; 4 (3): 4918.

Santos-Oliveira JR, Giacoia-Gripp CBW, Oliveira PA de, Amato VS, Lindoso JAL, et al. High levels of T lymphocyte activation in *Leishmania*-HIV-1 co-infected individuals despite low HIV viral load. BMC Infectious Diseases, 2010; 10:358.

Santos LO, Garcia-Gomes AS, Catanho M, Sodr  CL, Santos ALS, et al. Aspartic peptidases of human pathogenic trypanosomatids: Perspectives and trends for chemotherapy. Current Medicinal Chemistry, 2013; 20: 3116-3133.

Santos-Oliveira JR, Regis EG, Giacoia-Gripp CBW, Valverde JG, Alexandrino-de-Oliveira P, et al. Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. The Journal of Infectious Diseases 2013, 208:57-66 .

Savoia D, Alice T, Tovo PA. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005; 26: 92 - 94.

Serezani CHC, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. Journal of Immunology, 2006;177(5):3201-8.

Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. Indian Journal of Experimental Biology, 2009; 47: 412 - 423.

Silva FMC. Atividade leishmanicida de derivados aminoquinol nicos e efeito imunomodulatório em macrófagos peritoneais infectados com *Leishmania amazonensis* e *L. major*. 2010. 97 f. Disserta o (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

Slauch JM. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. Molecular Microbiology 2011, 80(3), 580-583.

Sousa-Franco J, Araujo-Mendes E, Silva-Jardim I. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. Microbes and Infection, 2006; 8 (2): 390-400.

Stebut E von. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. European Journal of Dermatology, 2007; 17(2): 115-22.

Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, Gils JM, Deng J, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature Immunology*, 2009; 11(2): 155-162.

SVS/MS. Boletim eletrônico epidemiológico. HIV/AIDS. Ministério da Saúde, 2012: 1-63.

SVS/MS. Boletim eletrônico epidemiológico. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. Ministério da saúde do Brasil, 2010; 2: 2-24.

Taylor S, Little J, Halifax K, Drake S, Back D. Pharmacokinetics of nelfinavir and nevirapine in a patient with end-stage renal failure on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000; 45: 709-717.

Tolouei S, Ghaedi K, Khamesipour A, Akbari M, Baghaei M, et al. IL-23 and IL-27 levels in macrophages collected from peripheral blood of patients with healing vs non-healing form of cutaneous leishmaniasis. *Iranian Journal of Parasitology*, 2012; 7(1):18-25

Trudel N, Garg R, Messier N, Sundar S, Ouellette M, et al. Intracellular survival of *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis is significantly reduced by HIV-1 protease inhibitors. *The Journal of Infectious Diseases*, 2008; 198: 1292-1299.

Torrentera FA, Lambot MA, Laman JD, Meurs M van, Kiss R, et al. Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2002; 66(3): 273-279.

Underhill DM, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, 1999; 17: 593-623.

Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual Review of Immunology*, 2002; 20: 825-852

Urdapilleta AAA. Atividade de substâncias isoladas de líquens sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Distrito Federal.

Van Gool SW, Vandenberghe P, de Boer M, Ceuppens JL. CD80, CD86 and CD40 Provide Accessory Signals in a Multiple-Step T-Cell Activation Model. *Immunological Reviews*, 1996; 153: 47-83.

Voronov E, Dotan S, Gayvoronsky L, White RM, Cohen I, et al. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *International Immunology*, 2010; 22(4): 245-257.

Wanasen M, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunologic Research*, 2008; 41(1): 15-25.

Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, Donhauser N, Röllinghoff M, et al. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *The Journal of Immunology*, 2001; 166(6): 4012-9.

Wu W, Weigand L, Mendez S. The IL-6-deficient mouse exhibits impaired lymphocytic responses to a vaccine combining live *Leishmania major* and CpG oligodeoxynucleotides. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009; 55(6):705 - 13.

Whelan KT, Lin CL, Cella M, McMichael AJ, Austyn JM, et al. The HIV protease inhibitor indinavir reduces immature dendritic cell transendothelial migration. *European Journal of Immunology*, 2003; 33: 2520-2530.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis: Forms of leishmaniasis. Fonte: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em 15 de outubro de 2013.

Wolday D, Akuffo H, Fessahaye G, Valantine A, Britton S. Live and killed human immunodeficiency virus type-1 increases the intracellular growth of *Leishmania donovani* in monocyte-derived cells. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 1998; 30(1): 29-34.

Wolday D, Berhe N, Britton S, Akuffo H. HIV-1 alters T helper cytokines, interleukin-12 and interleukin-18 responses to the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *AIDS*, 2000; 14(8):921-9.

Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clinical Immunology*, 2004; 113(1): 81-88.

Zhao C, Thibault S, Messier N, Ouellette M, Papadopoulou B, et al. In primary human monocyte-derived macrophages exposed to Human immunodeficiency virus type 1, does the increased intracellular growth of *Leishmania infantum* rely on its enhanced uptake? *Journal of General Virology*, 2006; 87: 1295-1302.

**ANEXO I**  
**(Parecer do Comitê de Ética no Uso Animal)**



Faculdade de Medicina  
Universidade de Brasília  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM

Brasília, 27 de fevereiro de 2012

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “Influência dos inibidores da protease do vírus da imunodeficiência humana (VIH) lapinavir/tritonavir e atazanavir sobre a produção de mediadores lipídicos, óxido nítrico e citocinas e sobre a ativação das vias do inflamassoma e NFKB e taxa de infecção em macrófagos murinos incubados *in vitro* com *Leishmania amazonensis*”, UnBDoc 12673/2012, sob responsabilidade da Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Gato V. dos Santos  
Coordenador do CEUA-FM