

MARIANNA CARMINATTI MARTINS PAPA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA, PRODUÇÃO DE
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E FATOR DE NECROSE TUMORAL POR
MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Brasília-DF 2007

MARIANNA CARMINATTI MARTINS PAPA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA, PRODUÇÃO DE
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E FATOR DE NECROSE TUMORAL POR
MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

BRASÍLIA – DF

2007

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE MEDICINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA, PRODUÇÃO DE
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E FATOR DE NECROSE TUMORAL POR
MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Profa Dra MARIA IMACULADA MUNIZ BARBOZA JUNQUEIRA

BRASÍLIA – DF
2007

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular, área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília-DF.

O presente trabalho foi realizado com recursos parcialmente providos pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e do PROF-CAPES, Patologia Molecular-UnB.

DEDICATÓRIA

A Deus, alicerce da minha fé, onde deposito minha confiança e encontro forças para alcançar meus objetivos.

Aos meus amados pais, Almeri e Zelma, que durante toda a vida me incentivaram, educaram e guiaram meus caminhos com total dedicação e amor.

Ao meu marido, Fabiano, pela compreensão e paciência nos momentos em que estive ausente, e pelo estímulo dado para seguir em frente.

Às minhas irmãs, Paolla e Anna Paula, pelo amor, amizade, e cumplicidade.

À minha querida orientadora, Doutora Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, por todo tempo abdicado com carinho e paciência, pela sabedoria, pelas conversas e conselhos e pelo incentivo a mim dados durante esses anos de convívio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os voluntários que doaram seu sangue propiciando a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Almeri e Zelma, que com todo amor me orientaram nos caminhos da vida e na formação do meu caráter.

Ao meu marido, Fabiano, que nas horas mais difíceis contribuiu com sua força apoio e paciência.

Às minhas irmãs, Paolla e Anna Paula, pelo carinho e sinceridade em todos os momentos das nossas vidas.

À Professora Doutora Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, por sua constante presença e apoio tanto na realização dos experimentos quanto na orientação e correções da dissertação e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Professor Doutor Carlos Eduardo Tosta, pela gratificante convivência, pelo carinho e pelos ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de Imunologia Celular, Shirley Claudino Pereira Couto, César Augustus Fernandes da Silva, Selma Aparecida Kückelhaus, Érica Alessandra Rocha Alves e Vanessa Viana Cardoso, que com seus auxílios, conversas e conselhos fizeram muito mais proveitosa e divertida esta etapa da minha vida.

Rosana Regina de Saldanha, amiga e companheira nos momentos áridos de trabalho, pelo carinho, amizade, confiança e força, sem os quais essa jornada se tornaria muito mais difícil.

Ao Sr José Siqueira da Silva, ao Sr Nelson Pelet Nascimento, em especial ao Sr Felício (*in memória*), equipe do laboratório de Imunologia Celular, pelo grande apoio dispensado no preparo de reagentes e pela amizade.

Aos amigos da Euroamericana, com especial agradecimento à Viviany Nicolau Dias Coelho, por sua confiança e compreensão nos meus momentos de ausência.

A professora e amiga Maria Augusta de Menezes que é responsável direta por esta realização.

Aos bibliotecários da Biblioteca Central da UnB, pelo auxílio nas pesquisas bibliográficas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIV
1) INTRODUÇÃO	1
2) OBJETIVOS	14
3) MATERIAL E MÉTODOS	16
• Delineamento dos experimentos	17
• Gráfico do delineamento	18
• Grupos de estudos e aspectos éticos	19
• Avaliação da capacidade fagocitária pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos	21
• Preparação das leveduras para o teste de fagocitose	22
• Avaliação da capacidade fagocitária pelos receptores para opsoninas.	24
• Produção do peróxido de hidrogênio pelos monócitos do sangue periférico	24
• Produção do fator de necrose tumoral- α pelos monócitos do sangue periférico	25
• Análise estatística	27
4) RESULTADOS	29
5) DISCUSSÃO	54
6) CONCLUSÕES	66
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE ABREVIATURAS

CMN	Células mononucleares
CO ₂	Dióxido de carbono
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
CR1	Receptor para complemento do tipo 1
CR3	Receptor para complemento do tipo 3
ADN	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fc	Fração constante
FNT- α	Fator de necrose tumoral- α
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
INF- γ	Interferon- γ
Ig	Imunoglobulina
IgG2	Imunoglobulina da classe G subclasse 2
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
LPG	Lipofosfoglucona
L-NMMA ³	L-NG-monometil-arginina

LPS	Lipopolissacárideo
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos -1
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaOH	Hidróxido de sódio
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Íon superóxido
PAMPS	Receptores para padrões moleculares de reconhecimento
PMA	Acetato forbol miristato
ARN	Ácido ribonucléico
SFB	Soro fetal bovino
STF	Solução salina tamponada com fosfato
Ta1	Linfócitos T auxiliar do tipo 1
Ta2	Linfócitos T auxiliar do tipo 2
TGF- β	Fator transformador de crescimento- β

RESUMO

A leishmaniose é endêmica em 88 países e é estimado que mais de 12 milhões de indivíduos são infectados pelas várias espécies do parasita, ocorrendo aproximadamente 1,5 a 2 milhões de casos clínicos por ano da doença no mundo. Os macrófagos são importantes na defesa contra a doença, pela fagocitose e os mecanismos microbicidas intracelulares. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade fagocitária, a capacidade de produção de peróxido de hidrogênio e a capacidade de produção de fator de necrose tumoral- α pelos monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana. A capacidade fagocitária foi avaliada em 18 indivíduos com leishmaniose e 15 indivíduos controles normais utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae*, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos e pelos receptores que reconhecem opsoninas. A produção de peróxido de hidrogênio foi avaliada pela técnica de oxidação do vermelho fenol na presença de peroxidase, e a avaliação da produção de fator de necrose tumoral- α foi realizada pela técnica de ELISA no sobrenadante das culturas dos monócitos. A capacidade fagocitária dos monócitos dos indivíduos com leishmaniose tegumentar americana foi menor do que a dos indivíduos normais, tanto pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos quanto pelos receptores para opsoninas. A menor capacidade fagocitária deveu-se ao menor envolvimento de macrófagos na fagocitose, não havendo alteração no número médio de leveduras fagocitadas, para a fagocitose testada por ambos os tipos de receptores. A produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos dos indivíduos com LTA foi maior do que a do grupo controle, tanto basal quanto após estímulo com LPS e PMA. A produção de fator de

necrose tumoral- α também foi maior nos indivíduos com leishmaniose. Nossos dados mostraram pela primeira vez que a capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos com LTA é menor do que a dos indivíduos normais, embora a produção de substâncias microbidas, como radicais de oxigênio e FNT- γ foi maior do que os valores dos indivíduos normais. É possível que estas alterações das funções dos fagócitos tenham repercussões tanto nos mecanismos de defesa antiparasitária quanto nos mecanismos de imunopatogenia da doença.

ABSTRACT

Leishmaniasis threatens 350 million people in 88 countries and remains a serious public health problem in several parts of the world with more than 12 million infected individuals by some species of the parasite, and about 1,5 million clinical cases by year. Macrophages are important in defense against parasite through phagocytosis and microbicidal mechanisms. This work aimed to evaluate the phagocytosis, hydrogen peroxide and TNF- α production by monocytes from leishmaniasis individuals. Phagocytosis was assessed in 18 infected individuals and 15 normal control using *Saccharomyces cerevisiae*, through pattern recognition receptors and opsonin receptors. The hydrogen peroxide production was assessed by the phenol red oxidation technique. Tumor necrosis factor- α was assessed in the supernatant of monocyte cultures by an immunoassay test. Phagocytosis was decreased in leishmaniasis individuals, through pattern recognition receptors and opsonin receptors. However, hydrogen peroxide and TNF- α production were increased in leishmaniasis individuals. Our data showed for the first time that phagocytic index of monocytes were decreased in leishmaniasis individuals. However, TNF- α production and the microbicidal hydrogen peroxide were increased in these individuals. These data suggest these alterations in monocytes might play a role both in defense against parasites as in pathogenesis of the disease.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é endêmica em 88 países e é estimado que mais de 12 milhões de indivíduos estão infectados pelas várias espécies do parasita, ocorrendo aproximadamente 1.5 a 2 milhões de casos clínicos por ano (WHO, 2007).

A *Leishmania* que é o parasita causador da leishmaniose, pertence à família dos tripanossomatídeos, sendo responsável por um grupo de doenças cujos sintomas variam desde lesões cutâneas ao envolvimento visceral fatal (Ansari e cols, 2006)

A leishmaniose é endêmica em áreas tropicais, subtropicais, no sul europeu e em desertos no oeste asiático e 90% das ocorrências de leishmaniose cutânea (LC) se concentram em 7 países - Afeganistão, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita e Síria, enquanto que 90% dos casos de leishmaniose visceral (LV) são mais freqüentemente diagnosticados em 5 países - Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (Saha e cols, 2006).

Dependendo da espécie do parasita e do padrão da resposta imunológica do hospedeiro é produzida uma variedade de doenças que vão desde forma assintomática, até leishmaniose tegumentar e visceral, podendo levar à desfiguração e até mesmo à morte, particularmente na forma visceral da doença (Cunningham, 2002; Ansari e cols, 2006; Leopoldo e cols, 2006).

A Leishmaniose tegumentar é classificada em três formas clínicas: cutânea (LC), mucosa (LM) e cutâneo-mucosa (LCM). Aproximadamente 2% das pessoas infectadas pela *Leishmania* (Vianna) *braziliensis* desenvolvem a forma mucosa (Wilson e cols, 2005), o restante desenvolve a forma cutânea (Pedras e cols,

2003). No Brasil, a *Leishmania braziliensis* é a principal responsável pela forma tegumentar da doença (Amato e cols, 2003) como também dos casos de leishmaniose cutâneo-mucosa (Wilson e cols, 2005).

Na forma cutânea da leishmaniose, as lesões evoluem de pápulas para nódulos até lesões ulceradas, delimitadas, com acentuada depressão central e bordas elevada que cicatrizam depois da quimioterapia específica. Algumas lesões não se tornam ulceradas, e persistem como nódulos ou placas (Herwaldt, 1999; Clarêncio e cols, 2006).

Os mecanismos pelos quais o parasita induz diferentes formas clínicas da doença incluem fatores como o comportamento do vetor, a virulência do parasita e o tipo de resposta do hospedeiro dependente da resistência inata e da imunidade adquirida (Herwaldt, 1999; Silveira e cols, 2005; Pinheiro e cols, 2006).

A forma cutâneo-mucosa é causada pela *L. braziliensis*. Este parasita tem tropismo pelos macrófagos da região naso-faríngea ocorrendo granuloma na mucosa local que eventualmente destrói o nariz e a boca (Descoteaux, 1999; Leopoldo e cols, 2006).

A leishmania vive dentro do fagolisossoma em monócitos e macrófagos do hospedeiro vertebrado na forma amastigota (3-7 μm de diâmetro), que é imóvel.

Quando o flebótomo ingere o macrófago parasitado, durante o repasto sangüíneo, os amastigotas são liberados no estômago do inseto. Rapidamente, essas formas se transformam em formas flageladas, chamadas promastigotas, que são móveis. Nesta fase, o parasita desenvolve uma série de modificações morfológicas se diferenciando em promastigota procíclico, encontrado nas

paredes do trato alimentar do flebótomo, que se multiplica extracelularmente por divisão binária. A partir daí, o parasita passa para o estágio promastigota metacíclico, sendo capazes de migrar para o intestino anterior do inseto de modo que ele pode ser transmitido no respasto sangüíneo subsequente (Shaha, 2006).

Estes organismos procíclicos, chamados de imaturos, expressam uma pequena quantidade de lipofosfoglucona (LPG) em sua superfície. Apesar de os parasitas maduros, metacíclicos, expressarem moléculas de LPG estes parecem ter resíduos de galactose e arabinose e um maior número de repetições de unidades de dissacarídeos de duas a três vezes, o que parece aumentar sua antigenicidade. Dando seguimento ao ciclo, estes parasitas metacíclicos são liberados das glândulas salivares do inseto. Enquanto as formas procíclicas do organismo são extremamente sensíveis à lise pelo complemento pela via alternativa, os organismos metacíclicos ativam a via clássica do complemento, mas não são lisados. Quando, então, o flebótomo pica um hospedeiro mamífero, ele transmite a leishmânia em sua forma promastigota metacíclica através da saliva (Awasthi e cols, 2004; Descoteaux, 1999).

A dose de parasitas inoculada pelo flebótomo é baixa, variando de 10-1000 promastigotas metacíclicos. Os parasitas são inoculados com uma pequena quantidade de saliva do flebótomo que contém moléculas anti-hemostáticas e proteínas imunomodulatórias (Belkaid e cols, 1998).

Uma vez no tecido do hospedeiro, os promastigotas infectam os macrófagos onde passam para a forma amastigota rapidamente, ali esses parasitas sobrevivem e se multiplicam dentro do fagolisossoma. Eventualmente

essa multiplicação leva à lise do macrófago. Os parasitas liberados infectam outros macrófagos e o ciclo continua (Awasthi e cols, 2004; Belkaid e cols, 1998).

No fagolisossoma dos macrófagos, a leishmânia é processada e seus antígenos são apresentados pelas moléculas de CPH de classe II na superfície do macrófago e são reconhecidos por linfócitos T CD4⁺ específicos para o antígeno do parasita induzindo a sua expansão (Launois e cols, 1998). O linfócito T tem um papel importante na resposta imune contra a leishmânia. O tipo de resposta imune por linfócitos T CD4⁺ é o determinante de cura ou de patogenicidade pelo parasita (Clarêncio e cols, 2006).

Há subpopulações distintas de linfócitos T CD4⁺, incluindo linfócitos T auxiliares 1 (Ta₁) e os linfócitos T auxiliares 2 (Ta₂). Os linfócitos Ta₁ produzem citocinas inflamatórias (Wilson e cols, 2005). Estes linfócitos levam à ativação de macrófagos e secreção de algumas subclasses de imunoglobulinas pelos linfócitos B, como a IgG2a, capazes de fixar complemento e neutralizar vírus. Enquanto os linfócitos T auxiliares 2 (Ta₂) liberam citocinas anti-inflamatórias, causam a exacerbação da doença e induzem a produção de anticorpos das classes IgG1, IgE e IgA, além de secretarem citocinas que inibem o desenvolvimento do linfócito Ta₁ (Cunningham, 2002; Awasthi e cols, 2004).

Estudos utilizando anticorpos monoclonais contra linfócitos T CD4⁺ demonstraram que estes linfócitos específicos contra o parasita são responsáveis pela resolução espontânea de lesões primárias em camundongos com fenótipos resistentes (Launois e cols, 1998). Tem sido demonstrado *in vitro* que linfócitos Ta₁ CD4⁺ produzem citocinas que ativam a via funcional do Fas (CD95)-Fas

ligante (FasL) e que os linfócitos Ta_2 não desencadeiam apoptose de células alvo através da interação de Fas/FasL. A morte por apoptose de macrófagos infectados pode resultar em um decréscimo no número de células parasitadas, porém não diminui a eficiência da ativação de macrófagos através de linfócitos T produtores de $INF-\gamma$ (Launois e cols, 1998). Em contraste, a IL-4, produzida pelos linfócitos Ta_2 , inibe a ativação de macrófagos, pela inibição do $INF-\gamma$, citocina primordial na ativação de macrófagos (Launois e cols, 1998).

Muitas outras citocinas são importantes na resposta contra o parasita, como a IL-2, que é um fator estimulador de células citotóxicas naturais (NK), e primordial na indução da maturação de linfócitos, além de importante imunorreguladora do início e manutenção da resposta Ta_1 . A produção de IL-2 por macrófagos e células dendríticas causa a diferenciação de linfócitos para Ta_1 e induz a produção de $INF-\gamma$ por linfócitos T e por células citotóxicas naturais (NK). O $INF-\gamma$ juntamente com o fator de necrose tumoral- α (FNT- α), este último produzido por macrófagos infectados, ativam mecanismos de toxicidade para o parasita (Saha e cols, 2006; Murray e cols, 2006).

Em modelos experimentais, utilizando camundongos infectados por *L. major* que desenvolveram leishmaniose, o padrão da doença foi determinado pela natureza e magnitude da resposta das células T e das citocinas liberadas. Em camundongos infectados, a produção de $INF-\gamma$ por linfócitos Ta_1 e células NK resulta em resistência, enquanto a expansão de células Ta_2 , produtoras de IL4, confere susceptibilidade à doença (Herwaldt, 1999 ;Rousseau e cols, 2001).

Há bom prognóstico para a evolução da leishmaniose cutânea quando existe predominância de resposta Ta_1 , desde que esta resposta leva à produção de interferon gama ($IFN-\gamma$), fator de necrose tumoral- α e ativação dos macrófagos infectados. Contudo, uma resposta Ta_1 exacerbada pode estar também associada com uma maior severidade clínica da doença (Antonelli e cols, 2005).

Estudos realizados por Leopoldo e cols (2006) mostraram que pacientes com LC produziam maior quantidade de $IFN-\gamma$ que pacientes com leishmaniose disseminada e que níveis de $FNT-\alpha$ de camundongos com LC também foram significativamente maiores do que os níveis encontrados em pacientes com leishmaniose disseminada quando estimulado por antígenos de *L. braziliensis*, específicos para leishmaniose disseminada e para leishmaniose cutânea. Estudos recentes também demonstraram que monócitos presentes em lesões leishmanióticas localizadas tinham uma produção aumentada de $FNT-\alpha$ (Carrada e cols, 2007).

Após a inoculação do parasita no tecido subcutâneo do hospedeiro pelo vetor os polimorfonucleares neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o sítio da infecção e fagocitar o parasita. Estes polimorfonucleares podem interiorizar a forma promastigota da leishmânia, mas uma vez dentro destas células, não se observa multiplicação do parasita. Desta forma, estas células serviriam somente como um abrigo temporário para o parasita nas primeiras horas ou dias depois da infecção. Depois da infecção com o parasita ocorre apoptose dos neutrófilos. Estas células infectadas secretam quimiocinas MIP-1, que atraem macrófagos (Zandbergen, 2004).

Tem sido observado que os macrófagos que ingeriam estes neutrófilos apoptóticos infectados com leishmânia e que os parasitas interiorizados desta forma indireta sobreviviam e se multiplicavam dentro dos macrófagos. Foi ainda verificado que a ingestão destes neutrófilos apoptóticos resultava na liberação de citocinas antiinflamatórias, como TGF- β , pelos macrófagos (Zandbergen, 2004).

Na resposta imune celular contra o parasita, o linfócito T CD8⁺ também participa. Linfócitos T CD8⁺ isolados de pacientes com forma assintomática da infecção por leishmânia mostrou produção aumentada de INF- γ , o que sugere um papel destes linfócitos na resistência em humanos contra a infecção pela leishmania (Saha e cols, 2006).

Os linfócitos citotóxicos naturais (NK) também fazem parte da população de células que podem participar da resposta imune contra a leishmânia. As células NK produzem tanto IFN- γ quanto IL-5. Acredita-se que estas células contribuam no controle da infecção em pacientes assintomáticos. Alguns estudos mostraram que os promastigotas de leishmânia são capazes de estimular células NK à secretarem IFN- γ em uma resposta inicial ao parasita (Saha e cols, 2006).

Alguns fagócitos profissionais, como os macrófagos, têm receptores de membrana que auxiliam a fagocitose. Ao menos três tipos de receptores têm sido descritos, o receptor para a porção Fc da IgG (FcR), os receptores para componentes do complemento (CR), CR-1 e CR-3, e os receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos (PAMPS). Os receptores para Fc facilitam a fagocitose de partículas opsonizadas por imunoglobulinas enquanto o CR-3 se liga a partículas recobertas pelas proteínas do complemento C3bi (Nagl e

cols, 2002; Stein e Keshav, 1992). Os receptores para PAMPS reconhecem padrões de moléculas como lipopolissacarídeos e manose, presentes na maioria dos microorganismos, neste caso a fagocitose ocorre sem depender da opsonização por anticorpos ou sistema complemento (Delves e Roitt, 2000).

Após a ingestão da leishmânia se iniciam os mecanismos microbicidas, entre eles, o processo oxidativo. A ligação ao receptor para Fc induz à liberação de vários produtos como fator de necrose tumoral (FNT- α) e desencadeia a explosão respiratória com produção de peróxido de hidrogênio (Nagl e cols, 2002; Stein e Keshav, 1992)

As leishmânias em suas formas promastigotas se ligam a receptores do complemento 1 e 3 (CR1&3) e C3b de macrófagos antes de serem internalizados. CR1 é o maior ligante presente em macrófagos para a ligação de promastigotas maduros além de outros receptores como CR3 que tem sido alvo de vários estudos.

A via de interiorização de amastigotas por macrófagos necessita de moléculas de adesão ou receptores para quimiocinas presentes na superfície dos fagócitos. Esta forma de fagocitose ainda está pouco definida. A identificação de anticorpos naturais ligados a amastigotas in vivo sugere que receptores de macrófagos para Fc e CR3 podem contribuir para a interiorização dos amastigotas.

A fagocitose de corpos estranhos pelos macrófagos resulta em explosão oxidativa, sendo produzidos radicais hidroxila, superóxido e peróxido de hidrogênio no sítio da fagocitose, que interage com a membrana fosfolipídica do

patógeno causando sua morte (Cunningham, 2002; Awasthi e cols, 2004, Wilson e cols, 2005).

Os macrófagos possuem mecanismos microbicidas intracelulares. Durante a infecção, a atividade microbicida da célula do hospedeiro para o parasita ocorre em vários períodos de tempo. No início, na fagocitose de promastigotas pode ocorrer resposta oxidativa estimulada pelos eventos da fagocitose. Posteriormente, os macrófagos quiescentes, contendo o parasita já como amastigota nos vacúolos fagocíticos dos macrófagos, podem ser ativados por citocinas e matar as leishmânias intracelularmente. Os mecanismos de evasão do parasita às moléculas microbicidas produzidas neste estágio da infecção são muito importantes para a leishmânia ser capaz de iniciar e manter a infecção da célula hospedeira (Gantt e cols, 2001).

Fagócitos de hospedeiros vertebrados produzem superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico como parte do armamento microbicida. Estes radicais reagem rapidamente para formar efetores tóxicos como radicais hidroxila e peroxinitritos. Os micróbios intracelulares que residem dentro de macrófagos estão sujeitos à ação destes radicais de oxigênio, porém alguns parasitas possuem mecanismos que possibilitam o escape destes agentes potencialmente fatais (Miller e cols, 2000).

A grande produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode levar a danos em macromoléculas como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos ou carboidratos, podendo afetar também a função celular (Vouldoukis e cols, 1995). Dois importantes oxidantes derivados de macrófagos têm sido identificados como

críticos no controle da infecção por leishmânia. Durante o primeiro estágio da infecção são produzidos superóxido como parte da explosão respiratória em macrófagos de camundongos em resposta à fagocitose. Promastigotas de leishmânia são susceptíveis à exposição ao superóxido e radicais hidroxila gerados pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Gantt e cols, 2001).

O H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério e tem vida longa, além de ser capaz de atravessar camadas lipídicas, e poder reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++} . Assim, é altamente tóxico para as células; e esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro (Ferreira e Matsubara, 1997).

Já está bem estabelecido que o H_2O_2 pode matar tanto o parasita promastigota quanto o amastigota. Este radical pode ser tóxico aos promastigotas se sofrerem exposição ao peróxido durante a fagocitose, ou se este for adicionado por vias exógenas in vitro.

Das e cols (2001) demonstraram que a exposição ao H_2O_2 causa várias modificações em promastigotas de *L. donovani* como condensação nuclear, acúmulo de cálcio intracelular, ativação da via das caspases, fragmentação do DNA celular e perda de volume celular. Demonstraram que altas concentrações de peróxido de hidrogênio aumentam a perda da motilidade assim como a morte celular, sugerindo que o grau de estresse oxidativo é importante para a sobrevivência do parasita.

Outro oxidante anti-leishmânia produzido por macrófagos é o óxido nítrico. Este radical é um gás inorgânico gerado a partir da oxidação da L-arginina por

uma família de enzimas, chamada de óxido nítrico sintase. Ele é produzido por diferentes tipos de células para uma variedade de funções biológicas. O óxido nítrico é também excretado em altas concentrações por macrófagos como parte de seu mecanismo de toxicidade para microorganismos (Spek e cols, 2001). Em humanos a atividade microbicida do óxido nítrico liberado por macrófagos é induzida por lipopolissacarídeos (LPS) e por algumas citocinas como interferon ($\text{INF-}\gamma$) (Vouldoukis e cols, 1995).

Diferentemente do superóxido que é gerado durante a fagocitose do parasita, o óxido nítrico é gerado depois da ativação do macrófagos por $\text{INF-}\gamma$ e $\text{FNT-}\alpha$ e é mais eficiente na morte dos amastigotas intracelulares. Inibidores tais como L-NG-monomethyl-arginina (L-NMMA)³ levam ao aumento da sobrevivência de amastigotas e de sua replicação dentro de macrófagos de camundongos (Gantt e cols, 2001; Das e cols, 2001). Embora existam fortes evidências de que o óxido nítrico e o H_2O_2 desempenham um importante papel na leishmaniose murina, ainda permanece controverso o papel destes radicais na resposta anti-leishmânia em macrófagos humanos (Gantt e cols, 2001; Das e cols, 2001).

O tipo de resposta do sistema de fagócitos tem papel primordial na evolução da doença, entretanto, os mecanismos envolvidos na defesa podem também participar da fisiopatogenia da doença, e está ainda pouco esclarecida a resposta dos fagócitos na leishmaniose humana. A fagocitose e os mecanismos microbicidas, que já têm sido avaliados em modelos experimentais, e as conseqüências que podem advir desse processo, permanecem ainda pouco esclarecidas em indivíduos infectados com a leishmânia. O esclarecimento das

funções dos fagócitos em indivíduos com leishmaniose poderá propiciar um melhor entendimento da imunidade e imunopatogenia da doença e um melhor acompanhamento destes pacientes.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a função dos fagócitos mononucleares, células efetoras na resposta imune contra a leishmânia. Os monócitos avaliados foram de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana, onde foi desenvolvido a avaliação da função fagocitária, produção de radicais de oxigênio e produção de fator de necrose tumoral α pelos monócitos do sangue periférico.

1) A capacidade fagocitária foi avaliada pela determinação da fagocitose pelos monócitos de indivíduos com leishmaniose e controles normais, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos e pelos receptores para opsoninas (complemento).

2) Os radicais de oxigênio foram avaliados pela produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos de indivíduos portadores de leishmaniose e controles normais.

3) A produção de fator de necrose tumoral- α pelos monócitos de indivíduos com leishmaniose foi avaliada no sobrenadante das culturas dos monócitos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupos de Estudo e Métodos

1. Delineamento experimental

No presente trabalho avaliou-se a atividade funcional de monócitos de indivíduos com Leishmaniose Tegumentar Americana em comparação com indivíduos voluntários normais. Foram avaliadas a capacidade fagocitária, a produção de peróxido de hidrogênio e de fator de necrose tumoral- α *in vitro* por estas células. Os testes foram realizados antes de iniciar qualquer tipo de tratamento antiparasitário. O desenho experimental encontra-se descrito na Figura 1.

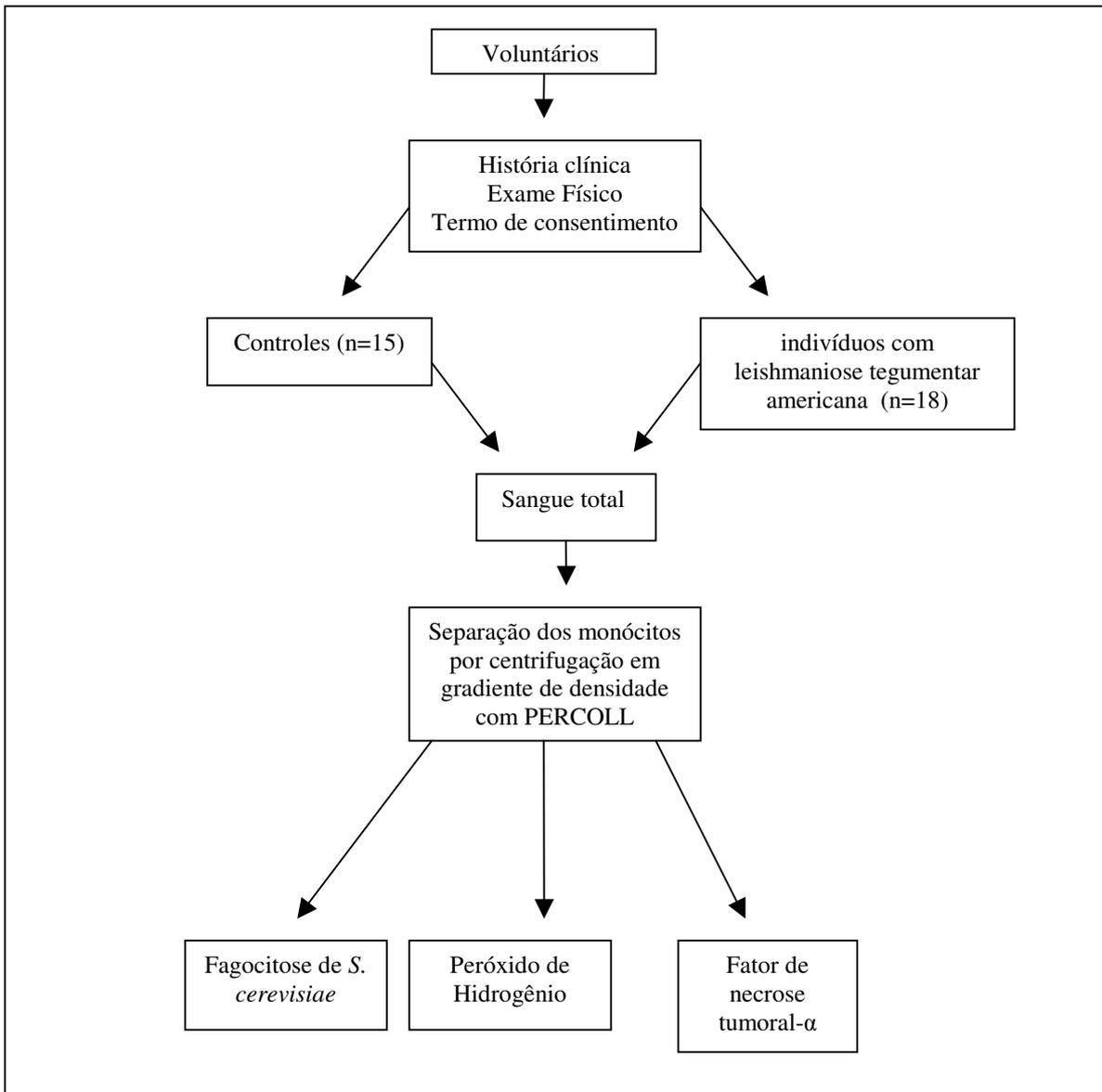


Figura 1. Delineamento do experimento

Grupos de estudos e aspectos éticos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular da Área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, onde foi avaliada a atividade do sistema fagocítico mononuclear de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana acompanhados no ambulatório de leishmaniose do Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília.

O presente projeto obedeceu as normas para pesquisa científica em seres humanos definidas pela declaração de Helsinki atualizada (WMA, 2002) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

No estudo foram incluídos somente os indivíduos que consentiram voluntariamente em participar da pesquisa, e que leram e assinaram o termo de consentimento. A coleta de sangue era feita antes do início do tratamento específico dos pacientes.

O grupo de estudo compreendeu 18 indivíduos portadores de leishmaniose tegumentar americana, com média \pm DP de idade de $41,6 \pm 15,8$ anos, variando entre 18 a 64 anos, sendo 15 homens e 3 mulheres.

A doença foi definida por parâmetros clínicos e laboratoriais. As formas clínicas foram caracterizadas como cutânea em 18 indivíduos.

Para definição diagnóstica foi considerado o paciente com quadro clínico sugestivo que apresentava pelo menos 1 diagnóstico laboratorial positivo entre os exames laboratoriais realizados. Foram realizados a cultura para *Leishmania* em

14 pacientes, a intradermoreação de Montenegro em 14 pacientes, pesquisa indireta de anticorpos fluorescentes em 18 pacientes e exame histopatológico em 18 pacientes (Sampaio e Paula, 1999).

Foram critérios de inclusão pacientes que tinham pelo menos um dos exames diagnósticos acima positivos.

Foram critérios de exclusão indivíduos que estavam reiniciando o tratamento com glucantime por motivo de reincidência da doença, pacientes em uso de medicamentos ou apresentando outras doenças concomitantes que pudessem interferir nas funções do sistema imunitário, idade menor de 18 ou maior de 65.

Como controle normal foram estudados 15 indivíduos normais, 7 homens e 8 mulheres, com média \pm DP de idade de 32.5 ± 10.1 , entre 18 e 52 anos.

O sangue foi coletado com vacutainer heparinizado com agulha de coleta múltipla, da região da fossa cubital, com material estéril e descartável, após a assepsia com álcool iodado. O material foi utilizado para a análise das funções dos fagócitos mononucleares dentro de no máximo 1 hora da coleta.

Capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.

Para avaliar a capacidade fagocitária de monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, foi realizado o teste de

fagocitose adaptado da técnica descrita por Muniz-Junqueira e cols (2001), na presença de soro fetal bovino (SFB).

Foram utilizados monócitos de 18 pacientes com leishmaniose. Eram coletados 20ml de sangue venoso dos indivíduos com leishmaniose e controles e centrifugado a 400g por 10 minutos a 4° C para separação do soro. Ressuspendia-se o sangue com solução salina tamponada com fosfato (STF) até o volume de 10ml que eram colocados delicadamente sobre o Percoll (GE Helth Care Biosciences), densidade=1,077, na proporção de 3 ml de Percoll para 5 ml de sangue. O material era centrifugado a 750g por 10 minutos a 4°C para a separação das células mononucleares (CMN) e a camada de CMN era recuperada e ressuspensa para 10 ml de STF a 4°C. As CMN eram novamente centrifugadas a 400g por 10 minutos, a 4°C para retirar o Percoll. O sobrenadante era desprezado e STF gelada era colocada até completar o volume de 10ml para nova centrifugação a 300g por 15 minutos, a 4°C, para retirar as plaquetas. O sobrenadante era desprezado e eram acrescentados às CMN 2ml de RPMI 1640 (Sigma) sem SFB. As células eram mantidas a 4°C até o momento de se colocar na placa de 24 escavações (TTP), estéril, de fundo chato. Em cada escavação da placa era previamente colocada uma lamínula de 13 mm de diâmetro, estéril. As células (5×10^5 CMN em 500 μ l) eram distribuídas nas escavações e incubadas em câmara úmida a 37°C, em 5% de CO₂ em ar, por 2 horas para permitir a aderência dos fagócitos, em seguida as placas eram lavadas com STF para retirada das células não aderentes. As células aderidas eram ressuspensas em 500 μ l de RPMI com SFB 10% contendo 10^6 ou 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* (não

sensibilizadas) por escavação, em preparações em duplicata. As placas eram encubadas por 30 minutos a 37 °C, em 5% de CO₂ em ar para permitir a fagocitose das leveduras. As células eram então lavadas com STF para retirar as leveduras não aderidas. A última lavagem era realizada com RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino a 30% para preservar as preparações. O material era seco com vento quente e corado com Giemsa (Dinâmica) a 10% em tampão para coloração, pH 7,2 por 10 minutos após serem fixados com metanol absoluto (Vetec) por 1 minuto. As lamínulas eram retiradas das escavações e fixadas em lâminas de microscopia com etelan (Merck) para análise ao microscópio óptico com objetiva de imersão (aumento de 1000x), sendo contados 200 monócitos por lamínula, para determinação do índice fagocitário. As lamínulas eram identificadas apenas ao final das leituras.

O índice fagocitário era determinado pela multiplicação da média de *Saccharomyces cerevisiae* ingeridas por monócito pela proporção de monócitos envolvidos na fagocitose (Muniz-Junqueira e cols, 2003).

Preparação da suspensão estoque de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização no teste de fagocitose

Para preparação da suspensão estoque de leveduras foi utilizada a técnica de Lachman e Hobart (1978). Com a preparação por esta técnica as leveduras sofrem uma modificação em sua superfície que facilita a adsorção do componente C₃ do complemento.

Um tablete de 50g de fermento fresco para pão (Fleischmann) foi dissolvido em 220ml de STF, pH 7,2, e autoclavado a 121° C em uma atmosfera, por 30 minutos, e em seguida a suspensão foi lavada com STF, pH 7,2 várias vezes por centrifugação até se obter o sobrenadante límpido. O sedimento foi suspenso em 28ml de STF, pH 7,2 contendo 0,1M de 2-mercaptoetanol e em seguida incubado a 37° C por 2 horas em agitação. A suspensão foi lavada três vezes para retirar o 2-mercaptoetanol e suspensa em 55ml de solução de iodocetamida 0,02M em STF, pH 7,2. Foi feita outra incubação à temperatura ambiente por 2 horas com agitação, e em seguida a suspensão foi lavada três vezes por centrifugação em STF, suspensa em 220ml de STF e o pH acertado para 7,2. A suspensão era autoclavada novamente por 30 minutos a 121° C, em seguida lavada por centrifugação até obter um sobrenadante límpido e suspensa em 110ml de tampão veronal, pH 7,2 contendo 220mg por litro de azida sódica, como preservativo. A suspensão estoque preparada foi mantida a 4°C e utilizada dentro de 6 meses da preparação.

Preparação das leveduras para uso no teste de fagocitose

Para cada experimento, uma alíquota de 100µl era retirada da suspensão estoque das leveduras, lavada três vezes por centrifugação e ressuspensa em 1ml de STF, e quantificadas em câmara de Neubauer. Em seguida eram incubadas com soro fetal bovino (Gibco) previamente inativado, a 10%, em RPMI 1640 (Gibco), pH 7,2.

Avaliação da capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais pelos receptores para opsoninas.

Para analisar a fagocitose por monócitos por meio de receptores para opsoninas, como os componentes do sistema complemento e os receptores para a fração Fc dos anticorpos, foi realizado o teste de fagocitose como acima descrito, porém substituindo o SFB pelo soro fresco do próprio doador para a sensibilização das leveduras. Quando o soro fresco é incubado com as leveduras, as frações do sistema do complemento adsorvem-se à superfície das mesmas propiciando a fagocitose pelos monócitos pelos receptores para as frações do complemento.

Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos de pacientes com leishmaniose tegumentar americana e controles normais

A produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos dos indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais foi determinada pela técnica descrita por Pick e Mizel (1981). O princípio desta técnica baseia-se na oxidação do vermelho de fenol pela peroxidase na presença de H_2O_2 formando um produto lido por colorimetria. As células mononucleares do sangue periférico eram separadas em Percoll (GE Health Care Biosciences) densidade=1,077, como acima descrito, e mantidas a 4°C até o momento de distribuir na placa de 96 escavações

(TTP), estéril, de fundo chato. As células ($1,5 \times 10^5$ CMN em 200 μ l) eram distribuídas nas escavações e os monócitos eram separados por aderência, pela incubação em câmara úmida, a 37°C com 5% de CO₂ em ar, por 60 minutos. A lavagem das placas era feita com STF, pH 7,2, a 37°C, para retirar as células não aderidas.

Após lavagem das escavações, era acrescentado vermelho de fenol (Merck) a 1% com peroxidase (Sigma) tipo RZ 1.3 correspondendo a 19 unidades de purpurogalina por mL, e as células eram estimuladas ou não com LPS (Sigma) 1 μ g por ml, PMA (Sigma) 20 nM, ou ambos. As preparações, em triplicatas, eram novamente incubadas por 60 minutos, em câmara úmida, a 37°C, contendo 5% de CO₂ em ar.

Uma curva padrão com peróxido de hidrogênio (Merck) era feita concomitantemente. A reação era interrompida com 10 μ l de NaOH 1N, e a leitura realizada em espectrofotômetro de placa (Titertek) no comprimento de onda de 630nm e os resultados expressos em densidade óptica.

Avaliação da produção do fator de necrose tumoral- α pelos monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais

As células mononucleares do sangue periférico de indivíduos portadores de leishmaniose tegumentar americana e controles normais eram separadas em Percoll (densidade 1,077), como acima descrito, ressuspensas em RPMI 1640, pH 7,2, sem soro fetal bovino e 5×10^5 células eram distribuídas, em duplicata, em um volume final de 500 μ l, na placa de 24 escavações (TTP). Após incubação por 2

horas em câmara úmida a 37°C, em 5% de CO₂ em ar, as escavações eram lavadas com STF 0,15 M, pH 7,2, a 37°C para retirar as células não aderentes, e as células aderidas (monócitos) eram ressuspensas em 500 µl de RPMI 1640, pH 7,2 com 10% de soro fetal bovino, contendo ou não 10 µg/ml de LPS (Sigma), como estímulo para a produção de fator de necrose tumoral- α . As placas eram incubadas por 6 horas em câmara úmida a 37°C, com 5% de CO₂ em ar e os sobrenadantes coletados e armazenados a -80°C até a determinação do fator de necrose tumoral- α .

A determinação do FNT- α realizou-se por ensaio imunoenzimático utilizando kit de ELISA comercializado (BioSource, Bélgica). O procedimento foi realizado conforme orientação do fabricante.

Todas as amostras foram testadas no mesmo ensaio após descongelamento das amostras até a temperatura ambiente. Foi feita a curva padrão utilizando fator de necrose tumoral- α humano.

Em placa sensibilizada com anti-FNT- α humano de captura foi adicionado tampão para estabilizar a reação e as amostras a serem analisadas. As amostras foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente para a ocorrência da reação antígeno-anticorpo. A placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem e adicionou-se então um segundo anticorpo anti-FNT- α conjugado com biotina. Novamente a placa foi incubada por uma hora, a temperatura ambiente para formar o complexo anticorpo-antígeno-anticorpo biotinilado ("ac-ag-ac-biotinilado"). A placa foi lavada por 4 vezes com solução de lavagem para retirada do segundo anticorpo não ligado. Uma solução de estreptavidina-peroxidase foi adicionada às

escavações e a placa foi incubada por mais 30 minutos. Após lavagem por 4 vezes com solução de lavagem foi acrescentado o cromógeno estabilizado (tetrametilbenzidina) e incubado por mais 30 minutos no escuro, sendo então adicionada a solução de interrupção. A leitura foi feita em espectrofotômetro de placa com filtro de 450 nm (Titertek).

Uma curva padrão utilizando escala semilogarítmica foi feita pelo programa computadorizado do espectrofotômetro e a densidade óptica convertida em pg/ml de FNT- α .

Análise Estatística

Previamente a aplicação dos testes estatísticos as variáveis foram analisadas quanto à normalidade das amostras.

Para comparação entre duas variáveis não correlacionadas com distribuição normal foi utilizado o teste *t* de Student, e para as amostras com distribuição não normal foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para amostras com distribuição normal e variâncias diferentes foi utilizado o teste *t* de Student com correção de Welch.

As diferenças entre as variáveis comparadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ($p < 0,05$). Para expressão dos dados nos gráficos foram utilizadas as medianas, quartis e extremos, exceto para a produção de FNT- α .

O software *Graphpad Prism 4* para Windows (Graphpad Software, Inc., San Diego, USA, 2005) foi utilizado para processamento e análises dos dados e confecção dos gráficos.

RESULTADOS

1. Caracterização dos aspectos clínicos dos indivíduos portadores de leishmaniose tegumentar americana e controles normais.

A avaliação da capacidade fagocitária, da produção de peróxido de hidrogênio e da produção de fator de necrose tumoral- α foram realizadas com monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais.

Os diagnósticos clínicos e laboratoriais confirmatórios foram realizados em todos os voluntários portadores de leishmaniose tegumentar americana que participaram da pesquisa. Só foram incluídos neste estudo os 18 que apresentaram a forma cutânea e preenchiem os critérios de inclusão e exclusão. Para os pacientes em que a cultura foi positiva, a identificação da cepa mostrou em todos *Leishmania brasiliensis*. As amostras de sangue foram coletadas antes que o paciente iniciasse qualquer tratamento. Os parâmetros clínicos e laboratoriais referentes aos indivíduos com LTA analisados se encontram na tabela 1. Os dados referentes aos controles normais se encontram na tabela 2.

Tabela 1. Identificação, idade, sexo, localização das lesões e exames diagnósticos dos indivíduos com leishmaniose cutânea estudados.

Iniciais	Idade (anos)	Sexo	Nº de lesões	Localização das lesões	Montenegro	Cultura	Biópsia/ aspirado*	Imunofluorescência
R R	44	M	1	Perna E	15x15 mm	Positivo	* Parasita pos	160
W B	26	M	4	Mão E e rosto	18x16 mm	Positivo	Parasita neg 1,2	80
S F S	65	M	1	Virilha E	15x15mm	-	-	20
P F G	21	M	1	Pênis	-	Negativo	Parasita pos	Não reagente
F C M S	55	M	1	Tornozelo E	7x7mm	Negativo	Parasita neg 2, 5	Não reagente
M F R	41	M	1	Perna D	19x18mm	Positivo	3	20
M D S	65	M	11	Perna D e E, Rosto, Braço E	-	-	Parasita neg 1, 2.	20
W M L	18	M	1	Joelho E	14x10mm	Positivo	6, 7	Não Reagente
A P R	53	M	1	Braço D	3x3mm	Negativo	Parasita neg 8	320
J T L	35	M	1	Perna D	3x3mm	Negativo	Parasita neg 1, 2, 9	160
G M N	37	M	1	Braço E	30x25 mm	Negativo	Parasita pos 10.	40
T A L S	39	F	6	Perna D	17x10mm	Negativo	Parasita neg 1.	Não reagente
R N S	24	M	1	Joelho D	10x10mm	Negativo	Parasita neg 10.	Não reagente
F C S	39	M	1	Rosto (Maxilar)	30x25mm	Negativo	Parasita pos 10.	40
Z L D	57	F	1	Braço D	18x18mm	-	Parasita pos 5, 6.	80
N G M	64	M	1	Mão D	20x20mm	-	Parasita neg 2, 5, 9.	80
N C C	46	F	1	Tornozelo direito	-	Negativo	Parasita neg 2.	40
E M	20	M	1	Perna D	-	-	-	80
	41,61 ± 15,81	15 M -3 F	1,90 ± 2,49	6 Perna, 2 Mão, 3 Rosto, 1 virilha, 1 Pênis, 2 Tornozelo, 2 Joelho, 4 Braço	10 Positivos 4 Negativos 6 Sem resultado	4 Positivos 10 Negativos 6 Sem resultado	-	14 Reagentes 6 Não reagentes

1. Hiperplasia pseudocarcinomatosa na epiderme; 2. Infiltrado denso linfoplasmocitário ocupando toda a derme; 3. Processo inflamatório crônico não específico; 4. Processo inflamatório; 5. Hiperplasia de epiderme com hiperqueratose; 6. Infiltrado de linfócitos, plasmócitos e histiócitos; 7. Áreas de necrose e células gigantes multinucleadas; 8. Processo inflamatório crônico com intensa reação inflamatória mononuclear e eosinofílico com hiperplasia epitelial reativa; 9. Áreas de necrose na derme; 10. Processo inflamatório granulomatoso.

Tabela 2. Identificação, idade e sexo dos indivíduos normais utilizados como grupo controle.

Indivíduos	Idade	Sexo
1	31	M
2	33	F
3	40	F
4	35	F
5	30	M
6	52	F
7	33	M
8	25	F
9	43	F
10	36	F
11	23	M
12	22	F
13	18	M
14	47	M
15	19	M
Total	32.5± 10.1	Masculino = 7 Feminino = 8

2. Capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.

A capacidade fagocitária dos monócitos, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, como manose e glucana, entre outros, foi avaliada pelo índice fagocitário, proporção de monócitos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas por monócito, comparativamente, entre indivíduos com LTA e controles normais.

Quando a fagocitose foi avaliada utilizando-se 4×10^6 leveduras por escavação, os monócitos dos indivíduos com LTA mostraram menor capacidade fagocitária do que os dos indivíduos controles normais, pela fagocitose pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos. Isto foi verificado pela mediana do índice fagocitário dos monócitos dos indivíduos com LTA 9,25 enquanto os controles normais apresentavam mediana de 22,0, $p=0,0389$, pelo teste de Mann-Whitney (Figura 2). O menor índice fagocitário deveu-se ao menor envolvimento dos monócitos na fagocitose, sendo a mediana de 6,0 para os indivíduos com LTA e de 15,0 para os indivíduos controles normais, $p=0,0218$, pelo teste de Mann-Whitney (Figura 3), pois não houve diferença no número médio de leveduras fagocitadas por monócito (Figura 4). Os valores das medianas do número médio de leveduras fagocitadas por monócito foram de 1,4 para os indivíduos com LTA e de 1,6 para os indivíduos controles normais, $p=0,56$, pelo teste de Mann-Whitney.

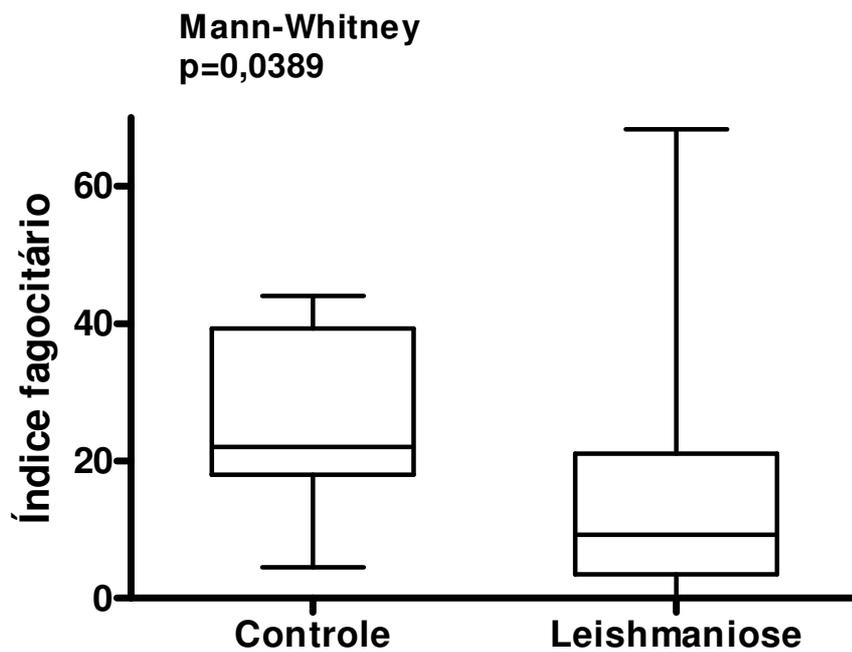


Figura 2. Índice fagocitário de monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, colocando-se 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* por monócito. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. A mediana do índice fagocitário dos monócitos foi significativamente maior nos indivíduos controles normais, $p= 0,038$ teste de Mann-Whitney.

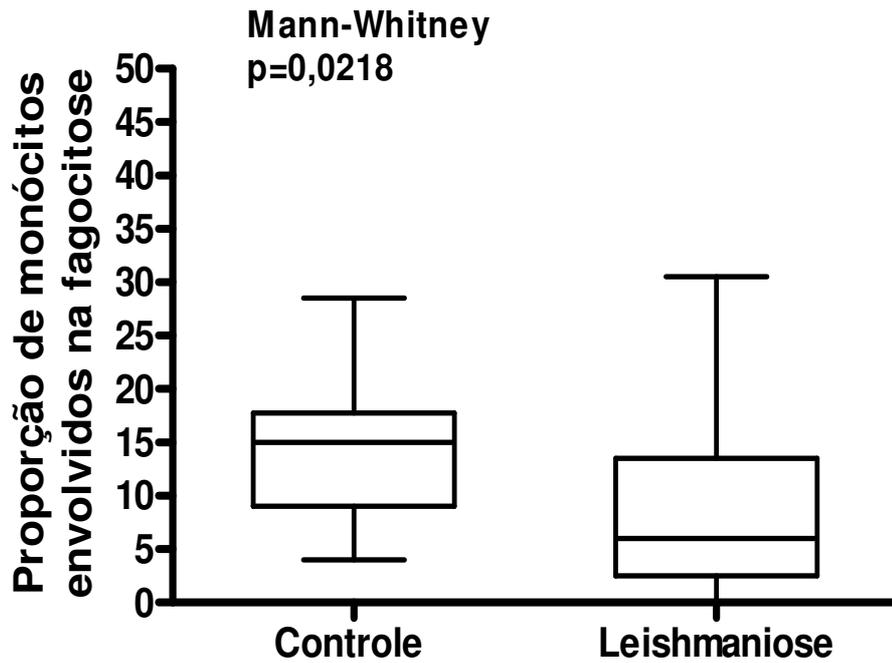


Figura 3. Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, colocando-se 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* por escavação. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. A mediana dos monócitos envolvidos na fagocitose foi significativamente maior nos indivíduos controle normais, $p=0,021$ teste de Mann-Whitney.

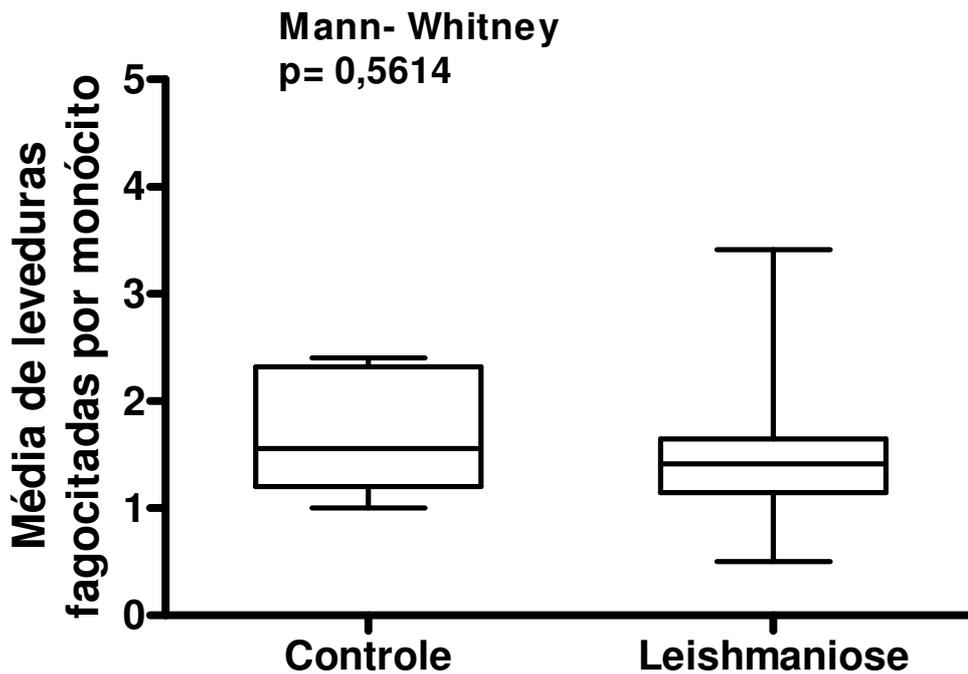


Figura 4. Média de leveduras fagocitadas por monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, na proporção de 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* por escavação. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. Não houve diferença estatística entre as medianas do número de leveduras fagocitadas por monócito de indivíduos com LTA e controles normais, $p= 0,56$ teste de Mann-Whitney.

Estas diferenças não foram demonstradas quando a fagocitose foi avaliada utilizando-se uma menor quantidade de leveduras por monócito (10^6 por escavação) (Figuras 5, 6, 7).

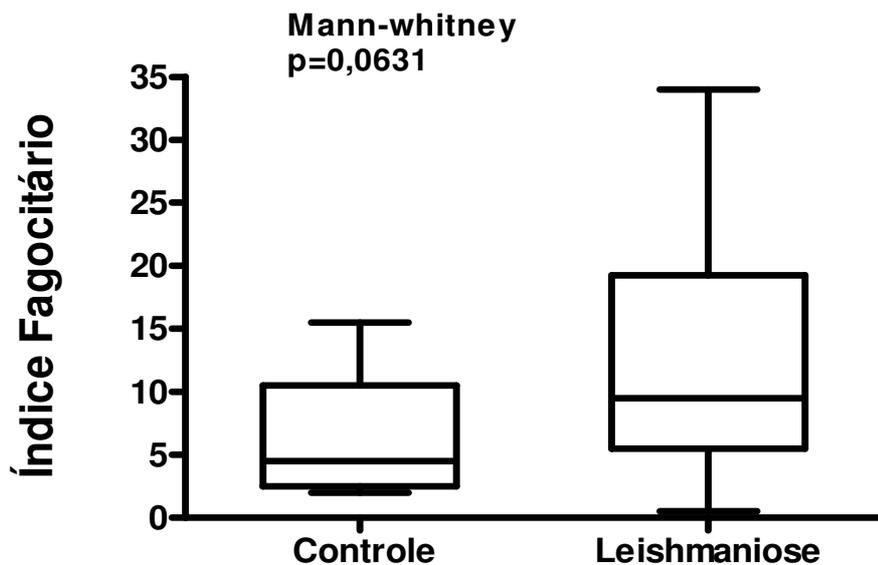


Figura 5. Índice fagocitário de monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, na proporção de 10^6 *Saccharomyces cerevisiae* por escavação. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. A mediana do índice fagocitário dos monócitos dos indivíduos com LTA mostrou discreto aumento em relação à dos controles normais, (tendência estatística) $p= 0,06$ teste de Mann-Whitney.

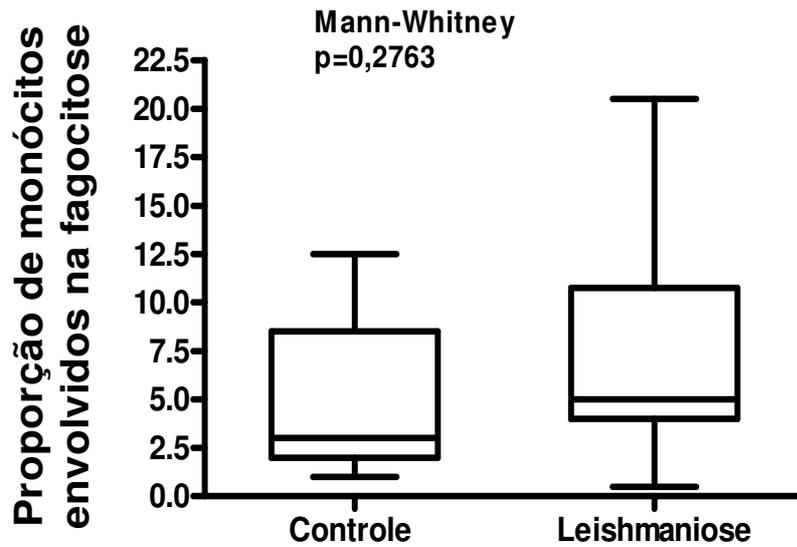


Figura 6. Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, na proporção de 10^6 *Saccharomyces cerevisiae* por escavação. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. Não houve diferença estatística entre as medianas do número de monócitos envolvidos na fagocitose de indivíduos com LTA e controles normais, $p = 0,27$ teste de Mann-Whitney.

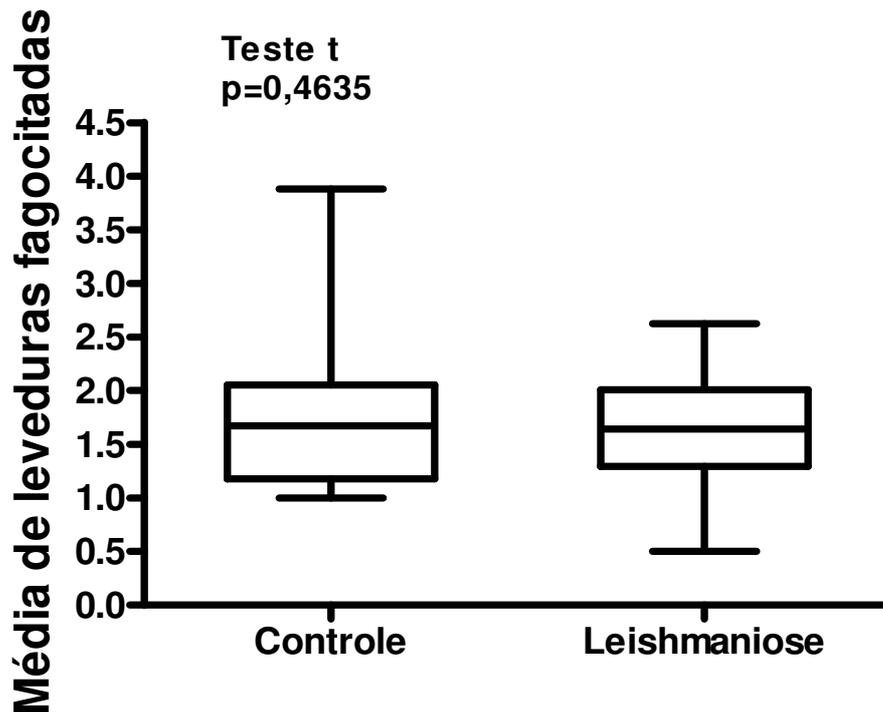


Figura 7. Média de leveduras fagocitadas por monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, na proporção de 10^6 *Saccharomyces cerevisiae* por escavação. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. Não houve diferença estatística entre as medianas do número de leveduras fagocitadas por monócitos de indivíduos com LTA e controles normais, $p= 0,46$ teste t de Student .

3. Capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais pelos receptores para opsoninas

A capacidade fagocitária dos monócitos, pelos receptores para opsoninas, foi avaliada pelo índice fagocitário, proporção de monócitos envolvidos na fagocitose e média de leveduras ingeridas por monócito, comparativamente, entre indivíduos com LTA e controles normais.

A análise da fagocitose utilizando-se 4×10^6 leveduras por escavação mostrou tendência a ter menor capacidade fagocitária dos monócitos dos indivíduos com LTA do que os dos indivíduos controles normais, pela fagocitose pelos receptores para opsoninas. A mediana do índice fagocitário dos monócitos dos indivíduos com LTA foi 26,0 e a dos controles normais foi 99,1, $p=0,07$, pelo teste de Mann-Whitney (Figura 8). Essa tendência do índice fagocitário a ser menor deveu-se ao menor envolvimento dos monócitos na fagocitose, onde a mediana da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose foi de 16,5 para os indivíduos com LTA e de 32,5 para os indivíduos controles normais, $p= 0,0824$, pelo teste de Mann-Whitney (Figura 9), pois não houve diferença nos valores encontrados no número de leveduras fagocitadas por monócitos. Isto foi verificado pela média \pm DP do índice fagocitário dos monócitos dos indivíduos com LTA 2.6 ± 0.26 em relação aos controles normais 2.6 ± 0.20 , $p=0,5493$, pelo teste t de *Student* (Figura 10).

Esta diferença não pode ser demonstrada quando a fagocitose foi avaliada utilizando-se 10^6 leveduras por escavação (Figuras 11, 12, 13).

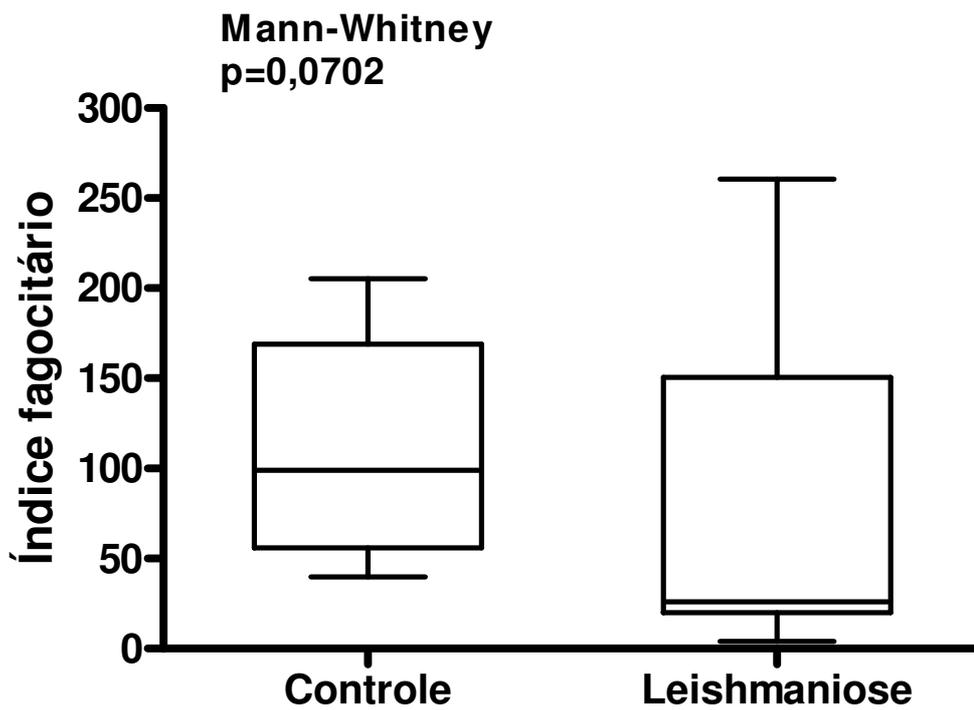


Figura 8. Índice fagocitário de monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, pelos receptores para opsoninas, na proporção de 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* por monócito. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. A mediana do índice fagocitário dos monócitos mostrou tendência estatística para ser maior nos indivíduos controles normais, $p= 0,07$ pelo teste de Mann-Whitney.

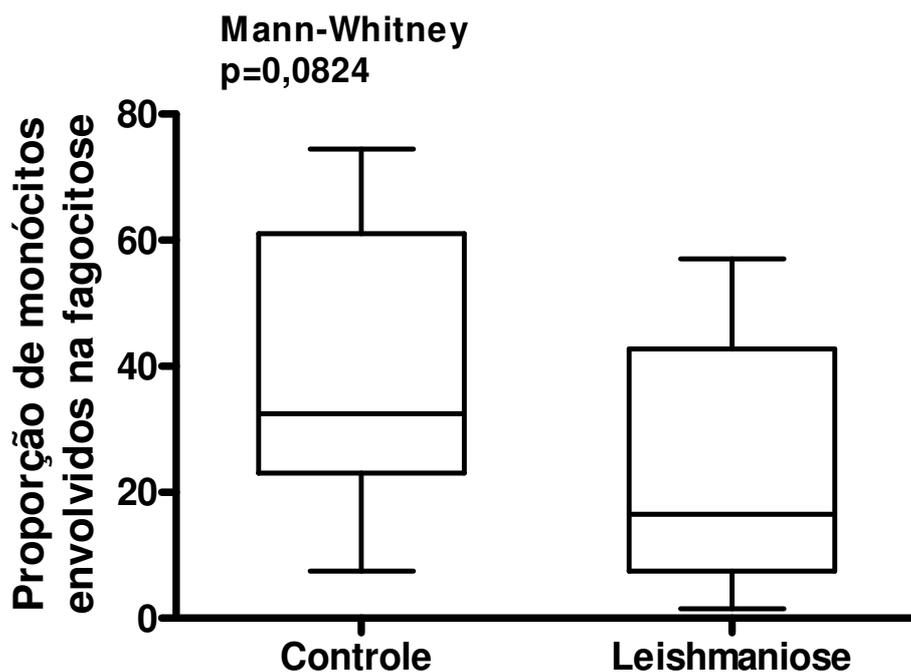


Figura 9. Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, pelos receptores para opsoninas, na proporção de 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* por escavação. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. A mediana do número de monócitos envolvidos na fagocitose mostrou tendência estatística para ser maior nos indivíduos controles normais, $p= 0,08$ pelo teste de Mann-Whitney.

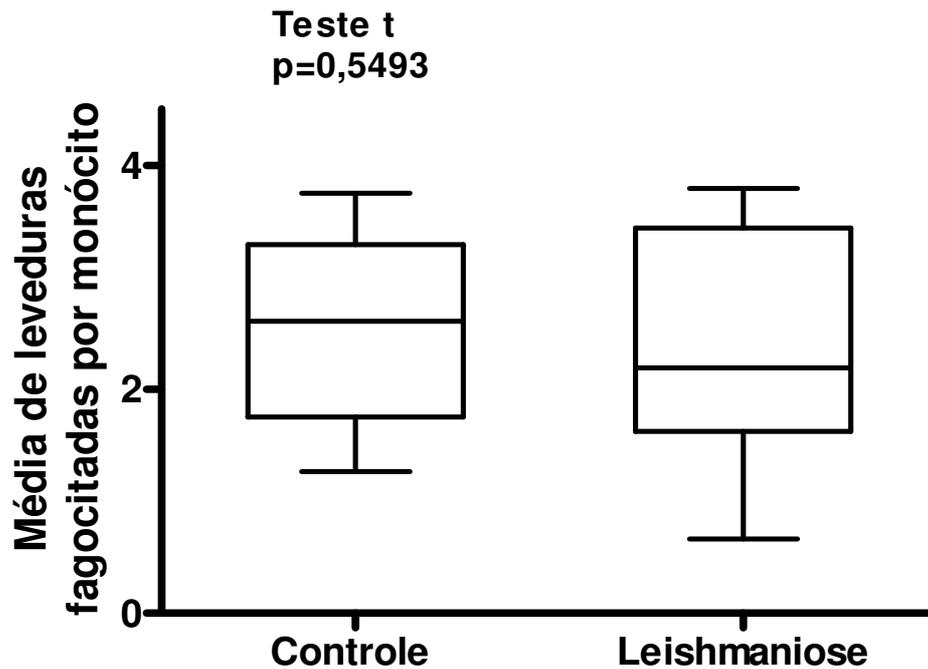


Figura 10. Média de leveduras fagocitadas por monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, pelos receptores para opsoninas, na proporção de 4×10^6 *Saccharomyces cerevisiae* por monócito. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. Não houve diferença estatística entre as medianas do número de leveduras fagocitadas por monócitos de indivíduos com LTA e controles normais, $p=0,54$ pelo teste t de *Student*.

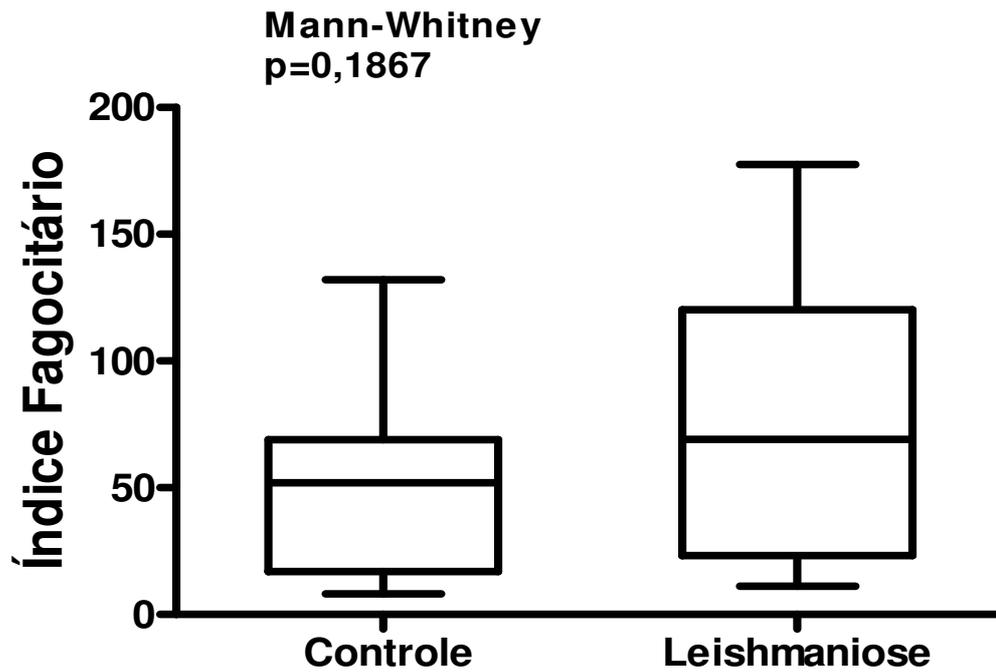


Figura 11. Índice fagocitário de monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, pelos receptores para opsoninas, na proporção de 10^6 *Saccharomyces cerevisiae* por escavação. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. Não houve diferença estatística entre os dados, $p= 0,18$ pelo teste de Mann-Whitney.

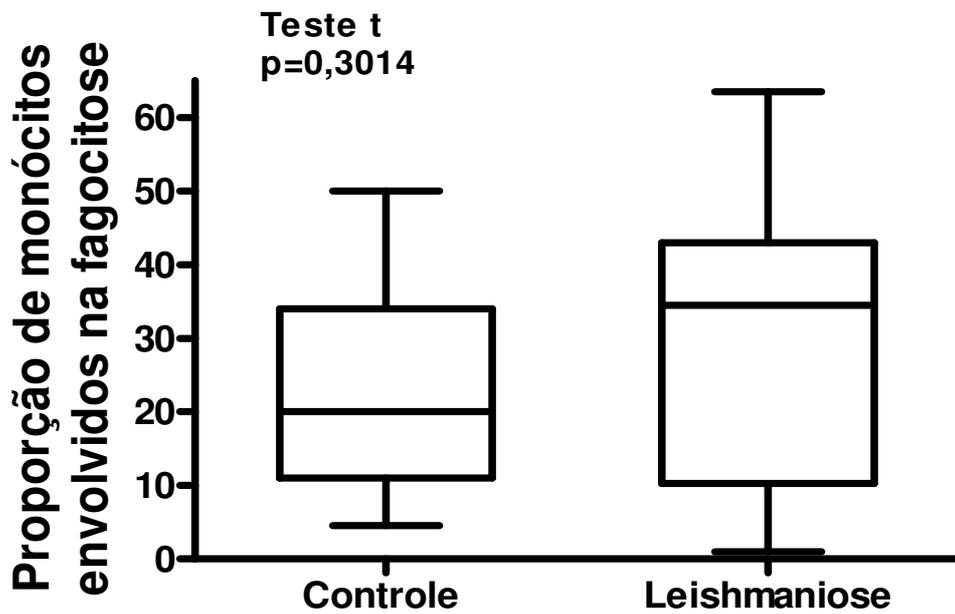


Figura 12. Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, pelos receptores para opsoninas, na proporção de 10^6 *Saccharomyces cerevisiae* por monócito. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. Não houve diferença entre os resultados, $p=0,30$ pelo teste t de Student.

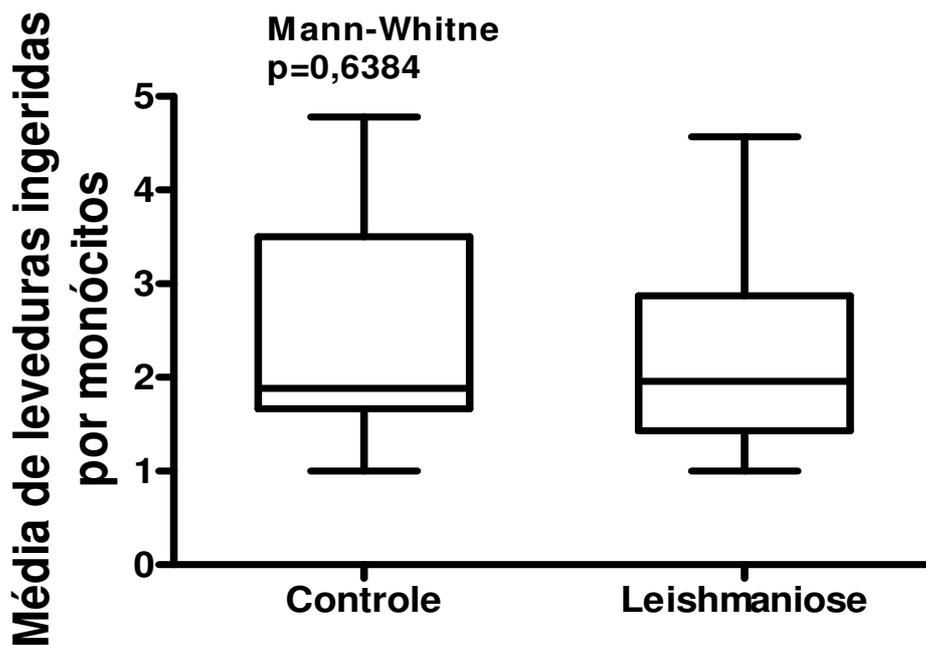


Figura 13. Média de leveduras fagocitadas por monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, pelos receptores para opsoninas, na proporção de 10^6 *Saccharomyces cerevisiae* por monócito. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. Não houve diferença estatística entre os dados, $p=0,63$ pelo teste de Mann-Whitney.

4. Produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais.

A produção de peróxido de hidrogênio por monócitos foi avaliada pelo método espectrofotométrico, baseado na oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase, comparando-se a produção pelas células de indivíduos com leishmaniose e indivíduos controles normais.

As células foram incubadas somente na presença de meio de cultura ou estimuladas com LPS, PMA e a associação de LPS e PMA concomitantemente.

Pela análise da produção de H_2O_2 pelos monócitos que não foram estimulados, observamos que estas células dos indivíduos com LTA produziram maior quantidade deste radical de oxigênio do que os dos indivíduos controles normais, sendo a mediana para os indivíduos com LTA de $129,5 \mu M/1,5 \times 10^6$ monócitos/hora e para os controles normais de $58,4 \mu M/1,5 \times 10^6$ monócitos/hora, $p=0,05$, pelo teste de Mann-Whitney (Figura 14).

Quando avaliamos os monócitos estimulados com LPS observou-se um aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio em relação ao grupo controle, sendo a mediana de $109,7 \mu M/1,5 \times 10^6$ monócitos/hora para indivíduo com LTA e de $50,5 \mu M/1,5 \times 10^6$ monócitos/hora para o grupo controle, $p=0,003$, pelo teste de Mann-Whitney (Figura 15). Ocorreu também um aumento na produção de peróxido de hidrogênio nas células estimuladas por PMA, onde houve uma elevação de de 80% na produção de peróxido de hidrogênio. Enquanto a mediana dos indivíduos com LTA foi de $145,9 \mu M/1,5 \times 10^6$ monócitos/hora, a do grupo controle foi de $34,7 \mu M/1,5 \times 10^6$ monócitos/hora, $p=0,1012$, pelo teste de Mann-Whitney (Figura 16).

Na avaliação feita com monócitos estimulados por LPS e PMA também se observou um aumento na produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos de pacientes com LTA em relação ao grupo controle normal. As medianas encontradas foram de 67,6 e 29,5 respectivamente, $p=0,0670$, pelo teste de Mann-Whitney (Figura 17).



Figura 14. Produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, sem estímulo. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. A mediana da concentração de H_2O_2 produzido pelos monócitos sem estímulo encontra-se no limite da significância estatística, havendo tendência para ser maior nos indivíduos com LTA, $p=0,05$ pelo teste de Mann-Whitney.

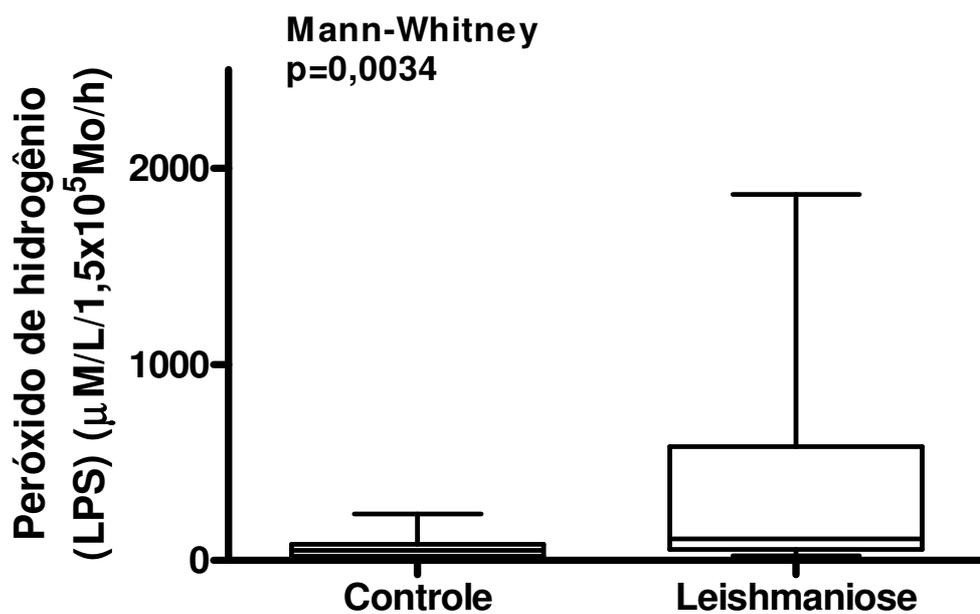


Figura 15. Produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, estimulados com LPS. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. A mediana da concentração de H_2O_2 produzido pelos monócitos estimulados com LPS foi significativamente maior nos indivíduos com LTA, $p= 0,0034$ pelo teste de Mann-Whitney.

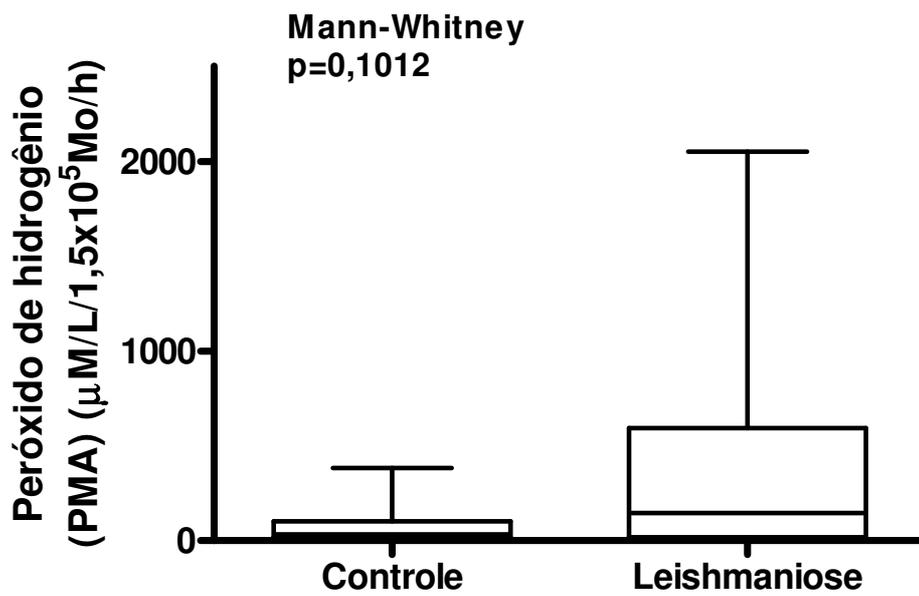


Figura 16. Produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, estimulados com PMA. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. Não houve diferença entre a mediana da concentração de H_2O_2 produzido pelos monócitos estimulados com PMA e nos indivíduos com LTA, $p= 0,10$ pelo teste de Mann-Whitney.

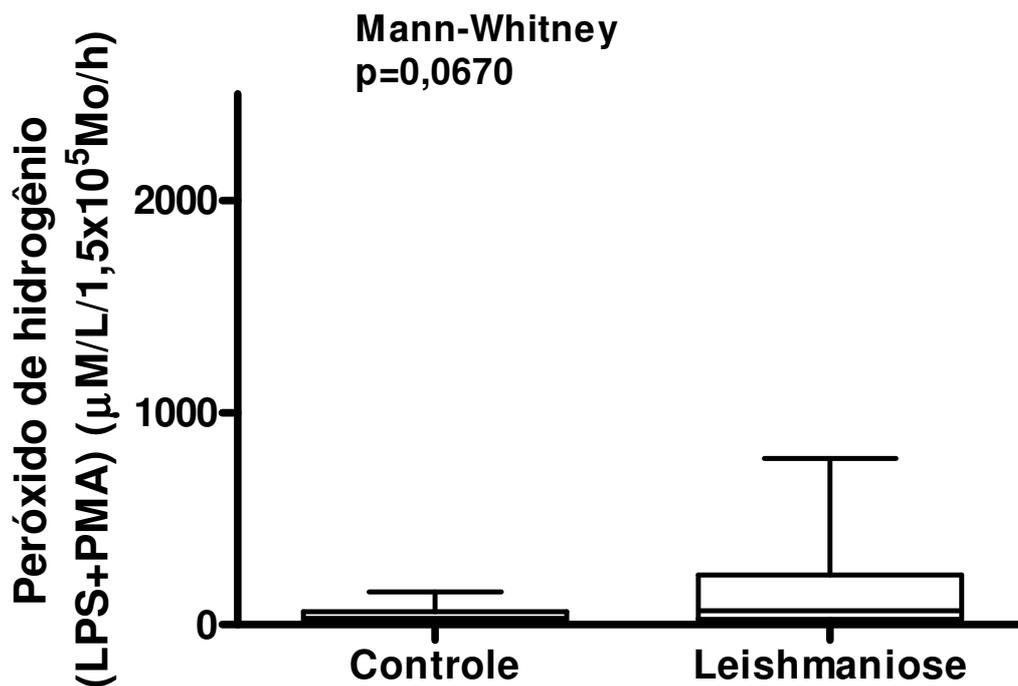


Figura 17. Produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais, estimulados com LPS e PMA. Os valores estão expressos em mediana, quartis e extremos. mediana da concentração de H_2O_2 produzido pelos monócitos estimulados com LPS e PMA ser maior nos indivíduos com LTA, $p=0,067$ pelo teste de Mann-Whitney.

5 Produção de fator de necrose tumoral- α por monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais.

A produção de fator de necrose tumoral- α foi determinada no sobrenadante das culturas dos monócitos. Observamos 81,9% de aumento na produção de fator de necrose tumoral- α pelas células mononucleares de indivíduos com LTA em relação ao grupo controle, onde a média \pm DP nos indivíduos com LTA foi de

298.8 ± 71.5 e a encontrada nos indivíduos normais foi 27.9 ± 3.8, $p= 0,006$, pelo teste *t* de *Student* com correção de Welch.

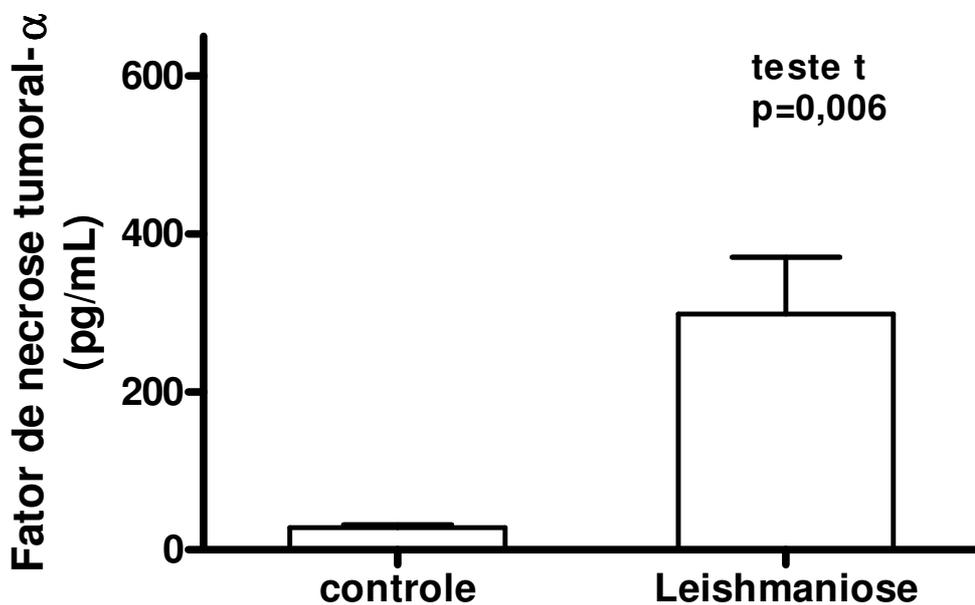


Figura 18. Produção de fator de necrose tumoral- α pelos monócitos de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e controles normais. Os valores estão expressos em média ± DP. A média ± DP de FNT- α produzido pelos monócitos dos indivíduos com LTA foi significativamente maior do que a dos controles normais, $p=0,0231$ pelo teste *t* de *Student* com correção de Welch.

DISCUSSÃO

As leishmânias são parasitas intracelulares obrigatórios do sistema reticuloendotelial do hospedeiro vertebrado, onde se multiplicam como amastigotas no fagolisosoma dos fagócitos (Bogdan e Rollinghoff, 1998). Entretanto, os fagócitos são também as células efetoras do sistema imunitário, que após ativação são capazes de matar os microorganismos intracelulares (Handman e Bullen, 2002). Nesse trabalho avaliamos as funções destes fagócitos em indivíduos com leishmaniose tegumentar americana.

As leishmânias têm uma notável capacidade para evitar a destruição nos ambientes hostis que encontra durante seu ciclo de vida. Elas se adaptaram não somente para sobreviver, mas para largamente proliferar nos diversos hospedeiros (Descoteaux, 1999). Durante o repasto sangüíneo pelos flebotomíneos os promastigotas metacíclicos são inoculados no hospedeiro mamífero, onde devem bem sucedidamente evadir e resistir aos mecanismos não específicos, como a lise mediada pelo complemento, ligar-se e entrar nos fagócitos por um processo mediado por receptores (Brittingham e Mosser, 1996).

Com o intuito de avaliar a capacidade fagocitária dos monócitos de indivíduos com LTA foi feito o teste de fagocitose, utilizando-se monócitos coletados do sangue periférico dos indivíduos com leishmaniose tegumentar americana.

Deve ser considerado inicialmente o tipo de fagocitose que ocorre pelo fagócito em relação à leishmânia. Tem sido demonstrado que a leishmânia pode penetrar no fagócito por dois processos, um deles por fagocitose por enrolamento (*coiling* fagocitose) e o outro por fagocitose ativa. A entrada do parasita por

fagocitose por enrolamento pode resultar em localização citoplasmática do parasita, enquanto que na fagocitose ativa o parasita ingerido se localiza dentro do vacúolo fagocítico (Love e cols, 1998; Bogdan e Rollinghoff, 1998). Analisando a fagocitose da leishmânia foi demonstrado que é um processo ativo com gasto de energia pelo fagócito e envolve co-localização de F-actina no local de contato entre o fagócito e o parasita, e é inibido pelo tratamento dos macrófagos previamente com citocalisa-B, indicando, portanto um processo de fagocitose ativa (Love e cols 1998). A fagocitose que foi avaliada neste trabalho corresponde a este processo de fagocitose ativa pelos monócitos.

Os monócitos do sangue periférico, conforme utilizado neste trabalho, podem ser representativos para estudo da fagocitose, pois tem sido demonstrado um importante papel do influxo deste fagócito do sangue circulante ao tecido, e destas células como efetoras tanto na fase inicial como também na lesão granulomatosa já estabelecida (Cervia e cols, 1993).

Neste trabalho utilizamos as leveduras *S. cerevisiae* como partícula a ser fagocitada. Estas leveduras mortas foram utilizadas, pois são ingeridas pelos monócitos pelos mesmos receptores para complemento e receptores para manose-fucose (Underhill e Ozinsky, 2002) pelos quais as leishmânias são fagocitadas (Handman e Bullen, 2002).

Muitos estudos têm identificado nos macrófagos os receptores envolvidos na entrada dos promastigotas e dos amastigotas, que incluem o receptor para manose-fucose (receptores para padrões moleculares de patógenos) (Wilson e Pearson, 1988; Laufs e cols, 2002), o receptor para a porção Fc da IgG (Guy e

Belosevic, 1993), e os receptores CR1 e CR3 para os componentes do sistema do complemento (Wilson e Pearson, 1998; Guy e Belosevic, 1993; Laufs e cols, 2002). A ligação ao receptor Fc sinaliza não somente para a fagocitose, mas também para síntese e liberação de radicais de oxigênio (O_2^- and H_2O_2), poderoso oxidante que sozinho ou junto com outras enzimas dos leucócitos eficientemente matam patógenos, além de estimular a liberação de citocinas, como o FNT- α (Nagl e cols, 2002; Stein e Keshav, 1992). Entretanto, tem sido demonstrado que quando a fagocitose ocorre pelos receptores C3b ou C3bi não ocorre a sinalização para liberação de H_2O_2 se os fagócitos não estiverem ativados por citocinas. Portanto, a fagocitose realizada através dos receptores para o complemento facilitaria a sobrevivência do parasita dentro do fagócito (Wright e Silverstein, 1983). De fato tem sido demonstrada uma forte correlação entre fixação de C3 pelo parasita e sobrevivência intracelular, e isto foi atribuído em parte, à menor magnitude da explosão respiratória no macrófago que estava recoberto com componentes do complemento (Mosser e Edelson, 1987; Brittingham e Mosser, 1996). Neste trabalho avaliamos a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos (manose-fucose entre outros) e para complemento.

Analizamos a capacidade fagocitária, a produção de peróxido de hidrogênio e a produção de FNT- α *in vivo*, utilizando sangue de indivíduos com leishmaniose tegumentar americana e comparando os resultados com indivíduos controles normais.

Quando avaliamos a fagocitose na presença de soro fresco do próprio indivíduo, a ligação das leveduras com os monócitos ocorreu principalmente pelos

receptores para complemento, embora moléculas de anticorpos também tenham sido demonstradas aderidas às leveduras após incubação com soro fresco, podendo, portanto estar facilitando a fagocitose também pelos receptores para Fc da IgG (Brandi, 1993; Muniz-Junqueira e cols, 2003). Enquanto que quando testamos a fagocitose na presença de soro fetal bovino inativado, a fagocitose ocorreu pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos (Blackwell e cols, 1985).

Quando analisamos a capacidade fagocitária dos monócitos utilizando 4×10^6 leveduras por escavação, verificamos uma menor capacidade fagocitária dos indivíduos com LTA quando comparado ao grupo controle, tanto pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos quanto por receptores para opsoninas. Essa redução deveu-se ao menor envolvimento dos monócitos na fagocitose, pois não houve diferença no número médio de leveduras fagocitadas por monócito. Esta diferença não pode ser demonstrada quando a fagocitose foi avaliada utilizando-se uma menor quantidade de leveduras. Não se encontra esclarecido porque ocorre a diminuição do número de monócitos envolvidos na fagocitose. Entretanto, pode ser sugerido que este menor envolvimento das células na fagocitose deveu-se aos efeitos das quimiocinas e citocinas a que os fagócitos encontravam-se submetidos no sangue dos indivíduos com LTA. De fato, tem sido descrito que os neutrófilos que chegam ao sítio da infecção e ingerem leishmânias produzem citocinas quimiotáticas para monócitos, MIP-1 β e IL-8, que atraem estas células para os locais da infecção (Teixeira e cols, 2006). É possível que os receptores para substâncias quimiotáticas dos

monócitos dos indivíduos infectados estivessem internalizados pela ação prévia destas quimiocinas ou citocinas inibitórias, respondendo em menor intensidade aos estímulos provenientes das leveduras, quando avaliados *in vitro*.

Além disso, a ligação de leishmânias a receptores para Fc γ e para componentes do sistema complemento resulta na diminuição da produção de IL-12 e a diminuição desta citocina está relacionada com uma menor reposta da imunidade mediada por células durante a infecção por leishmânia (Morehead e cols, 2002), sugerindo menor resposta dos fagócitos, que são os efetores da imunidade celular. Em nossos dados a capacidade fagocitária mediada por receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos foi menor do que a fagocitose por receptores para Fc e para componentes do sistema complemento. Isto sugere que, apesar da diminuição da capacidade fagocitária, predominaria a reposta pelos receptores que reconhecem opsoninas, o que levaria à inibição de IL-12 e depressão das funções dos fagócitos, como observada em nossos resultados.

Estudos realizados por Morehead e cols (2002) demonstram que a enzima Rac-1 é liberada somente quando ocorre a entrada da leishmânia opsonizada. A Rac-1, juntamente com componentes do citosol, é essencial para o desencadeamento de uma resposta oxidativa com a ativação da NADPH oxidase. Embora as leishmânias sejam suscetíveis aos intermediários de oxigênio gerados *in vitro* alguns parasitas permanecem resistentes durante a fagocitose e, assim, levam à permanência da lesão (Lodge e cols, 2006).

Outra possibilidade para explicar a menor fagocitose observada pelos monócitos dos indivíduos com LTA estaria relacionada ao aumento da produção de peróxido de hidrogênio por nós observado, pois, tem sido demonstrado que o tratamento de macrófagos de camundongos com H_2O_2 pode exercer um efeito inibitório na fagocitose de promastigotas de *Leishmania donovani* pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos (Chakraborty e cols, 2001). Nosso trabalho analisou sangue periférico de pacientes com a infecção por LTA já estabelecida, sendo assim os fagócitos estariam sofrendo a influência da forma amastigota do parasita. Apesar do trabalho realizado por Chakraborty ter utilizado promastigotas de *Leishmania donovani*, é possível que a influência exercida pelo H_2O_2 também poderia estar atuando pela ação das formas amastigotas, diminuindo a capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.

Nossos dados demonstraram uma diminuição significativa da fagocitose pelos monócitos de indivíduos com LTA quando comparados aos resultados de indivíduos normais. Estes dados, contudo não estão de acordo com estudos anteriores onde se observou um aumento na fagocitose de formas promastigotas de leishmânias por células mononucleares, quando estas eram opsonizadas por proteína C reativa. Esta proteína é capaz de se ligar a componentes do sistema complemento e aumentar a deposição na superfície do promastigota. Desta forma, a proteína C reativa influencia indiretamente a fagocitose via complemento (Bodman-Smith e cols, 2002). A proteína C reativa é encontrada na fase aguda da infecção em indivíduos com leishmaniose. É possível que esta diferença seja pelo fato de que os indivíduos estudados estavam em uma fase mais tardia da

infecção. Estudos *ex vivo* realizados por Dominguez e Toraño (1999) com células de indivíduos sadios demonstraram que a ligação de componentes C3 do complemento à promastigotas desencadearam uma reação de imunoaderência e ligação dos parasitas aos eritrócitos, aumentando assim a fagocitose pelas células mononucleares. É possível que as diferenças observadas sejam devidas ao fato de termos analisado a fagocitose pelos monócitos dos indivíduos com LTA. Isto sugere que não é somente a presença da leishmânia *per si*, mas o curso da infecção no organismo do hospedeiro que levou à diferentes respostas pelo sistema imunitário.

Neste trabalho observamos que a produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos de indivíduos com LTA foi significativamente maior do que o do grupo controle normal. Isso foi observado tanto nas amostras basais, que não receberam nenhum estímulo para produção do peróxido de hidrogênio, como nas amostras que receberam estímulos por LPS, PMA ou LPS+PMA. Em estudos feitos com quimioluminescência também foram encontrados níveis de radicais de oxigênio significativamente maiores em pacientes com leishmaniose cutânea do que os encontrados em controles normais (Kocyigit e cols, 2002).

Este aumento significativo da produção de peróxido de hidrogênio observado neste trabalho ocorreu independente da baixa capacidade fagocitária encontrada nos pacientes com LTA em relação ao grupo controle.

Na fagocitose de promastigotas pelos macrófagos observou-se estimulação da resposta oxidativa com produção de H_2O_2 (Gantt e cols, 2001). Contudo, a fagocitose de amastigotas, forma presente durante a infecção já estabelecida, desencadeou pequena ou nenhuma explosão respiratória durante a fagocitose. É

necessária a ativação dos macrófagos que fagocitam as formas amastigotas pelas citocinas INF- γ e FNT- α para que ocorra a resposta oxidativa tóxica para a leishmânia intracelular (Wilson e cols, 1994). Quando os monócitos humanos imaturos são infectados com amastigotas de *Leishmania donovani* não ocorre indução da resposta imune adquirida mediada por células e com isso pode ocorrer *in vitro* uma baixa produção de intermediários reativos de oxigênio (Pearson e cols, 1983). Observamos produção de peróxido de hidrogênio significativamente maior do que a dos indivíduos normais. É possível que os monócitos por nós estudados tenham sofrido estimulação *in vivo* por citocinas, como o fator de necrose tumoral (FNT), induzido pela infecção, que pode ter ocasionado ativação dos monócitos, portanto, aumentando, conseqüentemente, a produção dos radicais de oxigênio pelos fagócitos. De fato, observamos maior produção basal desta citocina nos sobrenadantes das culturas dos monócitos dos indivíduos com LTA.

Na evolução da leishmaniose cutânea se observa bom prognóstico quando existe predominância de resposta Ta₁, desde que esta resposta leva à produção de interferon gama (IFN- γ), FNT- α e ativação dos macrófagos infectados. Contudo, uma resposta Ta₁ exacerbada pode estar também associada com uma maior severidade clínica da doença (Antonelli e cols, 2005). A presença de FNT- α na resposta Ta₁ sugere um importante papel na resposta imune atuando na defesa contra microrganismos patogênicos. Evidências de experimentos com leishmaniose cutânea sugerem um papel protetor para esta citocina, pois a administração de FNT- α recombinante em camundongos suscetíveis causa uma

redução das lesões cutâneas (Medeiros e cols, 2000). Entretanto, a produção exacerbada de FNT- α pelos fagócitos mononucleares pode provocar lesão celular endotelial (Abbas e Lichtman, 2002). Observamos em nosso trabalho que monócitos de pacientes com LTA produzem quantidades maiores de FNT- α do que os monócitos de indivíduos normais. Podemos inferir que apesar da diminuição do número de monócitos envolvidos na fagocitose, a produção de FNT- α por estas células continua atuante, Isto poderia estar causando a manutenção da lesão em indivíduos com a infecção. De fato, tem sido mostrado em estudos recentes que monócitos presentes em lesões leishmanióticas localizadas tinham uma produção aumentada de FNT- α (Carrada e cols, 2007). Análises de lesões leishmanióticas mostraram a expressão aumentada de RNAm de INF- γ e FNT- α (Melby e cols, 1994). Níveis de FNT- α no sobrenadante de culturas de células de pacientes com LC também foram significativamente maiores do que os níveis encontrados em pacientes com leishmaniose disseminada quando estimulado por antígenos de *L. braziliensis*, específicos para leishmaniose disseminada e para leishmaniose cutânea (Leopoldo e cols, 2006).

Entretanto, nenhum aumento significativo de FNT- α foi detectado na fagocitose de promastigotas de leishmânias opsonizadas por proteína C reativa. (Bodman-Smith e cols, 2002). Em nosso trabalho observou-se um aumento significativo na produção de FNT em pacientes com leishmaniose cutânea acompanhado também de aumento significativo na produção de H₂O₂ em indivíduos portadores de LTA. Tendo em vista que esses aumentos ocorreram independentemente da diminuição da capacidade fagocitária pode-se sugerir que

a infecção pela leishmânia causa a diminuição no recrutamento de monócitos, porém, as células que conseguem fagocitar o parasita são fortemente estimuladas e produzem grande quantidade de FTN- α e de peróxido de hidrogênio. De fato, FTN- α tem se mostrado eficiente na ativação da sinalização de NF- κ B propiciando a ativação de macrófagos (Vouldoukis e cols, 1995).

Além disso, grande produção de radicais de oxigênio pode levar a danos em macromoléculas como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, podendo afetar também a função celular (Vouldoukis e cols, 1995), sugerindo um papel dos radicais de oxigênio também na imunopatogenia da úlcera leishmaniótica.

Nossos dados mostraram pela primeira vez que os monócitos de indivíduos com LTA, embora tenham menor capacidade fagocitária, produzem concentrações elevadas de peróxido de hidrogênio e de fator de necrose tumoral- α . Foi demonstrado que a tanto a capacidade fagocitária mediada pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos quanto pelos receptores para opsoninas se encontram diminuídas. Entretanto, os mecanismos microbicidas dependentes de radicais de oxigênio encontram-se exacerbados, possivelmente em resposta ao parasita, e envolvidos na defesa antiparasitária. Entretanto, este mesmo mecanismo pode estar envolvido no desenvolvimento da lesão ulcerada.

A produção aumentada de fator de necrose tumoral- α estaria atuando na ativação dos monócitos e possivelmente ocasionando um desvio da resposta imunitária para o tipo Ta1, relacionada à defesa antiparasitária, e de fato, mais do que 50% dos indivíduos mostraram um forte resposta ao teste de Montenegro, e

sugere que a maioria dos indivíduos já estavam produzindo uma resposta adequada em direção à cura.

CONCLUSÕES

1. O índice fagocitário de pacientes com LTA se encontra diminuído quando comparado ao grupo de indivíduos controle normais, pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos. Isto ocorreu devido à diminuição da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose, já que não influenciou a média de leveduras fagocitadas. Esta diminuição foi dose-dependente, pois as diferenças só foram significantes quando avaliadas utilizando 4×10^6 leveduras por escavação.
2. O índice fagocitário também estava diminuído nos indivíduos com LTA quando avaliada pelos receptores para o sistema complemento. Novamente devido à diminuição da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose, já que na média de leveduras fagocitadas não houve mudanças significativas quando comparado ao grupo controle normal. Esta diminuição foi dose-dependente, pois as diferenças só foram significantes quando avaliadas utilizando 4×10^6 leveduras por escavação.
3. A produção de peróxido de hidrogênio foi maior nos indivíduos com LTA quando comparados ao produzido pelos monócitos dos indivíduos controles normais. Estes resultados foram observados tanto na situação basal, quanto com a utilização de estímulos como LPS, PMA ou a associação de ambos LPS e PMA. O aumento na produção de peróxido e hidrogênio ocorreu de forma bastante significativa mesmo com a diminuição da capacidade fagocitária observada em nossos resultados.
4. Os monócitos dos indivíduos com LTA produziram maior quantidade de FNT- α basal quando comparado à produção pelos controles normais. Este

aumento justificaria a elevação de peróxido de hidrogênio pelos monócitos de indivíduos com LTA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Imunidade Inata. *Imunologia Celular e Molecular* 4^a ed. Copyright © 2002; p.270-90.

Amato VS, Júnior HFA, Duarte MIS. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop.* 2003; 85: 39-49.

Ansari NA, Saluja S, Salotra P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin Immunol.* 2006; 119: 339-345.

Antonelli L R V, Dutra W O, Almeida R P, Bacellar O, Carvalho E M, Gollob K J. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* 2005; 101: 226–230.

Awasthi A, Mathur R K, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res.* 2004; 119: 238-258.

Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med.* 1998; 16: 194-53.

Blackwell JM, Ezekowitz RAB, Roberts MB, Channon JY, Sim RB, Gordon S. Macrophage complement and lectin-Like receptors bind leishmania in the absence of serum. *J Exp Med.* 1985; 162: 324-331.

A citação bibliográfica no texto seguiu o sistema de Harvard e a estruturação das referências na listagem das referências bibliográficas seguiu o estilo de Vancouver. International Commitee of Medical Journal Editors. Uniform requeriments for manuscripts submitted to biomedical journals. *BMJ* 1991; 302:338-341. Halsey MJ. References. In Hall GM, ed. *How to wright a paper.* London *BJM*; 1994: 49-50.

Bodman-Smith KB, Mbuchi M, Culley FJ, Bates PA, Raynes JG. C-reactive protein-mediated phagocytosis of *leishmania donovani* promastigotes does not alter parasite survival or macrophages responses. *Parasite Immunol.* 2002; 24: 447-454

Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. *Int. J. Parasitol.* 1998; 28: 121-134.

Brandi MCAC, Padronização de um método de obtenção de fagócitos do sangue periférico para avaliação funcional. Tese de Mestrado. Brasília (DF). Universidade de Brasília, 1993.

Brittingham A, Mosser DM. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol. Today.* 1996; 12: 444-447.

Carrada, C. Cañeda, N. Salaiza, J. Delgado, A. Ruiz, B. Sanchez, L. Gutierrez-Kobeh, M. Aguirre & I. Becker. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol.* 2007; 29: 117-126.

Cervia JS, Rosen H, Murray HW. Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* 1993; 61: 1330-1333.

Chakraborty P, Ghosh D, Basu MK, Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes. *J Parasitol.* 2001; 87: 1023-1027

Clarêncio J, Oliveira C I, Bomfim G, Pompeu M M, Teixeira M J, Barbosa T C, Neto S S, Carvalho E M, Brodskyn C, Barral A, Netto M B. Characterization of the T-Cell Receptor V repertoire in the human immune response against leishmania parasites. *Infect Immun.* 2006; 74: 4757–4765.

Cunningham A C. Parasitic Adaptative Mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol.* 2002; 72: 132-141.

Das M, Mukherjee SB, Shaha C. Hidrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci.* 2001; 114: 2461-2469.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000; 343: 37-49

Descoteaux A. Glicoconjugates in Leishmania infectivity. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1455: 341-352

Domínguez M, Toraño A. Immune adherence–mediated opsonophagocytosis: The mechanism of *Leishmania* infection. *J Exp Med*. 1999; 189: 25–35.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Assoc Med Bras*. 1997; 43.

Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SMB, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative Response of Humna and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania Chagasi*. *J Immunol*. 2001; 167: 893-901.

Guy RA, Belosevic M. Comparison of receptors required to entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect. Immun*. 1993; 61: 1553-1558.

Handman E, Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol*. 2002; 18: 332-334.

Herwaldt B L. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999; 354: 1191-99

Kocyigit A, Gur S, Gurel MS, Bulut V, Ulukanligil M. Antimonial Therapy Induces Circulating Proinflammatory Cytokines in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Infect and Immun*. 2002; 70: 6589–6591.

Lachman PJ, Hobart MJ. Complement Technology. *Handbook of Experimental Immunology*. Immunochem 1978: 1-5.

Laufs H, Müller K, Fleisher J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect. Immun*. 2002; 70: 826-835.

Launois P, Silva F C, Himmerlich H, Parra-Lopez C, Tacchini-Cottier F & Louis J A. Setting in motion the immune mechanisms underlying genetically determined resistance and susceptibility to infection with *Leishmania major*. 1998; 20: 223.

Leopoldo PT, Machado P R L, Almeida R P, Schriefer A, Giudice A, Jesus A R, Ho J L, Guimarães L R, Bacellar O, Carvalho E M. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on *in vitro* cytokine production. *BMC Infect Dis*. 2006; 6: 75.

Lodge R, Diallo TO, Descoteaux A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol*. 2006; 8: 1922-1931.

Love DC, Kane MM, Mosser DM. *Leishmania amazonensis*: The Phagocytosis of Amastigotes by Macrophages. *Experimental Parasitology*. 1998; 88: 161-171

Medeiros IM, Reed S, Castelo A, Salomão R. Circulating levels of sTNFR and discrepancy between cytotoxicity and immunoreactivity of TNF-alpha in patients with visceral leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect*. 2000; 6: 34-37.

Melby PC, Andrade-Narvaez FJ, Darnell BJ, Valencia-Pacheco G, Tryon VV, Palomo-Cetina A. Increased Expression of Proinflammatory Cytokines in Chronic Lesions of Human Cutaneous Leishmaniasis. *Infect Immun*. 1994; 62: 837-842.

Miller MA, McGowan SE, Gantt KR, Champion M, Novick SL, Andersen KA, Bacchi CJ, Yarlett N, Britigan BE, Wilson ME. Inducible Resistance to Oxidant Stress in the Protozoan *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem*. 2000; 275: 33883–33889.

Morehead J, Coppens I, Andrews NW. Opsonization Modulates Rac-1 Activation during Cell Entry by *Leishmania amazonensis*. *Infect and Immun*. 2002; 70: 4571-4580.

Mosser DM, Edelson PJ. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*. 1987; 327: 329-331.

Muniz-Junqueira MI, Santos-Neto LL, Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor- α on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro. *Cel Immunol*. 2001; 208: 73-79.

Muniz-Junqueira M I, Peçanha L M F, Silva-Filho V L, Cardoso M C A, Tosta C E. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. *Clin Diag Lab Immuno* 2003; 10: 1096-1102;

Murray HW, Tsai C W, Liu J, Ma X. Responses to *Leishmania donovani* in Mice Deficient in Interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18. *Infect Immun*. 2006; 74: 4370–4374.

Nagl M, Kacani L, Mullauer B, Lemberg E M, Stoiber H, Sprinzl G M, Schennach H, Dierich M P. Phagocytosis and killing of bacteria by professional phagocytes and dendritic cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9: 1165-1168.

Pearson RD, Harcus LJ, Roberts D, Donowitz GR. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. *J Immunol*. 1983; 131: 1994 – 1999.

Pedras M J, Orsini M, Castro M, Passos V M A, Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania brasiliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 47: 477-485.

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

Pinheiro Jr. N F, Hermida M D R, Macedo M P, Mengel J, Bafica A, dos-Santos W L C. *Leishmania* Infection impairs beta 1-Integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infect Immun*. 2006; 74: 3912–3921

Rousseau D, Demartino S, Ferrua B, François J. In vivo Involvement of Polymorphonuclear Neutrophils in *Leishmania Infantum* Infection. *BMC Microbiol*. 2001;1:17-23.

Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res*. 2006; 123: 245-266

Sampaio RNR, Paula CDR. Mucocutaneous leishmaniasis in the Federal District. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 32: 523-528.

Shaha C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res*. 2006; 123: 233-244.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 525-34.

Spek EJ, Wright TL, Stitt MS, Taghizadeh NR, Tannebaum SR, Marinus MG, Engelward BP. Recombination repair is critical for survival of *Escherichia coli* exposed to nitric oxide. *J Bacteriol*. 2001: 131-138.

Stein M, Keshav S. The Versatility of Macrophages. *Clin Exp Allergy Clin Exp Allergy*. 1992; 22: 19-27.

Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Netto MB, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2006: 32-40.

Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Ann. Rev. Immunol*. 2002; 20: 825-852.

Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz FA, Becheral P, Debre P, Moncada S, Mossalayi MD. The Killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcεRII/CD23 surface. Proc Natl Acad Sci. 1995; 92: 7804-7808.

Wilson M E, Jeronimo S M B, Pearson R D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. Microb Pathol. 2005; 38: 147–160.

Wilson ME, Pearson RD. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Infect Immun. 1998; 56: 363-369.

Wilson ME, Andersen KA, Britigan BE. Response of *Leishmania chagasi* Promastigotes to Oxidant Stress. Infection and Immunity. 1994; 62: 5133-5141.

World Health Organization: Leishmaniasis. http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html acessado em 25/03/2007.

World Medical Association. Declaration of Helsinki ethical principles for medical research involving human subjects. 2002. http://www.rotrf.org/information/Helsinki_declaration.pdf (acessado em 25/03/2007)

Wright SD, Silverstein SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. J. Exp. Med. 1983; 158: 2016-2023.

Zandbergen G V, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting Edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *leishmania* entry into macrophages. J Immunol. 2004; 173: 6521–6525.