



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

Camila Imai Morato

**Avaliação da modulação da infecção de macrófagos
humanos com *Leishmania (Viannia) braziliensis* por
leucotrienos**

**Goiânia
2013**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Camila Imai Morato		
E-mail:	camilaimaimorato@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	☒ Sim	☐ Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:		Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	GO
		CNPJ:	00889834/0001-08
Título:	Avaliação da modulação da infecção de macrófagos humanos com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> por leucotrienos		
Palavras-chave:	Macrófago, Leucotrieno, Leishmania		
Título em outra língua:	Evaluation of modulation of human macrophage infection with <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> by leukotriene		
Palavras-chave em outra língua:	Macrophage; Leukotriene; Leishmania.		
Área de concentração:	Imunologia		
Data defesa:	22/02/2013		
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública		
Orientadora:	Fátima Ribeiro Dias		
E-mail:	fatimardias@gmail.com		

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Camila Imai Morato
Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Camila Imai Morato

Avaliação da modulação da infecção de macrófagos humanos com *Leishmania (Viannia) braziliensis* por leucotrienos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Fátima Ribeiro Dias

**Goiânia
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

M931a Morato, Camila Imai.
Avaliação da modulação da infecção de macrófagos humanos com *Leishmania (Viannia) braziliensis* por leucotrienos [manuscrito], , : / Camila Imai Morato. - 2013.
153 f. : il., figs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Ribeiro Dias;
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2013.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas.

Apêndices.

1. *Leishmania (Viannia) braziliensis* – Infecção 2.
Leucotrienos. 3. Leishmaniose. I. Título.

CDU: 616.993.161

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Dra. Fátima Ribeiro Dias, pelo seu apoio, paciência e dedicação e por ter me dado à oportunidade de começar no curso de extensão, posteriormente como participante do PVIC, e orientação da monografia de final de curso e enfim, ter me orientado no Mestrado.

Aos professores Milton Adriano Pelli, Miriam Leandro Dorta e Patrícia Nagib pelos conhecimentos transmitidos e ótimas sugestões.

Ao Dr. Carlos Henrique Serezani e a Dra. Maria Imaculada Muniz-Junqueira que gentilmente doaram reagentes para que as técnicas fossem executadas plenamente.

Aos amigos dos laboratórios de Imunidade Natural, Imunobiologia das Leishmanioses e Laboratório de Citocinas.

Aos funcionários e ao diretor do Banco de Sangue do INGOH, bem como aos doadores de sangue, pela concordância em participarem do estudo.

Aos meus companheiros de mestrado, Arissa Felipe Borges e Ildefonso Alves da Silva Júnior, pelo auxílio, pela amizade e pela paciência de ouvir minhas queixas e de compartilharem as dificuldades.

Aos meus pais Maria Sônia Imai e Aribelto Ferreira Morato pelo investimento de amor e carinho. Pela base sólida, força e educação para encarar a vida de frente.

As minhas amigas Hayanne Machado Gonzaga e Raíssa Lima Costa que tiraram risos dos momentos mais difíceis e permaneceram comigo mesmo com toda a distância.

Ao meu namorado Danillo Costa Franco pelo carinho, amor e atenção, sendo sempre um ombro amigo nos momentos de dúvidas e dificuldades.

À fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e ao centro de apoio a pesquisa (CAPES), pelo suporte financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo heteroxênico de infecção da leishmaniose.....	3
Figura 2- Receptores que participam na fagocitose de <i>Leishmania</i> sp nas células do hospedeiro.....	10
Figura 3- Curva de crescimento <i>in vitro</i> do isolado <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3.....	30
Figura 4- Infecção de macrófagos <i>in vitro</i> com o isolado <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3....	32
Figura 5- Os tratamentos com MK0591, CP-105,696 ou LTB ₄ não são citotóxicos para os parasitos ou células mononucleares humanas.....	34
Figura 6- O veículo DMSO não altera a infecção de macrófagos com <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3.....	36
Figura 7- Inibição de FLAP por MK0591 aumenta a infecção de macrófagos humanos com <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3.....	37
Figura 8- Inibição de leucotrienos endógenos aumenta a fagocitose de <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 por macrófagos humanos.....	39
Figura 9- Manutenção de MK0591 nas culturas durante 48 h intensifica o aumento da infecção de macrófagos por <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3.....	40
Figura 10- O tratamento com antagonista de receptor de BLT1 aumenta a infecção de macrófagos humanos por <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3.....	42
Figura 11- Antagonismo do receptor de leucotrieno B ₄ aumenta a infecção de macrófagos com <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 em 4 h.....	44
Figura 12- Avaliação dos efeitos do antagonismo do leucotrieno B ₄ na infecção de macrófagos com <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3, por 48 h.....	45
Figura 13- <i>L.(V.) braziliensis</i> induz a produção de LTB ₄ em macrófagos humanos.....	47
Figura 14- Tratamento com LTB ₄ diminui a infecção de macrófagos humanos por <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3.....	49

Figura 15- Tratamento com LTB ₄ modula a fagocitose de <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 por macrófagos humanos.....	50
Figura 16- Tratamento com LTB ₄ após a fagocitose (4 h) diminui a infecção de macrófagos humanos por <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3.....	51
Figura 17- Adição de LTB ₄ não reverte o efeito inibidor do antagonista de BLT1/ receptor de LTB ₄	52
Figura 18- Avaliação da inibição da produção de ROI na indução de atividade microbicida por LTB ₄ em macrófagos humanos infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	54
Figura 19- Avaliação da inibição da produção de ROI por macrófagos humanos infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	55
Figura 20- Avaliação da inibição da produção de ROI na atividade microbicida do LTB ₄ em macrófagos humanos infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> por 4 h.....	56
Figura 21- Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos humanos infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	58
Figura 22- Fotomicrografias de macrófagos infectados com o isolado <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3, sob diferentes tratamentos.....	59
Figura 23- Produção de ânion superóxido pela redução de NBT.....	61
Figura 24- Quantificação da produção de ânion superóxido avaliada pela redução de NBT.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO: 5- Lipoxigenase

AA: Ácido araquidônico

BLT1: Receptor do LTB₄

CO₂: Gás Carbônico

CP-105,696: Bloqueador do receptor de LTB₄

cPLA2 Fosfolipase A2 citosólica

CR1: *First complement receptor*- Receptor do complemento 1

CR3: *Third complement receptor*- Receptor do complemento 3

CysLTs: Cistenil-leucotrinos

EIA: *Enzymatic immuno assay* - Ensaio Imunoenzimático

FcγR: *Fc gama receptor*- Receptor Fc-gama

FLAP: *5-LO-activating protein*, Proteína ativadora da 5-lipoxigenase

FnR: *Fibronectin receptor*- Receptor de fibronectina

GM-CSF: *Granulocyte and macrophage colony-stimulating factor* - Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos

IFN: Interferon

IL: Interleucina

IMG3: Isolado MHOM/BR/2003/IMG

iNOS: *Inducible nitric oxide synthase*- Óxido nítrico sintase induzida

LCD: Leishmaniose Cutânea Disseminada

LCDf: Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada

LMC: Leishmaniose Muco cutânea

LPG: Lipofosfoglicano

LPS: Lipopolissacarídeo

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LTB₄: Leucotrieno B₄

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases* - proteína quinase ativada por mitógeno

MK0591: Inibidor de síntese dos Leucotrienos

MR: *Manose receptor*- Receptor de Manose

NO: *Nitric oxide* - Óxido Nítrico

PAF: *Platelet-activating factor* - Fator ativador de plaquetas

PBS: *Phosphate buffered saline* - Salina tamponada com fosfato

PKC: Proteína quinase C

PLA2: Fosfolipase A2

PLC: Fosfolipase C

PMN: Polimorfonucleares

RNI: *Reactive nitrogen intermediates* -Reativos intermediários do oxigênio

ROI: *Reactive oxygen intermediates*- Reativos intermediários do oxigênio

TH1: *T helper 1*- T CD4⁺ auxiliares do tipo 1

TH2: *T helper 2*- T CD4⁺ auxiliares do tipo 2

TNF- α : *Tumor necrosis factor α* – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A Leishmaniose Tegumentar Americana	1
1.1.1. Características gerais	1
1.1.2. A resposta imune na LTA.....	5
1.1.3. Os macrófagos na infecção por <i>Leishmania</i> sp.	8
1.2. Os leucotrienos	11
1.2.1. Características gerais	11
1.2.2. Os leucotrienos nas infecções, incluindo a leishmaniose	18
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. Geral:	22
3.2. Específicos:.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Aspectos éticos e doadores	23
4.2. Cultivo dos parasitos <i>in vitro</i>	23
4.3. Curva de crescimento dos parasitos.....	24
4.4. Separação de monócitos do sangue periférico e derivação dos macrófagos	24
4.5. Infecção dos macrófagos	25
4.6. Avaliação da citotoxicidade dos compostos para parasitos e células mononucleares	25
4.7. Modulação da infecção dos macrófagos por leucotrienos endógenos.....	26
4.8. Dosagem de Leucotrieno B ₄	27
4.9. Modulação da infecção dos macrófagos por leucotrieno B ₄	27
4.10. Avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio na atividade microbicida dos macrófagos	28
4.11. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos incubados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	28
4.12. Análises estatísticas	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Avaliação do crescimento <i>in vitro</i> do isolado <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 e infecção de macrófagos humanos	30

5.2 Avaliação da citotoxicidade dos compostos.....	33
5.3 Modulação da infecção dos macrófagos por leucotrienos endógenos.....	35
5.4 <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> estimulam a produção de LTB ₄ em macrófagos humanos.....	46
5.5 Modulação da infecção dos macrófagos por leucotrieno B ₄ exógeno.....	48
5.6 Avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio na atividade microbicida dos macrófagos	53
5.7 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos incubados com <i>L. (V.) braziliensis</i>	60
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÕES.....	73
7.1 Específicas.....	73
7.1 Geral	73
8. REFERENCIAS	74
ANEXO 1 : TERMO DE CONSENTIMENTO.....	92
ANEXO 2 : MANUSCRITO.....	95

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, cuja espécie mais prevalente no Brasil é *L. (Viannia) braziliensis*. A infecção de macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis* tem sido pouco estudada e não é conhecido se os leucotrienos, mediadores lipídicos produzidos por macrófagos, podem modular a infecção destas células por este parasito. O objetivo deste trabalho foi avaliar se os leucotrienos modulam a infecção de macrófagos humanos pelo isolado *L. (V.) braziliensis* IMG3. Macrófagos humanos foram derivados de monócitos do sangue periférico e infectados com formas promastigotas do isolado MHOM/BR/2003/IMG (IMG3) na proporção de ~10:1 (parasitos:célula). As culturas foram incubadas por 4 h, sendo em seguida lavadas para retirar o excesso de parasitos extracelulares, e incubadas por adicionais 24, 48 ou 72 h. Para inibir a síntese dos leucotrienos, as culturas foram tratadas com MK0591 e para antagonizar o receptor de LTB₄, CP-105,696. O LTB₄ também foi adicionado às culturas. A dosagem de LTB₄ foi realizada nos sobrenadantes das culturas, usando ensaio imunoenzimático. Para avaliar a participação de espécies intermediárias do oxigênio (ROI) e do óxido nítrico (NO), foram utilizados os seus respectivos inibidores, apocinina e aminoguanidina. Para avaliar a produção de ROIs foi utilizada a técnica do azul de tetrazólio (NBT). O isolado IMG3 infectou os macrófagos humanos, sendo selecionados os períodos de 4 h e 48 h de incubação para avaliar a fagocitose e a atividade microbicida, respectivamente. Os tratamentos com MK0591 ou CP105,696 aumentaram significativamente o índice de infecção, após 4 h ou 48 h de incubação ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que há necessidade da presença do composto MK0591 durante todo o período de incubação (48 h), mas não a do antagonista do LTB₄, cujo efeito é mantido após incubação por 4 h. A adição de LTB₄ às culturas diminuiu significativamente a infecção dos macrófagos, tanto durante as primeiras 4 h quanto após 48 h de cultura ($p < 0,05$). Os parasitos induziram a produção de LTB₄ nas culturas de macrófagos nos primeiros 30 min, caindo esta produção após 4 h ($p < 0,05$). Além disso, o uso de inibidores de ROI e NO aumentaram significativamente a infecção de macrófagos antes (ROI e NO) ou após a ativação com LTB₄ (ROI). Os resultados preliminares mostram a produção de ânion superóxido, induzida pelos parasitos e uma tendência no aumento pelo LTB₄. Em conclusão, os resultados sugerem que os macrófagos humanos produzem leucotrienos após a infecção por *L. (V.) braziliensis*, sendo o LTB₄ o principal leucotrieno produzido. O LTB₄ inibe a fagocitose e aumenta a atividade microbicida dos macrófagos, contribuindo para diminuir a infecção. Os resultados sugerem que há produção de ROI e NO após infecção com *L. (V.) braziliensis* e que o LTB₄ aumenta a atividade microbicida dos macrófagos via aumento da produção de ROI. Entender a participação dos leucotrienos no controle da infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis* pode levar à descoberta de novos alvos terapêuticos para a LTA.

Apoio financeiro: CAPES; FAPEG.

Palavras-chave: Macrófago; Leucotrieno; Leishmania.

ABSTRACT

The American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an infectious disease caused by parasitic protozoa of the genus *Leishmania*, whose most prevalent species in Brazil is *L. (Viannia) braziliensis*. The human macrophage infection with *L. (V.) braziliensis* has been poorly investigated and is not known whether leukotrienes, lipid mediators produced by macrophages, may modulate this infection. The objective of this study was to evaluate whether leukotrienes modulate infection of human macrophages with *L. (V.) braziliensis* IMG3, a field clinical isolate. Human monocyte-derived macrophages were infected with promastigote forms of MHOM/BR/2003/IMG (IMG3) at a ratio of ~ 10:1 (parasite:cell). Cultures were incubated for 4 h and then washed to remove excess extracellular parasites, and incubated for additional 24, 48 or 72 h. To inhibit leukotriene synthesis, the cultures were treated with MK0591 and to antagonize the LTB₄ receptor, CP-105, 696. LTB₄ was also added to the cultures. The measurement of LTB₄ was performed on culture supernatants using enzyme immunoassay. To evaluate the involvement of reactive oxygen intermediates (ROI) and nitric oxide (NO) their respective inhibitors were used, apocynin and aminoguanidine. To assess the production of ROIs it was used nitroblue tetrazolium salt (NBT). The IMG3 infected human macrophages, being selected periods of 4 h and 48 h incubation to assess phagocytosis and microbicidal activity, respectively. Treatments with MK0591 or CP105, 696 significantly increased the infection index after 4 h or 48 h incubation (p <0.05). The results show that the presence of MK0591 is need during whole incubation time (48 h) but not the LTB₄ antagonist, whose effect is maintained after incubation for 4 h. The addition of LTB₄ to the cultures significantly decreased macrophage infection, both during the first 4 h and after 48 h of incubation (p <0.05). The parasites induced LTB₄ production in macrophage cultures during the first 30 min, but this production decreased after 4 h (p <0.05). The ROI and NO inhibitors significantly increased the infection index, before (ROI and NO) or after treatment with LTB₄ (ROI). Preliminary results showed that production of superoxide anion is induced by parasites and this is further increased by LTB₄. In conclusion, the results suggest that human macrophages produce leukotrienes following infection with *L. (V.) braziliensis*, and the main of them is LTB₄. The LTB₄ inhibits phagocytosis and enhances the microbicidal activity of macrophages, contributing to control of the infection. Results suggest that *L. (V.) braziliensis* induces LTB₄, NO and ROI production and, in turn, LTB₄ increases the microbicidal activity of macrophages via increase of ROI. Understanding the involvement of leukotrienes in the control of human macrophage infection with *L. (V.) braziliensis* can lead to the development of novel therapeutic targets for ATL.

Financial support: CAPES; FAPEG.

Keyword: Macrophage; Leukotriene, Leishmania.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Leishmaniose Tegumentar Americana

1.1.1. Características gerais

A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma antroponose que acomete a pele e mucosas (nasal, oral, faringe e laringe). Ela é causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, podendo apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* e da relação entre o parasito e o hospedeiro (Gontijo & Carvalho 2003).

A Leishmaniose Tegumentar é considerada, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma das seis mais importantes doenças infecciosas, constituindo um problema de saúde pública em 88 países, sendo estimado que mais de 12 milhões de pessoas estejam infectadas. É estimado que cerca de dois milhões de novos casos aconteça por ano (WHO 2005). No Brasil, entre o período de 1988 a 2009, a LTA apresentou média anual de 26.021 casos registrados e coeficiente de detecção médio de 14,1 casos por 100.000 habitantes. Ao longo desse período, observou-se uma tendência no crescimento da endemia, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,8 e 22,9 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (Brasil 2010). Ao analisar a evolução da LTA no Brasil, observa-se uma expansão geográfica, sendo que, no início da década de 80, foram registrados casos autóctones em 19 unidades federadas e, no ano de 2003, foi confirmada autoctonia em todas as unidades federadas do país. A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos (cerca de 37,3% do total de casos registrados, no período de 1988 a 2009) e com os coeficientes médios mais elevados (66,9 casos por 100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-oeste (32,6 casos por 100.000 habitantes) e Nordeste (16,1 casos por 100.000 habitantes) (Brasil 2009). Na região Centro-Oeste do país foram notificados, entre o período de 1990 e 2010, 87.009 casos de LTA, com uma média de 4.143 novos casos ao ano. Deste total de casos, 8.342 foram notificados no estado de Goiás (Brasil 2010). De acordo com a Portaria GM/MS Nº. 2.472 de 31 de agosto de 2010, todo caso de LTA é de notificação obrigatória às autoridades locais de saúde. Deve-se realizar a investigação epidemiológica em até 48 horas após a notificação, avaliando a

necessidade de adoção de medidas de controle pertinentes. A investigação deverá ser encerrada até 180 dias após a notificação. A unidade de saúde notificadora deve utilizar a ficha de notificação/investigação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, encaminhando-a para ser processada, conforme o fluxo estabelecido pela Secretaria Municipal de Saúde (Brasil 2010).

Atualmente no país, as principais espécies responsáveis pela LTA pertencem a dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Dentro destes, sete espécies foram detectadas, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, associadas com lesões cutâneas localizadas (LCL, leishmaniose cutânea localizada) ou disseminadas (LCD, leishmaniose cutânea disseminada) e lesões mucocutâneas (LMC, leishmaniose mucocutânea) e *L. (L.) amazonensis*, associada com o desenvolvimento de lesões cutâneas localizadas ou com a forma difusa (LCDf, leishmaniose cutânea difusa). Também as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste do Brasil (Gontijo & Carvalho 2003; Brasil 2007).

Todas as espécies de *Leishmania* spp executam um ciclo de vida heteroxênico, sendo parte do ciclo em um hospedeiro vertebrado e parte no inseto vetor. Os vetores da LTA são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei* (Gontijo & Carvalho 2003; Brasil 2007).

A infecção do hospedeiro vertebrado se inicia pela picada do inseto flebotomíneo que inocula, durante o repasto sanguíneo, as formas promastigotas flageladas. As formas promastigotas são, então, fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, especialmente os macrófagos, e iniciam um processo de diferenciação em formas arredondadas, denominadas amastigotas. As formas amastigotas se reproduzem por divisão binária, sendo que a intensa multiplicação leva ao rompimento das células e liberação dessas formas, que infectam novas células. Ao exercer um repasto sangüíneo, a fêmea de um flebotomíneo ingere, juntamente com o sangue, células parasitadas com a forma amastigota. Durante o trajeto pelo trato

digestivo, as células se rompem, liberam as formas amastigotas, que rapidamente se dividem por divisão binária se transformando em formas promastigotas procíclicas. No intestino do inseto vetor, estas sofrem um processo de diferenciação morfológica e funcional em formas promastigotas metacíclicas, que ganham a probócida do inseto. Ao exercer um novo repasto sangüíneo, o flebotomíneo inocula as formas metacíclicas dando, assim, continuidade ao ciclo, como pode ser visto na Figura 1 (Gontijo & Carvalho 2003; Brasil 2007).

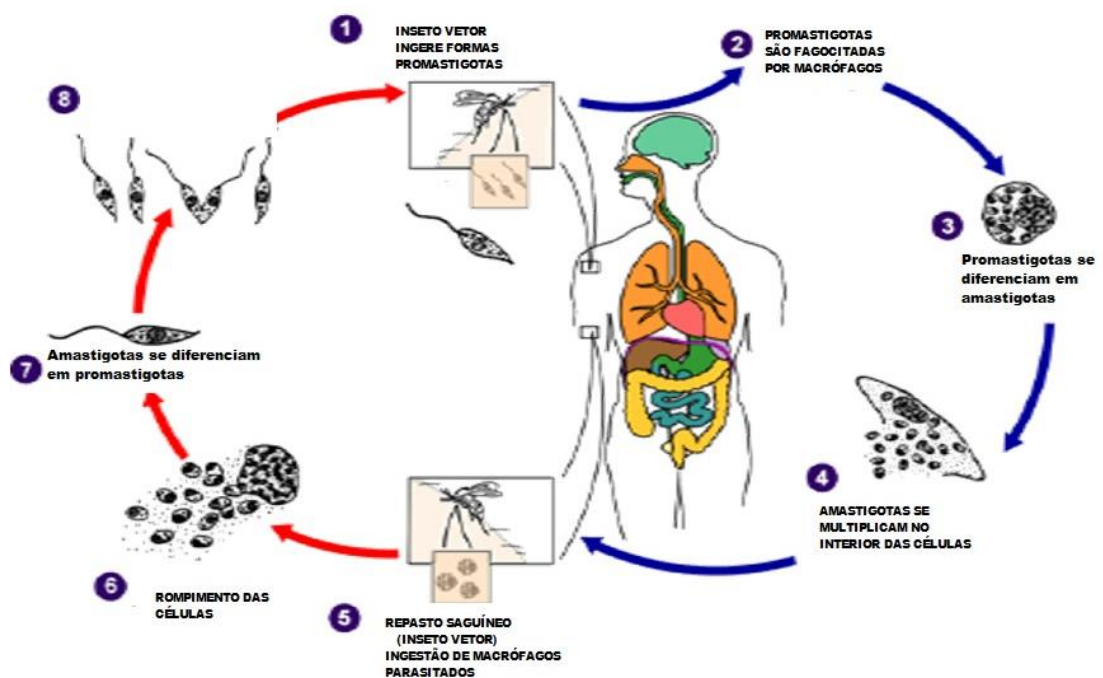


Figura 1. Ciclo heteroxênico de infecção da leishmaniose

(Adaptado de Centers For Disease Control And Prevention)

(<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>)

O diagnóstico clínico e epidemiológico da leishmaniose pode ser realizado, na ocorrência de lesões típicas da doença, especialmente se o paciente procede de áreas endêmicas ou esteve presente em lugares onde há casos de leishmaniose. Esse pode ser complementado com a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva e, eventualmente, pela resposta terapêutica. Entretanto, a confirmação do diagnóstico por métodos parasitológicos é fundamental, tendo em vista o número de doenças com as quais deve ser feito o diagnóstico diferencial com a LTA (Gontijo & Carvalho 2003; Brasil 2007).

O tratamento da LTA tem como fármaco de primeira escolha o antimonial pentavalente, existente sob a forma de N-metilglucamina, comercializado no Brasil. Não havendo resposta satisfatória ao tratamento com antimonial pentavalente, os fármacos de segunda escolha são a anfotericina B e as pentamidinas, consideradas mais eficazes do que os antimoniais no tratamento de lesões mucosas. Enquanto pacientes com LCL, com lesões cutâneas únicas ou múltiplas, apresentam cura espontânea ou boa resposta ao tratamento, aqueles com LMC, concomitantes lesões cutânea e mucosa ou lesão mucosa desenvolvida secundariamente à lesão cutânea, apresentam lesões que são altamente destrutivas e não respondem bem ao tratamento, ou mesmo quando ocorre a cicatrização, as recidivas são frequentes (Silveira et al. 2009).

No Brasil, no ano de 2007, os percentuais de cura clínica eram de 77,68% e o abandono do tratamento atingia 3,74%. Porém, esses indicadores são variáveis para cada região, estado, município e localidade (Gontijo & Carvalho 2003; Brasil 2007). A falha e o abandono são devidos a vários fatores. Primeiramente, à dificuldade do tratamento, pois os antimoniais possuem diversas contra-indicações como, por exemplo: não podem ser administrados em gestantes, pois estes fármacos atravessam a barreira placentária e podem impregnar o tecido nervoso do feto, levando a síndromes severas de retardamento mental. Há restrições também do uso dos antimoniais em pacientes com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas. Além disto, o tratamento com antimoniais e anfotericina causam vários efeitos adversos como: mialgia, anorexia e náuseas. Em algumas ocasiões, no início do tratamento, há uma exacerbação do quadro clínico com o aumento do infiltrado nas lesões, do eritema, das secreções nasal e faríngea. Presume-se que isso decorra de uma resposta aos antígenos liberados com a morte do parasito. Quando é necessário o fármaco de segunda escolha usado é a anfotericina, (Brasil 2007; Oliveira et al. 2011; WHO 2005). Devem ser levados em consideração outros fatores, como a resistência aos fármacos.

A falha no tratamento pode ser devida às próprias características intrínsecas do parasito, que podem expressar genes ligados à resistência (Guimond et al. 2003) Alguns estudos já relataram resistência em casos de tratamento de leishmaniose cutânea, que é a forma mais branda da doença e de maior probabilidade de cicatrização (Palacios et al. 2001; Ouellette et al. 2004; Hadighi et al. 2006; Rojas et al. 2006; Yardley et al. 2006; Arevalo et al. 2007). A forma cutânea difusa é de difícil tratamento, não havendo

fármacos que levem à cura clínica da doença (Salaiza-Suazo et al. 1999; Zerpa et al. 2007; Pereira et al. 2009). Além das dificuldades com a terapia da LTA, não há, ainda, uma vacina eficaz, que possa prevenir a doença (Noazin et al. 2008; Evans & Kedzierski 2012; Singh & Sundar 2012). O alto custo, a resistência e a toxicidade dos fármacos tradicionais, demonstram a necessidade de novas terapias e o desenvolvimento de vacinas eficientes.

O entendimento da relação entre o parasito e o hospedeiro é um fator determinante para se compreender a evolução da LTA, cujo desfecho depende do estabelecimento de uma resposta imune celular adequada, juntamente com a terapia.

1.1.2. A resposta imune na LTA

A infecção por *L. major*, em camundongos de linhagens geneticamente diferentes, constitui o modelo que melhor representa a relevância da genética do hospedeiro para a definição das consequências da infecção. *L. major* é uma das principais espécies causadoras de leishmaniose cutânea no sudeste da Ásia e norte da África (Sacks & Noben-Trauth 2002; WHO 2005). A infecção de camundongos da linhagem C57BL/6 por esta espécie revelou que estes desenvolvem lesões locais, que curam após algumas semanas. A resistência à infecção foi associada ao desenvolvimento de células T CD4⁺ auxiliares do tipo 1 (Th1, *T helper 1*), produtoras de interferon gama (IFN γ) e fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*). Estas citocinas são importantes para a ativação clássica de macrófagos, capacitando-os a produzirem maiores quantidades de reativos intermediários do oxigênio (ROI, *reactive oxygen intermediates*) e do nitrogênio (RNI, *reactive nitrogen intermediates*). Estas moléculas, altamente tóxicas, são responsáveis pela morte intracelular das leishmânias (Murray 1981; Murray et al. 1983; Liew et al. 1990; Zarley et al. 1991; Murray & Nathan 1999; Horta et al. 2012).

A suscetibilidade à infecção foi observada em camundongos da linhagem BALB/c. Estes camundongos desenvolvem lesões persistentes, progressivas, podendo ocorrer a disseminação dos parasitos para os órgãos viscerais. A resposta imune ineficiente para o controle da doença foi associada ao desenvolvimento de células T CD4⁺ auxiliares do tipo 2 (Th2, *T helper 2*), produtoras de interleucinas 4, 10 e 13 (IL-4, IL-10 e IL-13), e ao fator transformador do crescimento β (TGF- β , *transforming growth factor β*), que inibem a produção de IFN γ e a ativação dos macrófagos (Liese et

al. 2008). A IL-4 e a IL13 ativam os macrófagos de maneira alternativa, induzindo a produção de arginase, que gera a produção de poliaminas, as quais aumentam o crescimento do parasito intracelular e, conseqüentemente, a progressão da doença (Iniesta et al. 2002; Roberts et al. 2004; Naderer & McConville 2008; Mosser & Edwards 2008).

Devido à extrema importância dos ROIs e RNIs na atividade microbicida dos macrófagos, estudos vêm tentando comprovar a participação destes na morte de parasitos do gênero *Leishmania*. Para isto, podem ser utilizados inibidores da produção de ROI, sendo um desses inibidores a apocinina (Stefanska & Pawliczak 2008), o 4'-hydroxy-3'-methoxy-acetophenone, que tem como análogo a acetovanilona). A apocinina é um inibidor seletivo da atividade da NADPH oxidase, responsável pela produção de ROI, conseqüentemente, inibe a produção de ROI em diferentes tipos celulares, como neutrófilos e macrófagos (Muijsers et al. 2000; Worm et al. 2001, Almeida et al. 2011). Experimentos suportam a ideia de que a apocinina inibe a translocação das subunidades p47^{phox} e p67^{phox} para a membrana celular, inibindo assim a ação da NADPH oxidase (Ximenes et al. 2007).

Assim como para os ROIs, existem inibidores de RNI, como por exemplo, a aminoguanidina (Muijsers et al. 2000) que atua como um inibidor seletivo da óxido nítrico sintase (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*) (Misko et al. 1993; Holstad et al. 1997; Farhad et al. 2011). A participação da iNOS e gp 91 phox (subunidade da NADPH oxidase), que são necessárias para a formação de NO (*nitric oxide*) e ROI, respectivamente, foi relatada como fator crucial na morte de *L. major* em macrófagos murinos (Blos et al. 2003). Estudos vêm demonstrando a participação dos RNIs no controle da infecção murina com *L. major* (Trez et al. 2009; Fritzsche et al. 2010). Adicionalmente, estudos com *Leishmania* do Novo Mundo apontam uma relevância do NO no controle da infecção por *L. (L.) amazonensis* em murinos (Linares et al. 2001). Mukbel et al (2007) relataram que a participação de ânion superóxido e NO é necessária para a morte de formas amastigotas de *L. amazonensis*, em macrófagos murinos, que foram estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) e IFN γ . Em macrófagos humanos, já foi descrita a participação de ROI (ânion superóxido) no controle da infecção por *L. (L.) amazonensis* e por *L. (V.) braziliensis* (Khouri et al. 2009).

Em seres humanos, o paradigma Th1/Th2, associado à cura clínica ou não resolução da infecção na LTA, não é tão claro como nos camundongos. Na LTA,

durante a fase ativa da LCL, há predominância de linfócitos T CD4⁺ com produção mista de citocinas do tipo Th1 (IFN γ) e Th2 (IL-4). Nos indivíduos que cicatrizam espontaneamente ou naqueles que apresentam cicatrização após o tratamento quimioterápico, foi observada uma proporção similar de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, com produção de IFN γ e baixos níveis de IL-4 (Coutinho et al. 1998). No entanto, indivíduos com LMC, a forma mais grave da LTA, podem apresentar níveis de IFN γ similares àqueles de indivíduos que apresentam cicatrização espontânea de lesões cutâneas (Carvalho et al. 1995). As células mononucleares de pacientes considerados com leishmaniose subclínica, quando estimuladas com antígeno de *L. (L.) amazonensis*, produzem uma quantidade bem menor de IFN γ e TNF α , e quantidades um pouco mais elevadas de IL-5, comparadas às dos pacientes com leishmaniose cutânea, demonstrando, então, que pacientes que não desenvolvem a doença possuem a habilidade de modular a resposta imune para controlar a infecção com um perfil Th2 (Follador et al. 2002). Usando antígeno de *L. (V.) braziliensis*, foi demonstrado que células de pacientes com leishmaniose mucosa produzem altos níveis de IFN γ e de IL-5, quando comparadas com as de pacientes com LC (Da-Cruz et al. 2002).

Mais recentemente, Gomes-Silva et al. (2007) observaram que células de pacientes com leishmaniose mucosa, que haviam cicatrizado as lesões, estimuladas com antígenos de *L. (V.) braziliensis*, apresentam uma maior produção de IFN γ e uma menor produção de IL-10, quando comparadas às de pacientes com cicatrização espontânea, assintomáticos ou com leishmaniose cutânea cicatrizada, após tratamento, mostrando que mesmo após a cicatrização, pacientes que tiveram leishmaniose mucosa ainda mantêm um padrão de alta produção de citocinas. Vários estudos vêm tentando determinar um padrão de produção de citocinas, associado com a severidade da doença, a forma clínica ou mesmo com a resolução da infecção (Castes et al. 1988; Pirmez et al. 1993; Coutinho et al. 1996; Bacellar et al. 2002; Faria et al. 2005). Apesar da falta de uma clara associação entre a produção de citocinas e a evolução da infecção, uma resposta imune celular é necessária para a cura clínica da doença, como demonstrado nos camundongos C57/BL6 infectados com *L. major*. É a ativação da resposta imune celular com produção de IFN γ e TNF que garantem a adequada ativação dos macrófagos para a eliminação dos parasitos (Vouldolkis et al. 1995; Novais et al. 2009).

1.1.3. Os macrófagos na infecção por *Leishmania* sp.

Os macrófagos fazem parte do sistema mononuclear fagocitário, que é composto por subgrupos de leucócitos originados da medula óssea, derivados das células mielóides, que circulam no sangue como monócitos e populam os tecidos como macrófagos. Os monócitos, liberados da medula óssea, são morfologicamente heterogêneos, em relação ao tamanho, a granulosidade e ao núcleo e expressam diferentes moléculas em suas membranas, incluindo receptores de quimiocinas e moléculas de adesão, para migrarem do sangue para os tecidos. Os monócitos e macrófagos são reguladores críticos da resposta imune inata. Os macrófagos são fagócitos especializados, que residem em tecidos linfóides ou não linfóides, apresentando importante função na defesa contra as infecções, devido a uma grande variedade de receptores que reconhecem patógenos e à sua habilidade em produzir citocinas inflamatórias e moléculas microbidas (Aderem & Underhill 1999; Gordon 2003; Mosser & Edwards 2008). Em seres humanos, a subclasse de monócitos clássica é a melhor descrita, sendo definida por ser uma população pró-inflamatória, que expressa CD14 e receptor de baixa afinidade para a porção Fc de anticorpos IgG (CD16). Porém, nossos conhecimentos sobre como essa diversidade contribui para a LTA ainda é limitado. Os monócitos são uma população heterogênea de células, que também contribui para a geração de diferentes macrófagos e exercem um papel de extrema importância na infecção por leishmânias, pois estes se diferenciam em macrófagos, que é a célula onde o parasito se multiplica. (Aderem & Underhill 1999; Kaye & Scott 2011).

Apesar dos parasitos *Leishmania* sp poderem ser encontrados em neutrófilos, é nos fagócitos mononucleares que os parasitos apresentam maior replicação e sobrevivência, sendo que os macrófagos residentes da derme são rapidamente infectados, tornando-se a população infectada dominante nas primeiras 24 horas de infecção (Aderem & Underhill 1999; Kaye & Scott 2011). As formas promastigotas se ligam a receptores de superfície dos macrófagos, levando, então, à fagocitose do parasito, que é internalizado e se transforma em formas amastigotas. Alguns receptores já foram descritos como importantes para a internalização das formas promastigotas, como por exemplo: receptor do complemento 3 (CR3, *third complement receptor*), receptor do complemento 1 (CR1, *first complement receptor*), receptor de Manose (MR,

manose receptor), Receptor de fibronectina (FnR, *fibronectin receptor*) e em amastigotas já foi relatado também: receptor para porção Fc de IgG (FcγR, *Fc gamma receptor*) (Blackwell et al. 1985; Wilson & Pearson 1988; Russell & Wright 1988; Ueno & Wilson 2012). A Figura 2 apresenta os receptores relevantes para a fagocitose de *Leishmania* sp.

Estudos relataram que leishmânias promastigotas que se encontram na fase estacionária do crescimento, apresentam um aumento da expressão de moléculas de superfície, como a glicoproteína gp63 e alterações bioquímicas da lipofosfoglicana (LPG) (Puentes et al. 1988; Ramamoorthy et al. 1992, Pimenta et al. 1994; Forestier et al. 2011). Estas moléculas estariam relacionadas com a entrada dos parasitos nas células. A forma promastigota se liga a receptores do complemento de forma direta ou às proteínas do complemento. A gp63 presente na superfície das leishmânias ativa a cascata do complemento, se ligando a proteína do complemento C3 que é clivada em C3b (um ligante do CR1), que é clivado em iC3b (forma inativa do C3b), que se liga ao CR3 (Russel 1987; Ramamoorthy et al. 1992). Cooper et al. (1988) usaram anticorpos monoclonais ligantes ao CR3 e demonstraram a inibição da ligação de formas promastigotas de *L. major* e *L. donovani* a macrófagos murinos. A avaliação da ligação das formas promastigotas a macrófagos demonstrou uma cooperação entre CR1 e Mac-1/CD11b/CD18, especialmente em células humanas, onde foi mostrado que o Mac-1 estabiliza a adesão (Rosenthal et al. 1996). Além disso, outras interações também facilitariam a entrada destes parasitos, como os MRs interagindo com manose na superfície dos parasitos. A inibição da fagocitose dos parasitos por macrófagos humanos ocorre após a inibição dos MRs (Wilson & Pearson 1988). Também a participação do receptor FnR é importante para a fagocitose, uma vez que a gp63 possui motivos que se assemelham aos da fibronectina e dessa forma se liga aos FnR (Brittingham et al. 1999).

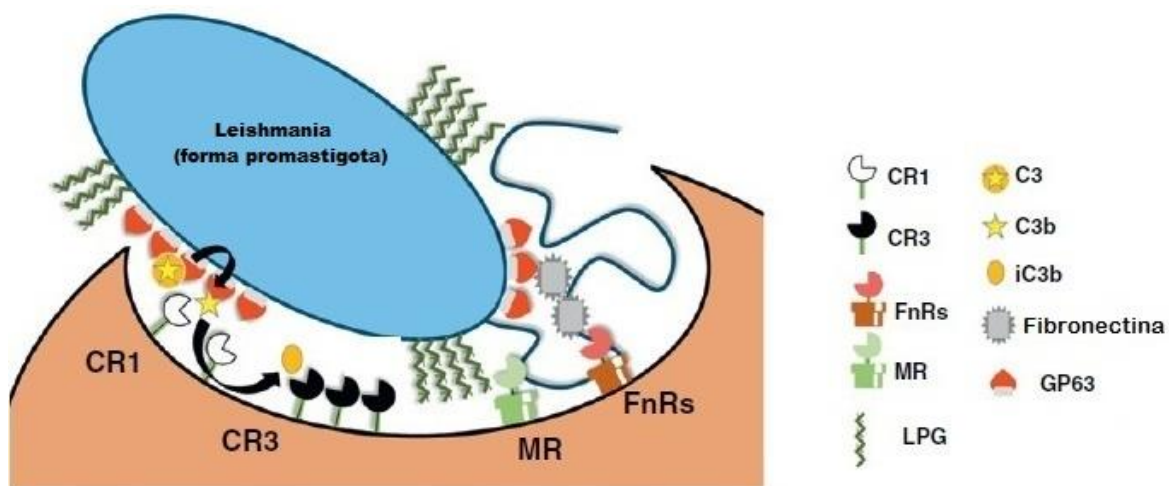


Figura 2. Receptores que participam na fagocitose de *Leishmania* sp nas células do hospedeiro. Adaptado de Ueno & Wilson, 2012.

A avaliação da infecção de macrófagos humanos *in vitro*, por diferentes espécies de *Leishmania* (*L. (V.) panamensis*, *L. major*, *L. infantum*) mostra que estas células são permissivas à infecção por estes parasitos, porém, uma vez ativadas com produtos bacterianos, tais como o LPS e citocinas, especialmente o IFN γ , são capazes de eliminar os parasitos intracelulares (Vouldoukis et al. 1995; Bosque et al. 1998; Panaro et al. 1999). Experimentos demonstraram que macrófagos de doadores saudáveis, após a infecção com *L. (V.) braziliensis*, produzem uma grande quantidade de moléculas pró-inflamatórias, como por exemplo, CXCL10, levando a um maior recrutamento celular (Vargas-Inchaustegui et al. 2010). Corroborando com este estudo, recentemente, experimentos com macrófagos derivados de células mononucleares do sangue periférico de pacientes demonstraram que, após a exposição a *L. (V.) braziliensis*, os macrófagos de indivíduos com infecção subclínica (sem lesões, IDRM positiva) mostraram uma menor taxa de infecção e um menor número de formas amastigotas intracelulares em comparação às células de pacientes com LCL ou LMC. Os macrófagos dos pacientes com LCL ou LMC produziram mais quimiocinas (CCL2, CXCL8, CCL9) e TNF- α do que aqueles de pacientes com a infecção subclínica, indicando que os macrófagos desempenham um papel crucial no controle da infecção por *L. (V.) braziliensis* em seres humanos, mas por secretar quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias contribuem para o recrutamento e ativação das células T, promovendo inflamação, com danos nos tecidos e maior gravidade da doença (Giudice et al. 2012).

Passwell et al. (1984) avaliaram a infecção de monócitos humanos por *L. major*, sob diferentes estímulos, não encontrando diferença na infecção dos monócitos estimulados ou não com endotoxinas, linfocinas, partículas de zimozan e concavalina A. Outro estudo demonstrou que macrófagos humanos, infectados com *L. (V.) panamensis* derivados de monócitos de indivíduos que tiveram leishmaniose cutânea tinham um número de células infectadas maior do que os indivíduos que possuíam a doença subclínica (Bosque et al. 2000). Poucos estudos avaliaram a infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis*, sendo que os estudos existentes tiveram um enfoque em avaliar apenas a participação de citocinas (Khouri et al. 2009; Giudice et al. 2012). Avaliar a interação entre macrófagos humanos e *L. (V.) braziliensis*, demonstrando que moléculas são induzidas nos macrófagos por estes parasitos e quais são os efeitos destas na infecção, é crucial para entender o que ocorre durante a infecção de macrófagos humanos por essa espécie, tanto para o controle da infecção quanto para entender a imunopatogenia da LTA.

1.2. Os leucotrienos

1.2.1. Características gerais

Os leucotrienos são mediadores lipídicos da inflamação e receberam esse nome devido a três ligações duplas conjugadas na estrutura de 20 carbonos e porque foram isolados inicialmente de leucócitos. Os leucotrienos são eicosanóides (do grego *eicosa* = vinte; para derivados de ácidos graxos contendo 20 carbonos) derivados do metabolismo do ácido araquidônico (all-cis-5,8,11,14-ácido eicosatetraenoico, AA), um componente essencial das membranas celulares, que é liberado por clivagem estreitamente regulada por fosfolipase. O AA é um intermediário biológico que pode ser convertido em um grande número de eicosanóides com potentes atividades biológicas (Crooks & Stockley 1998; Murphy & Gijón 2007; Nakamura & Shimizu 2011).

A biossíntese dos leucotrienos começa apenas após estimulação celular, quando as células ou tecidos são expostos a estímulos fisiológicos e patológicos, como por exemplo: imunocomplexos, endotoxinas, o componente do sistema complemento C5a, IL-1, TNF, fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), fator ativador de plaquetas (PAF, *platelet-activating factor*), elastase produzida pelo neutrófilo e o próprio leucotrieno B₄ (LTB₄),

que são capazes de ativar fosfolipases nos leucócitos para iniciar a síntese dos leucotrienos (Crooks & Stockley 1998; Funk 2001). Dependendo da estrutura molecular e das propriedades bioquímicas, a fosfolipase A2 (PLA2) pode ser classificada em quatro categorias principais: (1) PLA2 secretada (sPLA2); (2) a isoforma citosólica dependente de cálcio PLA2 (cPLA2); (3) a isoforma citosólica independente de cálcio PLA2 (iPLA2); e a (4) PAF Acetil-hidrolase, que inativa o PAF. Quanto à isoforma cPLA2, o cálcio não é necessário para a atividade catalítica, mas é importante para a interação com a membrana e os fosfolipídios. Há pelo menos seis tipos de cPLA2: cPLA2 α , cPLA2 β , cPLA2 γ , cPLA2 δ , cPLA2 ϵ e cPLA2 ζ , dos quais a cPLA2 α é uma enzima crucial na produção de eicosanóides. Esta enzima é amplamente expressa em vários tipos de tecidos e células, por exemplo, no cérebro, pulmão, rim, coração, baço, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e células epiteliais alveolares (Shimizu 2009, Nakamura & Shimizu 2011).

Após vários estímulos celulares, que geram um aumento de Ca²⁺ livre, as enzimas cPLA2 α e a 5-lipoxigenase (5-LO) são translocadas para o núcleo. Dessa forma, a cPLA2 α age sobre os glicerofosfolipídeos de membrana na posição sn-2, sendo então hidrolisados, liberando dois produtos: o AA e os lisofosfolipídeos. Os lisofosfolipídeos podem funcionar como moléculas bioativas ou servir como precursores de outros mediadores, como por exemplo, para o PAF. O AA é usado como substrato pela enzima 5-LO, juntamente com a FLAP, a proteína ativadora da 5-LO (FLAP, *5-LO-activating protein*). A FLAP, presente na membrana nuclear, se liga ao AA e, possivelmente, desempenha um papel na apresentação deste substrato a 5-LO. Já a enzima 5-LO é uma dioxigenase que possui um domínio NH₂ terminal (Cd-2 similar) que liga dois íons cálcio e um domínio catalítico que liga ferro. Dessa forma, a 5-LO catalisa duas reações sequenciais: primeiramente, a retirada de um átomo de hidrogênio do C-7 do AA e inserção de oxigênio molecular para formar ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HpETE) e, em seguida, remoção de um átomo de hidrogênio do C-10 do 5-HpETE, com conseqüente desidratação, para formar o conjugado trieno epóxido leucotrieno A₄ (LTA₄) (Crooks & Stockley 1998; Funk 2001, Murphy & Gijón 2007; Singh et al. 2010; Nakamura & Shimizu 2011). O LTA₄ pode ser hidrolisado pela enzima LTA₄ hidrolase, uma enzima citosólica que também exerce atividade de aminopeptidase e contém zinco no seu centro catalítico. Essa enzima adiciona água no C-12 para formar o LTB₄ (ácido 5(S),12(R)-dihidroxi-6,8,10,14-

(Z,E,E,Z)-eicosatetraenóico). Alternativamente, o LTA_4 pode ser conjugado com glutathione para formar leucotrieno C_4 (LTC_4 , ácido 5(S)-hidroxi-6(R)-S-glutathionil-7,9,11,14-(E,E,Z,Z)-eicosatetraenóico), por meio da ação da enzima LTC_4 sintase. O LTC_4 pode ser transferido para o meio extracelular e podem ainda serem formados o leucotrieno D_4 e o leucotrieno E_4 (LTD_4 e LTE_4 , respectivamente). No meio extracelular, a glutamil-transpeptidase cliva a molécula de ácido glutâmico para formar o LTD_4 , este, por sua vez, é transformado em LTE_4 , pela clivagem da molécula de glicina pela enzima dipeptidase (Crooks & Stockley 1998; Funk 2001; Murphy & Gijón 2007; Singh et al. 2010; Nakamura & Shimizu 2011). Alternativamente, os CysLTs (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4) também podem ser produzidos por meio do metabolismo transcelular, a partir de LTA_4 ou AA derivado de neutrófilos, plaquetas e células endoteliais vasculares. Por exemplo, durante o processo inflamatório pode ocorrer biossíntese transcelular de leucotrienos, mediada por transferência de AA ou LTA_4 de uma célula para outra. De tal forma que, mesmo que uma célula não possua alguma enzima da via de síntese de leucotrienos, é possível produzi-los. Esta biossíntese é considerada muito importante, porque pode gerar concentrações extremamente elevadas de CysLTs em um determinado local. Isso já foi relatado em células humanas como neutrófilos, plaquetas de sangue periférico, em células epiteliais humanas e em células endoteliais de suínos (Feinmark & Cannon 1986; Macclouf & Murphy 1988; Macclouf et al. 1989).

Normalmente, moléculas que funcionam como sinais para coordenar eventos bioquímicos, devem estar sujeitos a mecanismos que finalizam sua atividade. Os leucotrienos são inativados, por conversões metabólicas, em uma série de produtos, que não são reconhecidos pelos receptores específicos e também podem ser convertidos em derivados que facilitam a sua eliminação. Sabendo que o LTB_4 é essencialmente um ácido graxo, normalmente reações que envolvam a degradação de ácidos graxos, tais como vias de β -oxidação e reações de conjugação com ácido glicurônico, são essenciais. Há também a participação de enzimas específicas, incluindo o citocromo P450s e também a participação de oxirredutases que metabolizam o LTB_4 . O LTC_4 , sendo um peptidolípido, é um substrato para peptidases que formam o LTE_4 como o principal metabólito. O LTE_4 é, então, processado por uma reação de ω -oxidação, seguido por uma β -oxidação. As enzimas de degradação podem ser aumentadas pelo fator de transcrição do receptor ativador de proliferação de peroxissomos alfa

(*Peroxisome proliferator-activated receptor α* , PPAR α). Este receptor nuclear hormonal pode ser ativado pela ligação ao LTB₄, fazendo com que se forme um ciclo de retroalimentação que limita a duração da atividade do LTB₄ (Crooks & Stockley 1998; Murphy & Gijón 2007; Narala et al. 2010; Nakamura & Shimizu 2011).

Os leucotrienos são mediadores lipídicos da inflamação, eles são predominantemente produzidos por células inflamatórias, como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos, basófilos e mastócitos (Crooks & Stockley 1998; Murphy & Gijón 2007; Singh et al. 2010; Nakamura & Shimizu 2011). Em geral, os leucotrienos são análogos aos hormônios que atuam localmente, apresentando um efeito parácrino ao atuarem sobre células vizinhas, e autócrino, atuando sobre a própria célula fonte. Para isso, os leucotrienos devem ser reconhecidos. O efeito, então, é mediado por diferentes receptores acoplados à proteína G, que foram descobertos apenas a partir de 1997. Indícios da existência dos leucotrienos apareceram a partir de experimentos com leucócitos polimorfonucleares de coelho, que quando incubados com AA produziam metabólitos derivados do AA, até então desconhecidos (Borgeat & Samuelsson 1979). Porém, apenas décadas depois, devido às grandes diferenças relativas entre LTB₄ e seus derivados, foram identificados e classificados os receptores específicos. Estudos utilizando vários tecidos e células, por exemplo, leucócitos humanos e células de pulmão de porco forneceram evidências para a existência e distribuição dos receptores específicos para LTB₄ (Singh et al. 2010). Em 1997 e 2000, dois tipos de receptores do LTB₄ foram descobertos, o BLT1 e o BLT2, respectivamente (Yokomizo et al. 1997, 2000). O primeiro receptor do LTB₄ a ser clonado e caracterizado foi denominado BLT1, sendo identificado como um possível receptor transmembrânico contendo 352 aminoácidos. Em seres humanos, o receptor BLT1 é exclusivamente expresso em células inflamatórias, tais como neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, macrófagos, linfócitos B e T. O baço e o timo humano também expressam o mRNA BLT1, mas as quantidades são muito mais baixas do que a dos leucócitos do sangue periférico (Yokomizo et al. 1997; Shimizu et al. 2002; Pettersson et al. 2003; Tager et al. 2003; Nakamura & Shimizu 2011).

O segundo receptor do LTB₄ a ser descrito foi o BLT2, que é um receptor de baixa afinidade. Este receptor foi descoberto durante a análise do gene do receptor BLT1 (Yokomizo et al. 2000). Apesar de ser um receptor de baixa afinidade, o BLT2 envia, de forma eficiente, sinais intracelulares em resposta ao LTB₄. Este receptor é

expresso em diversos tecidos humanos, tais como músculo esquelético, coração, pulmão e glândulas mamárias. Foi detectado também o mRNA do BLT2 em abundância no baço, fígado, ovário e leucócitos (Yokomizo et al. 2000, 2001; Nakamura & Shimizu 2011).

Os receptores dos CysLts são subdivididos principalmente em duas classes: o CysLT1 e o CysLT2. Essa subdivisão foi determinada a partir da sensibilidade a determinados antagonistas (Labat et al. 1992; Bäck 2002; Capra 2004; Singh et al. 2010). O receptor CysLT1 é conhecido por ser sensível aos antagonistas montelukast, zafirlukast, pranlukast, pobilukast (antagonistas clássicos), enquanto o CysLT2 medeia vários efeitos que não são inibidos por estes antagonistas. O mRNA de CysLT1 foi primeiramente identificado em células pulmonares humanas, mais especificamente nas células musculares lisas e macrófagos do pulmão. Além disso, foi demonstrada a presença de mRNA e a proteína CysLT1 em leucócitos do sangue periférico e no baço (Lynch et al. 1999; Sarau et al. 1999; Figueroa et al. 2001). O padrão de expressão de CysLT2 em seres humanos parece ser substancialmente diferente do padrão de expressão de CysLT1. Embora o receptor CysLT2 também seja altamente expresso no baço e em leucócitos do sangue periférico e em células pulmonares humanas, a expressão no coração, glândulas adrenais e cérebro parece ser única para este subtipo (Labat et al. 1992; Bäck 2002; Mellor et al. 2003; Capra 2004; Singh et al. 2010).

Os mecanismos de transdução de sinal dos receptores de CysLT são semelhantes aos promovidos pelos receptores de LTB₄. Após o reconhecimento dos agonistas, os receptores acoplados a proteína G, sofrem mudanças conformacionais, resultando na ativação da proteína G e na troca GDP-GTP, seguida da hidrólise de GTP e de vários eventos de sinalização intracelular (Peres et al. 2007; Singh et al. 2010). A ligação dos leucotrienos a seus receptores ativa diferentes proteínas G, que desencadeiam várias vias bioquímicas de sinalização nas células, tais como inibição de cAMP (via Gi), ativação de fosfolipase C (PLC, *phospholípase C*, via Gq), aumento de cálcio intracelular (via Gq) e ativação de fosfatidil inositol-3-quinase (PI3K, *phosphatidyl inositide 3-kinase*) e proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs, *mitogen activated protein kinase*) (Peres et al. 2007; Singh et al. 2010). Por exemplo, a sinalização via BLT1 em células RAW 264.7 ativa um grande número de quinases, como as MAPKs e PI3K que são importantes para a proliferação dessas células induzida por LTB₄ (Nieves & Moreno 2006). Além disso, já foi demonstrado que o inibidor da

PI3K inibe a migração induzida pelo LTB₄ em células musculares lisas das vias aéreas, sugerindo a importância dessa quinase na sinalização (Watanabe et al. 2009). Recentemente, Okamoto et al. (2010) relataram que o BLT1 é necessário para a fagocitose nos macrófagos via FcγR, pois o LTB₄ potencializa a ativação de Rac quinase dependente de FcγR.

A regulação da expressão dos receptores de LTB₄ e de CysLTs tem sido associada à regulação por várias moléculas, tais como citocinas e agonista de receptores semelhantes a toll (TLRs, *toll like receptors*). Citocinas, como a IL-4 e a IL-13, podem aumentar a expressão de CysLT1. Também a nível transcricional, citocinas do tipo Th2, como a IL-4, podem aumentar os níveis de receptores de CysLT2 em monócitos e macrófagos humanos (Thivierge et al. 2001; Nakamura & Shimizu 2011). O LPS, agonista de TLR4, induz a expressão de CysLT2 em células dendríticas humanas (Thivierge et al. 2006). Além disso, citocinas como IL-5 e IFNγ podem aumentar a expressão de receptores para LTB₄ em eosinófilos e macrófagos humanos, respectivamente (Huang et al. 1998, Thivierge et al. 2000). Alguns experimentos também demonstraram que o LPS induz a expressão de BLT1, enquanto TNFα aumenta a expressão de BLT2, em células epiteliais humanas (Qiu et al. 2006).

Os leucotrienos são conhecidos principalmente pelas suas funções na inflamação (Samuelsson 1983). O LTB₄ tem papel fisiológico na quimiotaxia de leucócito (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos, além de células dendríticas e de células T efectoras CD4⁺ ou CD8⁺), na adesão de leucócitos a células endoteliais e na indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF (Tager et al. 2000, 2003; Goodarzi et al. 2003; Ott et al. 2003; Islam et al. 2006; Shin et al. 2006, Gaudreault & Gosselin 2009; Haneda et al. 2011). Os leucotrienos, por serem mediadores lipídicos da inflamação, são bem descritos por participarem dos processos inflamatórios de doenças crônicas, alérgicas e autoimunes (Griffiths et al. 1995; Capra et al. 2007; Ohnishi et al. 2008). Nesse contexto, os CysLTs estão envolvidos com eventos celulares tais como a migração celular e adesão de leucócitos (Dahlén et al. 1981; Yuan et al. 2009; Dannull et al. 2012). Em pacientes asmáticos, atuam de forma importante no sistema respiratório, participando da hiperplasia de células globosas, causando o aumento da secreção de muco, além de modularem eventos como a broncoconstrição (Manning et al. 1990; Kim et al. 2006; Hashimoto et al. 2009; Kazani et al. 2011). No sistema circulatório, participam de importantes mecanismos da

inflamação e arteriogênese, na regulação da permeabilidade vascular e também na modulação da pressão sanguínea sistêmica (Lötzer et al. 2003; Lee et al. 2004; Hui et al. 2004; Moos et al. 2008).

Em função da extrema importância dos leucotrienos na inflamação, houve a necessidade do estudo deste mediador em distintas doenças. A doença mais estudada é a asma, em que já foi relatada uma maior expressão de receptores para leucotrienos e indução de quimiotaxia para diferentes tipos celulares (eosinófilos, neutrófilos). Foi demonstrado também que os leucotrienos participam na modulação da função celular, como por exemplo, das células dendríticas na asma (Turner et al. 1996; Machida et al. 2004; Parameswaran et al. 2004; Zhu et al. 2005). Neste raciocínio de que os leucotrienos estariam participando diretamente na patologia da asma, visualizou-se a possibilidade de usar antagonistas dos receptores para leucotrienos no tratamento da asma (Drazen et al. 1999; Dahlén 2006; Montuschi et al. 2007; O'Byrne et al. 2009). O antagonismo dos leucotrienos nesta doença reverteu a contração prolongada da traqueia em suínos. Além disso, em seres humanos, o antagonismo possibilitou a inibição da liberação de citocinas como: IL-3, IL-4 e possivelmente IL-5, que participam da ativação de células (eosinófilos, linfócitos B), que aumentam a inflamação aguda e crônica, um dos principais fatores da fisiopatologia da asma brônquica. Em ambas as situações, foi usado um antagonista pranlukast, um antagonista clássico, que bloqueia o receptor CysLT1 (Obata et al. 1992, Tohda et al. 1999).

Outros inibidores já foram produzidos. A empresa Pfizer desenvolveu um potente antagonista de LTB₄, o CP-105,696 {1 - [3 - (4-phenylbenzyl) -4 hydroxychroman-7-il]-1-ciclopentano carboxílico}. Esse composto é altamente seletivo para BLT1, tendo sido demonstrada a sua ação na regulação da quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* e *in vivo* (Showell et al. 1995, 1996; Turner et al. 1996; Canetti et al. 2003). Sua importância na quimiotaxia também foi enfatizada, pela inibição da expressão de proteínas quimioatraentes, por monócitos humanos (Huang et al. 2004) e também na inibição da migração de outras células como eosinófilos (Gladue et al. 1996). Outra intervenção farmacológica para inibir os leucotrienos é a inibição da FLAP, que pode ser conseguida com o uso do composto MK0591, por exemplo. Este composto foi importante na inibição da hiperóxia, em camundongos com formação inadequada dos alvéolos (Park et al. 2011) e no próximo item veremos sua aplicação nas infecções.

Os leucotrienos também participam da regulação das atividades microbicidas dos leucócitos, as quais serão descritas na próxima seção, que discorre sobre o papel dos leucotrienos nas infecções.

1.2.2. Os leucotrienos nas infecções, incluindo a leishmaniose

Os leucotrienos são claramente descritos como importantes mediadores das respostas inflamatórias. Vários outros aspectos das funções dos leucotrienos vem sendo, todavia, descritos. Dentre estas funções, a participação no controle e eliminação de vários microrganismos. Como por exemplo, nas infecções virais e bacterianas (Flamand et al. 2007). Estudos demonstraram a participação do LTB₄ endógeno no aumento da fagocitose de bactérias opsonizadas, mostrando que o LTB₄ pode ser induzido após a fagocitose realizada por meio de receptores FcR ou CR (Mancuso et al. 2001). A atividade bactericida de macrófagos alveolares foi aumentada pela presença de LTB₄, além de ter sido demonstrada a participação de vários metabólitos da via da 5-LO na destruição de *Klebsiella pneumoniae*. O mecanismo proposto, responsável pela destruição bacteriana, seria por meio da participação dos leucotrienos, que aumentariam a indução da produção de peróxido de hidrogênio. Esta produção seria mediada pelo aumento da atividade NADPH-oxidase, sendo que o LTB₄ participaria na indução da proteína quinase-δ (PKC-δ), por mecanismos ainda desconhecidos, promovendo a translocação e fosforilação da p47phox, gerando a produção de ROI (Serezani et al. 2005). Além disso, os leucotrienos podem estar auxiliando na indução da liberação de potentes agentes antimicrobianos, que estariam participando do controle de vírus e bactérias. Nessa direção, estudos em células humanas e de camundongos demonstraram a atividade do LTB₄ na indução da liberação de peptídeos antimicrobianos tais como defensinas, catelicidinas e neurotoxina derivada de eosinófilo, participando no controle de infecções virais e bacterianas (Flamand et al. 2007; Gaudreault & Gosselin 2008).

Em um modelo murino, Machado et al. (2005) demonstraram a importância dos leucotrienos na infecção por *Strongyloides venezuelensis*. A inibição da síntese de leucotrienos mediada pelo composto MK-886, aumentou de forma significativa o número de ovos e das formas adultas do helminto, além de diminuir o número de eosinófilos e de células mononucleares no sangue, na cavidade peritoneal e no lavado brônquio-alveolar dos camundongos. A inibição de síntese dos leucotrienos, com esse

mesmo composto (MK-886), também modulou a infecção por *Histoplasma capsulatum* em camundongos. Os animais tratados com o inibidor morreram mais cedo (após 15 dias de tratamento) do que os controles, que não morreram até 30 dias. Além disso, foi observado um maior número de unidades formadoras de colônia do fungo nos pulmões e no baço dos camundongos tratados por 14 dias. Para verificar a modulação imune pelos leucotrienos, citocinas foram dosadas em pulmões de camundongos, que foram previamente tratados com inibidores de síntese de leucotrienos, e percebeu-se a diminuição de IL-2, IL-5, IL-12 e IFN γ (Medeiros et al. 2004). Outro exemplo do papel dos leucotrienos na resistência às infecções por fungos foi observado em camundongos deficientes em 5-LO. Neste caso, a falta de leucotrienos causou uma diminuição no recrutamento de linfócitos T de memória para os pulmões dos camundongos imunizados com extrato de antígeno de *H. capsulatum*, além de um aumento da mortalidade dos animais (Medeiros et al. 2008). Um estudo mais recente demonstrou que a inibição de 5-LO causou uma maior suscetibilidade à infecção fúngica pulmonar, que estaria associada à persistência do fungo no pulmão, à diminuição de NO e à diminuição da fagocitose (Secatto et al. 2012).

Na resposta imune inata a protozoários, os leucotrienos também participam dos mecanismos de resistência às infecções. O LTC₄ aumenta a fagocitose de *Trypanosoma cruzi* por macrófagos de camundongos, além de aumentar a morte intracelular destes parasitos (Wirth & Kierszenbaum 1985b). Talvani et al. (2002) relataram também a importante participação do LTB₄ na infecção por *T. cruzi*, sendo este um mediador lipídico importante para a migração e ativação de leucócitos, induzindo a produção de TNF e a indução de NO. Este RNI participa do controle e morte do parasito. Além disso, foi demonstrado, também, que o tratamento de camundongos com um antagonista de BLT1 (CP-105,696) aumenta a parasitemia, causada pelo *T. cruzi*. Corroborando estudos, Panis et al. (2011) demonstraram que camundongos deficiente em 5-LO apresentam uma maior parasitemia e uma menor detecção de NO no tecido cardíaco, além de, dentro de 30 dias de infecção, 60% dos camundongos morrerem, enquanto todos os selvagens permanecem vivos.

Na infecção por *Toxoplasma gondii*, o LTB₄ exógeno aumenta a atividade citotóxica de macrófagos derivados de monócitos humanos, promovendo a morte intracelular destes parasitos (Yong et al. 1994). Subsequentemente, um estudo avaliando a infecção por *T. gondii*, demonstrou que este parasito, incubado juntamente com

mastócitos, promove a desgranulação destas células e a liberação de LTB₄. A inibição da formação destes leucotrienos estaria diretamente associada à diminuição da citotoxicidade ao parasito (formação de vesícula e danos ao microrganismo) (Henderson & Chi 1998).

Alguns estudos vêm tentando entender melhor a infecção por *Leishmania sp* e a participação dos leucotrienos na infecção por este parasito. Em um estudo com *L. donovani* foi demonstrado que os macrófagos peritoneais de camundongos, ao serem infectados com formas amastigotas, produzem metabólitos derivados da via da 5-LO e da cicloxigenase (Reiner & Malesud 1985). Experimentos realizados por Milano et al. (1996) demonstraram que células do baço, oriundas de camundongos infectados com *L. major*, tinham um aumento significativo da produção de LTB₄ no início da infecção. Este aumento foi associado a uma intensa inflamação, como um importante estímulo no recrutamento e ativação de células inflamatórias. Mais recentemente, foi demonstrado que a deficiência na produção de leucotrienos, em camundongos deficientes em 5-LO ou estudos de inibição farmacológica, usando um inibidor de 5-LO (MK0591), resultou no aumento da gravidade da infecção murina por *L. (L.) amazonensis* (Serezani et al. 2006). A ausência de leucotrienos diminuiu a atividade microbicida dos macrófagos. Além disso, macrófagos de camundongos resistentes à infecção produziram níveis mais elevados de LTB₄, após a infecção por *L. (L.) amazonensis*, do que os animais suscetíveis. O LTB₄ causou um maior aumento da produção de NO em resposta a infecção por *L. (L.) amazonensis* em macrófagos de camundongos resistentes do que naqueles de camundongos suscetíveis (Serezani et al. 2006).

Os mecanismos de controle da infecção causada por *L. (V.) braziliensis* são ainda pouco conhecidos, especialmente pouco se sabe sobre a interação entre macrófagos humanos e esta espécie de *Leishmania*. Além disso, muito pouco é conhecido sobre a participação dos leucotrienos na infecção por *Leishmania* e o envolvimento destes na infecção por *L. (V.) braziliensis* ainda não foi investigado. Levando em consideração a elevada prevalência da espécie *L. (V.) braziliensis* no país, e, ainda, o elevado número de indivíduos infectados e as dificuldades do tratamento da LTA, o conhecimento da modulação da infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis* pode levar ao desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para esta doença ainda sem métodos de prevenção eficazes.

2. JUSTIFICATIVA

Os mecanismos de controle da infecção causada por *L. (V.) braziliensis* são ainda pouco conhecidos, especialmente pouco se sabe sobre a interação entre macrófagos humanos e esta espécie de *Leishmania*. *Leishmania. (V.) braziliensis* é a espécie responsável por um elevado número de casos de leishmaniose tegumentar no Brasil, uma doença que é um sério problema de saúde pública no país. Esta espécie causa a forma clínica mais grave da LTA, a leishmaniose mucosa. Muito pouco é conhecido sobre a participação dos leucotrienos na infecção por *Leishmania*, tendo sido avaliada esta participação em modelos murinos de infecção por *L. major*, *L. donovani* e *L. amazonensis*. Foi demonstrado que os leucotrienos são produzidos durante a infecção por estas espécies de *Leishmania* e que estão envolvidos no controle do parasito. É possível que os leucotrienos sejam também induzidos nos macrófagos humanos durante uma infecção por parasitos *L. (V.) braziliensis* e possam participar no controle da infecção. Investigar a participação dos leucotrienos no controle da infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis* é fundamental para uma compreensão dos mecanismos de controle do parasito *in vivo* nas lesões dos pacientes com LTA. Este conhecimento pode levar ao desenvolvimento de novas terapias, o que se justifica pela ausência de uma vacina eficaz para LTA, os fármacos usados causarem diversos e graves efeitos colaterais, além de estar surgindo resistência dos parasitos aos fármacos.

Nossa hipótese é a de que os macrófagos humanos produzem leucotrienos após a infecção por *L. (V.) braziliensis* e que estes mediadores podem ativar mecanismos microbicidas, dependentes da produção de ROI, que contribuam para o controle da infecção.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral:

- Avaliar se os leucotrienos modulam a infecção de macrófagos humanos por parasitos *L. (V.) braziliensis*.

3.2. Específicos:

Avaliar a infecção de macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis*;

- Avaliar o efeito de leucotrienos endógenos na infecção dos macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis*, utilizando um inibidor da síntese de leucotrienos e um antagonista de LTB₄;

- Avaliar a produção de LTB₄ em macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis*;

- Avaliar o efeito do LTB₄ exógeno na infecção dos macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis*;

-Avaliar a participação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, induzidas pelo parasito e por leucotrienos, na atividade microbicida dos macrófagos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos e doadores

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFG (Protocolo: 190/2011). Doadores do Banco de Sangue do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (n = 83) leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**ANEXO 1**), antes da colheita do sangue. Foram incluídos doadores saudáveis, de ambos os gêneros, faixa etária de 18 anos a 55 anos, que não estavam fazendo uso de medicamentos.

4.2. Cultivo dos parasitos *in vitro*

O isolado MHOM/BR/2003/IMG (IMG3), da espécie *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, presente no *Leishbank*, o Banco Imunobiológico de leishmânias da região Centro-Oeste (IPTSP/UFG), é oriundo de paciente com LTA, de 43 anos de idade, do gênero feminino, que apresentava três lesões de pele (cabeça, ante-braço e coxa) eritematosas, ulceradas, de tamanho ~0,3 cm cada, com diagnóstico de LCL. Os parasitos foram preservados em nitrogênio líquido, congelados em soro fetal bovino (SFB), contendo 10% de dimetilsulfóxido de sódio (DMSO, Sigma Chem. Co. St. Louis, MD, EUA).

Após descongelamento, os parasitos foram cultivados em meio Grace (Grace's Insect Medium, Sigma) completo, suplementado com 20% de SFB (Cripion Biotecnologia, Brasil) inativado, 2 mM de L-glutamina (Sigma), 100 U/mL de penicilina (Sigma) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), a 26°C. Os parasitos foram repicados de três em três dias, sempre iniciando a cultura com 5×10^5 parasitos/mL. Uma pequena alíquota da cultura era diluída em solução salina tamponada com fosfatos (PBS, *phosphate-buffered saline*), contendo formaldeído a 0,3% e os parasitos, quantificados em hematocítômetro, para estabelecer o repique, que foi realizado no máximo seis vezes.

4.3. Curva de crescimento dos parasitos

Os parasitos foram cultivados em meio Grace completo, à temperatura de 26°C, em placas de cultura de 24 poços (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), iniciando a cultura com 5×10^5 parasitos/mL. A quantificação dos parasitos, como descrito acima (Item 4.2), foi realizada, diariamente, durante 12 dias de cultivo. A quantidade de parasitos foi expressa em número de parasitos/mL.

4.4. Separação de monócitos do sangue periférico e derivação dos macrófagos

As amostras de sangue venoso (cerca de 10 mL) foram colhidas em tubos à vácuo (Greiner bio-one, Vacuette, Americana, SP, Brasil), contendo solução de EDTA como anticoagulante. O sangue foi centrifugado inicialmente a 200 g, por 5 minutos, à temperatura ambiente (T.a), para retirada do plasma. Em seguida, o sangue foi diluído volume/volume com PBS-EDTA 0,01 mM pH 7,3 e, então, foi aplicado sobre gradiente de densidade de sílica coloidal revestida por polivinilpirrolidona (Percoll, Sigma), com densidade igual a 1,077 (15 ml percoll/volume de sangue diluído ~20 mL). Após centrifugação (1.000 g por 20 min, T.a), o anel contendo as células mononucleares (CMN) foi colhido da interface e as células foram lavadas com PBS-EDTA duas vezes (600 g, 10 min, a 4°C; 200 g, 10 min, a 4°C). As CMN foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 (Sigma) sem SFB. As células foram quantificadas, em hematocítômetro, após a diluição de uma pequena alíquota da suspensão celular em solução de azul de tripano 0,1% em PBS. Em seguida, as CMN foram distribuídas em placas de 24 poços (TPP), sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Deckglaser, Braunschweig, Alemanha), na concentração de 2×10^5 células/500 µL. Primeiro, foi depositada uma gota de 200 µL sobre a lamínula, deixando sedimentar por 30 minutos, para depois completar o volume para 500 µL com meio RPMI completo, contendo 15% de SFB (Gibco, Brasil), 11 mM de bicarbonato de sódio e 2 mM de L-glutamina. Para a derivação dos macrófagos (total de tempo de cultura: 5 dias), o meio foi trocado a cada 48 h (meio RPMI completo contendo 15% de SFB), sendo as células mantidas a 36°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂. Após este período, os macrófagos foram infectados com os parasitos.

4.5. Infecção dos macrófagos

Os parasitos (6^o dia de cultura, fase estacionária inicial) foram lavados duas vezes com solução salina (NaCl 0,85%), a 10°C, 15 min, 1.000 g, e, em seguida, lavados uma vez com PBS pH 7,3 (10°C, 15 min, 1.000 g). Em seguida, foram ressuspendidos em meio RPMI contendo 15% de SFB e foram quantificados em hematocitômetro. A suspensão de parasitos (1×10^8 parasitos/mL) continha, em cada 20 μ L, 2×10^6 parasitos. Os parasitos foram adicionados aos macrófagos na proporção de $\sim 10:1$ (parasito:célula). As placas foram incubadas a 36 °C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂. As culturas foram incubadas por 4 h, lavadas 3 vezes com meio RPMI completo (15% de SFB), a 37°C, para retirar o excesso de parasitos, e o meio foi repostado em todos os poços. As lamínulas foram colhidas após 4, 24, 48 ou 72 h de cultura, sendo as células fixadas com metanol absoluto e coradas com corante panótico, utilizando o Kit comercial Instant Prov (Newprov, Pinhais, PR, Brasil). Em seguida, as lamínulas foram fixadas sobre lâminas para microscopia, usando Entellan Novo (Merck KgaA, Damstadt, Alemanha). Sob microscopia de luz (aumento de 1.000 vezes), foi determinada a frequência de células infectadas (300 células analisadas) e o número médio de parasitos por célula infectada (mínimo de 50 células infectadas avaliadas). O índice de infecção foi obtido multiplicando-se a porcentagem de células infectadas pelo número médio de parasitos por células infectadas.

4.6. Avaliação da citotoxicidade dos compostos para parasitos e células mononucleares

Os parasitos, no 6^o dia de cultura (fase estacionária inicial), foram centrifugados e quantificados em hemacitômetro, como descrito no item 4.3. A suspensão de parasitos continha 1×10^7 parasitos/100 μ L. As CMN foram quantificadas em hemacitômetro e a suspensão continha 5×10^5 células/100 μ L. Para avaliar a atividade metabólica dos parasitos cultivados em meio Grace completo e das CMN em meio RPMI completo, foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol- 2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma), conforme descrito por Ribeiro-Dias et al (2000).

O MTT é um sal tetrazólico, solúvel em água, que é convertido em formazan insolúvel, de coloração roxa, por clivagem do anel tetrazólico pela enzima succinato desidrogenase, no interior da mitocôndria. As membranas celulares são impermeáveis ao produto formazan, dessa maneira, este se acumula no interior de células vivas (Mosmann, 1983). As células ou parasitos foram incubados na ausência de tratamento ou tratados com MK0591 (inibidor da FLAP, Merck) CP-105,696 (bloqueador do receptor BLT1, Pfizer, Groton, CT) gentilmente doados pelo Dr. Carlos Henrique Serezani (Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, EUA), estes compostos foram dissolvidos em DMSO (10^{-3} M), veículo do composto, e estocados a -80°C até o momento de uso, ou tratados também com LTB_4 (Cayman Chem. Co., Ann Arbor, Michigan, EUA), que foi dissolvido em etanol (3×10^{-4} M), por 24 h. Aos 100 μL das suspensões de parasitos ou células foram adicionados 20 μL do MTT (5 mg/mL em PBS) e as placas foram, então, incubadas por 4 h em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Após este período, foram adicionados 100 μL da solução SDS 10% - DMF 50% (SDS, Duodecil sulfato de sódio, USBTM Cleveland, OH, EUA; DMF, Dimetilformamida, Vetec, São Paulo, SP, Brasil) (Tada et al. 1986). O SDS foi dissolvido a 10% a 37°C em solução de DMF 50% em água, pH 4,7, ajustado com ácido acético a 80%. Esta solução dissolve os cristais de formazan oriundos da redução do MTT, durante 20 h a 36°C . A densidade óptica (D.O.) foi determinada em filtro de 550 nm em um leitor de microplacas Thermo Labsystems, descontando-se a D.O. dos poços controles que continham apenas meio completo (branco). A viabilidade celular foi calculada pela fórmula: % de células viáveis = $\text{DO células tratadas} \div \text{DO células não tratadas} \times 100\%$.

4.7. Modulação da infecção dos macrófagos por leucotrienos endógenos.

Para avaliação do efeito dos leucotrienos endógenos na infecção, os macrófagos foram tratados com MK0591 ou CP-105,696. Para os experimentos, os compostos foram diluídos em meio RPMI contendo 15 % de SFB (10^{-4} M) e adicionados às culturas dos macrófagos, em diferentes concentrações, 30 min antes da infecção com as leishmânias. A maior concentração usada dos compostos foi de 10^{-6} M, sendo a concentração do veículo DMSO 0,1% (baseada em Serezani et al., 2006). O DMSO foi adicionado como controle nas mesmas concentrações dos compostos diluídos. Foram

comparados os resultados de culturas tratadas com os de culturas contendo somente o veículo. Nos experimentos de 48 h após a lavagem (4 h), em alguns experimentos os compostos não foram repostos, mas em outros houve reposição após a lavagem e, então, re-incubação. Após 4 ou 48 h de incubação, as lamínulas foram retiradas, sendo as células fixadas, coradas e avaliadas quanto à infecção, como descrito acima (Item 4.5).

4.8. Dosagem de Leucotrieno B₄

Para a dosagem do LTB₄, as CMN foram separadas segundo o item 4.4 e distribuídas (2×10^7 /mL, total 2 mL) em placas de seis poços (fundo chato, TPP), sendo incubadas a 36°C, 5% de CO₂. No quarto dia de cultivo, os macrófagos foram removidos mecanicamente do poço, utilizando PBS gelado e um êmbolo (seringa de 1 mL), fazendo movimentos suaves e unidirecionais. As células foram coletadas, quantificadas e distribuídas em placas de 24 poços (10^6 células/500 µL em meio RPMI 5% SFB). No dia seguinte (5º dia), as células incubadas na ausência ou presença do inibidor de síntese MK0591 por 30 min, foram incubadas com os parasitos (~10:1). Após 30 min e 4 h, os sobrenadantes foram colhidos e estocados a -80°C. A dosagem de LTB₄ foi realizada por ensaio imunoenzimático, usando kit de dosagem (Cayman), seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL. E o limite de detecção sendo de 13 pg/mL.

4.9. Modulação da infecção dos macrófagos por leucotrieno B₄.

Para avaliação do efeito dos leucotrieno exógeno, os macrófagos foram tratados com LTB₄. A solução estoque de LTB₄ foi diluída em PBS e adicionada às culturas dos macrófagos (10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M), durante a infecção com os parasitos (4 h). Em alguns experimentos com incubação por até 48 h, após a infecção por 4 h e a lavagem, o LTB₄ foi repostado. Ainda, para observar o efeito do LTB₄ somente na atividade leishmanicida dos macrófagos, o LTB₄ foi adicionado somente após a fagocitose (4 h) ou após 24 h de infecção. Após 4 ou 48 h de incubação, as lamínulas foram retiradas, sendo as células fixadas, coradas e avaliadas quanto à infecção, como descrito acima (Item 4.5).

4.10. Avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio na atividade microbicida dos macrófagos

Para avaliar se a atividade microbicida dos macrófagos é mediada por ROIs e RNIs produzidos durante a infecção, os macrófagos foram tratados com Apocinina (inibidor da NADPH oxidase, Sigma) ou Aminoguanidina (inibidor de NOS induzida, Sigma). O composto Apocinina foi dissolvido em DMSO (500 mM) e a aminoguanidina foi dissolvida em PBS (500 mM), ambos no momento do uso. Para os experimentos, os compostos foram diluídos em meio RPMI contendo 15 % de SFB e adicionados às culturas dos macrófagos, em diferentes concentrações, 30 minutos antes da incubação com as leishmânias e do tratamento com LTB₄ (10⁻⁷ M). A maior concentração usada dos compostos foi de 10⁻³ M. Foram comparados os resultados de culturas tratadas com os de culturas incubadas com os veículos dos compostos. Nos experimentos de 48 h, após a lavagem (4 h), os compostos foram repostos, e, então, as placas foram re-incubadas. Após 4 h ou 48 h de incubação, as lamínulas foram retiradas, sendo as células fixadas, coradas e avaliadas quanto à infecção, como descrito acima (Item 4.5).

4.11. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos incubados com *L. (V.) braziliensis*

A técnica do NBT (azul de nitro tetrazólio, *nitro blue tetrazolium*), foi adaptada a partir da técnica descrita por Muniz-junqueira & Paula-Coelho (2008), com o objetivo de avaliar se o mecanismo microbicida dos macrófagos envolve a produção de ânion superóxido (O₂⁻), capaz de reduzir o composto NBT para uma forma insolúvel, com o nome de formazan, que é identificada por meio de microscopia de luz por uma coloração azul ou precipitados azulados escuros no citoplasma da célula. Inicialmente, os macrófagos foram incubados 30 min antes da infecção, na ausência ou presença de apocinina, MK0591 ou CP-105,696. Em seguida, os macrófagos foram incubados com os parasitos (10:1) e tratados com LTB₄. Após 1 h, os macrófagos foram tratados com uma solução Hanks-Tris contendo 0,05% de NBT (Sigma) por 20 min, 36°C, 5% de CO₂. As lâminas foram então lavadas, fixadas com metanol e coradas com uma solução de safranina 1,4% de glicerol e 28,6% em água destilada, gentilmente fornecida pela Dra. Maria Imaculada Muniz-Junqueira, UNB. A porcentagem de macrófagos que reduziu o NBT foi avaliada por microscopia de luz. Em uma tentativa de quantificar a

redução do NBT as células contendo precipitados grandes fortemente corados foram enumerados dentre as células positivas (citoplasma azul ou sem precipitados). Os resultados foram expressos em % de células positivas e % de células fortemente positivas.

4.12. Análises estatísticas

Os dados são apresentados como mediana, valores mínimos e máximos e interquartis (25% e 75%) ou como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados pelo teste de Mann Whitney ou pelo teste pareado de Wilcoxon, para as variáveis não paramétricas e ANOVA Two-way/Bonferroni, para as paramétricas. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. As análises foram realizadas usando *GraphPad Prism 5.0 Software* (San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do crescimento *in vitro* do isolado *L. (V.) braziliensis* IMG3 e infecção de macrófagos humanos

Para avaliar o perfil de crescimento *in vitro*, em meio Grace a 26°C, foram realizadas culturas com inóculo inicial de 5×10^5 parasitos/mL, sendo estes parasitos obtidos de culturas de dois a três dias. Baseado nas curvas de crescimento, os parasitos foram considerados em fase logarítmica de crescimento até o quarto dia de cultura, passando após este período para a fase estacionária (Fig. 3). De acordo com estes experimentos, foi definida a utilização dos parasitos em fase estacionária inicial do crescimento (6º dia de cultivo) para os experimentos de infecção dos macrófagos.

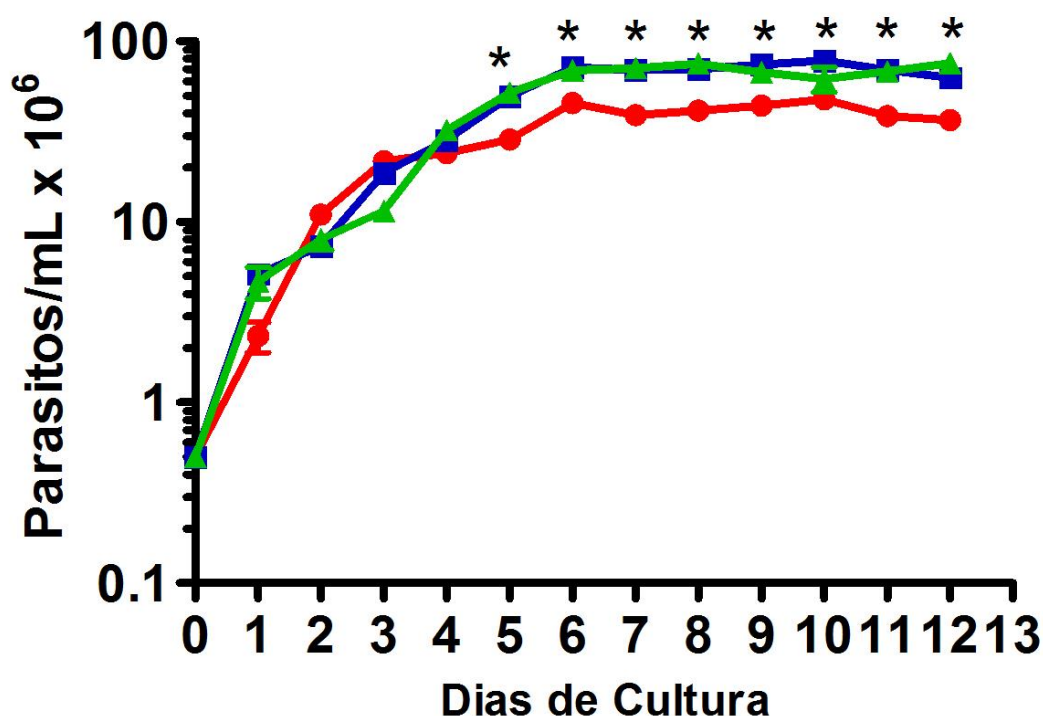


Figura 3. Curva de crescimento *in vitro* do isolado *L. (V.) braziliensis* IMG3. Os parasitos foram cultivados na concentração inicial de 5×10^5 formas promastigotas de fase logarítmica/mL em meio Grace, à temperatura de 26°C. A quantificação dos parasitos foi realizada diariamente, durante 12 dias de cultura, usando hematocítômetro. Cada curva representa um experimento em triplicata, sendo apresentado em cada ponto a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ (dias vs 1º ou 2º dia de cultivo).

Os macrófagos foram incubados com os parasitos por 4 h, sendo, em seguida, lavados para retirar o excesso de parasitos extracelulares e incubados por adicionais 24, 48 e 72 h. Após cada período de incubação, foram determinados a porcentagem de células infectadas, o número médio de parasitos por célula infectada e o índice de infecção. O isolado IMG3 infectou os macrófagos humanos, sendo observada, após cada período de incubação, uma alta variabilidade individual, especialmente na porcentagem de células infectadas (Fig. 4A) e no índice de infecção (Fig. 4C). A variação do número de parasitos por macrófago variou de 1 a 7,3 durante os vários períodos de incubação (Fig. 4B). Analisando os perfis individuais, foram selecionados os períodos de 4 h e 48 h de incubação para avaliar a fagocitose e a atividade microbicida, respectivamente. Embora não tenha sido detectada diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de macrófagos infectados entre 4 h e 48 h (40% vs 41%, $n = 19$, Fig. 4D), o número médio de parasitos por macrófago, assim como o índice de infecção aumentaram significativamente de 4 h para 48 h (Número de parasitos por macrófago 2,7 vs 4,2, $p < 0,05$, $n = 19$, Fig. 4E; índice de infecção 110 vs 166,5, $p < 0,05$, $n = 19$, Fig. 4F).

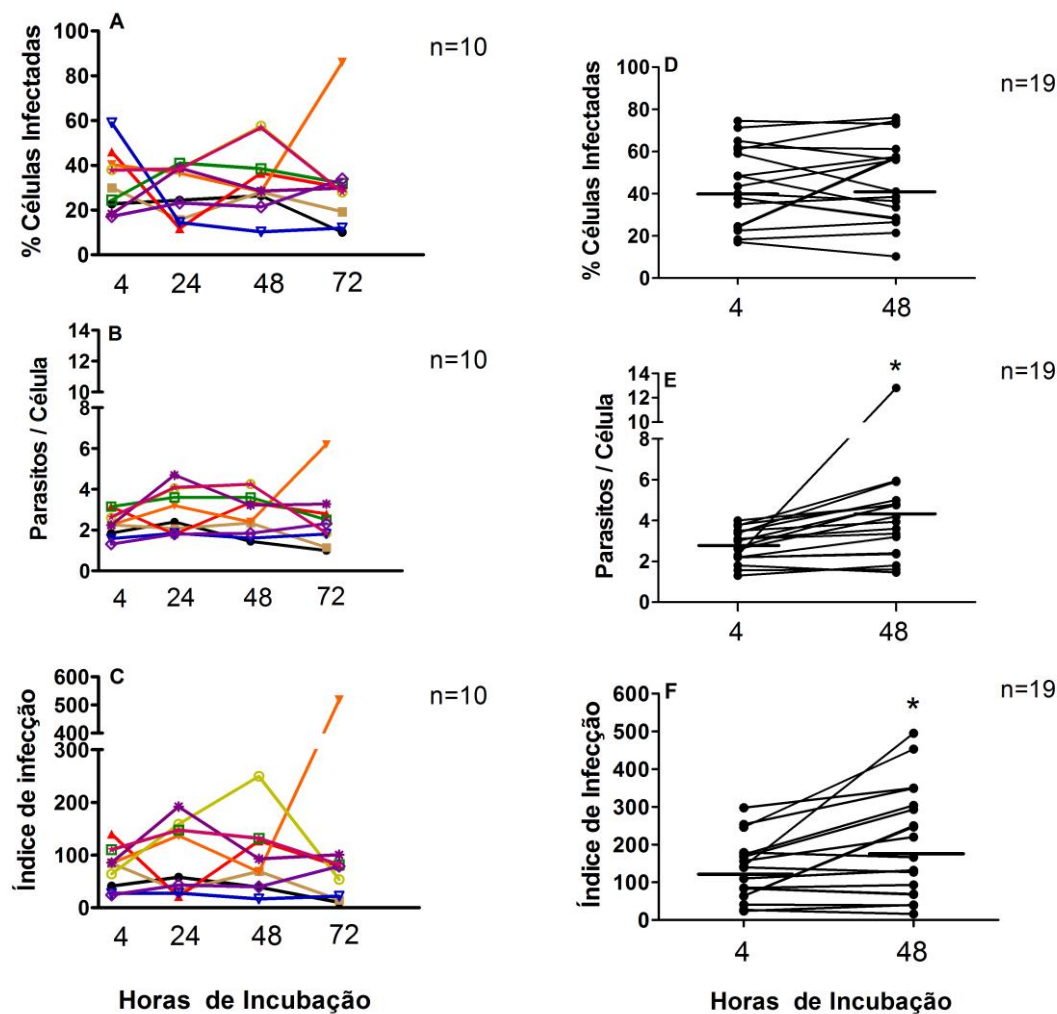


Figura 4. Infecção de macrófagos *in vitro* com o isolado *L. (V.) braziliensis* IMG3. Macrófagos humanos foram derivados de monócitos durante cinco dias (2×10^5 células mononucleares), sendo em seguida cultivados por 4 h com os parasitos IMG3 (2×10^6 parasitos; 6º dia de cultivo). Os poços foram lavados e os macrófagos foram incubados por 24, 48 ou 72 h, a 36°C (5% CO₂). Em **A e D**, a porcentagem de macrófagos infectados; Em **B e E**, o número de parasitos por célula; Em **C e F**, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo avaliado, em testes realizados em duplicatas (n = 4 experimentos independentes); as linhas horizontais (**D, E, F**) são as medianas. *p < 0,05 (4 h vs 48 h).

5.2 Avaliação da citotoxicidade dos compostos

A viabilidade do isolado IMG3 (Fig. 5A), cultivado com CP-105,696 10^{-6} M, MK0591 10^{-6} M ou LTB₄ 10^{-7} M, as maiores concentrações usadas nos experimentos, não sofreu alteração significativa em relação à dos parasitos cultivados na ausência desses tratamentos (% parasitos viáveis: Meio vs MK0591 = 100 % vs 88%; Meio vs CP-105, 696 10^{-6} M = 100% vs 103,6%; Meio vs LTB₄ = 100 % vs 98,5%; n = 5). Na avaliação da atividade metabólica de CMN (Fig. 5B), na presença de CP-105,696 10^{-6} M, MK0591 10^{-6} M ou LTB₄ 10^{-7} M, os resultados mostraram que não houve alteração significativa da atividade metabólica das células (% células viáveis: Meio vs MK0591 = 100 % x 99,9%; Meio vs CP-105, 696 10^{-6} M = 100% vs 100%, Meio vs LTB₄ = 100 % vs 98%; n = 4).

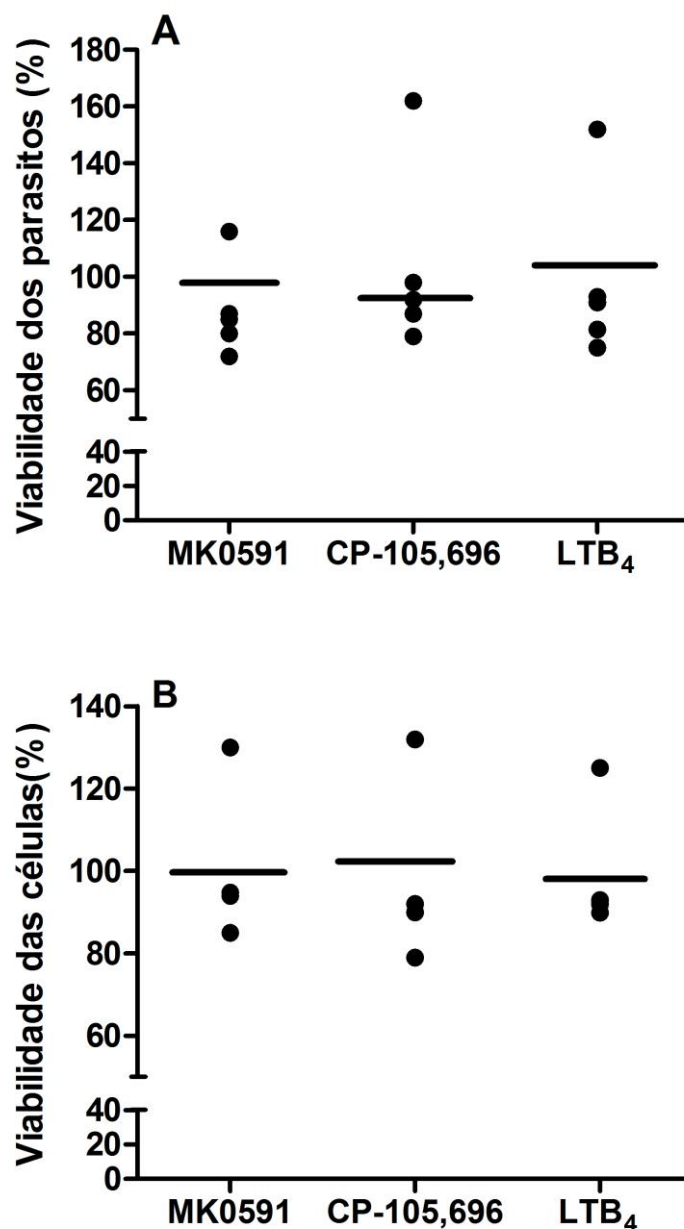


Figura 5. Os tratamentos com MK0591, CP-105,696 ou LTB₄ não são citotóxicos para os parasitos ou células mononucleares humanas. Formas promastigotas, na fase logarítmica do crescimento, foram incubadas na concentração de 1×10^7 parasitos/0,1mL de meio Grace completo (A). Células mononucleares humanas foram incubadas na concentração de 5×10^5 /0,1mL de meio RPMI completo (B). As suspensões de parasitos e células foram cultivadas na ausência ou na presença de MK0591 10^{-6} M, CP-105,696 10^{-6} M ou LTB₄ 10^{-7} M. As culturas foram mantidas a 36°C em atmosfera úmida, contendo 5% CO₂. Após 24 h de incubação, a solução de MTT foi adicionada às culturas (4 h), seguida da solução SDS 10% - DMF 50% (~20 h). Após incubação, foram adquiridas as densidades ópticas (550nm) e foi determinada a viabilidade celular. Os dados representam em A, quatro experimentos realizados em triplicatas; em B, dois experimentos com quatro doadores, realizados em triplicatas. São apresentados os valores individuais e as medianas.

5.3 Modulação da infecção dos macrófagos por leucotrienos endógenos

Os compostos para inibição de síntese de leucotrienos (MK0591) e para bloqueio do receptor BLT1 para LTB₄ (CP-105,696) foram dissolvidos em DMSO. Inicialmente, portanto, a fim de avaliar se este veículo dos compostos seria citotóxico, interferindo com o índice de infecção, as culturas de macrófagos com parasitos foram realizadas na ausência (Meio) ou na presença de 0,1% de DMSO (veículo), que é a maior concentração de DMSO usada nas culturas, por 4 h ou 48 h (Fig. 6). As análises das porcentagens de macrófagos infectados (Fig. 6A e 6D), dos números de parasitos por macrófago (Fig. 6B e 6E) e dos índices de infecção (Fig. 6C e 6F) mostraram que o DMSO, na concentração avaliada, independente do tempo de incubação, não altera a infecção dos macrófagos de maneira estatisticamente significativa.

Para avaliar se a inibição de FLAP, com MK0591, alteraria a infecção de macrófagos humanos pelo isolado IMG3, inicialmente foi analisado o efeito na atividade leishmanicida (48 h). Para isso, foram realizados experimentos de concentração-resposta (Fig. 7), em que as culturas de macrófagos foram tratadas com MK0591 em diferentes concentrações, por 30 minutos antes da infecção com os parasitos. Os parasitos foram adicionados (~ 10:1) e as culturas incubadas por 4 h, lavadas e incubadas por até 48 h. Os resultados foram comparados com os de culturas apenas tratadas com o veículo (DMSO). Como pode ser visto na Figura 7, o tratamento com MK0591 aumentou ($p < 0,05$) a porcentagem de células infectadas (Fig. 7A), o número de parasitos por macrófago (Fig. 7B), bem como o índice de infecção (Fig. 7C), de maneira dependente da concentração. A concentração mais eficaz foi 10^{-6} M de MK0591 (Índice de infecção - DMSO vs MK0591: 362 vs 581,3, $p < 0,05$; Fig 7C), sendo, então, esta concentração usada nos experimentos subsequentes.

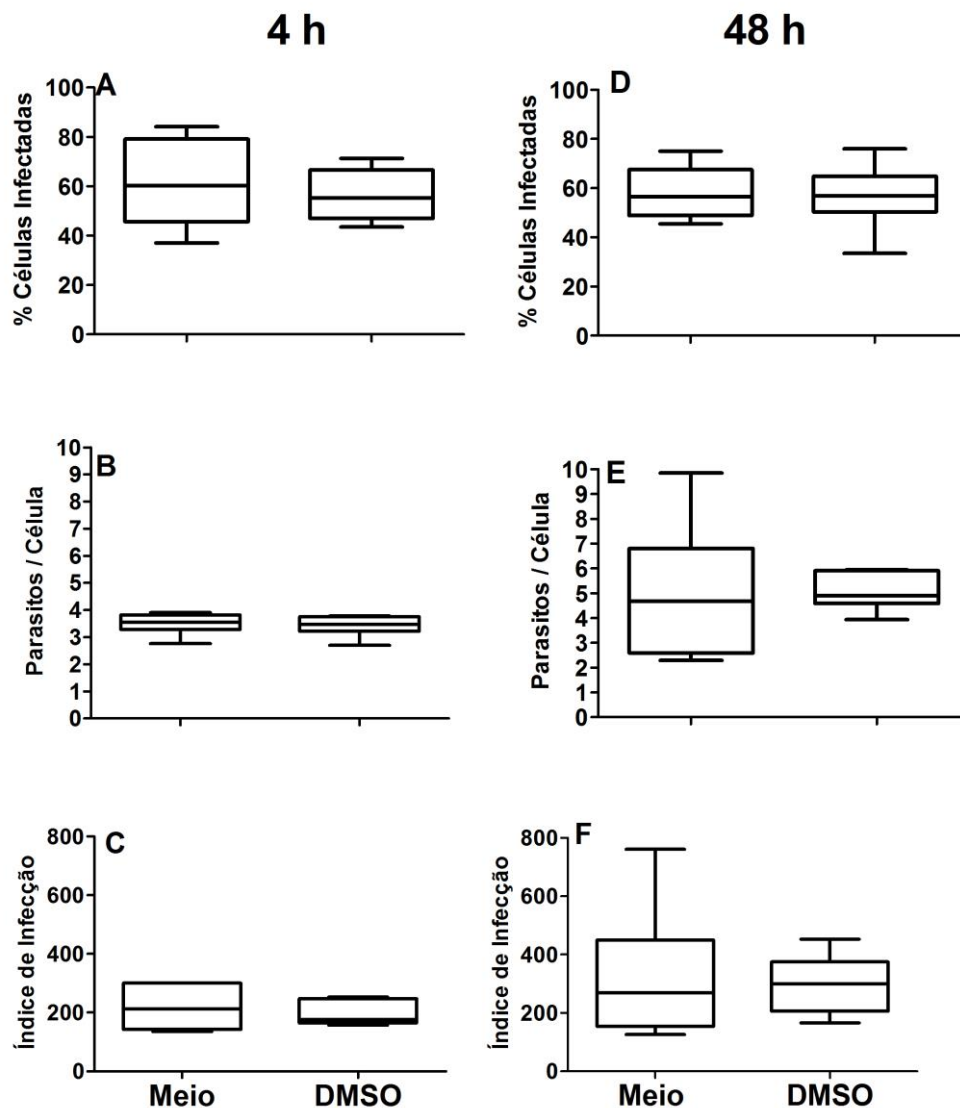


Figura 6. O veículo DMSO não altera a infecção de macrófagos com *L. (V.) braziliensis* IMG3. Os macrófagos foram cultivados com os parasitos na ausência (Meio) ou na presença de DMSO (0,1%), a 36°C, por 4 h (**A; B; C**), foram lavados e cultivados até 48 h (**D; E; F**). Em **A e D**: a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B e E**, o número de parasitos por célula infectada. Em **C e F**, o índice de infecção. São apresentadas as medianas, os interquartis e os valores mínimos e máximos de experimentos realizados em duplicatas (n = 6, em 4 h e 48 h).

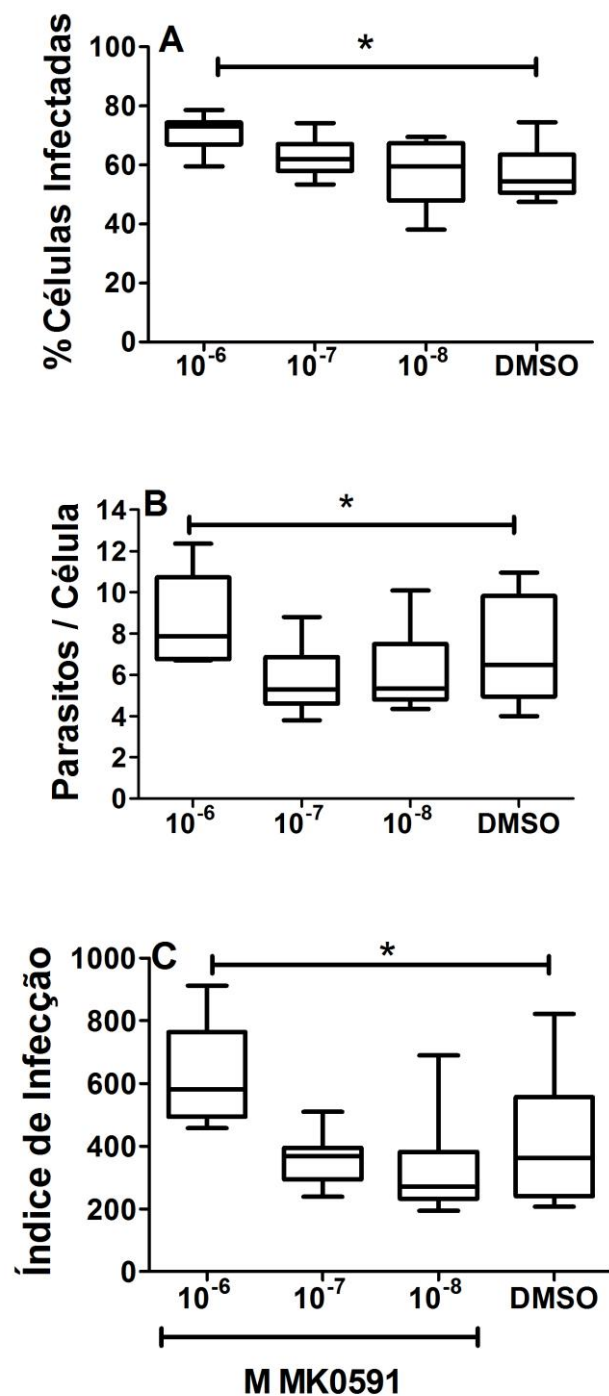


Figura 7. Inibição de FLAP por MK0591 aumenta a infecção de macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis* IMG3. Os macrófagos foram tratados 30 minutos antes da infecção com diferentes concentrações de MK0591 ou cultivados na presença de DMSO (0,1%). As culturas de parasitos e macrófagos (~10:1), após 4 h de incubação, foram lavadas, o meio foi repostado e as culturas foram incubadas por mais 48 h. Em **A**: a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B**, o número de parasitos por célula infectada. Em **C**, o índice de infecção. São apresentados as medianas, os interquartis e os valores mínimos e máximos (n = 8 doadores avaliados em experimentos realizados em duplicatas). Foram realizados 3 experimentos independentes. *p < 0,05 (10^{-6} M vs DMSO).

Em seguida, para avaliar se a inibição de FLAP com MK0591 alteraria também a fagocitose de *L. (V.) braziliensis* por macrófagos humanos, as culturas de macrófagos foram tratadas, 30 minutos antes da infecção com os parasitos, com MK0591 (10^{-6} M) ou cultivados na presença de DMSO (0,1%). As culturas de parasitos e macrófagos (~10:1) foram incubadas por 4 h. Não houve diferença significativa na porcentagem de células infectadas (Fig. 8A), porém o número de parasitos por célula (Fig. 8B) e o índice de infecção (DMSO vs MK0591: 176,6 vs 223,5, $p < 0,05$; Fig 8C) foram aumentados significativamente com o tratamento com o composto MK0591. Portanto, a inibição da FLAP modula a fagocitose (Fig. 8) e a atividade leishmanicida dos macrófagos (Fig. 7).

Para avaliar se a manutenção do composto MK0591 durante as 48 h de cultivo dos macrófagos infectados intensificaria o efeito na inibição da FLAP e, conseqüentemente, na infecção, após lavagem das culturas, para retirada do excesso dos parasitos, o MK05091 foi repostado. As análises das culturas de macrófagos e parasitos com reposição do MK0591, em relação às porcentagens de células infectadas (Fig. 9A), ao número de parasitos por célula (Fig. 9B) e também ao índice de infecção (Fig. 9C), mostraram que a reposição do composto MK0591, durante as 48 h de incubação, intensifica o aumento da infecção dos macrófagos de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

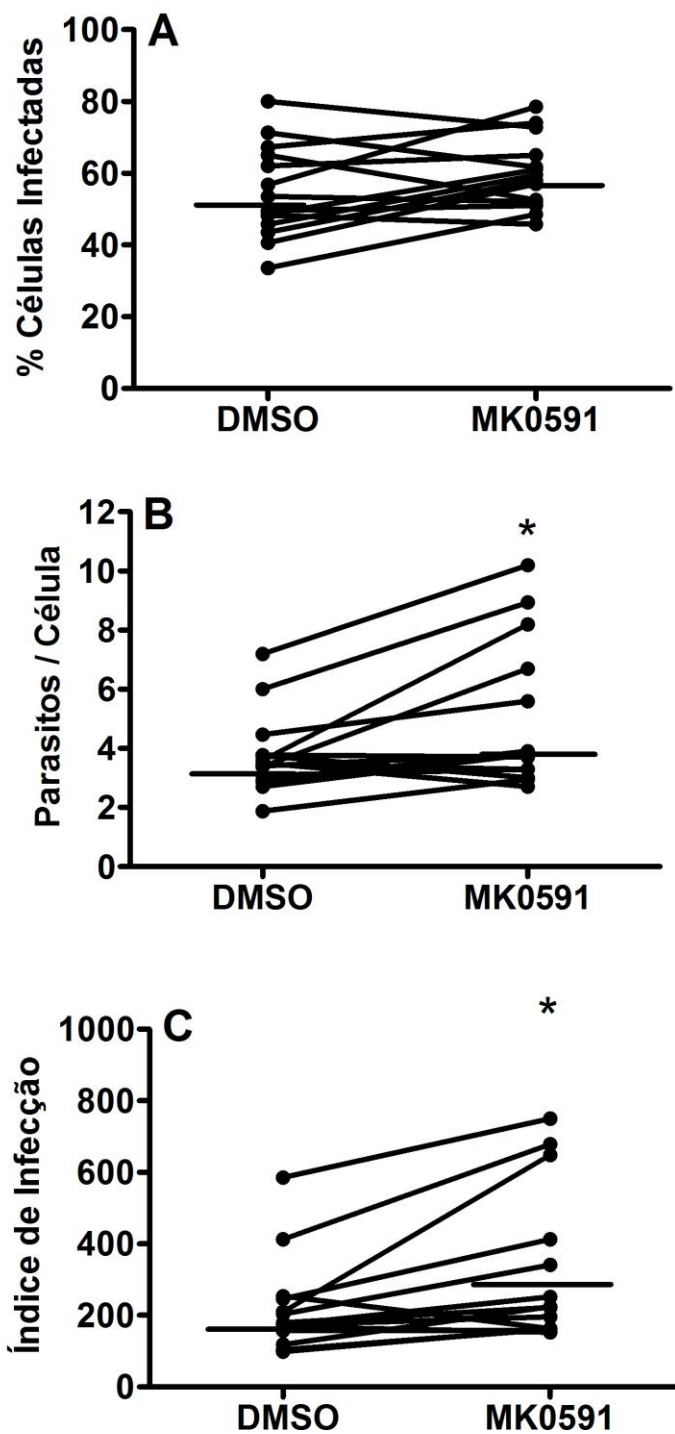


Figura 8. Inibição de leucotrienos endógenos aumenta a fagocitose de *L. (V.) braziliensis* IMG3 por macrófagos humanos Os macrófagos foram tratados, 30 minutos antes da infecção, com MK0591 (10^{-6} M) ou cultivados na presença de DMSO (0,1%). As culturas de parasitos e macrófagos (~10:1) foram incubadas por 4 h. Em **A**, a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B**, o número de parasitos por macrófago. Em **C**, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata (n = 14), sendo realizados 4 experimentos independentes. As linhas horizontais são as medianas. *p < 0,05.

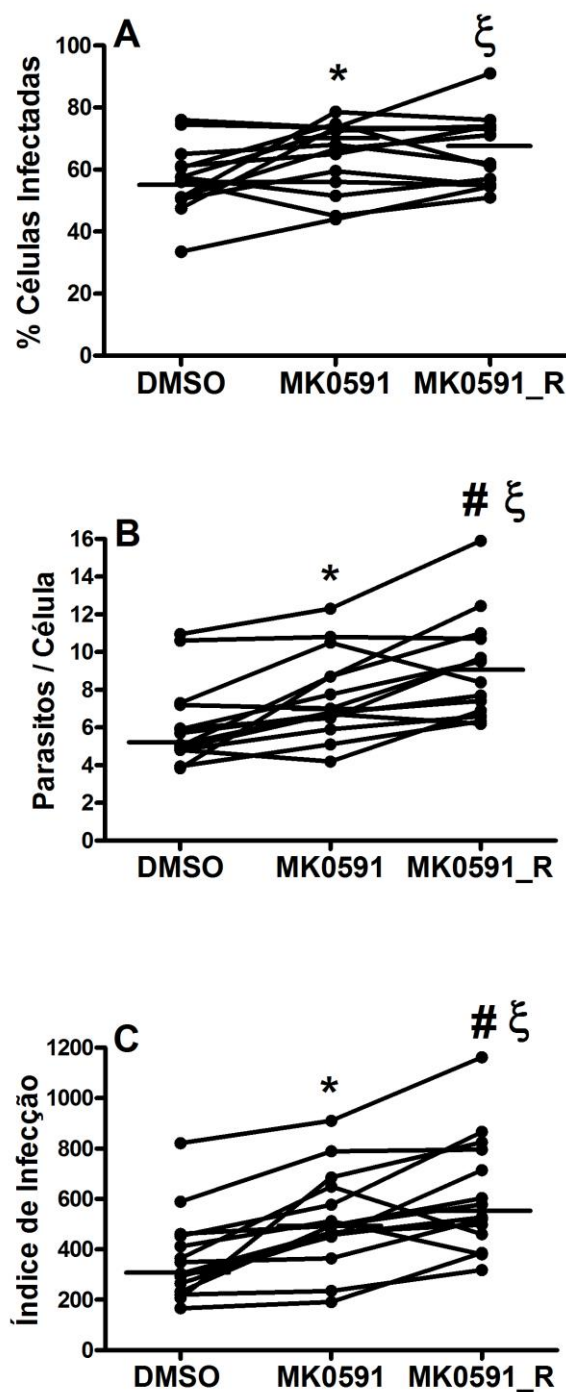


Figura 9. Manutenção de MK0591 nas culturas durante 48 h intensifica o aumento da infecção de macrófagos por *L. (V.) braziliensis* IMG3. Os macrófagos foram tratados 30 minutos antes da infecção com MK0591 (10^{-6} M) ou cultivados na presença de DMSO (0,1%). As culturas de parasitos e macrófagos (~10:1), após 4 h de incubação, foram lavadas e algumas foram tratadas novamente (MK0591_R), sendo, em seguida, incubadas por até 48 h. Em **A**, a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B**, o número de parasitos por macrófago. Em **C**, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo analisado em duplicata (n = 14), sendo realizados 4 experimentos independentes. As linhas horizontais são as medianas *p < 0,05 (DMSO vs MK0591); # p < 0,05 (MK0591 vs MK0591_R); ξ p < 0,05 (DMSO vs MK0591_R).

Para avaliar se o LTB₄ seria o leucotrieno responsável pela modulação da infecção dos macrófagos por *L.(V.) braziliensis*, as culturas foram tratadas com um antagonista do receptor para LTB₄, o BLT1. Inicialmente, foi analisado o efeito do composto CP-105,696 na atividade leishmanicida (48 h), para isso, foram realizados experimentos de concentração-resposta (Fig. 10), nas quais, as culturas de macrófagos foram tratadas com CP-105,696 em diferentes concentrações, por 30 minutos antes da infecção com os parasitos. Os parasitos foram adicionados (~10:1) e as culturas incubadas por 4 h, lavadas e incubadas até 48 h. Os resultados foram comparados com os de culturas tratadas com o veículo (DMSO). O bloqueio do receptor BLT1 aumentou significativamente ($p < 0,05$) a infecção dos macrófagos (Fig. 10A, 10B, 10C), de maneira dependente da concentração. A concentração eficaz foi 10⁻⁶ M (Índice de infecção - DMSO vs: CP-105,696 220 vs 428, $p < 0,05$; Fig 10C), sendo esta concentração usada nos experimento subsequentes.

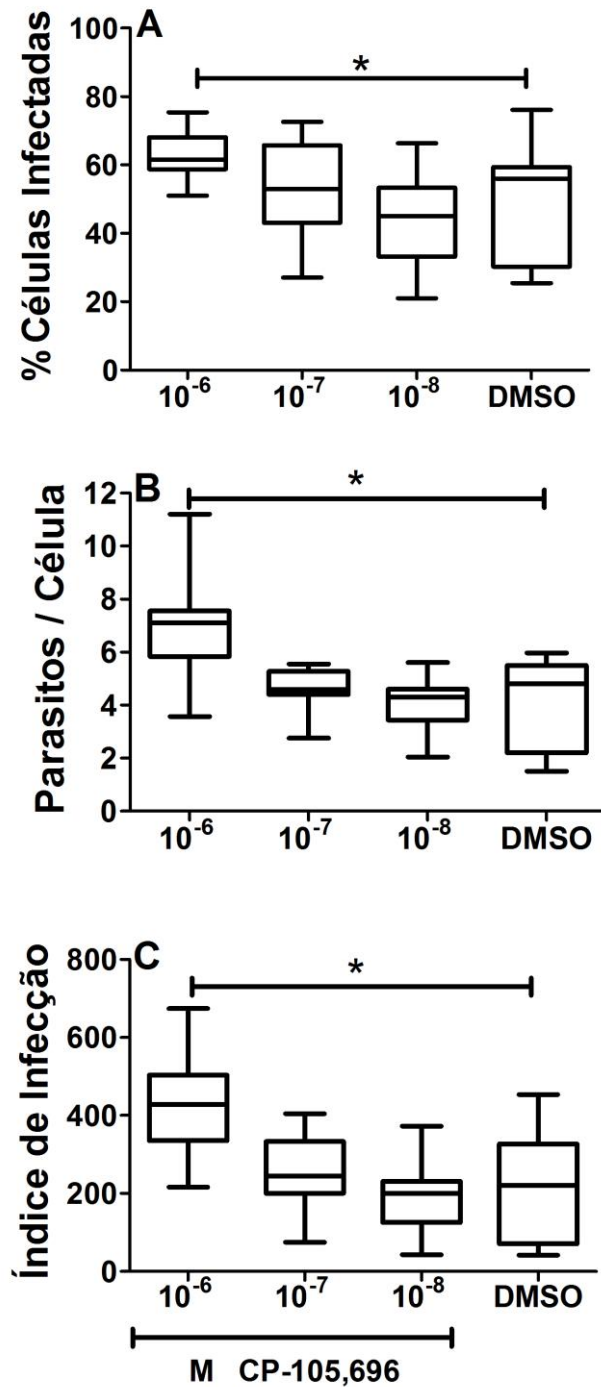


Figura 10. O tratamento com antagonista de receptor de BLT1 aumenta a infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis* IMG3. Os macrófagos foram tratados, 30 minutos antes da infecção, com CP-105,696 em diferentes concentrações ou cultivados na presença de DMSO (0,1%). As culturas de parasitos e macrófagos (~10:1), após 4 h de incubação, foram lavadas, o meio foi repostado e as culturas foram incubadas por até 48 h. Em **A**: a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B**, o número de parasitos por célula infectada. Em **C**, o índice de infecção. São apresentadas as medianas, os interquartis e os valores mínimos e máximos; ensaios realizados em duplicatas (n = 9 doadores). Foram realizados 3 experimentos independentes. *p < 0,05 (10^{-6} M vs DMSO).

Em seguida, para avaliar se o bloqueio do receptor alteraria a fagocitose de *L. (V.) braziliensis* IMG3 por macrófagos humanos, as culturas de macrófagos foram tratadas, 30 minutos antes da infecção com os parasitos, com CP-105,696 (10^{-6} M) ou incubadas na presença de DMSO (0,1%). As culturas de parasitos e macrófagos foram incubadas por 4 h. Como mostrado na Figura 11 foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de células infectadas (Fig. 11 A), no número de parasitos por célula (Fig. 11 B) e no índice de infecção (DMSO vs CP-105,696 – 110 vs 130, $p < 0,05$, Fig. 11 C), após o bloqueio do receptor de LTB₄.

Para verificar se o tratamento com o composto CP-105,696 alteraria os resultados da infecção se fosse mantido durante as 48 h de incubação, os macrófagos foram tratados 30 minutos antes da infecção com CP-105,696 (10^{-6} M) ou cultivados na presença de DMSO (0,1%) e, após 4 h de incubação com os parasito e lavagem, o CP-105,696 foi repostado e as culturas foram incubadas por até 48 h. Como pode ser observado na Figura 12, a reposição de CP-105,696 não alterou significativamente o efeito deste composto em relação às culturas tratadas por 4 h, mas sem reposição (Fig. 12A, 12B, 12C).

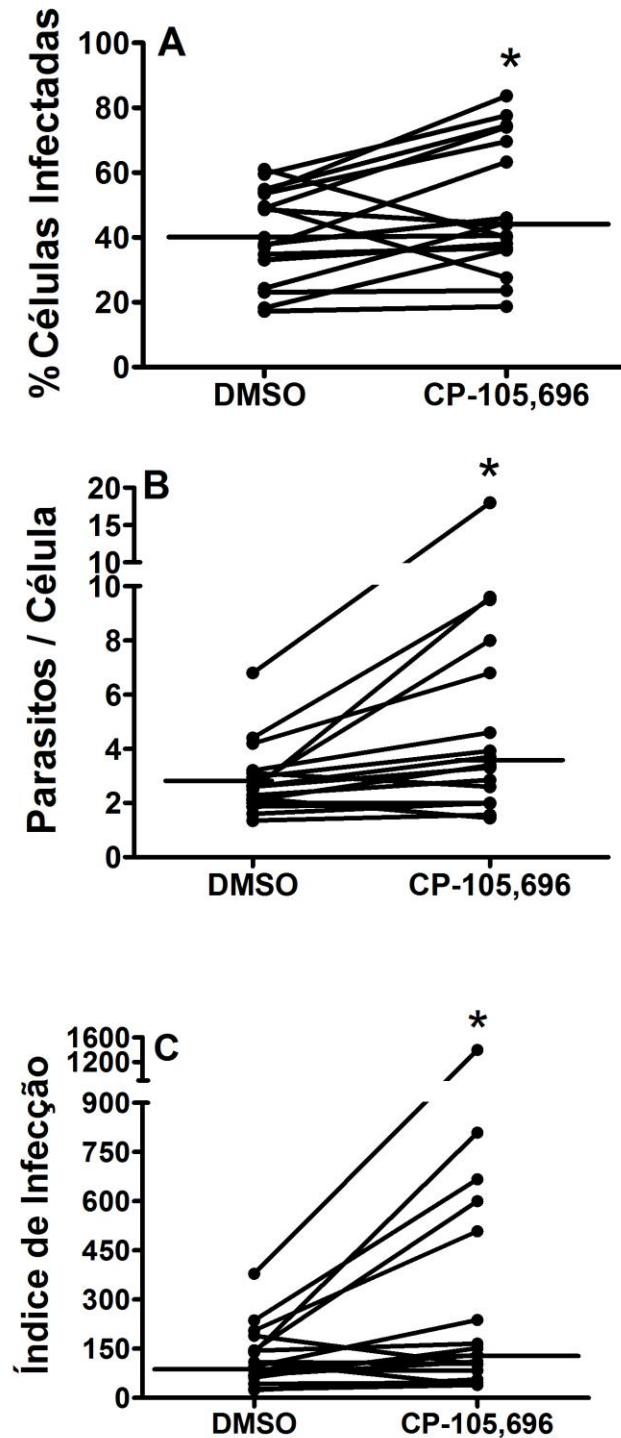


Figura 11. Antagonismo do receptor de leucotrieno B₄ aumenta a infecção de macrófagos com *L. (V.) braziliensis* IMG3 em 4 h. Os macrófagos foram tratados 30 minutos antes da infecção com CP-105, 696 (10^{-6} M) ou cultivados na presença de DMSO (0,1%). As culturas de parasitos e macrófagos (~10:1) foram incubadas por 4 h. Em **A**, a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B**, o número de parasitos por macrófago. Em **C**, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata (n = 17), sendo realizados 8 experimentos independentes. As linhas horizontais representam as medianas. *p < 0,05.

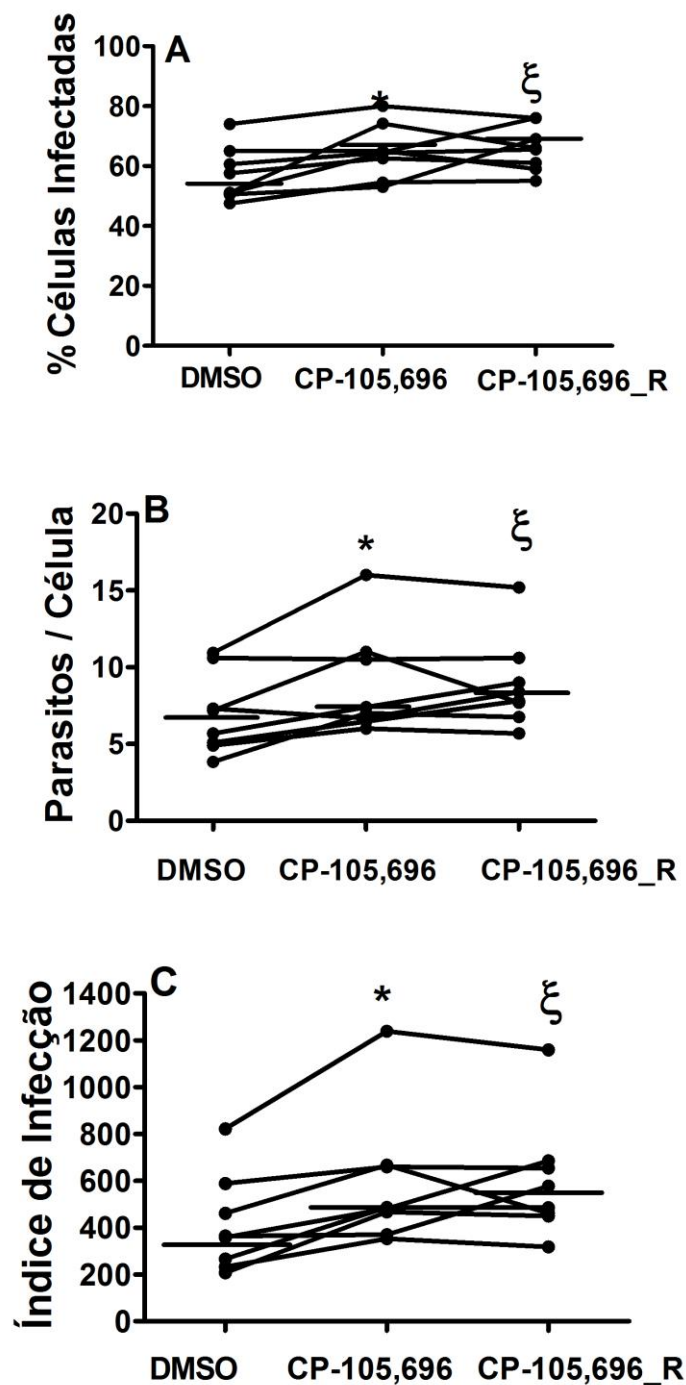


Figura 12. Avaliação dos efeitos do antagonismo do leucotrieno B₄ na infecção de macrófagos com *L. (V.) braziliensis* IMG3, por 48 h. Os macrófagos foram tratados ou não com CP-105, 696 (10⁻⁶ M) 30 minutos antes da adição dos parasitos (~10:1). Após incubação por 4 h, as culturas foram lavadas e incubadas por até 48 h, na ausência (CP-105, 696) ou na presença de reposição do CP-105, 696 (CP-105, 696_R). Em **A**, a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B**, o número de parasitos por macrófago. Em **C**, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata (n = 8); foram realizados 2 experimentos independentes. As linhas horizontais são medianas *p < 0,05 (DMSO vs CP-105, 696); §p < 0,05 (DMSO vs CP-105, 696_R).

5.4 Leishmania (Viannia) braziliensis estimulam a produção de LTB₄ em macrófagos humanos

Para avaliar se *L.(V.) braziliensis* induziria a produção de LTB₄ em culturas de macrófagos humanos, e simultaneamente checar a eficiência do MK0591 em inibir a síntese de LTB₄, os macrófagos foram incubados na ausência ou presença de MK0591 (30 min antes da infecção) e, em seguida, os parasitos foram adicionados.

Os parasitos induziram significativa produção de LTB₄ após 30 min de incubação (Meio vs Leishmania: 7,8 pg/mL vs 541 pg/mL, $p < 0,05$, Fig. 13A), a qual diminuiu significante após 4h. Além disso, a inibição da síntese de LTB₄ pelo composto MK0591 foi significativa, como observado na Figura 13B (Leishmania vs MK0591+Leishmania: 541 pg/mL vs 218 pg/mL, $p < 0,05$).

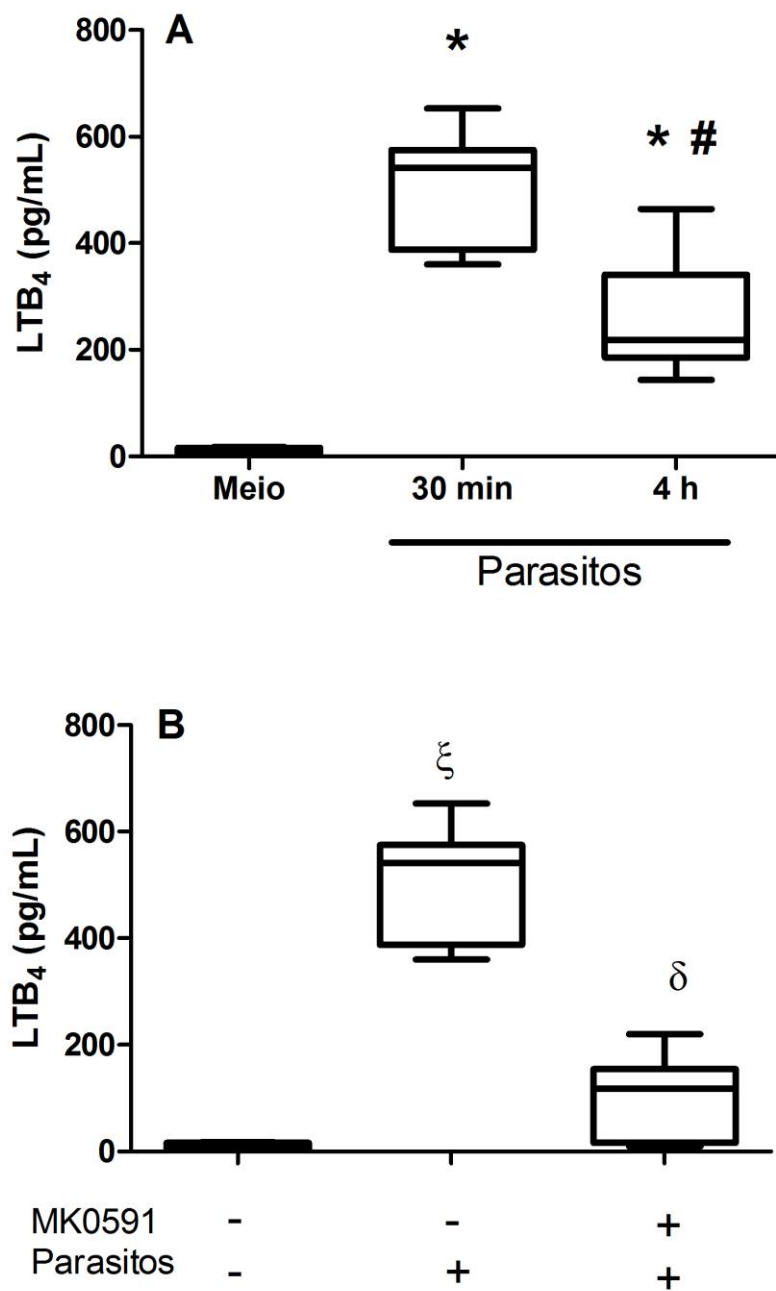


Figura 13. *L.(V.) braziliensis* induz a produção de LTB₄ em macrófagos humanos. Os macrófagos foram incubados na ausência ou na presença de MK0591(10^{-6} M) 30 minutos antes da infecção com os parasitos (~10:1), a 36 °C, por 30 minutos e 4 h. O sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C e depois foi realizado o ensaio imunoenzimático para dosagem de LTB₄. Em A: curso temporal da produção de LTB₄. Em B, inibição da síntese de LTB₄, dosagem de LTB₄, sobrenadantes de 30 de incubação com os parasitos. São apresentados as medianas, os interquartis e os valores mínimos e máximos (n = 6). *p < 0,05 (Meio vs Parasitos 30 min, Parasitos 4h); # p < 0,05 (Parasitos 30 min vs Parasitos 4h); ξ p < 0,05 (meio vs Parasitos); δ p < 0,05 (Meio vs Parasitos+ MK0591).

5.5 Modulação da infecção dos macrófagos por leucotrieno B₄ exógeno

Para avaliar se a adição de LTB₄ exógeno modularia a infecção de macrófagos humanos pelo isolado IMG3, inicialmente foi analisado o efeito na atividade leishmanicida (48 h). Para isso, foram realizados experimentos de concentração-resposta (Fig.14), em que as culturas de macrófagos foram tratadas com LTB₄ em diferentes concentrações, durante a infecção com os parasitos. Os parasitos foram adicionados (~ 10:1) e as culturas foram incubadas por 4 h, lavadas e incubadas por até 48 h. Os resultados foram comparados com os de culturas não tratadas (Meio). Como pode ser visto na Figura 14, o tratamento com LTB₄ diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a porcentagem de células infectadas (Fig. 14A), o número de parasitos por macrófago (Fig. 14B), bem como o índice de infecção (Fig. 14C), de maneira dependente da concentração, sendo que todas as concentrações de LTB₄ foram efetivas (10^{-7} M, 10^{-8} M e 10^{-9} M). A concentração mais eficaz foi a de 10^{-7} M (Meio vs LTB₄: 473 vs 195, $p < 0,05$, Fig. 14C), sendo esta concentração usada nos experimentos subsequentes.

Em seguida, para avaliar se a adição de LTB₄ exógeno alteraria também a fagocitose de *L. (V.) braziliensis* por macrófagos humanos, as culturas de macrófagos foram tratadas (LTB₄ 10^{-7} M) durante a infecção com os parasitos. As culturas de parasitos e macrófagos (~10:1) foram incubadas por 4 h. Como pode ser visto na Figura 15, o tratamento com LTB₄ diminuiu significativamente o índice de infecção (Meio vs LTB₄: 202 vs 168, $p < 0,05$, Fig.15 C), o que foi devido à diminuição do número de parasitos por célula (Fig. 15A, 15B e 15C, $p < 0,05$).

Para avaliar se o efeito do LTB₄ na atividade microbicida dos macrófagos (48 h, Fig. 16) era devido à modulação da fagocitose, os macrófagos foram tratados com o LTB₄ (10^{-7} M) após 4 h de incubação com os parasitos e o índice de infecção foi avaliado após 48 h de incubação. O índice de infecção diminuiu significativamente com o tratamento com o LTB₄ (Meio vs LTB₄: 145 vs 73, $p < 0,05$, Fig.16 C), o que foi devido à diminuição do número de parasitos (Fig. 16A, 16B, 16C, $p < 0,05$). Também foram realizados experimentos para avaliar o efeito do LTB₄ adicionado 24 h após as 4 h de infecção, porém, neste caso não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação às culturas não tratadas (Índice de infecção Meio vs LTB₄: 145 vs 86, $n= 9$).

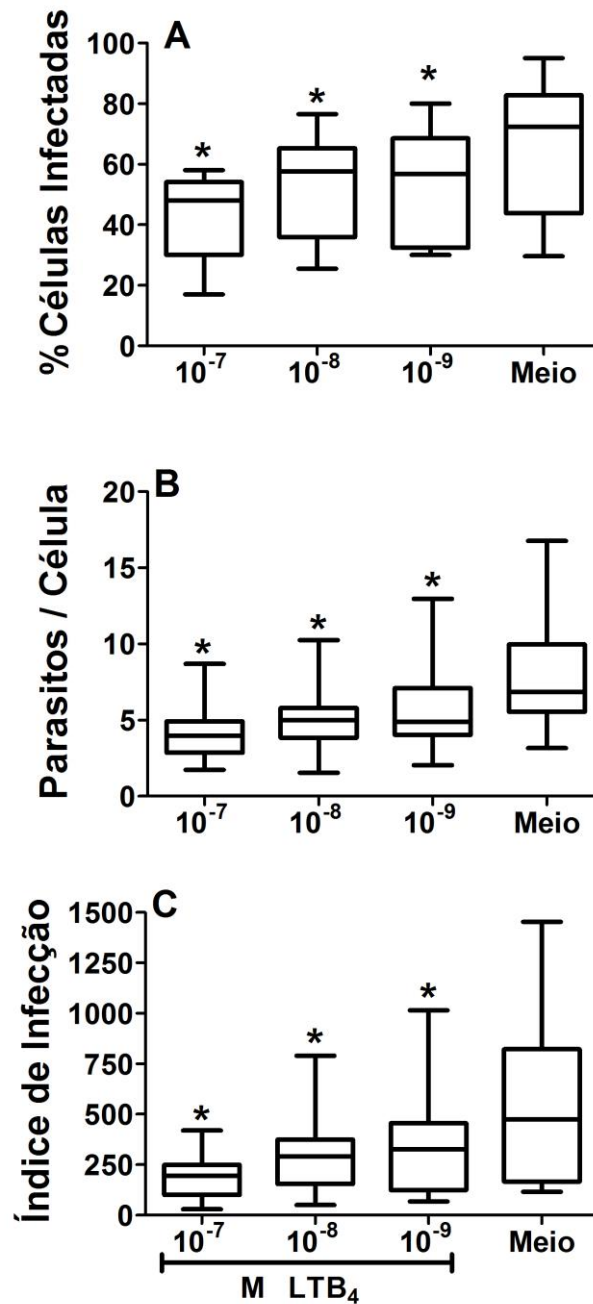


Figura 14. Tratamento com LTB₄ diminui a infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis* IMG3. Os macrófagos foram incubados com formas promastigotas de fase estacionária do crescimento (~10:1), a 36 °C, na ausência (Meio) ou na presença de diferentes concentrações de LTB₄, por 4 h. Após a incubação, as culturas foram lavadas, o meio foi repostado e as culturas foram incubadas por até 48 h. Em **A**: a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B**, o número de parasitos por célula infectada. Em **C**, o índice de infecção. São apresentados as medianas, os interquartis e os valores mínimos e máximos (n = 18), indivíduos avaliados em duplicata). Foram realizados 6 experimentos independentes. *p < 0,05 (Meio vs 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M) .

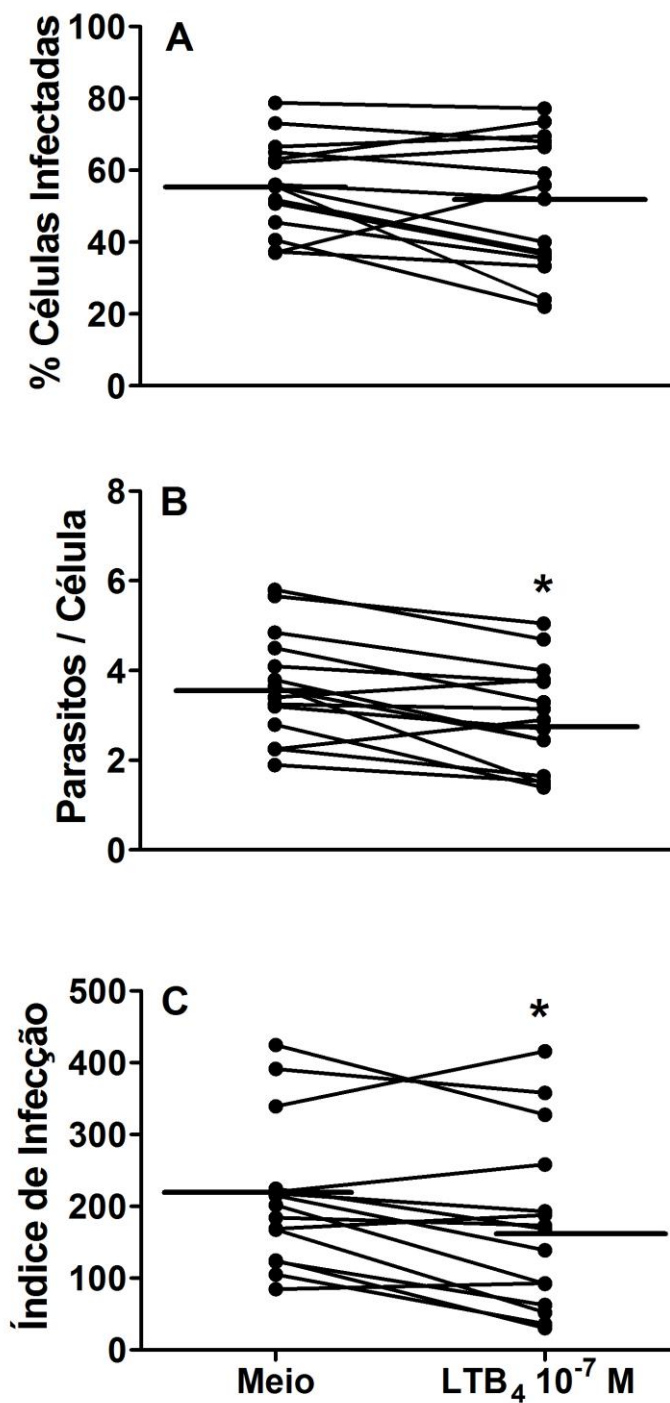


Figura 15. Tratamento com LTB₄ modula a fagocitose de *L. (V.) braziliensis* IMG3 por macrófagos humanos. Os macrófagos foram incubados com formas promastigotas da fase estacionária do crescimento (~ 10:1), a 36 °C, na ausência (Meio) ou na presença de LTB₄ (10⁻⁷ M), por 4 h . Em **A**: a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B**, o número de parasitos por célula infectada. Em **C**, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata (n = 9) e as linhas horizontais são as medianas, sendo realizados 3 experimentos independentes. *p < 0,05.

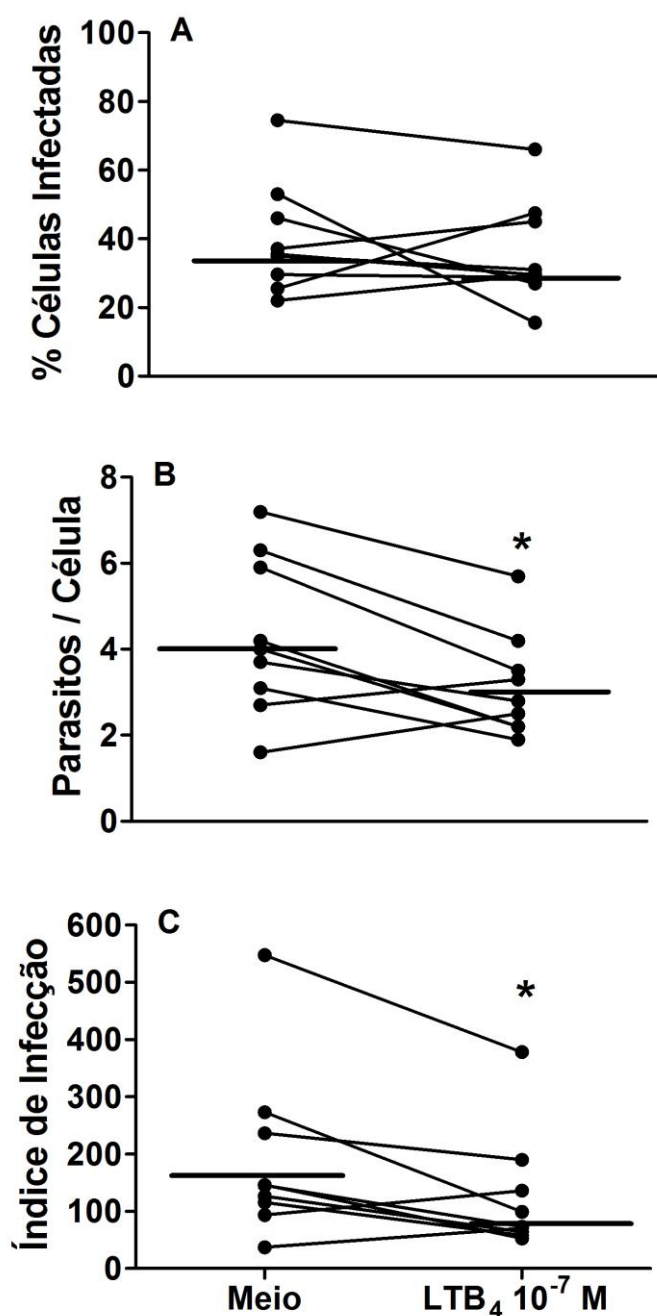


Figura 16. Tratamento com LTB₄ após a fagocitose (4 h) diminui a infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis* IMG3. Os macrófagos foram incubados com formas promastigotas da fase estacionária do crescimento (~10:1), por 4 h, a 36 °C. Em seguida, as culturas foram lavadas e o LTB₄ foi adicionado (10⁻⁷ M) ou não (Meio) às culturas. As culturas foram incubadas por 48 h. Em **A**: a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B**, o número de parasitos por célula infectada. Em **C**, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata (n = 9) e as linhas horizontais são as medianas, sendo realizados 3 experimentos independentes. *p < 0,05

Sabendo que o LTB₄ possui efeito endógeno e exógeno na atividade micobicida, em seguida para verificar se o bloqueio do receptor BLT1 foi efetivo, foram realizados experimentos de infecção de macrófagos, em que culturas de macrófagos que foram tratadas com CP-105,696 30 minutos antes da infecção com os parasitos foram posteriormente tratadas com LTB₄ (Fig. 17). Foi demonstrado que o BLT1 foi bloqueado, pois a adição de LTB₄ não reverteu o efeito do tratamento com CP-105,696, tanto após 4 h (Fig. 17A), quanto 48 h (Fig. 17B).

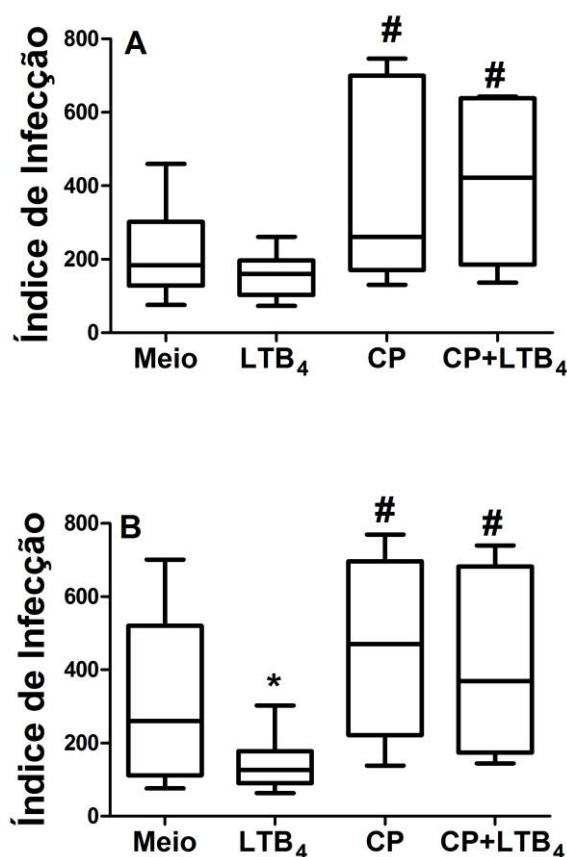


Figura 17. Adição de LTB₄ não reverte o efeito inibidor do antagonista de BLT1/ receptor de LTB₄. Os macrófagos foram incubados na ausência (Meio) ou na presença de CP-105,696 10⁻⁶ M (CP), 30 minutos antes da infecção. No momento da adição dos parasitos, foi adicionado também LTB₄ (10⁻⁷M) aos macrófagos tratados ou não com CP. As culturas de parasitos e macrófagos (~10:1), após 4 h de incubação, foram lavadas, o meio foi repostado e as culturas foram incubadas por até 48 h. Em **A**: 4 h, **B**: 48 h. São apresentados as medianas, os interquartis e os valores mínimos e máximos; ensaios realizados em duplicatas (n = 9 doadores). Foram realizados 3 experimentos independentes. *p < 0,05 (MEIO vs LTB₄); # p < 0,05 (MEIO vs CP; CP+LTB₄);

5.6 Avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio na atividade microbicida dos macrófagos

Para avaliar se os ROIs seriam os responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos, induzida pelo LTB₄, as culturas foram tratadas com um inibidor de NADPH oxidase, a Apocinina. Inicialmente, foi analisado o efeito da Apocinina na atividade leishmanicida após 48 h. Para isto, foram realizados experimentos concentração-resposta (Fig. 18), nas quais, as culturas de macrófagos foram tratadas com a apocinina em diferentes concentrações, por 30 minutos antes da infecção com os parasitos. Os parasitos foram adicionados (~10:1), assim como o LTB₄, e as culturas incubadas por 4 h. Após a lavagem, a apocinina e o LTB₄ foram repostos ao meio e as culturas foram incubadas até 48 h. Os resultados foram comparados com os de culturas sem tratamento. A inibição da produção de ROI reverteu o efeito do LTB₄ na infecção dos macrófagos ($p < 0,05$) nas concentrações de 10^{-4} M e 10^{-3} M (Fig. 18).

Visto que a leishmania induz a produção de ROI, para avaliar se a apocinina inibe essa produção induzida por *L. (V.) braziliensis*, em macrófagos humanos, as culturas de macrófagos foram tratadas com a apocinina (10^{-4} M), por 30 minutos antes da infecção com os parasitos. Os parasitos foram adicionados (~10:1), e as culturas incubadas por 4 h. Após a lavagem, a apocinina foi repostada ao meio e as culturas foram incubadas até 48 h. Como mostrado na Figura 19 o bloqueio da NAPH oxidase, promoveu um aumento da infecção, devido a um aumento no número de parasitos por célula (Fig. 19A, 19B e 19C), que estaria sendo controlado pelos ROIs produzidos pelos macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis*.

Em seguida, para avaliar se a síntese de ROI era responsável pela diminuição da fagocitose causada pelo LTB₄, as culturas de macrófagos foram tratadas, 30 minutos antes da infecção com os parasitos, com Apocinina 10^{-4} M. Os parasitos foram adicionados juntamente com LTB₄ e as culturas foram incubadas por 4 h. Como mostrado na Figura 20 a apocinina reverteu o efeito inibidor do LTB₄ ($p < 0,05$) na porcentagem de células infectadas (Fig. 20A), no número de parasitos por célula (Fig. 20B) e no índice de infecção (Fig. 20C).

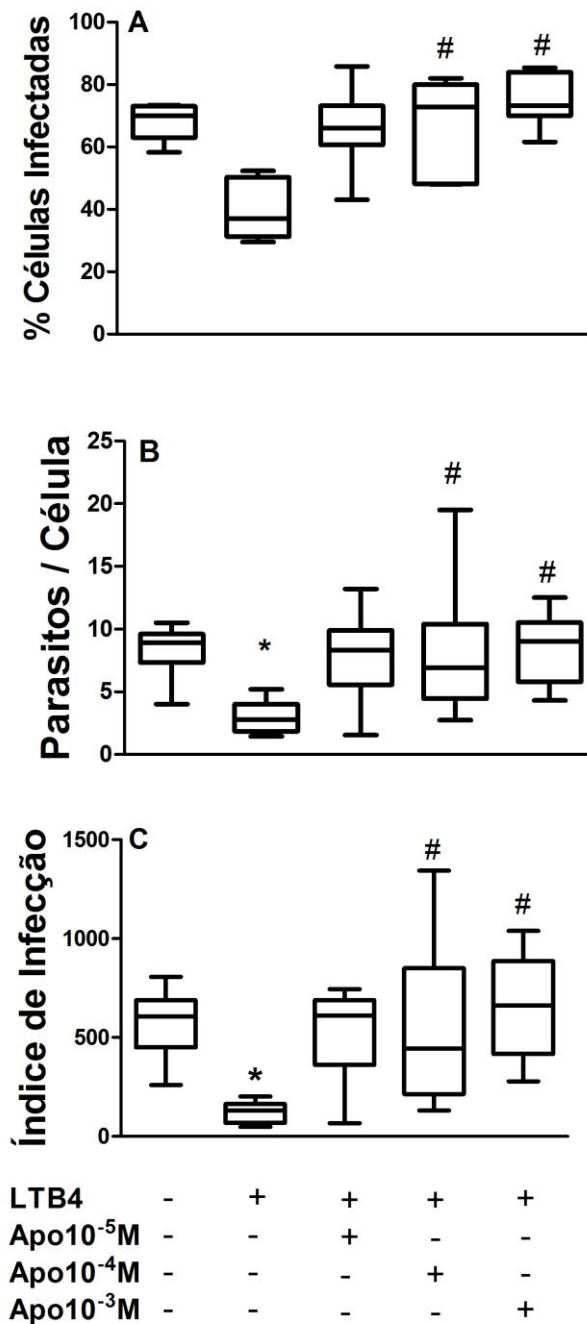


Figura 18. Avaliação da inibição da produção de ROI na indução de atividade microbicida por LTB₄ em macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis*. Os macrófagos foram tratados 30 minutos antes da infecção com Apocinina em diferentes concentrações (APO 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M e 10⁻³ M). Os parasitos foram adicionados juntamente com LTB₄ às culturas, após 4 h de incubação, foram lavadas e tratadas novamente (Apocinina e LTB₄), sendo, em seguida, incubadas por até 48 h. Em A, a porcentagem de macrófagos infectados. Em B, o número de parasitos por macrófago. Em C, o índice de infecção. São apresentados as medianas, os interquartis e os valores mínimos e máximos;. Foram realizados 3 experimentos independentes, em duplicatas (n = 7). *p < 0,05 (Meio vs LTB₄); #p < 0,05 (LTB₄ vs LTB₄ + Apo10⁻⁴ M, 10⁻³ M).

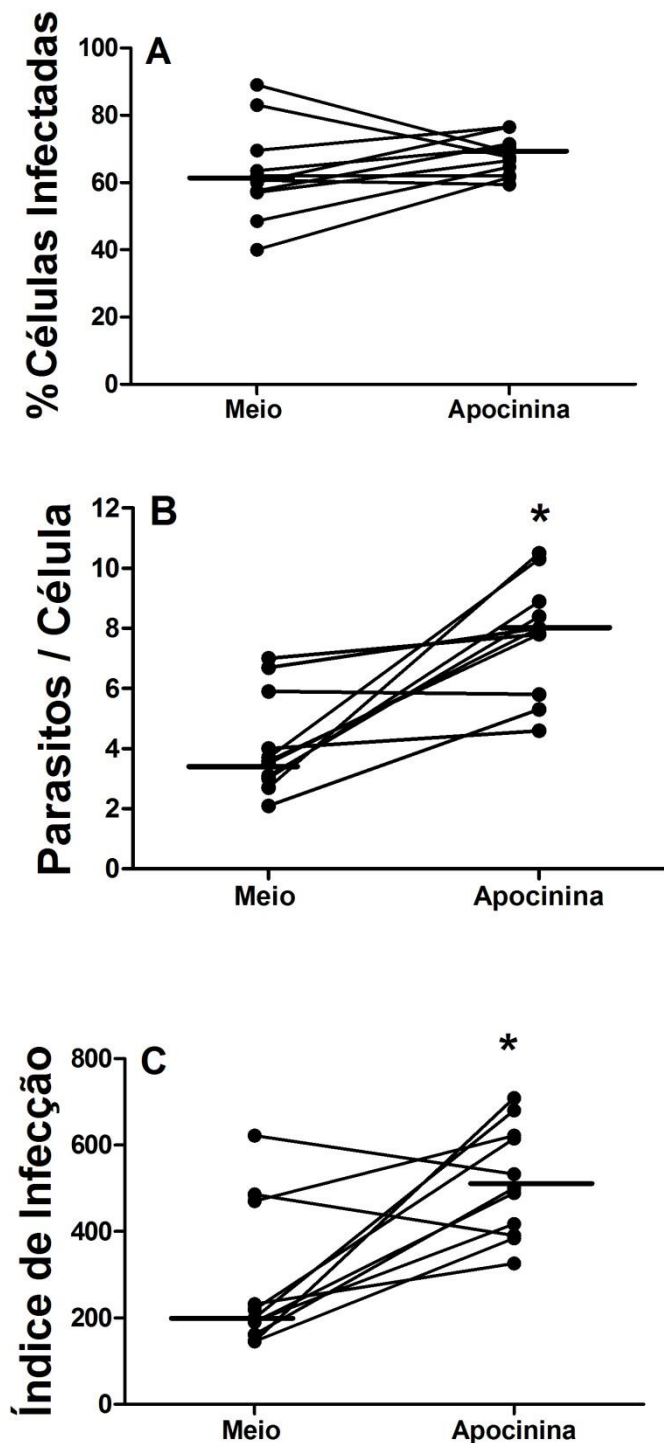


Figura 19. Avaliação da inibição da produção de ROI por macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis* Os macrófagos foram tratados 30 minutos antes da infecção com Apocinina (10^{-4} M). As culturas de parasitos e macrófagos (~10:1), após 4 h de incubação, foram lavadas, foram tratadas novamente (Apocinina), sendo, em seguida, incubadas por até 48 h. Em A, a porcentagem de macrófagos infectados. Em B, o número de parasitos por macrófago. Em C, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata e as linhas horizontais são as medianas (n = 11), sendo realizados 3 experimentos independentes. *p < 0,05.

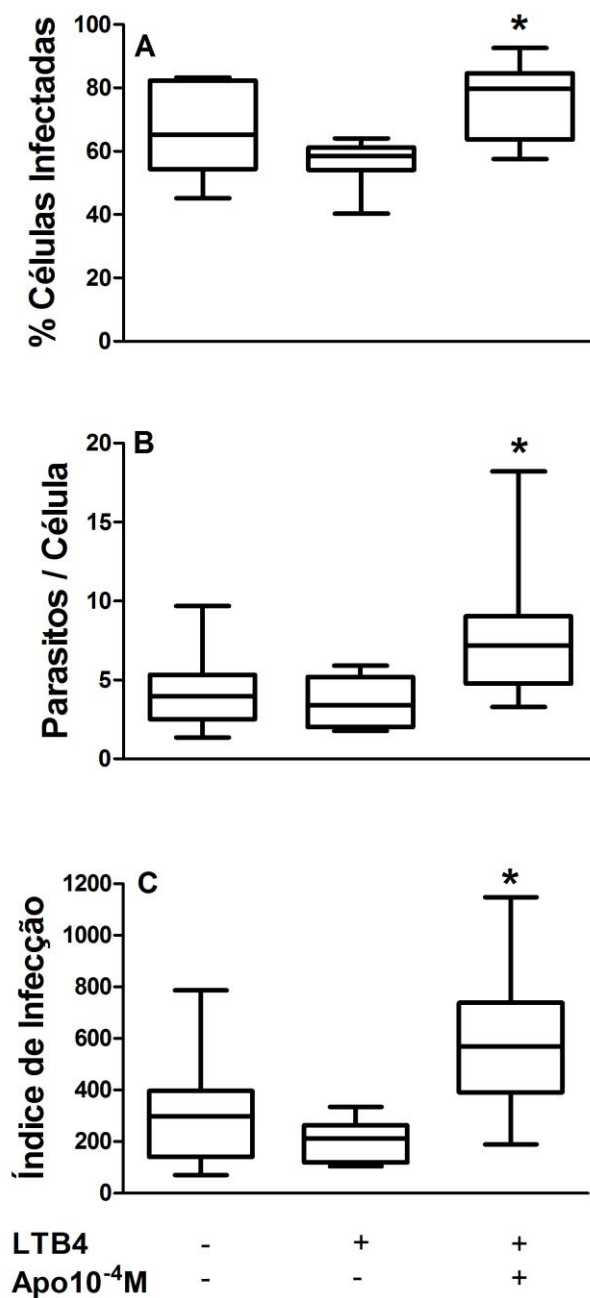


Figura 20. Avaliação da inibição da produção de ROI na atividade microbicida do LTB₄ em macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis* por 4 h. Os macrófagos foram tratados 30 minutos antes da infecção com Apocinina (10⁻⁴ M). Os parasitos forma adicionados na ausência ou presença de LTB₄ e as culturas foram mantidas por 4 h s. Em A, a porcentagem de macrófagos infectados. Em B, o número de parasitos por macrófago. Em C, o índice de infecção. São apresentados as medianas, os interquartis e os valores mínimos e máximos. Foram realizados 3 experimentos independentes, em duplicatas (n = 9) *p < 0,05 (LTB₄ vs LTB₄ + Apocinina).

Para avaliar se o NO seria uma das moléculas responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos, as culturas foram tratadas com um inibidor de iNOS, a aminoguanidina. Foi analisado o efeito da aminoguanidina na atividade leishmanicida após 48 h de cultivo. Para isto, foram realizados experimentos, nas quais, as culturas de macrófagos foram tratadas com a aminoguanidina por 30 minutos antes da infecção com os parasitos.. A inibição da produção de NO pelo composto aminoguanidina, apesar de não aumentar de forma significativa a porcentagem de células infectadas (Fig. 21A), aumentou significativamente o número de parasitos por macrófagos (Fig. 21B), e o índice de infecção (Meio vs Aminoguanidina: 200 vs 389, $p < 0,05$, Fig. 21C), na concentração de 10^{-3} M, quando comparado com as culturas não tratadas.

Na Figura 22 são apresentadas fotomicrografias dos macrófagos infectados, na ausência ou presença dos tratamentos, a fim de mostrar os efeitos da ausência ou da presença, dos leucotrienos endógenos e do LTB₄, bem como de ROI e NO no controle da infecção.

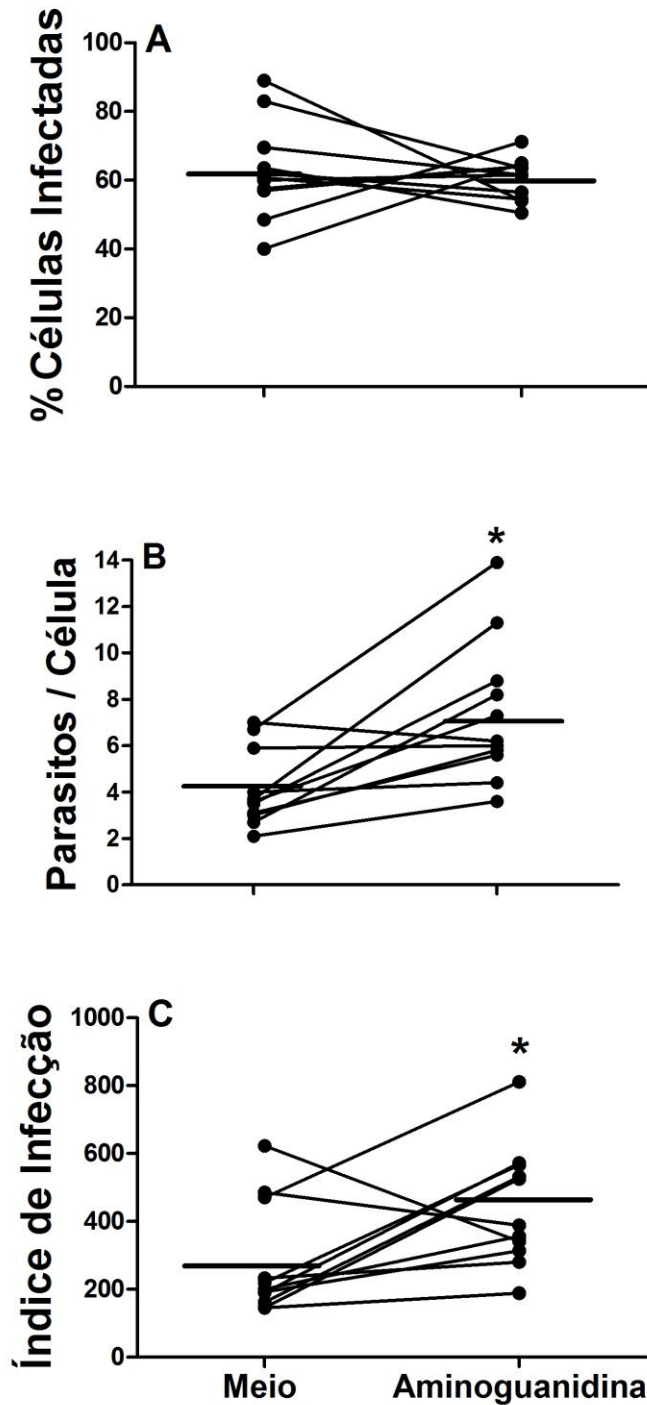


Figura 21. Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis*. Os macrófagos foram tratados 30 minutos antes da infecção com Aminoguanidina (10^{-3} M). As culturas de parasitos e macrófagos (~10:1), após 4 h de incubação, foram lavadas e tratadas novamente com aminoguanidina, sendo, em seguida, incubadas por até 48 h. Em A, a porcentagem de células infectadas. Em B, o número de parasitos por macrófago. Em C, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata e as linhas horizontais são as medianas (n = 11), sendo realizados 3 experimentos independentes. *p < 0,05;

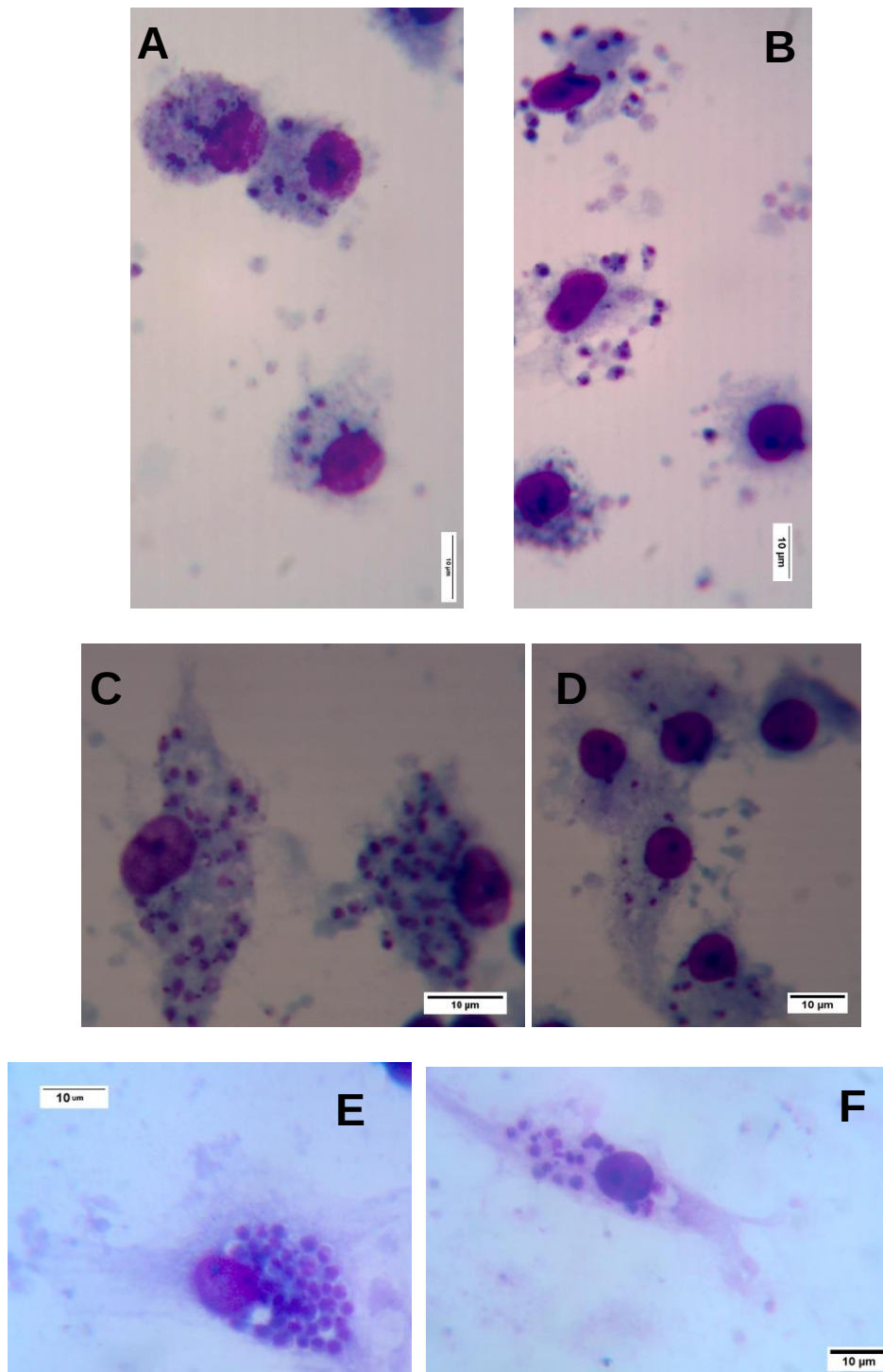


Figura 22. Fotomicrografias de macrófagos infectados com o isolado *L. (V.) braziliensis* IMG3, sob diferentes tratamentos. Macrófagos humanos foram derivados de monócitos durante cinco dias (2×10^5 células mononucleares), sendo em seguida cultivados por 4 h com parasitos IMG3 (2×10^6 parasitos; 6º dia de cultivo). Após a retirada do excesso de parasitos extracelulares, os macrófagos foram incubados por 48 h a 36°C (5% CO₂). Em A: macrófagos cultivados na ausência de tratamento, Meio; Em B: macrófagos tratados com MK0591, inibidor de síntese de leucotrienos; Em C: macrófagos foram tratados com CP-105,696, bloqueador de BLT1, receptor para LTB₄; Em D: macrófagos tratados durante a infecção com LTB₄; Em E: macrófagos tratados com apocinina; Em F: macrófagos tratados com aminoguanidina.

5.7 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos incubados com *L. (V.) braziliensis*

Para avaliar se os macrófagos humanos eram capazes de produzir ROI, foi avaliada a produção de ânion superóxido por meio da redução do NBT. Os macrófagos foram infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com LTB₄, apocinina ou os compostos MK0591 e CP-105,696. Os resultados mostraram que os macrófagos após a infecção produzem ânion superóxido (Meio vs Leishmânia: 0% vs 27%, n =7, Fig. 23A), assim como quando tratadas com LTB₄, em que há uma tendência no aumento da produção de ROI em relação a produção induzida por leishmânia (Leishmânia vs LTB₄: 27% vs 31%, n =5, Fig. 23B). Além disso, os macrófagos quando tratados com apocinina, diminuem a produção de ROI induzidas por leishmânia (Leishmânia vs apocinina: 27% vs 11%, n = 7, Fig. 23C), e induzidas por LTB₄ (LTB₄ vs LTB₄ + apocinina: 31% vs 10%, n = 7, Fig. 23D). A inibição de síntese de leucotrienos também diminui a produção de ROI induzida por leishmânia (Leishmânia vs MK0591: 27% vs 11%, n = 7, Fig. 23E), e o bloqueio de BLT1, que inibe a ação de LTB₄ endógeno, inibiu a produção de ROI, ou seja, as leishmanias induzem a produção de ROI na presença de LTB₄ (Leishmânia vs CP-105,696: 27% vs 13%, n = 7, Fig. 23F). Além disso, nestes experimentos a adição de LTB₄ as culturas reverteu o efeito inibidor do tratamento com CP, indicando que o BLT1 foi eficientemente bloqueado (LTB₄ vs LTB₄ + CP105-696: 31% vs 12,5%, n = 7).

Além disso, em uma tentativa de quantificar a produção de ânion superóxido, dentre as células positivas, foram contadas as células fortemente positivas. Os resultados preliminares mostram, na Figura 24A, uma tendência de aumento na produção de ROI quando adicionado o LTB₄ aos macrófagos infectados. A Figura 24B é uma fotomicrografia que ilustra células positivas (seta preta) e células fortemente positivas (seta branca).

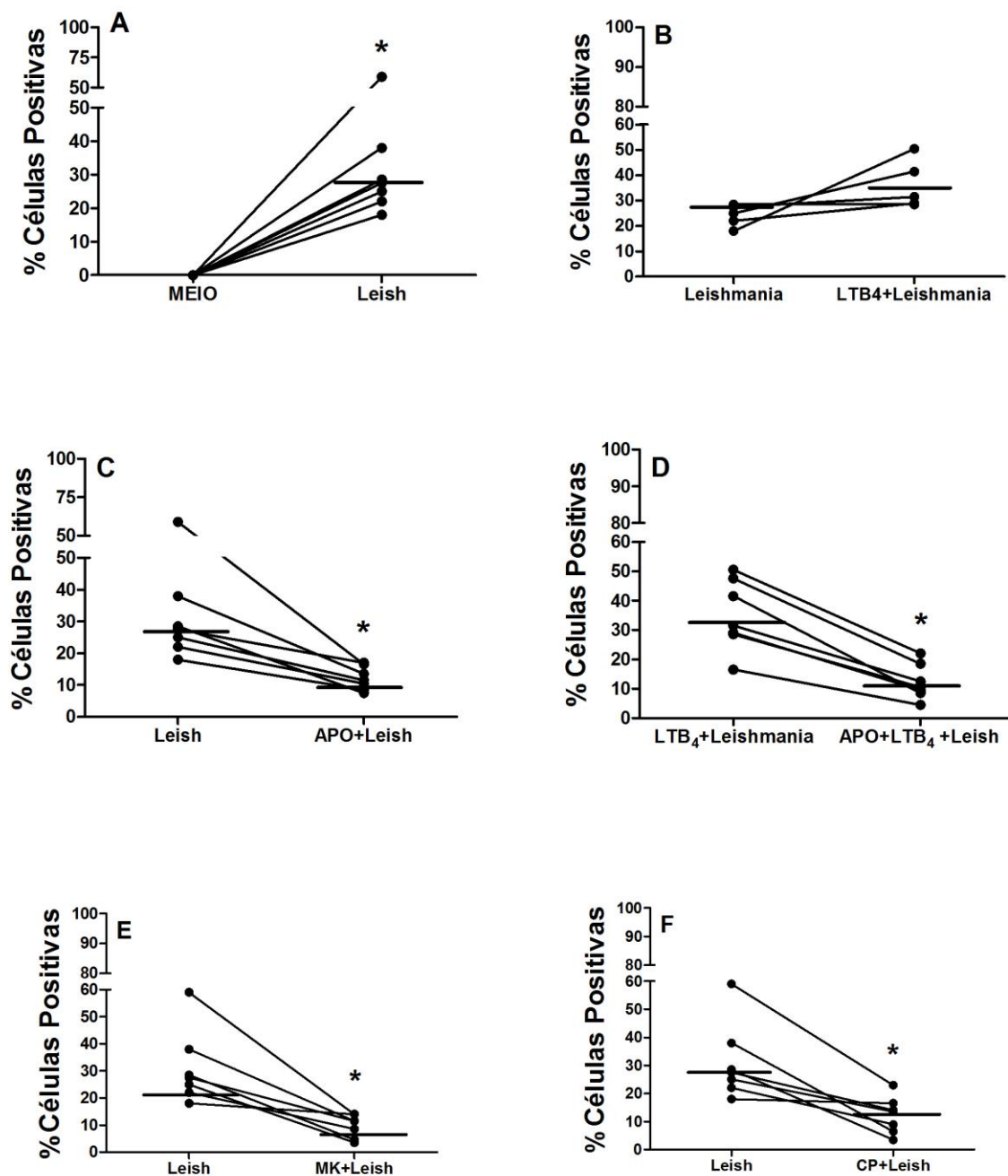


Figura 23. Produção de ânion superóxido pela redução de NBT. Macrófagos humanos foram pré-tratados com apocinina, MK0591, CP 105-696 e em seguida infectados e tratado com LTB₄, e incubados por 1h , depois foi adicionado uma solução de Hanks-Tris 0,05% de NBT e incubados por 20 minutos, a 36°C (5% CO₂), as células foram fixadas e coradas com safranina . De A-F são demonstradas as células porcentagem de positivas. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata e as linhas horizontais são as medianas (n = 7), sendo realizado 2 experimentos independentes. *p < 0,05;

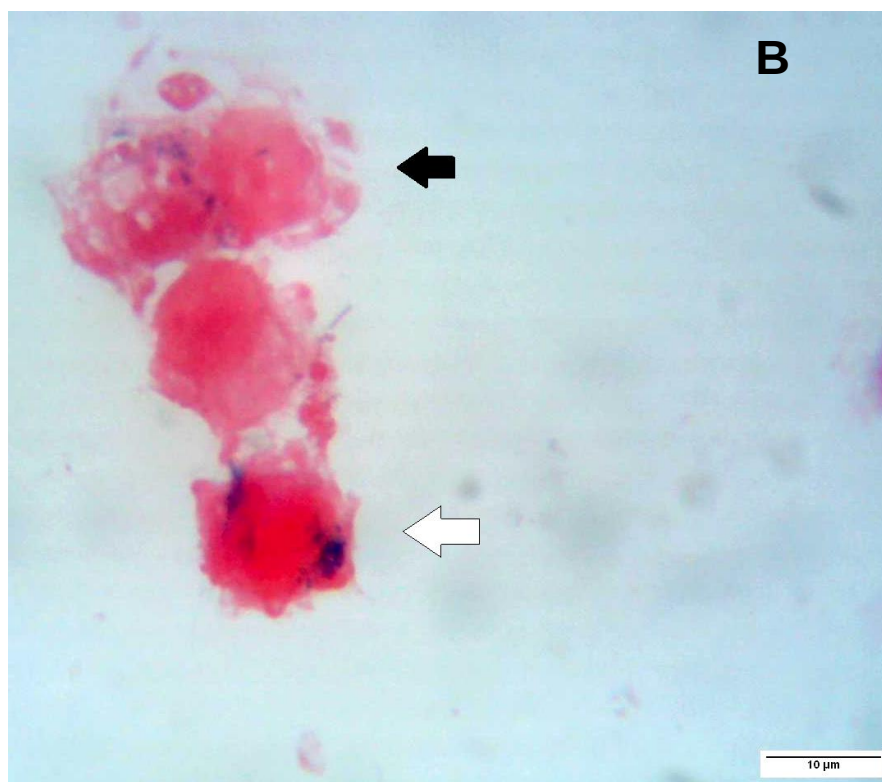
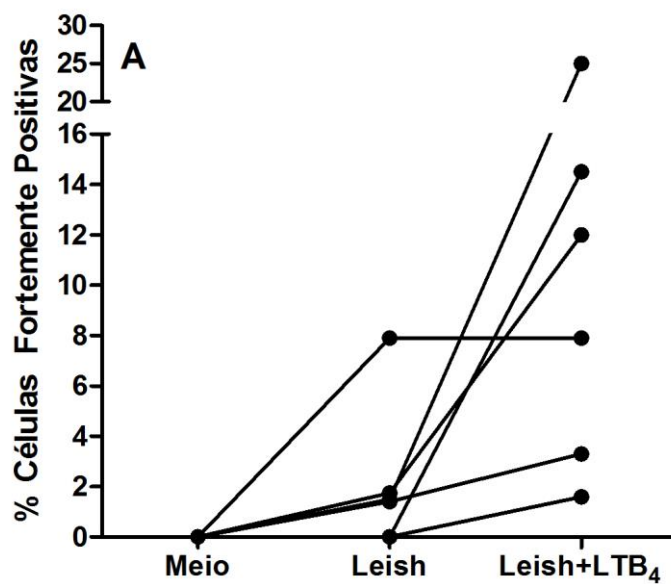


Figura 24. Quantificação da produção de ânion superóxido avaliada pela redução de NBT. Macrófagos humanos foram incubados com parasitos e tratados com LTB₄ (10^{-7} M), por 1h. Após, foi adicionada uma solução de Hanks-Tris 0,05% de NBT e as culturas foram incubadas por 20 min, a 36°C (5% CO₂). As células foram fixadas e coradas com safranina. Em A: são demonstradas as % de células fortemente positivas. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata (n = 6), sendo realizado um experimento; Em B: fotomicrografia que mostra célula positiva contendo pouco precipitado azul (seta preta) e célula fortemente positiva (seta branca), entre elas uma célula negativa (Aumento 1000x).

6. DISCUSSÃO

Para analisar a modulação da infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis* pelos leucotrienos o isolado IMG3 deste estudo foi obtido a partir de biópsia de um paciente diagnosticado com LTA na forma clínica LCL. Nos experimentos de cultivo *in vitro*, os parasitos foram considerados em fase logarítmica de crescimento até o quarto dia de cultura, passando após este período para a fase estacionária, de acordo com curvas de crescimento de outros isolados de *L. (V.) braziliensis* descritas anteriormente (Walton et al. 1977; Lemesre et al. 1988; Rey et al. 1990).

De acordo com os nossos experimentos, foi definida a utilização dos parasitos em fase estacionária inicial do crescimento (6º dia de cultivo) para os experimentos de infecção dos macrófagos, fase rica em formas promastigotas metacíclicas, as formas infectantes (Silva & Sacks 1987; Soares et al. 2005). O perfil da curva de crescimento obtida no presente trabalho, para o isolado clínico IMG3 foi similar àquele obtido por outros autores, tais como Souza-Neto et al. (2004) que usando uma cepa de *L.(V.) braziliensis* M2903, obteve que a fase estacionária é estabelecida no 5º dia de cultura. Em geral, o 5º ou 6º dias de cultivo tem sido escolhidos para ensaios de infecção de macrófagos por diferentes espécies de *Leishmania*, devido há um possível maior número de formas promastigotas metacíclicas nestes (Louassini et al. 1998, da Luz et al. 2009, Siqueira-Neto et al. 2012). Observando que as condições técnicas são diferentes, consequentemente, o perfil de crescimento *in vitro* de *Leishmania* é variável dependendo de vários fatores, incluindo o tempo de adaptação dos parasitos ao meio de cultura, o tipo de meio de cultura e sua suplementação, o isolado ou cepa, de tal forma que a fase estacionária do crescimento dos parasitos pode demorar mais ou ser mais rápida para se estabelecer em algumas condições (Luz et al. 2009).

No presente trabalho, no período da fase estacionária, numerosos parasitos livres dos aglomerados típicos da fase log do crescimento, eram observados, contendo o corpo pequenino e longo flagelo, movimentando-se rapidamente (dados não mostrados). Essas mudanças coincidem com aquelas descritas durante o processo de metaciclogênese para *L. (V.) braziliensis* (Pinto-da-Silva et al. 2002; Soares et al. 2005), em que o processo de adaptação dos parasitos ao meio de cultura é acompanhado por

mudanças bioquímicas e morfológicas, que os tornam potencialmente mais infectantes. Portanto, os nossos dados sugerem que o dia 6 da curva de crescimento contém parasitos adequados para os experimentos de infecção dos macrófagos humanos. Corroborando estes dados, nosso grupo encontrou que no 6^o dia de cultura do isolado IMG3 há uma elevada porcentagem de formas metacíclicas que infectam os macrófagos humanos (*manuscrito em preparação*, da Silva Jr et al.).

Neste trabalho, nas culturas de macrófagos humanos com o isolado IMG3 houve um aumento significativo no índice de infecção de 4 h para 48 h, o que foi devido especialmente a um aumento no número médio de parasitos por macrófagos, o que indica que estava havendo replicação dos parasitos dentro das células. Estes dados mostram que os macrófagos humanos são permissivos à infecção por *L. (V.) braziliensis*. Estudos com macrófagos humanos infectados com *L. infantum* demonstraram que este parasito consegue se replicar dentro dessas células (Hsiao et al. 2011). Além disso, tem sido demonstrado que macrófagos humanos são infectados por várias espécies de *Leishmania*, incluindo *L. (V.) panamensis* e *L. major* (Vouldoukis et al. 1995, Bosque et al. 1998). Além disso, em um estudo avaliando a infecção por *L. (V.) braziliensis*, Campos et al. (2008) mostraram que os macrófagos estavam infectados após 24 h de incubação. Dados similares foram obtidos por Maia et al. (2007) avaliando infecção com *L. infantum*. Corroborando com os nossos dados, estudos com linhagens celulares de monócitos humanos demonstraram que estas células são infectadas com *L. (V.) braziliensis* (Ogunkolade et al. 1990; Zauli-Nascimento et al. 2010). Nossos dados, portanto, demonstram que o isolado de *L. (V.) braziliensis* IMG3 infecta os macrófagos humanos, sobrevivendo dentro destes por um período de até 96 h (dados não mostrados).

A fim de avaliar a participação dos leucotrienos em macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis*, no presente estudo, foram utilizados os compostos MK0591, CP-105,696 e o LTB₄. Nenhuma citotoxicidade significativa foi detectada com todos estes tratamentos, tanto para os parasitos quanto para as células humanas. As concentrações utilizadas são compatíveis com concentrações utilizadas anteriormente em experimentos com células murinas, para as quais também não houve citotoxicidade (Serezani et al. 2005, 2006; Talvani et al. 2002). Além disso, para avaliar os mecanismos microbicidas dos macrófagos foram utilizados apocinina e

aminoguanidina, sendo já conhecida a ausência de citotoxicidade destes reagentes nas concentrações usadas no presente trabalho (Muijsers et al. 2000, Ximenes et al. 2007).

Aqui, a inibição da produção de leucotrienos com MK0591 aumentou significativamente a infecção dos macrófagos durante os períodos de 4 h e 48 h de incubação, demonstrando a modulação da fagocitose e da atividade microbicida dos macrófagos por leucotrienos endógenos. Serezani et al. (2006) publicaram, até o momento, o único trabalho que avalia a contribuição dos leucotrienos no controle da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos suscetíveis e resistentes à infecção, bem como em macrófagos destes animais. Os autores mostraram que, o bloqueio da produção de leucotrienos (com MK0591) em macrófagos murinos infectados com *L. (L.) amazonensis* aumenta o índice de infecção, sugerindo que os leucotrienos estariam envolvidos no controle do parasito. Estes autores também demonstraram que os macrófagos dos camundongos resistentes à infecção produzem maiores quantidades de leucotrienos do que os dos animais suscetíveis. *In vivo*, a inibição dos leucotrienos causou um aumento da lesão nos camundongos. Portanto, os resultados do presente trabalho, que avaliou a infecção de macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis*, mostram que, similarmente ao que ocorre na infecção com *L. (L.) amazonensis* em macrófagos murinos, os leucotrienos possuem um papel importante para o controle da infecção dos macrófagos humanos. A relevância dos leucotrienos em infecções tem sido avaliada em outros modelos, como em um modelo murino de infecção com helmintos, demonstrando que o tratamento dos animais com um inibidor de síntese de leucotrienos (MK-866), favorece o aumento do número de parasitos e de ovos, consequentemente, os leucotrienos estariam induzindo mecanismos para o controle da infecção (Machado et al. 2005). Experimentos com camundongos infectados com fungos, usando o mesmo inibidor, levaram à morte os camundongos tratados, após 15 dias da infecção, enquanto os não tratados permaneceram vivos até 30 dias depois de serem infectados (Medeiros et al. 2004). Ainda, em um modelo de infecção por bactérias, *Mycobacterium tuberculosis*, os camundongos tratados com inibidor de síntese de leucotrienos perderam a capacidade de controlar a infecção (Peres et al. 2007). Coletivamente, estes dados sugerem que os leucotrienos são produzidos por macrófagos após infecção com diferentes microrganismos e os nossos resultados sugerem que os leucotrienos são produzidos pelos macrófagos humanos após infecção com *L. (V.) braziliensis*.

No presente trabalho, o bloqueio do receptor BLT1 com CP105,696, de uma maneira geral, aumentou a infecção dos macrófagos humanos, indicando a participação de LTB₄ na modulação da fagocitose e da atividade leishmanicida. Estes resultados sugerem que em alguns indivíduos, os macrófagos podem estar produzindo LTB₄, após a infecção por *L. (V.) braziliensis*, e esta produção é suficiente para modular a infecção. Estudos usando o bloqueador de BLT1, CP105,696, contribuíram para avaliar a importância do LTB₄ endógeno nos nossos experimentos. Nos nossos resultados, o bloqueio do receptor aumentou a fagocitose, sugerindo então que o LTB₄ diminui a fagocitose. Alguns artigos tem demonstrado que os leucotrienos podem aumentar a infecção por modularem a capacidade de fagocitose dos macrófagos. Os leucotrienos, LTB₄ e CysLTs aumentam a fagocitose de *Klebsiella pneumoniae*, por macrófagos alveolares de ratos (Mancuso et al. 1998; Silva et al. 2010). Okamoto et al. (2010) demonstraram que o bloqueio do receptor de leucotrienos, em macrófagos de camundongos, diminuem a fagocitose de bactérias. Esses dados são aparentemente discordantes dos que nós encontramos o que pode ser devido a diferenças nos modelos usados, em relação ao usado no presente trabalho. Pelo menos duas diferenças importantes podem explicar as discrepâncias: os macrófagos são oriundos de espécies diferentes e os microrganismos são diferentes, além disso, nos experimentos com as bactérias, estas foram opsonizadas antes de avaliar a fagocitose, logo, os mecanismos ativados também serão diferentes, pois usam diferentes receptores acoplados a diferentes vias. Sugerimos que para *L. (V.) braziliensis*, os leucotrienos diminuem a fagocitose de formas promastigotas por macrófagos humanos, por meio de mecanismos ainda desconhecidos. Outra alternativa será discutida mais abaixo em relação aos mecanismos microbicidas que podem estar atuando já nas primeiras horas da infecção.

Em outros modelos de infecção tem sido demonstrada a modulação da atividade microbicida de macrófagos por LTB₄ endógeno. Serezani et al. (2005) demonstraram que o bloqueio do receptor BLT1 aumenta a sobrevivência de bactéria em macrófagos alveolares de ratos. Talvani et al. (2002) em um modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi*, demonstraram que o antagonismo de BLT1 diminui a produção de nitrito em macrófagos de camundongos, aumentando a infecção, o que indica que a produção de NO seria o mecanismo envolvido pelo controle da infecção por *T. cruzi*, a qual é aumentada por LTB₄ endógeno. Os resultados do presente trabalho sugerem que *L. (V.)*

braziliensis pode induzir a produção de LTB₄ em macrófagos humanos e que este leucotrieno aumenta a atividade microbicida destes macrófagos, agindo em receptores BLT1.

Como os resultados obtidos com inibição de síntese de leucotrienos e bloqueio do receptor BLT1 indicaram que *L. (V.) braziliensis* poderia induzir a produção de LTB₄ em macrófagos humanos, este leucotrieno foi, então, quantificado nos sobrenadantes das culturas desses macrófagos. Foi verificada uma rápida produção de LTB₄ após interação macrófagos-parasitas, com uma queda progressiva das concentrações com o período de incubação, indicando a degradação do leucotrieno e uma diminuição da produção dos leucotrienos com o tempo. Serezani et al. (2006) demonstraram que o LTB₄ foi gerado após a infecção com *L. (L.) amazonensis* em macrófagos de camundongos, sendo que havia uma maior produção de LTB₄ em macrófagos de camundongos resistentes, quando comparados com os de macrófagos de camundongos suscetíveis, em todos os períodos avaliados. Diferentemente do nosso trabalho, nos macrófagos de camundongos, a maior concentração de LTB₄ foi detectada após 24 horas de infecção, sendo que no nosso trabalho a maior concentração foi detectada após 30 minutos e foi diminuindo ao longo do tempo. Podemos afirmar, então, que *L. (V.) braziliensis* induz a rápida produção de LTB₄ em macrófagos humanos.

No presente estudo, a adição de LTB₄ exógeno diminuiu o índice de infecção dos macrófagos humanos infectados com um isolado de *L. (V.) braziliensis*. Este efeito foi observado tanto após 4 h quanto 48 h, em acordo com os nossos resultados obtidos com o tratamento com o inibidor de síntese de leucotrienos, bem como com o antagonista do receptor do LTB₄. A adição de LTB₄ em culturas de macrófagos murinos aumenta a fagocitose de *T. cruzi*, por mecanismos desconhecidos (Wirth & Kierszenbaum 1985). É conhecido que o LTB₄ aumenta a fagocitose de macrófagos murinos, atuando em BLT1 que leva à ativação de proteína Gi, PI3K (*fosfatidil inositol-3-quinase*) e Rac quinase (Okamoto et al. 2010). Nós não sabemos por que a ativação dos macrófagos humanos com LTB₄ causa uma diminuição da fagocitose de *L. (V.) braziliensis*, mas pode ser especulado que a sinalização via BLT1 possa interferir na sinalização dos receptores usados para a fagocitose de leishmânias, tais como receptores

para o Complemento ou outros receptores utilizados pelo parasito (Ueno & Wilson 2012).

Para avaliar se o LTB₄ modularia infecção somente nos momentos iniciais (4 h), este foi adicionado no momento da adição dos parasitos, 4 h ou 24 h após. Quando o LTB₄ foi adicionado simultaneamente com os parasitos ou 4 h após a infecção, houve uma diminuição da infecção, avaliada após 48 h, sugerindo que o LTB₄ pode diminuir a fagocitose e aumentar a atividade microbicida dos macrófagos humanos. A adição do LTB₄ após 24 h de infecção, no entanto, não alterou significativamente a atividade microbicida dos macrófagos, indicando que os macrófagos infectados não eram mais responsivos ao LTB₄ neste período. Os resultados sugerem que os parasitos podem estar diminuindo a expressão de BLT1, de modo a escapar da ativação dos macrófagos pelo LTB₄ e manter a infecção. Experimentos estão sendo realizados para avaliar esta hipótese.

Serezani et al. (2006) relataram a participação de LTB₄ no controle da infecção por *L. (L.) amazonensis*. Eles demonstraram que a adição de LTB₄ diminui o índice de infecção em macrófagos de camundongos resistentes ou suscetíveis à infecção por *L. (L.) amazonensis*. Dados semelhantes foram descritos por Serezani et al. (2005), que demonstraram que a adição de LTB₄ aumenta a atividade microbicida de macrófagos alveolares de ratos, infectados com bactérias. Também em infecção de macrófagos murinos com *T. cruzi*, a adição de LTB₄ aumenta a morte dos parasitos intracelulares (Wirth & Kierszenbaum 1985a). Na infecção por *Toxoplasma gondii*, o LTB₄ exógeno aumenta a atividade citotóxica de macrófagos derivados de monócitos humanos, promovendo a morte intracelular destes parasitos (Yong et al. 1994). Estes trabalhos demonstram a capacidade do LTB₄ em ativar macrófagos humanos para a destruição de protozoários. O presente trabalho, mostrando que o LTB₄ aumenta a atividade leishmanicida de macrófagos humanos, vem corroborar a idéia de que o LTB₄ induz atividade microbicida destes macrófagos, auxiliando no controle da infecção.

Para investigar a participação de ROI e RNI na atividade microbicida de macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis*, em nossos experimentos foi usado um inibidor de NADPH oxidase, a apocinina, o que tem por consequência o bloqueio da produção de ROI. Foi demonstrado um aumento significativo da infecção,

sugerindo que essas moléculas estariam aumentando a atividade microbicida dos macrófagos. Blois et al. (2003) demonstraram que camundongos gp91^{phox -/-}, ou seja, camundongos deficientes de NADPH oxidase infectados com *L. major*, na fase crônica da doença, permaneciam com parasitos na pele, linfonodo e baço. Outros experimentos demonstraram a importância dos ROI, tais como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (O₂⁻ e H₂O₂), no controle da infecção por espécies de *Leishmania*, em diferentes linhagens celulares de camundongos e humanos (Murray 1981; Murray et al. 1983). Os nossos resultados são similares aos de Khouri et al. (2009) que mostraram um importante papel microbicida dos ROI em macrófagos humanos infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Os leucotrienos são lipídios que estimulam a produção de substâncias antimicrobianas, tais como os ROI e RNI (Woo et al. 2002; Serezani et al. 2005; Serezani et al. 2006). Neste trabalho, além da apocinina aumentar a infecção por *L. (V.) braziliensis*, esta também reverteu o efeito inibidor do LTB₄, sugerindo que o efeito deste mediador em aumentar a atividade leishmanicida era via aumento da produção de ROI. A capacidade de induzir ROI tem sido demonstrada para o LTB₄ em outros trabalhos, como por exemplo, Serezani et al. (2005), demonstraram que o LTB₄ induz a produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos alveolares de ratos, e que este mecanismo microbicida, estaria contribuindo para o controle da infecção destes macrófagos por *K. pneumoniae*. No presente estudo, foi utilizado a apocinina, um inibidor seletivo da atividade da NADPH oxidase. Experimentos suportam a ideia de que a apocinina inibe a translocação das subunidades p47phox e p67phox para a membrana celular, inibindo assim a ação da NADPH oxidase e a consequente produção de ROI (Muijsers et al. 2000; Worm et al. 2001; Ximenes et al. 2007; Almeida et al. 2011). A inibição de ROI diminuiu a infecção já nas primeiras horas, sugerindo então que, a diminuição da infecção causada pelos leucotrienos durante 4 h pode não ser um efeito no processo da fagocitose em si, mas sim já indicar a morte dos parasitos durante este período. No presente estudo foi avaliada, também, a participação dos RNI na infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis*, sendo utilizado um inibidor de iNOS, a aminoguanidina. Foi demonstrado que a inibição da produção de NO levou a um aumento na infecção dos macrófagos, demonstrando assim sua participação na atividade microbicida. Corroborando com nossos dados Linares et al. (2001)

demonstraram a participação de peroxinitrito no controle da infecção de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, em que a produção na fase inicial da infecção, destes complexos formados pela reação entre peróxido de hidrogênio e NO, estaria relacionada à resistência destes camundongos à doença. Outro trabalho demonstrou que o LTB₄ induz a produção de NO em macrófagos murinos e isto estaria relacionado ao controle e à resistência da infecção por *T. cruzi* (Talvani et al. 2002). No entanto, a produção de NO em macrófagos humanos é muito baixa (Brandonisio et al. 2002) e Khouri et al. (2009) relataram que em macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis* a produção de NO não é relevante para o controle da infecção. Nós não avaliamos a produção de NO, mas para confirmar os resultados do tratamento com aminoguanidina, é necessário utilizar outros inibidores de NO, a fim de eliminar a possibilidade de outros efeitos da aminoguanidina na infecção independentes de NO, bem como avaliar a expressão de iNOS nos macrófagos. Experimentos futuros podem esclarecer melhor a participação do NO nos mecanismos microbicidas dos macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis*. Não foi avaliado até o momento a participação do NO no aumento da atividade microbicida induzida pelos leucotrienos.

Desde que a inibição de ROI aumentou a infecção dos macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis*, na ausência ou presença do leucotrieno, no presente trabalho a produção de ROI foi avaliada pela técnica de redução do NBT. *Leishmania (V.) braziliensis* induziu a produção de ânion superóxido e o LTB₄ aumentou esta produção. Nossos resultados corroboram com Murray (1981) que utilizou a mesma técnica e demonstrou que as espécies de *Leishmania tropica* e *Leishmania donovani* induzem a produção de ânion superóxido em uma linhagem de macrófagos murinos. Aqui, demonstramos pela primeira vez que o LTB₄ aumenta a produção de ROI, via NADPH oxidase, induzida por *L. (V.) braziliensis* em macrófagos humanos. Os resultados são ainda preliminares e serão repetidos para confirmação.

Vários trabalhos já relataram a produção de ROI induzida por leucotrienos (Serezani et al. 2005; Woo et al. 2000a; Woo et al. 2000b; Woo et al. 2002; Cho et al. 2011), porém os mecanismos pelos quais os leucotrienos induzem ROI ainda não são bem esclarecidos. Serezani et al. (2005) relataram a indução da produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos alveolares de ratos, quando tratados com LTB₄. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que os induziram a translocação da subunidade

p47phox para a membrana, via PKC- δ , sugerindo assim, uma via de sinalização para a produção de peróxido de hidrogênio induzido por LTB₄. Alguns trabalhos sugeriram o envolvimento da produção de ROI de maneira dependente de Rac quinase, ativados por AA e por cPLA₂. (Woo et al. 2000a, 2000b).

Outros mecanismos microbicidas que podem ser induzidos por leucotrienos é a indução de peptídeos antimicrobianos. Os peptídeos antimicrobianos são peptídeos catiônicos que podem ser produzidos por células epiteliais e leucócitos, entre os quais os macrófagos. Tem sido demonstrado que o LTB₄ induz a produção de defensina ou catelicidina. Dessa forma, por induzir a liberação destas substâncias, o LTB₄ ativa as propriedades microbicidas de polimorfonucleares e macrófagos (Yong et al. 1994; Serezani et al. 2005; Wan et al. 2007; Flamand et al. 2007). Tem sido demonstrado o efeito tóxico de diferentes peptídeos antimicrobianos para diferentes espécies de *Leishmania* (Pérez-Cordero et al. 2011). Assim, investigações futuras podem esclarecer se os peptídeos antimicrobianos são mediadores do aumento da atividade leishmanicida causada pelo LTB₄ em macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis*.

A partir dos resultados do presente trabalho, pode ser proposto que a infecção por *L. (V.) braziliensis* induz a produção de LTB₄ por macrófagos humanos, o qual diminui a infecção desde as primeiras horas. A produção de LTB₄ é rápida e diminui após 4 h de infecção, mas os efeitos nos mecanismos microbicidas são percebidos nas primeiras horas, mediados pela rápida produção de ROI, e até 48 h de incubação, talvez mediados pela produção tardia de NO. Após 24 h de infecção, ao adicionar o LTB₄ nas culturas, este passa a não ter efeito na atividade microbicida, sugerindo, então, que a leishmânia estaria tornando os macrófagos não responsivos a LTB₄, talvez por modular a expressão dos receptores para leucotrieno, como o BLT1. De fato, nossos resultados preliminares (não mostrados) indicam que a infecção com *L. (V.) braziliensis* diminui a expressão de BLT1 nos macrófagos. Desta maneira, a leishmânia encontraria uma maneira de escapar da resposta do macrófago, sobrevivendo nesta célula e mantendo a infecção, que *in vitro* é observada até 96 h.

Entender os mecanismos de controle da infecção por *L. (V.) braziliensis* é fundamental para encontrar novos alvos terapêuticos para a LTA, uma doença que apresenta uma grave forma clínica, a LM, para a qual ainda há dificuldades no

tratamento, com muitas recidivas e desenvolvimento de resistência dos parasitos aos fármacos. A capacidade de ativação celular promovida pelo LTB₄ vem sendo explorada experimentalmente para tratamento de infecção fúngica, utilizando microesferas biodegradáveis contendo LTB₄ (Nicolette et al. 2009). Os nossos resultados sugerem que o LTB₄ pode ativar os macrófagos humanos, auxiliando no controle da infecção por *L. (V.) braziliensis*, o que abre perspectivas para novas terapias da LTA.

7. CONCLUSÕES

7.1 Específicas

- Macrófagos humanos são eficientemente infectados com *L. (V.) braziliensis* IMG3;
- O tratamento dos macrófagos com um inibidor de síntese de leucotrienos aumenta significativamente o índice de infecção, por promover a fagocitose e inibir a atividade microbida dos macrófagos;
- O tratamento dos macrófagos com um antagonista de BLT1 aumenta significativamente o índice de infecção, sugerindo que o LTB₄, produzido após infecção com *L. (V.) braziliensis*, é um dos leucotrienos que inibe a fagocitose e aumenta a atividade microbida dos macrófagos;
- O LTB₄ é produzido após a infecção de macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis*.
- O tratamento dos macrófagos com LTB₄ diminui significativamente o índice de infecção dos macrófagos, inibindo a fagocitose e aumentando a atividade microbida;
- O tratamento dos macrófagos com inibidor de ROI ou NO aumenta significativamente o índice de infecção, sugerindo a participação destas moléculas nos mecanismos microbicidas dos macrófagos;
- Os dados sugerem que *L. (V.) braziliensis* induz ROI e que o LTB₄ aumenta a produção destas moléculas, contribuindo para o controle do parasito em macrófagos humanos.

7.1 Geral

Os macrófagos humanos produzem leucotrienos após a infecção por *L. (V.) braziliensis*, estes mediadores podem ativar mecanismos microbicidas, de maneira dependente da produção de ROI, e que contribuem para o controle da infecção.

8. REFERENCIAS

- Aderem A, Underhill DM 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 17: 593–623.
- Almeida AC, Marques OC, Arslanian C, Condino-Neto A, Ximenes VF 2011. 4-Fluoro-2-methoxyphenol, an apocynin analog with enhanced inhibitory effect on leukocyte oxidant production and phagocytosis. *European Journal of Pharmacology* 660:445-453
- Arevalo J, Ramirez L, Adaui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, Doncker S De, Maurer A, Chappuis F, Dujardin J-C, Llanos-Cuentas A 2007. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases* 195: 1846–1851.
- Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and immunity* 70: 6734–6740.
- Blackwell JM, Ezekowitz RAB, Roberts MB, Channon JY, Sim RB, Gordon S 1985 Macrophage complement and lectin-like receptors bind leishmania in the absence of serum. *The Journal of Experimental Medicine* 162: 324-331
- Blos M, Schleicher U, Rocha FJS, Meißne U, Rölinghoff M, Bogdan C 2003. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *European Journal of Immunology* 33: 1224–1234
- Borgeat P, Samuelsson B 1979. Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes. Structural analysis of novel hydroxylated compounds. *The Journal of biological chemistry* 254: 7865–7869.
- Bosque F, Milon G, Valderrama L, Saravia NG 1998. Permissiveness of human monocytes and monocyte-derived macrophages to infection by promastigotes of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*. *The Journal of parasitology* 84: 1250–1256.
- Bosque F, Saravia NG, Valderrama L, Milon G 2000. Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scandinavian journal of immunology* 51: 533–541.
- Brandonisio O, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, Acquafredda A, Spinelli R, Mitolo V 2002. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clinical and experimental medicine* 2: 125–129.

BRASIL. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2º ed Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf>. Acessado em 20 de junho de 2012.

BRASIL. Ministério da saúde. 2009. Disponível em:http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31927 Acesso em 20 junho de 2012

BRASIL. Ministério da saúde. 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf Acesso em 20 junho de 2012

Brittingham A, Chen G, Mcgwire BS, Chang KP, Mosser D 1999. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infection And Immunity* 67: 4477–4484.

Bäck M 2002. Functional characteristics of cysteinyl-leukotriene receptor subtypes. *Life sciences* 71: 611–622.

Campos MB, Castro Gomes CM De, Souza AAA de, Lainson R, Corbett CEP, Silveira FT 2008. In vitro infectivity of species of *Leishmania* (*Viannia*) responsible for American cutaneous leishmaniasis. *Parasitology research* 103: 771–776.

Canetti CA, Leung BP, Culshaw S, McInnes IB, Cunha FQ, Liew FY, Cannetti CA 2003. IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4. *Journal of immunology* 171: 1009–1015.

Capra V 2004. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. *Pharmacological research* 50: 1–11.

Capra V, Thompson MD, Sala A, Cole DE, Folco G, Rovati GE 2007. Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. *Medicinal research reviews* 27: 469–527.

Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H 1995. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 53: 273–277.

Castes M, Cabrera M, Trujillo D, Convit J 1988. T-cell subpopulations, expression of interleukin-2 receptor, and production of interleukin-2 and gamma interferon in human American cutaneous leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology* 26: 1207–1213.

Cho K-J, Seo J-M, Kim J-H 2011. Bioactive lipxygenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species. *Molecules and cells* 32: 1–5.

Cooper A, Rosen H, Blackwell JM 1988. Monoclonal antibodies that recognize distinct epitopes of the macrophage type three complement receptor differ in their ability to inhibit binding of *Leishmania* promastigotes harvested at different phases of their growth cycle. *Immunology* 65: 511-514

Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, De-Luca P 1998. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas* 31: 139-142.

Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, Luca PM De, Mendonça SC, Bertho AL, Soong L, McMahon-Pratt D 1996. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Experimental parasitology* 84: 144-155.

Crooks SW, Stockley RA 1998. Leukotriene B4. *The international journal of biochemistry & cell biology* 30: 173-178.

Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG 2002. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 9: 251-256.

Dahlén S-E 2006. Treatment of asthma with antileukotrienes: first line or last resort therapy? *European journal of pharmacology* 533: 40-56.

Dahlén SE, Björk J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarström S, Lindgren JA, Samuelsson B 1981. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 3887-3891.

Dannull J, Schneider T, Lee WT, Rosa N de, Tyler DS, Pruitt SK 2012. Leukotriene C4 induces migration of human monocyte-derived dendritic cells without loss of immunostimulatory function. *Blood* 119: 3113-3122.

Drazen JM, Israel E, O'Byrne PM 1999. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *The New England journal of medicine* 340: 197-206.

Evans KJ, Kedzierski L 2012. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. *Journal of tropical medicine* 2012: 1-14.

Farhad AR, Razavi S, Jahadi S, Saatchi M 2011. Use of aminoguanidine, a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor, to evaluate the role of nitric oxide in periapical inflammation. *Journal of Oral Science* 53: 225-230.

Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Schrieffer A, Machado PRL, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, Jesus AR de, Carvalho EM, Dutra WO 2005. Decreased in

situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and immunity* 73: 7853–7859.

Feinmark SJ, Cannon PJ 1986. Endothelial cell leukotriene C4 synthesis results from intercellular transfer of leukotriene A4 synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of biological chemistry* 261: 16466–16472.

Figuerola DJ, Breyer RM, Defoe SK, Kargman S, Daugherty BL, Waldburger K, Liu Q, Clements M, Zeng Z, O'Neill GP, Jones TR, Lynch KR, Austin CP, Evans JF 2001. Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *American journal of respiratory and critical care medicine* 163: 226–233.

Flamand L, Tremblay MJ, Borgeat P 2007. Leukotriene B4 triggers the *in vitro* and *in vivo* release of potent antimicrobial agents. *Journal of immunology* 178: 8036 – 8045.

Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM 2002. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical Infectious Diseases* 34: e54–e58.

Forestier CL, Machu C, Loussert C, Pescher P, Späth G 2011. Imaging host cell-*leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. *Cell Host & Microbe* 9: 319–330

Fritzsche C, Schleicher U, Bogdan C 2010. Endothelial nitric oxide synthase limits the inflammatory response in mouse cutaneous leishmaniasis. *Immunobiology* 215: 826 -832.

Funk CD 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871–1875.

Gaudreault E, Gosselin J 2008. Leukotriene B4 induces release of antimicrobial peptides in lungs of virally infected mice. *Journal of immunology* 180: 6211–6221.

Gaudreault E, Gosselin J 2009. Leukotriene B4 potentiates CpG signaling for enhanced cytokine secretion by human leukocytes. *Journal of immunology* 183: 2650–2658.

Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O 2012. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC infectious diseases* 12: 75.

Gladue RP, Carroll LA, Milici AJ, Scampoli DN, Stukenbrok HA, Pettipher ER, Salter ED, Contillo L, Showell HJ 1996. Inhibition of leukotriene B4-receptor interaction suppresses eosinophil infiltration and disease pathology in a murine

model of experimental allergic encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 183: 1893–1898.

Gomes-Silva A, Cássia Bittar R de, Santos Nogueira R Dos, Amato VS, Silva Mattos M da, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clinical and experimental immunology* 149: 440–444.

Gontijo B, Carvalho MLR 2003. American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 71–80.

Goodarzi K, Goodarzi M, Tager AM, Luster AD, Andrian UH von 2003. Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nature immunology* 4: 965–973.

Gordon S 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology* 3: 23–35.

Griffiths RJ, Pettipher ER, Koch K, Farrell CA, Breslow R, Conklyn MJ, Smith MA, Hackman BC, Wimberly DJ, Milici AJ 1995. Leukotriene B4 plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 517–521.

Guimond C, Trudel N, Brochu C, Marquis N, El Fadili A, Peytavi R, Briand G, Richard D, Messier N, Papadopoulou B, Corbeil J, Bergeron MG, Légaré D, Ouellette M 2003. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic acids research* 31: 5886–5896.

Hadighi R, Mohebbi M, Boucher P, Hajjarian H, Khamesipour A, Ouellette M 2006. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS medicine* 3: e162.

Haneda Y, Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Ohsaki A, Ichiyama T 2011. Leukotriene D4 enhances tumor necrosis factor- α -induced vascular endothelial growth factor production in human monocytes/macrophages. *Cytokine* 55: 24–28.

Hashimoto K, Ichiyama T, Hasegawa M, Hasegawa S, Matsubara T, Furukawa S 2009. Cysteinyl leukotrienes induce monocyte chemoattractant protein-1 in human monocyte/macrophages via mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways. *International archives of allergy and immunology* 149: 275–282.

Henderson WR, Chi EY 1998. The importance of leukotrienes in mast cell-mediated *Toxoplasma gondii* cytotoxicity. *The Journal of infectious diseases* 177: 1437–1443.

Holstad M, Jansson L, Sandler S 1997. Inhibition of nitric oxide formation by aminoguanidine: an attempt to prevent insulin-dependent diabetes mellitus. *General Pharmacology* 29: 697-700.

Horta MF, Mendes BP, Roma EH, Noronha FSM, Macêdo JP, Oliveira LS, Duarte MM, Vieira LQ 2012. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *Journal of parasitology research* 2012: 1-11.

Hsiao C-hung C, Ueno N, Shao JQ, Schroeder KR, Moore KC, Donelson JE, Wilson ME 2011. The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*. *Microbes and Infection* 13: 1033–1044.

Huang WW, Garcia-Zepeda EA, Sauty A, Oettgen HC, Rothenberg ME, Luster AD 1998. Molecular and biological characterization of the murine leukotriene B4 receptor expressed on eosinophils. *The Journal of experimental medicine* 188: 1063–1074.

Huang L, Zhao A, Wong F, Ayala JM, Struthers M, Ujjainwalla F, Wright SD, Springer MS, Evans J, Cui J 2004. Leukotriene B4 strongly increases monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24: 1783–1788.

Hui Y, Cheng Y, Smalera I, Jian W, Goldhahn L, Fitzgerald GA, Funk CD 2004. Directed vascular expression of human cysteinyl leukotriene 2 receptor modulates endothelial permeability and systemic blood pressure. *Circulation* 110: 3360–3366.

Iniesta V, Gómez-nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, Alonso C, Corraliza I 2002. Arginase I induction in macrophages , triggered by Th2-type cytokines , supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite immunology* 24: 113–118.

Islam SA, Thomas SY, Hess C, Medoff BD, Means TK, Brander C, Lilly CM, Tager AM, Luster AD 2006. The leukotriene B4 lipid chemoattractant receptor BLT1 defines antigen-primed T cells in humans. *Blood* 107: 444–453.

Kaye P, Scott P 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews. Microbiology* 9: 604–615.

Kazani S, Sadeh J, Bunga S, Wechsler ME, Israel E 2011. Cysteinyl leukotriene antagonism inhibits bronchoconstriction in response to hypertonic saline inhalation in asthma. *Respiratory medicine* 105: 667–673.

Khoury R, Bafica A, Silva MPP, Noronha A, Kolb JP, Wietzerbin J, Barral A, Barral-Netto M, Weyenbergh JV 2009. IFN- β impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 182: 2525-2531.

Kim DC, Hsu FI, Barrett NA, Friend DS, Grenningloh R, Ho I-C, Al-Garawi A, Lora JM, Lam BK, Austen KF, Kanaoka Y 2006. Cysteinyl leukotrienes regulate Th2 cell-dependent pulmonary inflammation. *Journal of immunology* 176: 4440–4448.

Labat C, Ortiz JL, Norel X, Gorenne I, Verley J, Abram TS, Cuthbert NJ, Tudhope SR, Norman P, Gardiner P 1992. A second cysteinyl leukotriene receptor in human lung. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 263: 800–805.

Lee KS, Kim SR, Park HS, Jin GY, Lee YC 2004. Cysteinyl leukotriene receptor antagonist regulates vascular permeability by reducing vascular endothelial growth factor expression. *The Journal of allergy and clinical immunology* 114: 1093–1099.

Lemesre JL, Darcy F, Kweider M, Capron A, Santoro F 1988. Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes *in vitro*. *Acta tropica* 45: 99–108.

Liese J, Schleicher U, Bogdan C 2008. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology* 213: 377–387.

Linares E, Giorgio S, Mortara RA, Santos CXC, Yamada AT, Augusto O 2001. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms *in vivo* revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free Radical Biology & Medicine* 30: 1234 – 1242.

Liew FY, Li Y, Millott S 1990. Tumour necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. II. TNF- α -induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology* 71: 556–559.

Louassini M, Adroher FJ, Foulquié MR, Benítez R 1998. Investigations on the *in vitro* metacyclogenesis of a visceral and a cutaneous human strain of *Leishmania infantum*. *Acta tropica* 70: 355–368.

Luz RI, Vermeersch M, Dujardin J-C, Cos P, Maes L 2009. *In vitro* sensitivity testing of *Leishmania* clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53: 5197–5203.

Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateaneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF 1999. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 399: 789–793.

Lötzer K, Spanbroek R, Hildner M, Urbach A, Heller R, Bretschneider E, Galczenski H, Evans JF, Habenicht AJR 2003. Differential leukotriene receptor expression and calcium responses in endothelial cells and macrophages indicate 5-

lipoxygenase-dependent circuits of inflammation and atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23: e32–e36.

Machado ER, Ueta MT, Lourenço EV, Anibal FF, Sorgi CA, Soares EG, Roque-Barreira MC, Medeiros AI, Faccioli LH 2005. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. *Journal of immunology* 175: 3892–3899.

Machida I, Matsuse H, Kondo Y, Kawano T, Saeki S, Tomari S, Obase Y, Fukushima C, Kohno S 2004. Cysteinyl leukotrienes regulate dendritic cell functions in a murine model of asthma. *Journal of immunology* 172: 1833–1838.

MacLouf JA, Murphy RC 1988. Transcellular metabolism of neutrophil-derived leukotriene A₄ by human platelets. A potential cellular source of leukotriene C₄. *The Journal of biological chemistry* 263: 174–181.

MacLouf J, Murphy RC, Henson PM 1989. Transcellular sulfidopeptide leukotriene biosynthetic capacity of vascular cells. *Blood* 74: 703–707.

Maia C, Rol N, Nunes M, Gonc L, Campino L 2007. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. *Acta Tropica* 103: 150–155.

Mancuso P, Nana-Sinkam P, Peters-Golden M 2001. Leukotriene B₄ augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity* 69: 2011–2016.

Mancuso P, Standiford TJ, Marshall T, Peters-Golden M 1998. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity* 66: 5140–5146.

Manning PJ, Watson RM, Margolskee DJ, Williams VC, Schwartz JI, O’Byrne PM 1990. Inhibition of exercise-induced bronchoconstriction by MK-571, a potent leukotriene D₄-receptor antagonist. *The New England journal of medicine* 323: 1736–1739.

Medeiros AI, Sá-Nunes A, Soares EG, Peres CM, Silva CL, Faccioli LH 2004. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infection and immunity* 72: 1637–1644.

Medeiros AI, Sá-Nunes A, Turato WM, Secatto A, Frantz FG, Sorgi CA, Serezani CH, Deepe GS, Faccioli LH 2008. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. *Journal of immunology* 181: 8544–8551.

Mellor EA, Frank N, Soler D, Hodge MR, Lora JM, Austen KF, Boyce JA 2003. Expression of the type 2 receptor for cysteinyl leukotrienes (CysLT₂R) by human mast cells: Functional distinction from CysLT₁R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 11589–11593.

- Milano S, Arcoleo F, Dieli M, D'Agostino R, Nucci G De, D'Agostino P, Cillari E 1996. Ex vivo evidence for PGE2 and LTB4 involvement in cutaneous leishmaniasis: relation with infection status and cytokine production. *Parasitology* 112 : 13–19.
- Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA , Tilton RG, McDamel ML, Wilhamson JR, Currle MG 1993. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *European Journal of Pharmacology* 233: 119-125
- Montuschi P, Sala A, Dahlén S-E, Folco G 2007. Pharmacological modulation of the leukotriene pathway in allergic airway disease. *Drug discovery today* 12: 404–412.
- Moos MPW, Mewburn JD, Kan FWK, Ishii S, Abe M, Sakimura K, Noguchi K, Shimizu T, Funk CD 2008. Cysteinyl leukotriene 2 receptor-mediated vascular permeability via transendothelial vesicle transport. *FASEB journal* 22: 4352–4362.
- Mosmann T 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63
- Mosser DM, Edwards JP 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology* 8: 958–969.
- Muijsers RBR, Worm E, Folkerts G, Beukelman C.J, Koster AS, Postma DS, Nijkamp FP 2000. Apocynin inhibits peroxynitrite formation by murine macrophages. *British Journal of Pharmacology* 130: 932 – 936.
- Mukbel RM, Patten Jr C, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene* 76: 669–675
- Muniz-Junqueira MI, Paula-Coelho VN 2008. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, *in vitro*. *International Immunopharmacology* 8: 1633-1638.
- Murphy RC, Gijón MA 2007. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *The Biochemical journal* 405: 379–395.
- Murray HW 1981. Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line. Correlation between intracellular killing and the generation of oxygen intermediates. *The Journal of experimental medicine* 153: 1690–1695.
- Murray HW, Nathan CF 1999. Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *The Journal of experimental medicine* 189: 741–746.

- Murray HW, Rubin BY, Rothermel CD 1983. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *The Journal of clinical investigation* 72: 1506–1510.
- Naderer T, McConville MJ 2008. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular microbiology* 10: 301–308.
- Nakamura M, Shimizu T 2011. Leukotriene receptors. *Chemical reviews* 111: 6231–6298.
- Narala VR, Adapala RK, Suresh MV, Brock TG, Peters-Golden M, Reddy RC 2010. Leukotriene B4 is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist. *The Journal of biological chemistry* 285: 22067–22074.
- Nicolette R, Secatto A, Pereira PAT, Soares EG, Faccioli LH 2009. Leukotriene B4-loaded microspheres as a new approach to enhance antimicrobial responses in *Histoplasma capsulatum*-infected mice. *International journal of antimicrobial agents* 34: 365–369.
- Nieves D, Moreno JJ 2006. Role of 5-lipoxygenase pathway in the regulation of RAW 264.7 macrophage proliferation. *Biochemical pharmacology* 72: 1022–1030.
- Noazin S, Modabber F, Khamesipour A, Smith PG, Moulton LH, Nasser K, Sharifi I, Khalil EAG, Bernal IDV, Antunes CMF, Kieny MP, Tanner M 2008. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine* 26: 6759–6767.
- Novais OF, Santiago RC, Khouri ABR, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A, Oliveira CI 2009. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *The Journal of Immunology* 183:8088-8098.
- Obata T, Okada Y, Motoishi M, Nakagawa N, Terawaki T, Aishita H 1992. *In vitro* antagonism of ONO-1078, a newly developed anti-asthma agent, against peptide leukotrienes in isolated guinea pig tissues. *Japanese journal of pharmacology* 60: 227–237.
- Ogunkolade BW, Colomb-Valet I, Monjour L, Rhodes-Feuillette A, Abita JP, Frommel D 1990. Interactions between the human monocytic leukaemia THP-1 cell line and Old and New World species of *Leishmania*. *Acta tropica* 47: 171–176.
- Ohnishi H, Miyahara N, Gelfand EW 2008. The role of leukotriene B(4) in allergic diseases. *Allergology international* 57: 291–298.
- Okamoto F, Saeki K, Sumimoto H, Yamasaki S, Yokomizo T 2010. Leukotriene B4 augments and restores Fc γ R2-dependent phagocytosis in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 285: 41113–41121.

Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA 2011. Acta Tropica Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica* 118: 87–96.

Ott VL, Cambier JC, Kappler J, Marrack P, Swanson BJ 2003. Mast cell-dependent migration of effector CD8⁺ T cells through production of leukotriene B₄. *Nature immunology* 4: 974–981.

Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug resistance updates* 7: 257–266.

O’Byrne PM, Gauvreau GM, Murphy DM 2009. Efficacy of leukotriene receptor antagonists and synthesis inhibitors in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 124: 397–403.

Palacios R, Osorio LE, Grajalew LF, Ochoa MT 2001. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia* species. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 64: 187–193.

Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Trotta T, Satalino R, Saccia M, Mitolo V, Brandonisio O 1999. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *International journal of clinical & laboratory research* 29: 122–127.

Panis C, Mazzuco TL, Costa CZF, Victorino VJ, Tatakihara VLH, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Cecchini R, Rizzo LV, Pinge-Filho P 2011. *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Experimental parasitology* 127: 58–65.

Parameswaran K, Watson R, Gauvreau GM, Sehmi R, O’Byrne PM 2004. The effect of pranlukast on allergen-induced bone marrow eosinophilopoiesis in subjects with asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 169: 915–920.

Park MS, Sohn MH, Kim K-E, Park MS, Namgung R, Lee C 2011. 5-Lipoxygenase-activating protein (FLAP) inhibitor MK-0591 prevents aberrant alveolarization in newborn mice exposed to 85% oxygen in a dose- and time-dependent manner. *Lung* 189: 43–50.

Passwell J, Shor R, Keren G, Messer G, El-On J 1984. Comparison of the effect of various stimuli on the leishmanicidal capacity of human monocytes *in vitro*. *Clinical and experimental immunology* 56: 553–558.

Pereira LIA, Dorta ML, Pereira AJCS, Bastos RP, Oliveira MAP, Pinto SA, Galdino H, Mayrink W, Barcelos W, Toledo VPCP, Lima GMCA, Ribeiro-Dias F 2009. Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the

clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/Leishmania antigens. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 81: 378–383.

Peres CM, Aronoff DM, Serezani CH, Flamand N, Faccioli LH, Peters-Golden M 2007. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. *Journal of immunology* 179: 5454–5461.

Pettersson A, Richter J, Owman C 2003. Flow cytometric mapping of the leukotriene B4 receptor, BLT1, in human bone marrow and peripheral blood using specific monoclonal antibodies. *International immunopharmacology* 3: 1467–1475.

Pimenta PFP, Saraiva EMB, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks DL 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan *Proceedings of the National academy of sciences of USA* 91: 9155-9159.

Pinto-da-Silva LH, Camurate M, Costa KA, Oliveira SMP, Cunha-e-Silva NL da, Saraiva EMB 2002. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using Bauhinia purpurea lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. *International journal for parasitology* 32: 1371–1377.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *The Journal of clinical investigation* 91: 1390–1395.

Pérez-Cordero JJ, Lozano JM, Cortés J, Delgado G 2011. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. *Peptides* 32: 683–690.

Puentes SM, Sacks DL, Silva RP, Joiner KA 1988. Complement binding by two developmental stages of leishmania major promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine* 167: 887-902

Qiu H, Johansson A-S, Sjöström M, Wan M, Schröder O, Palmblad J, Haeggström JZ 2006. Differential induction of BLT receptor expression on human endothelial cells by lipopolysaccharide, cytokines, and leukotriene B4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 6913–6918.

Ramamoorthy R, Donelson JE, Paetz KE, Maybodi M, Roberts SC, Wilson ME 1992. Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donouani chagasi* promastigotes to an infectious form. *The Journal of Biological Chemistry* 267:1888-1895

Reiner NE, Malemud CJ 1985. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: *in vitro* evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. *Journal of immunology* 134: 556–563.

Rey JA, Travi BL, Valencia AZ, Saravia NG 1990. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex *in vivo* and *in vitro*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 43: 623–631.

Ribeiro-Dias F, Barbuto JAM, Tsujita M, Jancar S 2000. Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine spleen cells by MTT assay: differential inhibition by PGE and EDTA. *Journal of Immunological Methods* 241: 121–129.

Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B 2004. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *The Journal of biological chemistry* 279: 23668–23678.

Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG 2006. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *The Journal of infectious diseases* 193: 1375–1383.

Rosenthal LA, Sutterwala FS, Kehrli ME, Mosser DM 1996. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infection and Immunity* 64: 2206–2215.

Russel DG 1987. The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *European Journal of Biochemistry* 164: 213–221.

Russell DG, Wright SD 1988. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-gly-asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. *The Journal of Experimental Medicine* 168: 279–292.

Sacks D, Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews. Immunology* 2: 845–858.

Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, Moll H, Gillitzer R, Pérez-Torres A, Pérez-Montfort R, Domínguez JD, Velasco-Castrejón O, Crippa M, Becker I 1999. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Tropical medicine & international health* 4: 801–811.

Samuelsson B 1983. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220: 568–575.

Sarau HM, Ames RS, Chambers J, Ellis C, Elshourbagy N, Foley JJ, Schmidt DB, Muccitelli RM, Jenkins O, Murdock PR, Herrity NC, Halsey W, Sathe G, Muir AI,

- Nuthulaganti P, Dytko GM, Buckley PT, Wilson S, Bergsma DJ, Hay DW 1999. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Molecular pharmacology* 56: 657–663.
- Secatto A, Rodrigues LC, Serezani CH, Ramos SG, Dias-Baruffi M, Faccioli LH, Medeiros AI 2012. 5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection. *PloS one* 7: e31701.
- Serezani CHC, Aronoff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M 2005. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood* 106: 1067–1075.
- Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S 2006. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177: 3201–3208.
- Shimizu T 2009. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology* 49: 123–150.
- Shimizu T, Yokomizo T, Izumi T 2002. Characterization of two distinct types of leukotriene B4 receptor. *International Congress Series* 1233: 415–420.
- Shin EH, Lee HY, Bae Y-S 2006. Leukotriene B4 stimulates human monocyte-derived dendritic cell chemotaxis. *Biochemical and biophysical research communications* 348: 606–611.
- Showell HJ, Breslow R, Conklyn MJ, Hingorani GP, Koch K 1996. Characterization of the pharmacological profile of the potent LTB4 antagonist CP-105,696 on murine LTB4 receptors in vitro. *British journal of pharmacology* 117: 1127–1132.
- Showell HJ, Pettipher ER, Cheng JB, Breslow R, Conklyn MJ, Farrell CA, Hingorani GP, Salter ED, Hackman BC, Wimberly DJ 1995. The *in vitro* and *in vivo* pharmacologic activity of the potent and selective leukotriene B4 receptor antagonist CP-105696. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 273: 176–184.
- Silva RC, Landgraf MA, Hiyane MI, Pacheco-Silva A, Câmara NO, Landgraf RG 2010. Leukotrienes produced in allergic lung inflammation activate alveolar macrophages. *Cellular physiology and biochemistry* 26: 319–326.
- Silva R, Sacks DL 1987. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and immunity* 55: 2802–2806.
- Silveira FT, Lainson R, Castro Gomes CM De, Laurenti MD, Corbett CEP 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.)*

amazonensis in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology* 31: 423–431.

Singh RK, Gupta S, Dastidar S, Ray A 2010. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology* 85: 336–349.

Singh B, Sundar S 2012. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* 30: 3834–3842.

Siqueira-Neto JL, Moon S, Jang J, Yang G, Lee C, Moon HK, Chatelain E, Genovesio A, Cechetto J, Freitas-Junior LH 2012. An Image-Based High-Content Screening Assay for Compounds Targeting Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes in Human Macrophages. *PLoS neglected tropical diseases* 6: e1671.

Soares RPP, Cardoso TL, Barron T, Araújo MSS, Pimenta PFP, Turco SJ 2005. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International journal for parasitology* 35: 245–253.

Souza AS, Giudice A, Pereira JM, Guimarães LH, Jesus AR de, Moura TR de, Wilson ME, Carvalho EM, Almeida RP 2010. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. *BMC infectious diseases* 10: 209.

Souza-Neto SM, Carneiro CM, Vieira LQ, Afonso LCC 2004. *Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 289–294.

Stefanska J, Pawliczak R 2008. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators of inflammation* 2008: 106507.

Tada H, Shiho O, Kuroshima KI, Koyama M, Tsukamoto K 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *Journal of Immunological Methods* 93: 157–165

Tager AM, Bromley SK, Medoff BD, Islam SA, Bercury SD, Friedrich EB, Carafone AD, Gerszten RE, Luster AD 2003. Leukotriene B₄ receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nature immunology* 4: 982–990.

Tager AM, Dufour JH, Goodarzi K, Bercury SD, Andrian UH von, Luster AD 2000. BLTR mediates leukotriene B₄-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. *The Journal of experimental medicine* 192: 439–446.

Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, Teixeira MM 2002. Leukotriene B₄ induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infection and immunity* 70: 4247–4253.

Thivierge M, Doty M, Johnson J, Stanková J, Rola-Pleszczynski M 2000. IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *Journal of immunology* 165: 5221–5226.

Thivierge M, Stankova J, Rola-Pleszczynski M 2006. Toll-like receptor agonists differentially regulate cysteinyl-leukotriene receptor 1 expression and function in human dendritic cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 117: 1155–1162.

Thivierge M, Stanková J, Rola-Pleszczynski M 2001. IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *Journal of immunology* 167: 2855–2860.

Tohda Y, Nakahara H, Kubo H, Haraguchi R, Fukuoka M, Nakajima S 1999. Effects of ONO-1078 (pranlukast) on cytokine production in peripheral blood mononuclear cells of patients with bronchial asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 29: 1532–1536.

Trez C, Magez S, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Muraille E 2009. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS pathogens* 5: 1-13.

Turner CR, Breslow R, Conklyn MJ, Andresen CJ, Patterson DK, Lopez-Anaya A, Owens B, Lee P, Watson JW, Showell HJ 1996. *In vitro* and *in vivo* effects of leukotriene B4 antagonism in a primate model of asthma. *The Journal of clinical investigation* 97: 381–387.

Ueno N, Wilson ME 2012. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in parasitology* 1122: 1-10.

Vargas-Inchaustegui DA, Hogg AE, Tulliano G, Llanos-Cuentas A, Arevalo J, Endsley JJ, Soong L 2010. CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania braziliensis* infection. *Infection and immunity* 78: 301–308.

Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Bécherel P, Debré P, Moncada S, Mossalayi MD 1995. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 7804–7808.

Ximenes VF, Kanegae MPP, Rissato SR, Galhiane MS 2007. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 457: 134–141.

Walton BC, Shaw JJ, Lainson R 1977. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. *The Journal of parasitology* 63: 1118–1119.

Wan M, Sabirsh A, Wetterholm A, Agerberth B, Haeggstro JZ 2007. Leukotriene B₄ triggers release of the cathelicidin LL-37 from human neutrophils : novel lipid-peptide interactions in innate immune responses. *The FASEB Journal* 21: 2897–2905.

Watanabe S, Yamasaki A, Hashimoto K, Shigeoka Y, Chikumi H, Hasegawa Y, Sumikawa T, Takata M, Okazaki R, Watanabe M, Yokogawa T, Yamamura M, Hayabuchi T, Gerthoffer WT, Halayko AJ, Shimizu E 2009. Expression of functional leukotriene B₄ receptors on human airway smooth muscle cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 124: 59–65.e1–3.

Wilson ME, Pearson RD 1988. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infection and Immunity* 56: 363-369.

Wirth JJ, Kierszenbaum F 1985a. Stimulatory effects of leukotriene B₄ on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of immunology* 134: 1989–1993.

Wirth JJ, Kierszenbaum F 1985b. Effects of leukotriene C₄ on macrophage association with and intracellular fate of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* 15: 1–10.

Woo CH, Eom YW, Yoo MH, You HJ, HanHJ, Song WK, Yoo YJ, Chun JS, Kim JH 2000a. Tumor Necrosis Factor- α Generates Reactive Oxygen Species via aCytosolic Phospholipase A₂-linked Cascade. *The Journal Of Biological Chemistry* 275: 32357-323562.

Woo CH, Lee ZW, Kim BC, Ha KS, Kim JH 200b. Involvement of cytosolic phospholipase A₂, and the subsequent release ofvarachidonic acid, in signalling by Rac for the generation of intracellular reactive oxygen species in Rat-2 fibroblasts. *The Biochemical Journal* 348: 525-530

Woo C-H, You H-J, Cho S-H, Eom Y-W, Chun J-S, Yoo Y-J, Kim J-H 2002. Leukotriene B₄ stimulates Rac-ERK cascade to generate reactive oxygen species that mediates chemotaxis. *The Journal of biological chemistry* 277: 8572–8578.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO 2005. *Leishmaniasis*. Disponível em: <Who.int/ tdr/dw/leish2005.htm>. Acessado em 20 junho de 2012

Worm EV, Beukelman CJ, Berg AJJV, Kroes BH, Labadie RP, Dijk HV 2001. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *European Journal of Pharmacology* 433: 225– 230.

- Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, Ramirez L, Croft S, Arevalo J, Adaui V, Bermudez H, Decuypere S, Dujardin J-C 2006. American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *The Journal of infectious diseases* 194: 1168–1175.
- Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T 1997. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 387: 620–624.
- Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T 2001. Leukotriene B₄: metabolism and signal transduction. *Archives of biochemistry and biophysics* 385: 231–241.
- Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T 2000. A second leukotriene B₄ receptor, BLT₂. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *The Journal of experimental medicine* 192: 421–432.
- Yong EC, Chi EY, Henderson WR 1994. *Toxoplasma gondii* alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon gamma-induced antitoxoplasma activity. *The Journal of experimental medicine* 180: 1637–1648.
- Yuan Y-M, Fang S-H, Qian X-D, Liu L-Y, Xu L-H, Shi W-Z, Zhang L-H, Lu Y-B, Zhang W-P, Wei E-Q 2009. Leukotriene D₄ stimulates the migration but not proliferation of endothelial cells mediated by the cysteinyl leukotriene cyslt(1) receptor via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Journal of pharmacological sciences* 109: 285–292.
- Zarley JH, Britigan BE, Wilson ME 1991. Hydrogen peroxide-mediated toxicity for *Leishmania donovani chagasi* promastigotes. Role of hydroxyl radical and protection by heat shock. *The Journal of clinical investigation* 88: 1511–1521.
- Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Pereira LIA, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SRB 2010. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 15: 68–76.
- Zerpa O, Ulrich M, Blanco B, Polegre M, Avila A, Matos N, Mendoza I, Pratlong F, Ravel C, Convit J 2007. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *The British journal of dermatology* 156: 1328–1335.
- Zhu J, Qiu Y-S, Figueroa DJ, Bandi V, Galczenski H, Hamada K, Guntupalli KK, Evans JF, Jeffery PK 2005. Localization and upregulation of cysteinyl leukotriene-1 receptor in asthmatic bronchial mucosa. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 33: 531–540.

ANEXO 1 : TERMO DE CONSENTIMENTO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), em uma pesquisa, por ser um doador de sangue sadio. Meu nome é.. sou um dos pesquisadores do projeto e minha área de atuação é Imunologia. Após ler com atenção este documento, ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine em todas as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias e também será assinado por mim, pesquisador, em todas as folhas. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, Dr^a. Fátima Ribeiro Dias nos telefones: Laboratório de Imunidade Natural/IPTSP: 062-3209 6116; residência: 62 3225 3751. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: 32 69 83 38 – 32 69 84 26 ou no endereço: 1^a Avenida S/Nº Setor Leste Universitário, Unidade de Pesquisa Clínica, 2º andar. INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE A PESQUISA:

- **Título:** Avaliação dos efeitos do leucotrieno B4 na infecção de macrófagos humanos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis* (Associado ao projeto: Banco imunológico de leishmanias (Leishbank) da região Centro-Oeste).
- **Informações sobre quem está aplicando o termo de consentimento:** Camila Imai Morato, pesquisadora da equipe do projeto
- **Objetivos da pesquisa:** Neste estudo pretendemos entender melhor como as pessoas que têm leishmaniose, doença que acontece em seres humanos e cães, se defendem da doença;
- **Detalhamento dos procedimentos:** Uma das formas que podemos fazer para entender melhor a doença é estudando o sangue das pessoas que tem a doença e comparando com o das que não tem. A sua colaboração nesse sentido, seria a doação de cerca de 10 mL de sangue. A quantidade será obtida da colheita da bolsa de sangue, não sendo necessária uma nova coleta e o material será colhido uma única vez; seu sangue será utilizado imediatamente e não será estocado para outros trabalhos.
- **Riscos causados pela pesquisa:** Pesquisa de risco mínimo
- Ressaltamos que sua participação é voluntária e não irá além da coleta dos 10 mL de sangue que será levada para o Laboratório do IPTSP, não havendo nenhum tipo de risco à sua saúde ou integridade física, a não ser os riscos

mínimos de uma doação de sangue. Entretanto, caso algum dano a sua pessoa seja causado pelo desenvolvimento desta pesquisa, você tem o direito de solicitar indenização pelo dano causado.

- Não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela sua participação

- **Benefícios decorrentes da participação na pesquisa:** Não haverá nenhum benefício direto a sua pessoa por esta pesquisa, porém, você estará contribuindo para estudos que tentam melhorar a qualidade de vida de pessoas com leishmaniose ou para prevenir contra a doença.

- **Período de participação do sujeito na pesquisa:** A sua colaboração seria apenas a doação de cerca de 10 mL de sangue uma única vez, não sendo necessária uma nova coleta, assim encerrando a sua participação na pesquisa.

- **Sigilo:** os resultados obtidos serão publicados em congressos e revistas especializadas, onde não terá nenhuma informação capaz de fazer a sua identificação. Garantido, assim, sigilo de sua participação.

- Garantimos a expressão de liberdade de não aceitação, bem como o de retirar o consentimento de nossa pesquisa a qualquer momento.

- Os dados coletados serão utilizados apenas para esta pesquisa e não serão armazenados para estudos futuros.

Nome e Assinatura do pesquisador

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____, RG/ CPF/ nº de prontuário/ nº de matrícula _____, abaixo assinado,

concordo em participar do estudo **Avaliação dos efeitos do leucotrieno B4 na infecção de macrófagos humanos com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis* (Associado ao projeto: Banco imunológico de leishmanias (Leishbank) da região Centro-Oeste)**, sob a responsabilidade do Dr^a Fátima Ribeiro Dias, como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Camila Imai Morato sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade.

Local e data

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável:

Assinatura Dactiloscópica:



Nome e assinatura do Pesquisador Responsável

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

• Observações complementares:

ANEXO 2 : MANUSCRITO

Leucotrieno B₄ aumenta os mecanismos microbicidas de macrófagos humanos contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*: diminuição dos receptores BLT1 contribui para a permanência dos parasitos nos macrófagos

Camila Imai Morato, Ildelfonso Alves da Silva Jr, Arissa Felipe Borges, Miriam Leandro Dorta, Milton Adriano Pelli de Oliveira, Sonia Jancar, Carlos Henrique Serezani, Fátima Ribeiro-Dias

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, EUA

Autor para correspondência: Profa. Dra. Fátima Ribeiro-Dias, Setor de Imunologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás – Rua 235 S/N – Setor Universitário – Goiânia – GO, Brasil; 74605-050; fone: (55) 62 3209 6116; Fax: (55) 62 2309 6363; e-mail: fatimardias@gmail.com; fdias@iptsp.ufg.br.

Resumo

A infecção de macrófagos humanos com *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem sido pouco estudada e não é conhecido se os leucotrienos, mediadores lipídicos produzidos por macrófagos, podem modular a infecção destas células por este parasito. Neste trabalho, foi avaliada a contribuição do LTB₄ no controle da infecção de macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis* e a expressão do receptor para este mediador (BLT1) nos macrófagos infectados. Macrófagos humanos foram derivados de monócitos do sangue periférico e infectados com formas promastigotas durante 4 h ou 48 h. Os tratamentos com MK0591 (inibidor de síntese de leucotrienos) ou CP105,696 (antagonista de BLT1) aumentaram o índice de infecção, após 4 h ou 48 h de incubação ($p < 0,05$). Por outro lado, a adição de LTB₄ às culturas diminuiu a infecção dos macrófagos (4 h e 48 h, $p < 0,05$). Os macrófagos infectados não responderam mais ao LTB₄ após 24 h de incubação. Os parasitos induziram a produção de LTB₄ nas culturas de macrófagos nos primeiros 30 min, caindo esta produção após 4 h ($p < 0,05$). Inibidores de ROI (apocinina) aumentou significativamente a infecção de macrófagos antes ou após a ativação com LTB₄. Houve produção de ânion superóxido induzida pelos parasitos e aumentada pelo LTB₄. A expressão de BLT1 diminuiu significativamente após 6 h (RNAm) e 24 h (proteína) de infecção dos macrófagos ($p < 0,05$). Os resultados sugerem que os macrófagos humanos produzem LTB₄ após a infecção com *L. (V.) braziliensis*. O LTB₄ aumenta a atividade microbicida dos macrófagos, desde as primeiras horas da infecção, diminuindo a infecção. Os resultados sugerem que

há produção de ROI após infecção com *L. (V.) braziliensis* e que o LTB₄ aumenta a atividade microbicida dos macrófagos via aumento da produção de ROI. No entanto, a infecção causa uma diminuição de BLT1, favorecendo o escape do parasito e garantindo a sobrevivência do mesmo nos macrófagos. Entender a participação dos leucotrienos no controle da infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis* pode levar à descoberta de novos alvos terapêuticos para a leishmaniose tegumentar americana.

Palavras-chaves: *Leishmania braziliensis*, macrófagos humanos, leucotrienos, ROI

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, podendo apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* e da relação entre o parasito e o hospedeiro. Nas Américas ou Novo Mundo, várias espécies causam LTA, sendo que no Brasil, *L. (Viannia) braziliensis* é a espécie mais prevalente, que causa a leishmaniose cutânea (LC) e a forma clínica mais grave da LTA, a leishmaniose mucosa (LM), que atinge as mucosas nasal e orofaríngea. Alvar et al. (2012) relataram que os dez países com os mais elevados números de casos de LC são Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, o Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, juntos, eles respondem por 70 a 75% da incidência global estimada. O tratamento da LTA tem como fármaco de primeira escolha o antimonial pentavalente, existente sob a forma de N-metilglucamina, comercializado no Brasil. Não havendo resposta satisfatória ao tratamento com antimonial pentavalente, os fármacos de segunda escolha são a anfotericina B e as pentamidinas, consideradas mais eficazes do que os antimoniais no tratamento de lesões mucosas. Enquanto pacientes com LCL, com lesões cutâneas únicas ou múltiplas, apresentam cura espontânea ou boa resposta ao tratamento, aqueles com LM, concomitantes lesões cutânea e mucosa ou lesão mucosa desenvolvida secundariamente à lesão cutânea, apresentam lesões que são altamente destrutivas e não respondem bem ao tratamento, ou mesmo quando ocorre a cicatrização, as recidivas são frequentes (Silveira et al. 2009). A falha no tratamento pode ser devida às próprias características intrínsecas do

parasito, que podem expressar genes ligados à resistência (Guimond et al. 2003). Além das dificuldades com a terapia da LTA, não há, ainda, uma vacina eficaz, que possa prevenir a doença (Noazin et al. 2008; Evans & Kedzierski 2012; Singh & Sundar 2012).

Os leucotrienos são mediadores lipídicos da inflamação, sendo que a sua biossíntese começa apenas após estimulação celular, quando as células ou tecidos são expostos a estímulos fisiológicos e patológicos (Crooks & Stockley 1998; Murphy & Ginjón 2007). Os leucotrienos são predominantemente produzidos por células inflamatórias, como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos, basófilos e mastócitos (Singh et al. 2010; Nakamura & Shimizu 2011). Os leucotrienos agem em receptores acoplados a proteína G, sendo claramente descritos como importantes mediadores das respostas inflamatórias. O primeiro receptor do LTB_4 a ser clonado e caracterizado foi denominado BLT1, que é o receptor de alta afinidade. Em seres humanos, o receptor BLT1 é exclusivamente expresso em células inflamatórias, tais como neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, macrófagos, linfócitos B e T (Yokomizo et al. 1997; Shimizu et al. 2002; Pettersson et al. 2003; Tager et al. 2003; Nakamura & Shimizu 2011). Várias funções dos leucotrienos vem sendo, descritas, dentre estas, a participação no controle e eliminação de vários microrganismos como bactérias, vírus e protozoários. Estudos demonstraram a participação do LTB_4 endógeno no aumento da fagocitose de bactérias opsonizadas e aumento da atividade bactericida de macrófagos. Além disso, os leucotrienos podem auxiliar na indução da liberação de potentes agentes antimicrobianos, que estariam participando do controle de vírus e bactérias, como, por exemplo, peptídeos antimicrobianos tais como defensinas,

catelicidinas e neurotoxina derivada de eosinófilo. Os leucotrienos também induzem a migração e ativação de leucócitos, produção de fator de necrose tumoral (TNF) e de reativos intermediários de oxigênio (ROI) (Mancuso et al. 2001; Talvani et al. 2002; Serezani et al. 2005; Serezani et al. 2006; Flamand et al. 2007).

Pouco se sabe sobre a infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis* e não é conhecido se os leucotrienos são produzidos durante esta infecção e se poderiam modular a infecção, contribuindo para o controle do parasito. No presente trabalho, o objetivo foi avaliar se os leucotrienos, especialmente o leucotrieno B₄ (LTB₄), modulam a infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo dos parasitos *in vitro*.

O isolado MHOM/BR/2003/IMG, da espécie *L. (V.) braziliensis*, presente no *Leishbank*, o Banco Imunobiológico de leishmânias da região Centro-Oeste (IPTSP/Universidade Federal de Goiás, Brasil), é oriundo de paciente com leishmaniose cutânea localizada. Os parasitos encontram-se preservados em nitrogênio líquido, congelados em soro fetal bovino (SFB), contendo 10% de dimetilsulfóxido de sódio (DMSO, Sigma Chem. Co. St. Louis, MD, EUA). Após descongelamento, os parasitos foram cultivados em meio Grace (Grace's Insect Medium, Sigma) completo, suplementado com 20% de SFB (Cripion Biotecnologia, Brasil) inativado, 2 mM de L-glutamina (Sigma), 100 U/mL de penicilina (Sigma) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), a 26°C. Os parasitos foram repicados de três em três dias, sempre iniciando a cultura com 5×10^5 parasitos/mL. Uma pequena alíquota da cultura era diluída em solução salina tamponada com fosfatos (PBS, phosphate-buffered saline), contendo formalina a 0,3% e os parasitos, quantificados em hematocitômetro, para estabelecer o repique, que foi realizado no máximo seis vezes.

Separação de monócitos do sangue periférico e derivação dos macrófagos.

As amostras de sangue venoso (cerca de 10 mL), obtidas de doadores saudáveis (n = 83), que não estavam fazendo uso de medicamentos (Comitê de Ética em Pesquisa do HC/UFG-Protocolo: 190/2011), foram colhidas em tubos à vácuo (Greiner bio-one, Vacuette, Americana, SP, Brasil), contendo solução

de EDTA. Para obter as células mononucleares (CMN), o sangue foi centrifugado (200 g, por 5 minutos, temperatura ambiente), para eliminar o plasma. Em seguida, o sangue foi diluído volume/volume com PBS-EDTA 0,01 mM pH 7,3 e, então, foi aplicado sobre gradiente de densidade de sílica coloidal revestida por polivinilpirrolidona (Percoll, Sigma). As CMN foram distribuídas em placas de 24 poços (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Deckglaser, Braunschweig, Alemanha), na concentração de 2×10^5 células/500 μ L de meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 15% de SFB (Gibco, Brasil), 11 mM de bicarbonato de sódio e 2 mM de L-glutamina. Para a derivação dos macrófagos (5 dias), o meio foi trocado a cada 48 h (meio RPMI completo contendo 15% de SFB), sendo as células mantidas a 36°C, 5% de CO₂. Após este período, os macrófagos foram infectados com os parasitos.

Infecção dos macrófagos.

As formas promastigotas (6^o dia de cultura, fase estacionária inicial) foram ressuspensas em meio RPMI completo (1×10^8 parasitos/mL) e foram adicionados aos macrófagos na proporção de $\sim 10:1$ (parasito:célula). As placas foram incubadas a 36 °C, 5% de CO₂ por 4 h, lavadas 3 vezes com meio RPMI completo, a 37°C, para retirar o excesso de parasitos, e o meio foi repostado em todos os poços. As lamínulas foram colhidas após 4 h, 24 h, 48 h ou 72 h de cultura, sendo as células coradas com o Kit comercial Instant Prov (Newprov, Pinhais, PR, Brasil). Em seguida, as lamínulas foram fixadas sobre lâminas para microscopia, usando Entellan Novo (Merck KgaA, Damstadt, Alemanha) e sob microscopia de luz (aumento de 1.000 vezes), foi

determinada a frequência de células infectadas (300 células analisadas) e o número médio de parasitos por célula infectada (mínimo de 50 células infectadas avaliadas). O índice de infecção foi obtido multiplicando-se a porcentagem de células infectadas pelo número médio de parasitos por células infectadas.

Modulação da infecção dos macrófagos por leucotrienos endógenos.

Para avaliação do efeito dos leucotrienos endógenos na infecção, os macrófagos foram tratados com MK0591 (inibidor da FLAP, Merck, KgaA, Damstadt, Alemanha) ou CP105,696 (bloqueador do receptor BLT1, Pfizer, Groton, CT, EUA). Os compostos (MK0591 e CP105,696 10^{-3} M), foram dissolvidos em DMSO, veículo do composto e estocados a -80°C até o momento de uso. Para os experimentos, os compostos foram diluídos em meio RPMI contendo 15 % de SFB (10^{-4} M) e adicionados às culturas dos macrófagos, em diferentes concentrações, 30 min antes da infecção com os parasitos. O DMSO foi adicionado como controle nas mesmas concentrações dos compostos diluídos. Foram comparados os resultados de culturas tratadas com os de culturas contendo somente o veículo (referido nas figuras como Meio). Nos experimentos de 48 h, após a lavagem (4 h), em alguns experimentos os compostos não foram repostos, mas em outros houve reposição após a lavagem e, então, re-incubação. Após 4 h ou 48 h de incubação, as lamínulas foram retiradas, sendo as células fixadas, coradas e avaliadas quanto à infecção, como descrito acima.

Dosagem de LTB₄.

Os macrófagos foram infectados como descrito acima, tendo sido pré-tratados ou não com o inibidor de síntese MK0591 (30 min). Após adição dos parasitos, as culturas foram incubadas até 4 h. O sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C e depois, então, realizado o ensaio imunoenzimático de dosagem de LTB₄, seguindo as instruções do fabricante do kit (EIA, *enzymatic immuno assay*, Cayman Chem. Co., Ann Arbor, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mL e o limite de detecção foi de 13 pg/mL.

Modulação da infecção dos macrófagos por leucotrienos exógenos.

Para avaliação do efeito dos leucotrienos exógenos, os macrófagos foram tratados com LTB₄ (Cayman), o qual foi dissolvido em etanol (3×10^{-4} M), sendo então diluído em PBS e adicionado às culturas dos macrófagos (10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M) durante a infecção com os parasitos (4 h). Em alguns experimentos com incubação por até 48 h, após a infecção por 4 h e a lavagem, o LTB₄ foi repostado. Ainda, para observar o efeito do LTB₄ na atividade leishmanicida dos macrófagos, o LTB₄ foi adicionado após 4 h ou 24 h de infecção. As culturas controles continham etanol na mesma concentração utilizada nas culturas tratadas com LTB₄ (referido como Meio). Após incubação, as células foram coradas e avaliadas quanto à infecção, como descrito acima.

Avaliação da participação de ROI no controle da infecção.

Os macrófagos foram tratados com Apocinina (inibidor da NADPH oxidase, Sigma), a qual foi dissolvida em DMSO (500 mM), no momento do

uso. Para os experimentos, foi diluída em meio RPMI completo e adicionada às culturas dos macrófagos, em diferentes concentrações, 30 min antes da incubação com os parasitos e do tratamento com LTB₄ (10⁻⁷ M). A maior concentração usada de apocinina foi 10⁻³ M. Foram comparados os resultados de culturas tratadas com os de culturas incubadas com meio contendo DMSO (referido como Meio). Nos experimentos de 48 h, após a lavagem (4 h), os compostos foram repostos, e, então, as placas foram re-incubadas. Após 4 h ou 48 h de incubação, as células foram coradas e avaliadas quanto à infecção, como descrito acima.

Avaliação da produção de ROI por macrófagos incubados com *L. (V.) braziliensis*.

A técnica do NBT (azul de nitro tetrazólio, *nitro blue tetrazolium*), foi adaptada a partir da técnica descrita por Muniz-junqueira & Paula-Coelho (2008), para avaliar a produção de ânion superóxido (O₂⁻). Os macrófagos foram incubados 30 min antes da infecção, na ausência ou presença de apocinina (10⁻⁴ M), MK0591 (10⁻⁶ M) ou CP-105,696 (10⁻⁶ M). Em seguida, os macrófagos foram incubados com os parasitos e tratados com LTB₄. Após 1 h, os macrófagos foram tratados com uma solução Hanks-Tris contendo 0,05% de NBT (Sigma) por 20 min, 36°C, 5% de CO₂. As lâminas foram então lavadas, fixadas com metanol e coradas com uma solução de safranina 1,4% de glicerol e 28,6% em água destilada. A porcentagem de macrófagos que reduziu o NBT foi avaliada sob microscopia de luz. Os resultados foram expressos em % de células positivas.

Modulação da expressão do receptor leucotrieno B₄ (BLT1) durante infecção *in vitro* com *Leishmania (V.) braziliensis*.

Para avaliação do efeito da infecção *in vitro* com *L. (V.) braziliensis* na modulação da expressão do receptor BLT1, os macrófagos humanos foram infectados com os parasitos, como descrito acima, e após 6 h ou 24 h, a expressão do receptor BLT1 foi avaliada por RT-PCR e Western blotting. Após 6 h de incubação com os parasitos, as culturas de macrófagos foram lavadas 3x com PBS aquecido (37°C) e o RNA foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA) e congeladas a -80°C até o momento de uso. Após descongelamento, as amostras foram homogeneizadas com 200 µL de clorofórmio (proporção 2:1) e incubadas 10 min no gelo. Em seguida, a mistura foi centrifugada à 12.000 g por 15 min, a 4°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo contendo o mesmo volume de isopropanol. As soluções foram agitadas até a homogeneização, centrifugadas novamente a 14.000 g por 20 min, a 4°C. O sedimento foi lavado com 600 µL de etanol gelado a 70% e submetido à nova centrifugação de 14.000 g, 15 min, a 4°C. O RNA foi dissolvido em 15 µL de água livre de RNase. Após esta etapa, foi realizada a síntese do cDNA, utilizando-se o kit Revert Aid TM First Strand cDNA Synthesis (Thermo scientific, Waltham, MA , USA) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA sintetizado foi utilizado para reação de PCR quantitativa, adicionando-se 8 ng de cDNA de cada amostra no PCR-mastermix (Power SyBr® Green, AppliedBiosystems, Warrington, UK) contendo os primers específicos para BLT1 humano (primer sense 5'-TATGTCTGCGGAGTCA-GCATGTACGC-3' e antisense 5'

CCTGTAGCCGACG CCCTATGTCCG) ou gene controle GAPDH (primer sense GAGTCAACGGAT TTGGTCGT; anti-sense TTGATTTTG GAGGGATCTCG). A PCR em tempo real foi realizada utilizando o aparelho Stratagene Mx3005PTM QPCR Systems (Santa Clara, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A expressão relativa dos genes foi calculada pela metodologia $2^{-\Delta\Delta C(T)}$, como descrito por Livak & Schmittgen (2001).

Após 24 h de incubação com os parasitos, as culturas de macrófagos foram lavadas 3x com PBS aquecido (37°C), seguido da lise das células utilizando tampão RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0, 1% NP₄O, 0,5% Deoxicolato de sódio, 0,1% SDS) e quantificação das proteínas utilizando kit BCA (Pierce, Rockford, IL, EUA). Volumes correspondentes a 20 µg de proteínas foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% na presença de dodecilsulfato de sódio a 1% (SDS-PAGE), sob corrente de 25 mA (~3 a 4 h). Solução padrão de proteínas foi usada como referência de massa molecular. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; metanol 20%), a 150 mA (50V), 2 h. Em seguida, a membrana teve seus sítios inespecíficos bloqueados pela incubação com solução de soroalbumina bovina (BSA) a 2% em tampão Tris-salina (TBST). 1 h, sondada com anticorpo primário específico para BLT1 (20 µg/mL, Enzo Life Science, São Caetano do Sul, SP, Brasil) durante 15-18 h, 4°C. As membranas foram sondadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-rabbit-HRP-conjugado, 100 µg/mL, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA), 2 h em solução TBST. A visualização foi realizada com o sistema de quimioluminescência

(ECL, Santa Cruz Biotechnology). Utilizaram-se filmes de raios-X Kodak T-MAT, revelador e fixador Kodak em concentrações apropriadas. As bandas foram quantificadas por análise computadorizada de imagem (com auxílio do software ImageJ versão 1.32j, NHI) onde a densidade ótica de cada banda foi aferida. Como controle da quantidade de proteína submetida à eletroforese, as membranas já reveladas foram sondadas novamente para β -actina (sigma, 1:30000). Os dados são mostrados como unidade arbitrária da relação entre as densidades óticas obtidas para BLT1/ β -actina.

Análises estatísticas.

Os dados são apresentados como mediana, valores mínimos e máximos e interquartis. Os resultados foram avaliados pelo teste de Mann Whitney ou pelo teste pareado de Wilcoxon. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. As análises foram realizadas usando *GraphPad Prism 5.0 Software* (San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

Inibição de leucotrienos endógenos aumenta a infecção de macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis*

Os macrófagos foram incubados com os parasitos por 4 h, sendo, em seguida, lavados para retirar o excesso de parasitos extracelulares e incubados por até 96 h. São apresentados os resultados das análises após 4 h e 48 h de infecção. Os parasitos infectaram os macrófagos humanos, sendo observada, após cada período de incubação, uma elevada variabilidade individual na porcentagem de células infectadas (Fig. 1A), no número médio de parasitos por célula (Fig. 1B) e, consequentemente, no índice de infecção (Fig. 1C). Apesar disto, foi demonstrado um aumento significativo do índice de infecção de 4 h para 48 h (110 vs 166, $p < 0,05$, Fig. 1). O índice de infecção diminuiu após 72 h de incubação, mas não de maneira significativa e ainda havia parasitos íntegros dentro dos macrófagos (índice de infecção 48 h vs 72 h: 127 [26 e 300] vs 78 [10 e 525]).

Para avaliar a possível participação dos leucotrienos endógenos na infecção por *L. (V.) braziliensis*, foi utilizado um inibidor de síntese de leucotrienos (MK0591) e um antagonista do receptor BLT1 (CP-105,696). Nenhuma concentração utilizada dos inibidores foi citotóxica, para as células ou para os parasitos (dados não mostrados). As culturas de macrófagos foram tratadas com MK0591 ou CP-105,696, em diferentes concentrações, por 30 min antes da infecção com os parasitos. Como pode ser visto na Figura 2, após 48 h de infecção, o tratamento com MK0591 aumentou significativamente a

porcentagem de células infectadas (Fig. 2A, $p < 0,05$), o número de parasitos por macrófago (Fig. 2B, $p < 0,05$), bem como o índice de infecção (Fig. 2C, $p < 0,05$), de maneira dependente da concentração. A concentração mais eficaz foi 10^{-6} M de MK0591 (índice de infecção Meio vs MK0591: 362 vs 581, $p < 0,05$, Fig. 2C). Sendo, então, esta concentração usada nos experimentos subsequentes. O bloqueio do receptor BLT1 também aumentou significativamente a infecção dos macrófagos (Fig. 2D; 2E; 2F), de maneira dependente da concentração. A concentração eficaz foi 10^{-6} M (índice de infecção Meio vs CP-105,696: 220 vs 428, $p < 0,05$, Fig. 2F), sendo esta concentração usada nos experimento subsequentes.

A inibição de FLAP com MK0591 10^{-6} M alterou, também, o índice de infecção nas primeiras horas de infecção (4 h). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens de células tratadas com MK0591 infectadas em relação às controles não tratadas (Fig. 3A), porém o número de parasitos por célula (Fig. 3B) e o índice de infecção (Fig. 3C) foram aumentados significativamente (índice de infecção Meio vs MK0591: 176,6 vs 223,5 $p < 0,05$, Fig. 3C). O bloqueio do receptor do LTB_4 (com CP-105,696 10^{-6} M) aumentou a infecção dos macrófagos com os parasitos *L. (V.) braziliensis* desde as primeiras 4 h de incubação. Como mostrado na Figura 3, foram observados aumentos significantes da porcentagem de células infectadas ($p < 0,05$, Fig. 3D), do número de parasitos por macrófagos ($p < 0,05$, Fig. 3E) e, conseqüentemente, do índice de infecção dos macrófagos (índice de infecção Meio vs CP-105,696: 110 vs 130 $p < 0,05$, Fig. 3F).

***Leishmania (Viannia) braziliensis* induz a produção de LTB₄ e este leucotrieno diminui a infecção de macrófagos humanos**

Os resultados com inibidores de leucotrienos sugeriram a produção de leucotrienos após infecção com *L. (V.) braziliensis*. De fato, houve uma significativa produção de LTB₄ após 30 min de incubação dos macrófagos com os parasitos (Meio vs Parasitos: 7,8 pg/mL vs 541 pg/mL, $p < 0,05$, Fig. 4A), a qual diminuiu significativamente após 4 h. Além disso, foi demonstrado que o composto MK0591 10^{-6} M estava sendo eficiente na inibição da síntese de LTB₄ induzida pelos parasitos ($p < 0,05$, Fig. 4B).

Para avaliar se a adição de LTB₄ exógeno modularia a infecção de macrófagos humanos pelos parasitos, foram realizados experimentos de concentração-resposta (Fig. 5). Os macrófagos foram tratados com LTB₄, em diferentes concentrações, no momento da adição dos parasitos. Após incubação por 4 h, as culturas foram lavadas e incubadas por até 48 h. Como pode ser visto na Figura 5, o tratamento com LTB₄ diminuiu significativamente a infecção dos macrófagos (Fig. 5A, 5B, 5C), de maneira dependente da concentração. A concentração mais eficaz foi 10^{-7} M (índice de infecção Meio vs LTB₄: 473 vs 195, $p < 0,05$, Fig. 5C), sendo esta concentração usada nos experimentos subsequentes. O tratamento com LTB₄ 10^{-7} M durante as primeiras horas de infecção com os parasitos (4 h), também diminuiu significativamente o índice de infecção, o que foi devido especialmente à diminuição do número de parasitos por célula (Fig. 5D, 5E, 5F). Para avaliar até que momento os macrófagos responderiam ao LTB₄ após a infecção, o LTB₄ 10^{-7} M foi adicionado às culturas após 4 h ou 24 h de incubação dos macrófagos com os parasitos e o índice de

infecção foi avaliado às 48 h de incubação. O índice de infecção diminuiu significativamente com o tratamento com o LTB₄ quando este foi adicionado após 4 h de infecção, o que foi devido à diminuição do número de parasitos por macrófagos (Fig. 6A, 6B, 6C). Após 24 h de infecção, todavia, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dados obtidos com macrófagos tratados e não tratados com LTB₄ (Índice de infecção Meio vs LTB₄: 145 [37 - 547] vs 86 [42 - 373], n = 9).

Avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio na atividade microbicida dos macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis*

Para avaliar se os ROIs seriam os responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis*, as culturas foram tratadas com um inibidor de NADPH oxidase, a Apocinina. Inicialmente, foram realizados experimentos concentração-resposta (dados não mostrados) e definida a concentração que possuía um efeito mais eficaz, a qual foi 10⁻⁴ M. As culturas de macrófagos foram tratadas com a apocinina (10⁻⁴ M), por 30 min antes da infecção com os parasitos. Os parasitos foram adicionados (~10:1), e as culturas incubadas por 4 h. Após a lavagem, a apocinina foi repostada ao meio e as culturas foram incubadas até 48 h. Como mostrado na Figura 7, o bloqueio da NADPH oxidase, promoveu um aumento da infecção, devido a um aumento no número de parasitos por célula (Fig. 7A, 7B e 7C).

Em seguida, para avaliar se a produção de ROI era responsável pelo aumento da atividade leishmanicida causado pelo LTB₄, os macrófagos foram tratados

com apocinina (10^{-4} M), 30 min antes da infecção com os parasitos. Os parasitos foram adicionados juntamente com LTB₄ e as culturas foram incubadas por 4 h. Após a lavagem, a apocinina e o LTB₄ foram repostos ao meio e as culturas foram incubadas até 48 h. Como mostrado na Figura 8, a apocinina reverteu o efeito inibidor do LTB₄ ($p < 0,05$) na porcentagem de células infectadas (4 h e 48 h, Fig. 8A; 8D), no número de parasitos por célula (Fig. 8B; 8E) e no índice de infecção (Fig. 8C; 8F).

Para avaliar se os macrófagos humanos eram capazes de produzir ROI, foi avaliada a produção de ânion superóxido por meio ensaio da redução do NBT. Os macrófagos foram infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com LTB₄, apocinina ou os compostos MK0591 e CP-105,696. Os resultados mostraram que os macrófagos, após incubação com os parasitos, produzem ânion superóxido (Fig. 9A). Esta produção tem uma tendência no aumento quando os macrófagos são tratados com LTB₄ durante a incubação com os parasitos (Fig. 9B). Além disso, os macrófagos, quando tratados com apocinina, tem reduzida a produção de ROI induzidas pelos parasitos (Fig. 9C) e aumentada pelo LTB₄ (Fig. 9D). A inibição de síntese de leucotrienos também diminui a produção de ROI induzida por *L. (V.) braziliensis* (Fig. 9E) e o bloqueio de BLT1, que inibe a ação de LTB₄ endógeno, inibiu a produção de ROI (Fig. 9F). Além disso, nestes experimentos a adição de LTB₄ às culturas não reverteu o efeito inibidor do tratamento com CP-105,696, indicando que o BLT1 foi eficientemente bloqueado (LTB₄ vs LTB₄ + CP105-696: 31% [16 e 50] vs 12,5% [5 e 24], $n = 3$).

Na Figura 10 são apresentadas fotomicrografias dos macrófagos infectados, na ausência ou presença dos tratamentos, a fim de mostrar os efeitos da ausência ou da presença dos leucotrienos endógenos e do LTB₄, bem como de ROI no controle da infecção.

***Leishmania (V.) braziliensis* diminui a expressão do receptor BLT1**

Para avaliar se a expressão do receptor do leucotrieno B₄ (BLT1) seria modulado durante a infecção de macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis*, a expressão do receptor foi avaliada por qRT-PCR (6 h após a adição dos parasitos) e Western blotting (24 h) após a adição dos parasitos). Houve uma diminuição relativa da expressão do RNAm para BLT1 após a infecção dos macrófagos em relação aos macrófagos não infectados ($p < 0,05$, Fig. 11A). A diminuição da mensagem para BLT1 refletiu-se na expressão proteica do receptor após 24 h de infecção ($p < 0,05$, Fig. 11B).

DISCUSSÃO

Neste trabalho, mostramos, pela primeira vez, que o LTB₄ é produzido durante a infecção de macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis* e contribui para o controle da infecção. Os macrófagos humanos foram infectados com o isolado IMG3, que faz parte do *Leishbank* (Banco de *Leishmania* da Universidade Federal de Goiás, Brasil), o qual foi isolado de paciente com leishmaniose cutânea localizada. O índice de infecção aumentou significativamente de 4 h para 48 h, o que foi devido especialmente a um aumento no número médio de parasitos por macrófagos, o que indica que estava havendo replicação dos parasitos dentro das células. Estes dados mostram que os macrófagos humanos são permissivos à infecção por *L. (V.) braziliensis*. Corroborando com os nossos dados, estudos com linhagens celulares de monócitos humanos demonstraram que estas células são infectadas com *L. (V.) braziliensis* (Ogunkolade et al. 1990; Zauli-Nascimento et al. 2010), bem como macrófagos humanos derivados de monócitos (Khoury et al. 2009; Giudice et al. 2012). Nossos dados demonstram que o isolado *L. (V.) braziliensis* IMG3 infecta os macrófagos humanos e sobrevivem dentro destes por um período de até 96 h (dados não mostrados).

A fim de avaliar a participação dos leucotrienos na infecção dos macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis*, no presente estudo, foram utilizados os compostos MK0591 (inibidor de FLAP), CP-105,696 (antagonista de BLT1) e o LTB₄. A inibição da produção de leucotrienos ou o bloqueio do BLT1 aumentou, de maneira dependente da concentração, a infecção dos macrófagos durante os períodos de 4 h e 48 h de incubação, sugerindo que o LTB₄ é rapidamente

produzido durante a infecção e deve ativar mecanismos microbicidas que contribuem para o controle da infecção. Serezani et al. (2006) publicaram, até o momento, o único trabalho que avalia a contribuição dos leucotrienos no controle da infecção por outra espécie de *Leishmania* do Novo Mundo, *L. (L.) amazonensis* *in vivo* e *in vitro*. Estes autores mostraram que os leucotrienos endógenos são importantes para o controle da infecção de macrófagos murinos por esta espécie de *Leishmania*. Demonstraram, ainda, que a adição de LTB₄ causou um aumento da atividade microbicida dos macrófagos murinos, via aumento da produção de NO. Portanto, os resultados do presente trabalho, somados ao de Serezani et al. (2006), indicam que os leucotrienos participam do controle da infecção de macrófagos com *Leishmania* do Novo Mundo.

Os resultados obtidos com a inibição da síntese de leucotrienos e bloqueio do receptor BLT1 indicaram que *L. (V.) braziliensis* poderia induzir a produção de LTB₄ em macrófagos humanos, assim, este leucotrieno foi, então, quantificado nos sobrenadantes das culturas desses macrófagos. De fato, foi verificada uma rápida produção de LTB₄ após interação macrófagos-parasitas, com uma queda progressiva das concentrações com o período de incubação, indicando a degradação do leucotrieno e/ou uma diminuição da produção destes mediadores com o tempo. Serezani et al. (2006) demonstraram que o LTB₄ foi gerado após a infecção com *L. (L.) amazonensis* em macrófagos de camundongos, sendo que havia uma maior produção de LTB₄ em macrófagos de camundongos resistentes, quando comparados com os de macrófagos de camundongos suscetíveis. Diferentemente do nosso trabalho, nos macrófagos de camundongos, a maior concentração de LTB₄ foi detectada após 24 horas

de infecção, sendo que no nosso trabalho a maior concentração foi detectada após 30 minutos e foi diminuindo ao longo do tempo. Os resultados do presente trabalho sugerem que o LTB₄ deve agir nas primeiras horas de infecção, para inibir ou diminuir o sucesso do estabelecimento da infecção dos macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis*. A produção de LTB₄ vem sendo relatada em outros modelos de infecção, tais como *Histoplasma capsulatum*; *Strongyloides venezuelensis*, sendo importante para a eliminação destes diferentes organismos (Medeiro et al. 2004; Machado et al. 2005). No presente estudo, a adição de LTB₄ aos macrófagos diminuiu o índice de infecção tanto após 4 h quanto 48 h, em acordo com os nossos resultados obtidos com os tratamentos com o inibidor de síntese de leucotrienos, bem como com o antagonista do receptor do LTB₄. A redução da infecção após 4 h pode ser devido a uma diminuição da fagocitose ou a um aumento da atividade microbida dos macrófagos. A adição de LTB₄ em culturas de macrófagos murinos aumenta a fagocitose de *T. cruzi*, por mecanismos desconhecidos (Wirth & Kierszenbaum 1985). É conhecido que o LTB₄ aumenta a fagocitose de macrófagos murinos, atuando em BLT1 que leva à ativação de proteína Gi, PI3K (*fosfatidil inositol-3-quinase*) e Rac quinase (Okamoto et al. 2010). Nós não sabemos por que a ativação dos macrófagos humanos com LTB₄ causa uma diminuição da fagocitose de *L. (V.) braziliensis*, mas pode ser especulado que a sinalização via BLT1 possa interferir na sinalização dos receptores usados para a fagocitose de *Leishmania*, tais como receptores para o Complemento ou outros receptores utilizados pelo parasito (Ueno & Wilson 2012), o que deve posteriormente ser investigado.

Neste trabalho, a diminuição da infecção dos macrófagos humanos pelos parasitos, após 4 h ou 48 h, pode ser devido ao aumento da ativação de mecanismos microbicidas pelo LTB₄. Serezani et al. (2006) relataram a participação de LTB₄ no controle da infecção por *L. (L.) amazonensis*. Eles demonstraram que a adição de LTB₄ diminui o índice de infecção em macrófagos de camundongos resistentes ou suscetíveis à infecção por *L. (L.) amazonensis*. Dados semelhantes foram descritos por Serezani et al. (2005), que demonstraram que a adição de LTB₄ aumenta a atividade microbicida de macrófagos alveolares de ratos, infectados com bactérias. Estes trabalhos demonstram a capacidade do LTB₄ em ativar macrófagos humanos para a destruição de protozoários. O presente trabalho, mostrando que o LTB₄ aumenta a atividade leishmanicida de macrófagos humanos, vem corroborar a idéia de que o LTB₄ induz atividade microbicida nos macrófagos, auxiliando no controle da infecção.

Para investigar a participação de ROI na atividade microbicida, em nossos experimentos, foi usado um inibidor de NADPH oxidase, a apocinina, o que tem por consequência a inibição da produção de ROI. Foi demonstrado um aumento significativo da infecção, sugerindo que essas moléculas são produzidas após infecção de macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis* e que estas participam da atividade microbicida dos macrófagos. Experimentos prévios tem demonstrado a importância dos ROI, tais como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (O₂⁻ e H₂O₂), no controle da infecção por espécies de *Leishmania*, em diferentes linhagens celulares de camundongos e humanos (Murray 1981; Murray et al. 1983). Os nossos resultados são similares aos de

Khouri et al. (2009) que mostraram um importante papel microbicida dos ROI em macrófagos humanos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Ainda, no presente trabalho, a apocinina reverteu o efeito inibidor do LTB₄ na atividade microbicida dos macrófagos, indicando que o LTB₄ aumenta a atividade microbicida induzida por *L. (V.) braziliensis*. A inibição de ROI diminuiu a infecção dos macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis* tanto nas primeiras horas de infecção quanto após 48 h, sugerindo que, a diminuição da infecção causada pelos leucotrienos durante 4 h pode não ser um efeito no processo da fagocitose em si, mas sim já indicar a morte dos parasitos durante este período.

Desde que a inibição de ROI aumentou a infecção dos macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis*, na ausência ou presença do leucotrieno, no presente trabalho, a produção de ROI foi avaliada pela técnica de redução do NBT. *Leishmania (V.) braziliensis* induziu a produção de ânion superóxido e o LTB₄ aumentou esta produção. Nossos resultados corroboram com os de Murray (1981) que utilizou a mesma técnica e demonstrou que as espécies *L. tropica* e *L. donovani* induzem a produção de ânion superóxido em uma linhagem de macrófagos murinos. Também, Khouri et al. (2009) mostraram a produção de ânion superóxido em macrófagos humanos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Aqui, demonstramos pela primeira vez que o LTB₄ aumenta a produção de ROI, via NADPH oxidase, induzida por *L. (V.) braziliensis* em macrófagos humanos. Vários trabalhos já relataram a produção de ROI induzida por leucotrienos (Serezani et al. 2005; Woo et al. 2000a; Woo et al. 2000b; Woo et al. 2002), porém os mecanismos pelos quais os leucotrienos

induzem ROI ainda não são bem esclarecidos. Serezani et al. (2005) relataram a indução da produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos alveolares de ratos, quando tratados com LTB₄. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que os leucotrienos induziram a translocação da subunidade p47phox para a membrana, via PKC-δ, sugerindo, assim, uma via de sinalização para a produção de peróxido de hidrogênio induzido por LTB₄. Alguns trabalhos sugeriram o envolvimento da produção de ROI de maneira dependente de Rac quinase, ativada de maneira dependente de AA e ativação de cPLA₂, o que pode envolver a via de produção de leucotrienos (Woo et al. 2000a, 2000b).

Em nossos experimentos, a adição do LTB₄ após 24 h de infecção dos macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis* não alterou significativamente a atividade microbicida dos macrófagos, indicando que os macrófagos infectados não eram mais responsivos ao LTB₄ neste período. Os resultados sugeriram que os parasitos poderiam estar diminuindo a expressão de BLT1, de modo a escapar da ativação dos macrófagos pelo LTB₄ e manter a infecção. Realmente, observamos que a infecção com *L. (V.) braziliensis* diminui a expressão do receptor de maior afinidade para LTB₄/BLT1 nos macrófagos humanos, tendo sido detectadas uma redução da expressão do RNAm e da proteína BLT1. Diminuir a expressão de BLT1 pode ser um mecanismo de escape da atividade microbicida induzida pela ação do LTB₄. Esta é a primeira vez que é demonstrado que a infecção de macrófagos humanos com *L. (L.) braziliensis* inibe a expressão de BLT1.

A partir dos resultados do presente trabalho, pode ser proposto que a infecção por *L. (V.) braziliensis* induz a produção de LTB₄ em macrófagos humanos, o

qual contribui para o controle da infecção desde as primeiras horas. A produção de LTB₄ é rápida e diminui após 4 h de infecção, sendo os efeitos nos mecanismos microbicidas detectados desde as primeiras horas e ainda com reflexo nas 48 h de infecção, mediados pela rápida produção de ROI. Após 24 h de infecção, ao adicionar o LTB₄ nas culturas, este passa a não ter efeito na atividade microbicida, sugerindo, então, que a leishmânia estaria tornando os macrófagos não responsivos a LTB₄, inibindo a expressão do receptor para LTB₄, o BLT1. Desta maneira, a leishmânia encontraria uma maneira de escapar da resposta do macrófago, sobrevivendo nesta célula e mantendo a infecção, que *in vitro* é observada até 96 h.

Entender os mecanismos de controle da infecção por *L. (V.) braziliensis* é fundamental para encontrar novos alvos terapêuticos para a LTA, uma doença que apresenta uma grave forma clínica, a LM, para a qual ainda há dificuldades no tratamento, com muitas recidivas e desenvolvimento de resistência dos parasitos aos fármacos. A capacidade de ativação celular promovida pelo LTB₄ vem sendo explorada experimentalmente para tratamento de infecção fúngica, utilizando microesferas biodegradáveis contendo LTB₄ (Nicolette et al. 2009). Os nossos resultados sugerem que o LTB₄ pode ativar os macrófagos humanos, auxiliando no controle da infecção por *L. (V.) braziliensis*, o que abre perspectivas para novas terapias da LTA.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Henrique Serezani e a Dra. Maria Imaculada Muniz-Junqueira que gentilmente doaram reagentes para que as técnicas fossem executadas plenamente

Aos funcionários e ao diretor do Banco de Sangue do INGOH, bem como aos doadores de sangue, pela concordância em participarem do estudo.

À fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e ao centro de apoio a pesquisa (CAPES), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano P, Jannin J, Boer M., the WHO Leishmaniasis Control Team 2012. Leishmaniasis world wide and global estimates of its incidence. *Plos One* 7:12
- Crooks SW, Stockley RA 1998. Leukotriene B4. *The international journal of biochemistry & cell biology* 30: 173–178
- Evans KJ, Kedzierski L 2012. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. *Journal of tropical medicine* 2012: 1-14.
- Flamand L, Tremblay MJ, Borgeat P 2007. Leukotriene B4 triggers the *in vitro* and *in vivo* release of potent antimicrobial agents. *Journal of immunology* 178: 8036 –8045.
- Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O 2012. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC infectious diseases* 12: 75.
- Guimond C, Trudel N, Brochu C, Marquis N, El Fadili A, Peytavi R, Briand G, Richard D, Messier N, Papadopoulou B, Corbeil J, Bergeron MG, Légaré D, Ouellette M 2003. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic acids research* 31: 5886–5896.
- Gontijo B, Carvalho MLR 2003. American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 71–80.
- Khoury R, Bafica A, Silva MPP, Noronha A, Kolb JP, Wietzerbin J, Barral A, Barral-Netto M, Weyenbergh JV 2009. IFN- γ impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 182: 2525-2531
- Machado ER, Ueta MT, Lourenço EV, Anibal FF, Sorgi CA, Soares EG, Roque-Barreira MC, Medeiros AI, Faccioli LH 2005. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. *Journal of immunology* 175: 3892–3899.
- Mancuso P, Nana-Sinkam P, Peters-Golden M 2001. Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity* 69: 2011–2016.
- Medeiros AI, Sá-Nunes A, Soares EG, Peres CM, Silva CL, Faccioli LH 2004. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infection and immunity* 72: 1637–1644

Murray HW 1981. Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line. Correlation between intracellular killing and the generation of oxygen intermediates. *The Journal of experimental medicine* 153: 1690–1695.

Murray HW, Rubin BY, Rothermel CD 1983. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *The Journal of clinical investigation* 72: 1506–1510.

Murphy RC, Gijón MA 2007. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *The Biochemical journal* 405: 379–395..

Nakamura M, Shimizu T 2011. Leukotriene receptors. *Chemical reviews* 111: 6231–6298.

Nicolete R, Secatto A, Pereira PAT, Soares EG, Faccioli LH 2009. Leukotriene B4-loaded microspheres as a new approach to enhance antimicrobial responses in *Histoplasma capsulatum*-infected mice. *International journal of antimicrobial agents* 34: 365–369.

Noazin S, Modabber F, Khamesipour A, Smith PG, Moulton LH, Nasser K, Sharifi I, Khalil EAG, Bernal IDV, Antunes CMF, Kieny MP, Tanner M 2008. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine* 26: 6759–6767.

Ogunkolade BW, Colomb-Valet I, Monjour L, Rhodes-Feuillette A, Abita JP, Frommel D 1990. Interactions between the human monocytic leukaemia THP-1 cell line and Old and New World species of *Leishmania*. *Acta tropica* 47: 171–176.

Okamoto F, Saeki K, Sumimoto H, Yamasaki S, Yokomizo T 2010. Leukotriene B4 augments and restores Fc gammaRs-dependent phagocytosis in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 285: 41113–41121

Pettersson A, Richter J, Owman C 2003. Flow cytometric mapping of the leukotriene B4 receptor, BLT1, in human bone marrow and peripheral blood using specific monoclonal antibodies. *International immunopharmacology* 3: 1467–1475.

Serezani CHC, Aronoff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M 2005. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood* 106: 1067–1075

Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S 2006. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177: 3201–3208.

Shimizu T, Yokomizo T, Izumi T 2002. Characterization of two distinct types of leukotriene B4 receptor. *International Congress Series* 1233: 415–420.

Silveira FT, Lainson R, Castro Gomes CM De, Laurenti MD, Corbett CEP 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology* 31: 423–431.

Singh RK, Gupta S, Dastidar S, Ray A 2010. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology* 85: 336–349

Singh B, Sundar S 2012. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* 30: 3834–3842.

Tager AM, Bromley SK, Medoff BD, Islam SA, Bercury SD, Friedrich EB, Carafone AD, Gerszten RE, Luster AD 2003. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nature immunology* 4: 982–990.

Ueno N, Wilson ME 2012. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in parasitology* 1122: 1-10.

Wirth JJ, Kierszenbaum F 1985a. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of immunology* 134: 1989–1993.

Woo CH, Eom YW, Yoo MH, You HJ, HanHJ, Song WK, Yoo YJ, Chun JS, Kim JH 2000a. Tumor Necrosis Factor- α Generates Reactive Oxygen Species via aCytosolic Phospholipase A2-linked Cascade. *The Journal Of Biological Chemistry* 275: 32357-323562.

Woo CH, Lee ZW, Kim BC, Ha KS, Kim JH 200b. Involvement of cytosolic phospholipase A2, and the subsequent release ofvarachidonic acid, in signalling by Rac for the generation of intracellular reactive oxygen species in Rat-2 fibroblasts. *The Biochemical Journal* 348: 525-530

Woo C-H, You H-J, Cho S-H, Eom Y-W, Chun J-S, Yoo Y-J, Kim J-H 2002. Leukotriene B(4) stimulates Rac-ERK cascade to generate reactive oxygen species that mediates chemotaxis. *The Journal of biological chemistry* 277: 8572–8578

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO 2005. *Leishmaniasis*. Disponível em: <Who.int/ tdr/dw/leish2005.htm>. Acessado em 20 junho de 2012

Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T 1997. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 387: 620–624

Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Pereira LIA, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SRB 2010. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 15: 68–76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1

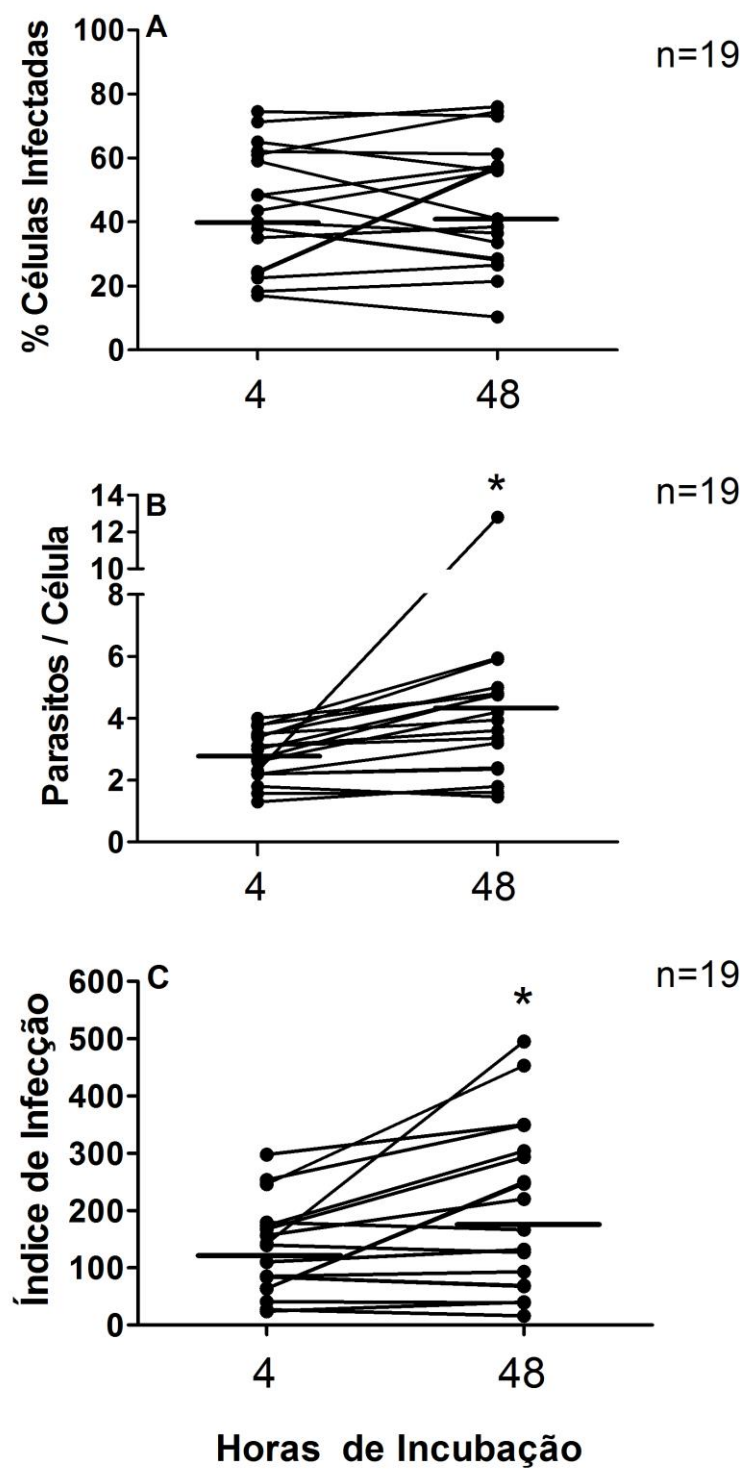


Figura 2

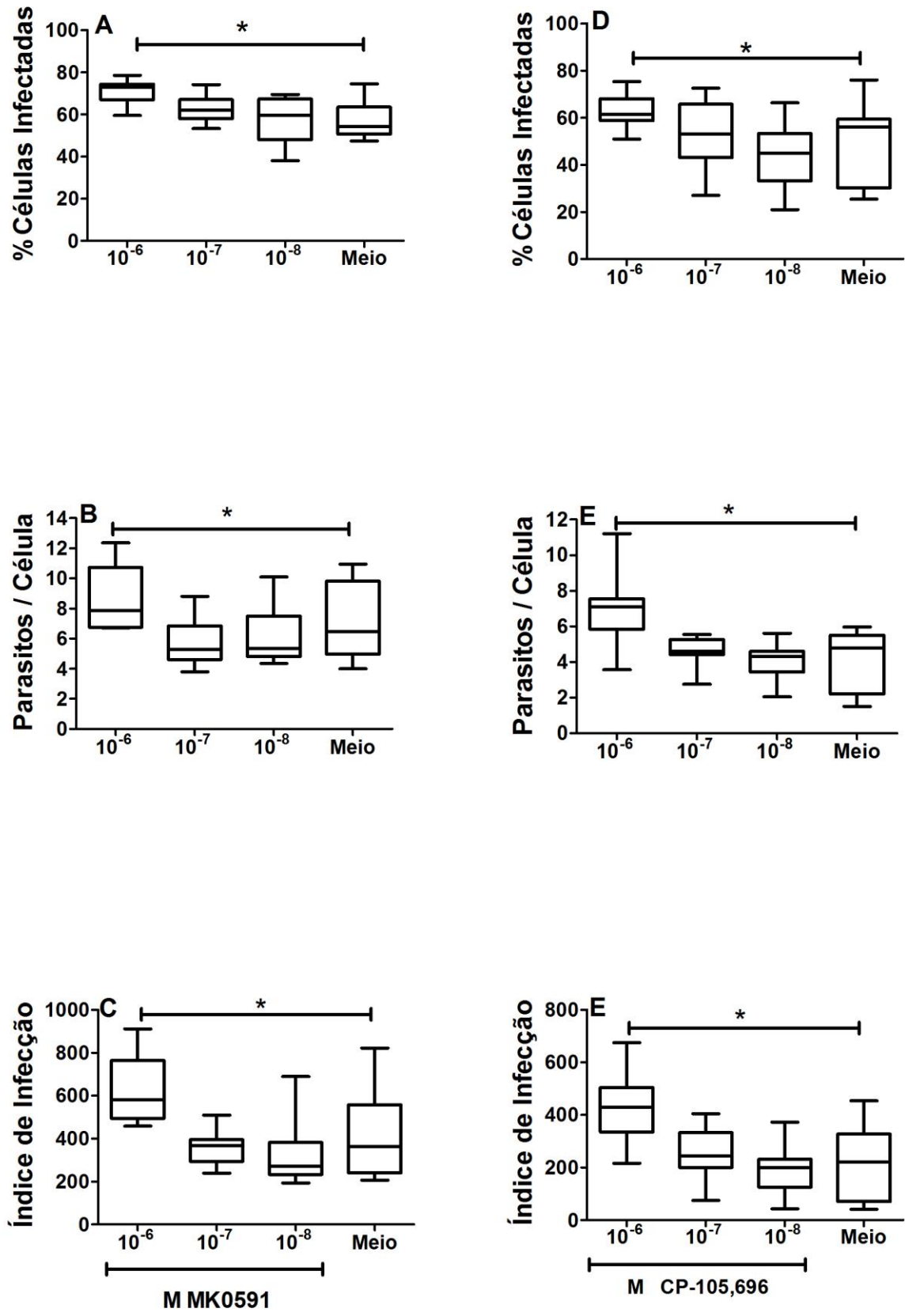


Figura 3

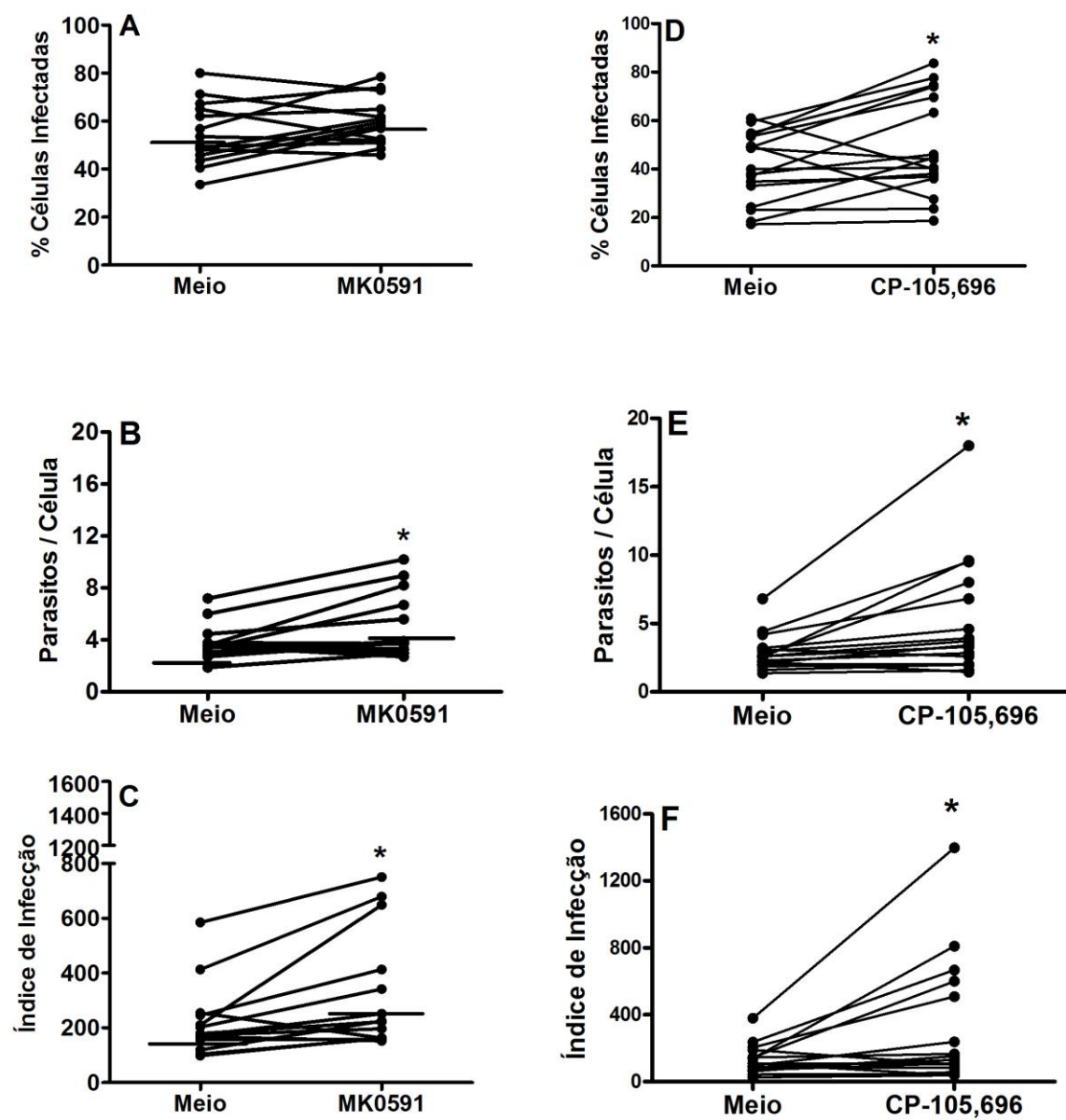


Figura 4.

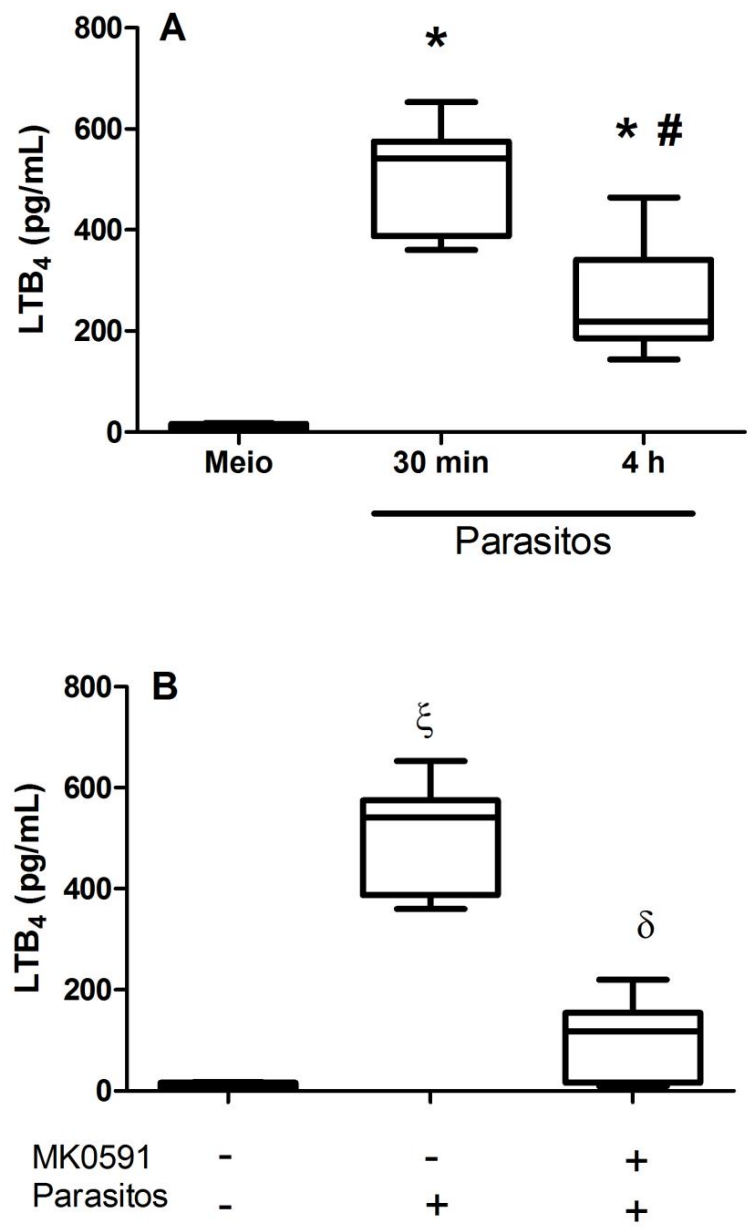


Figura 5

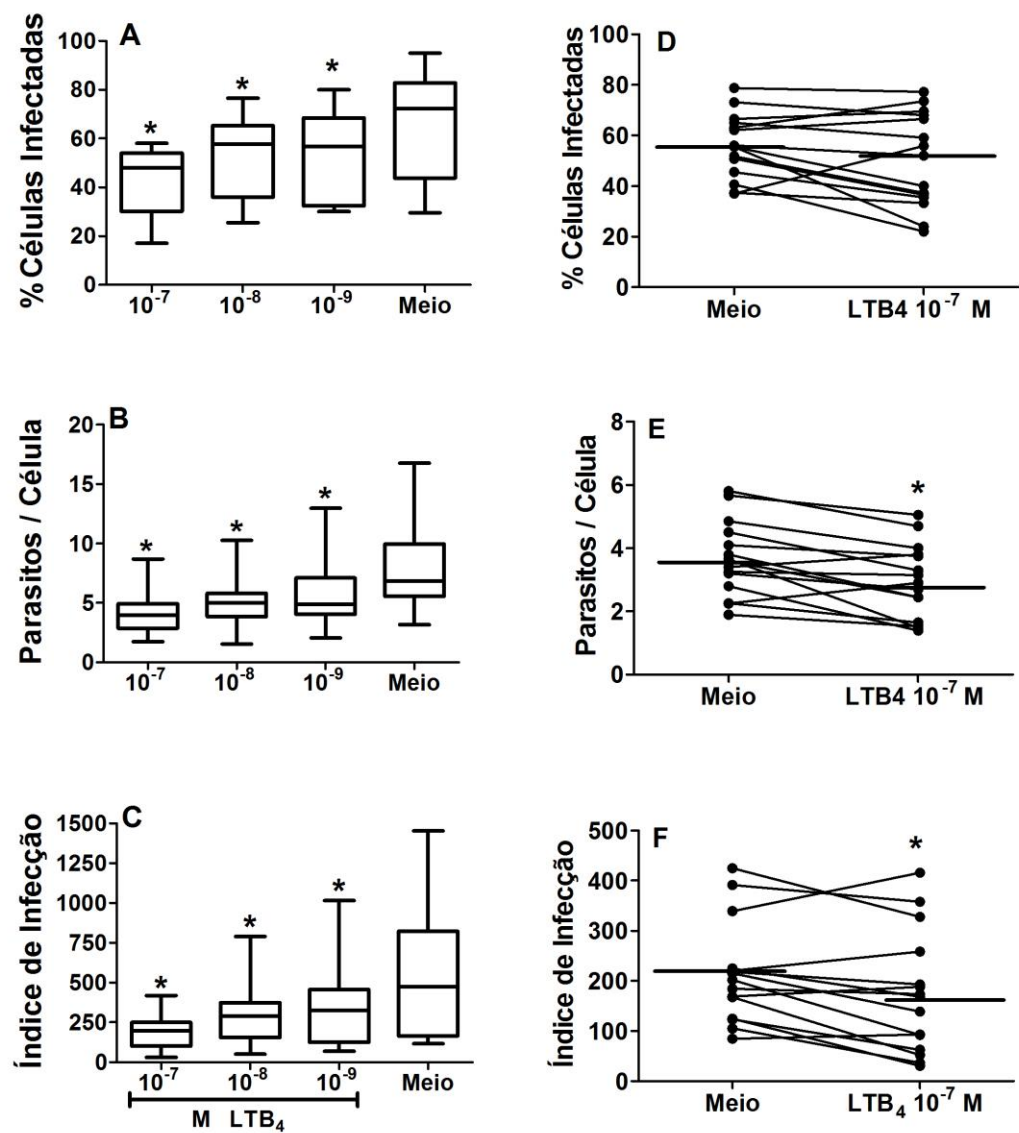


Figura 6.

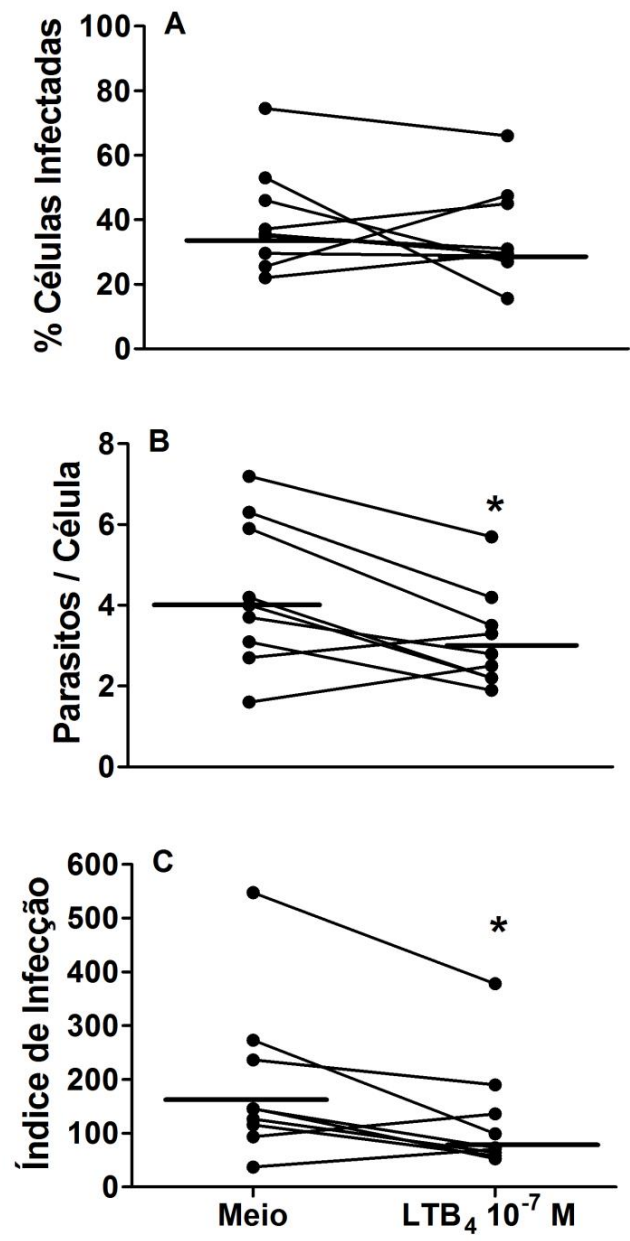


Figura 7.

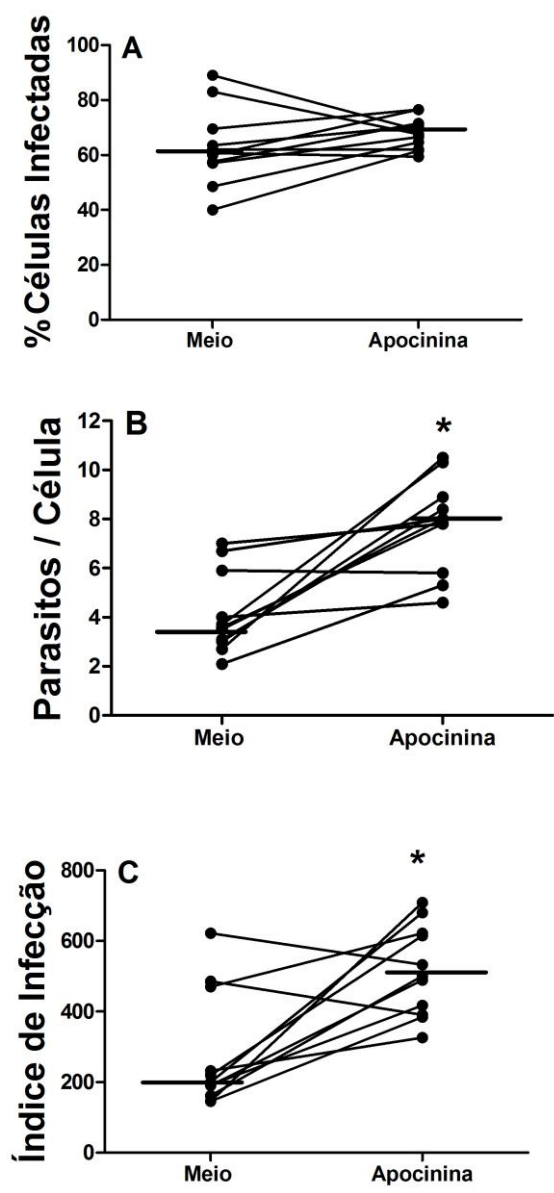


Figura 8.

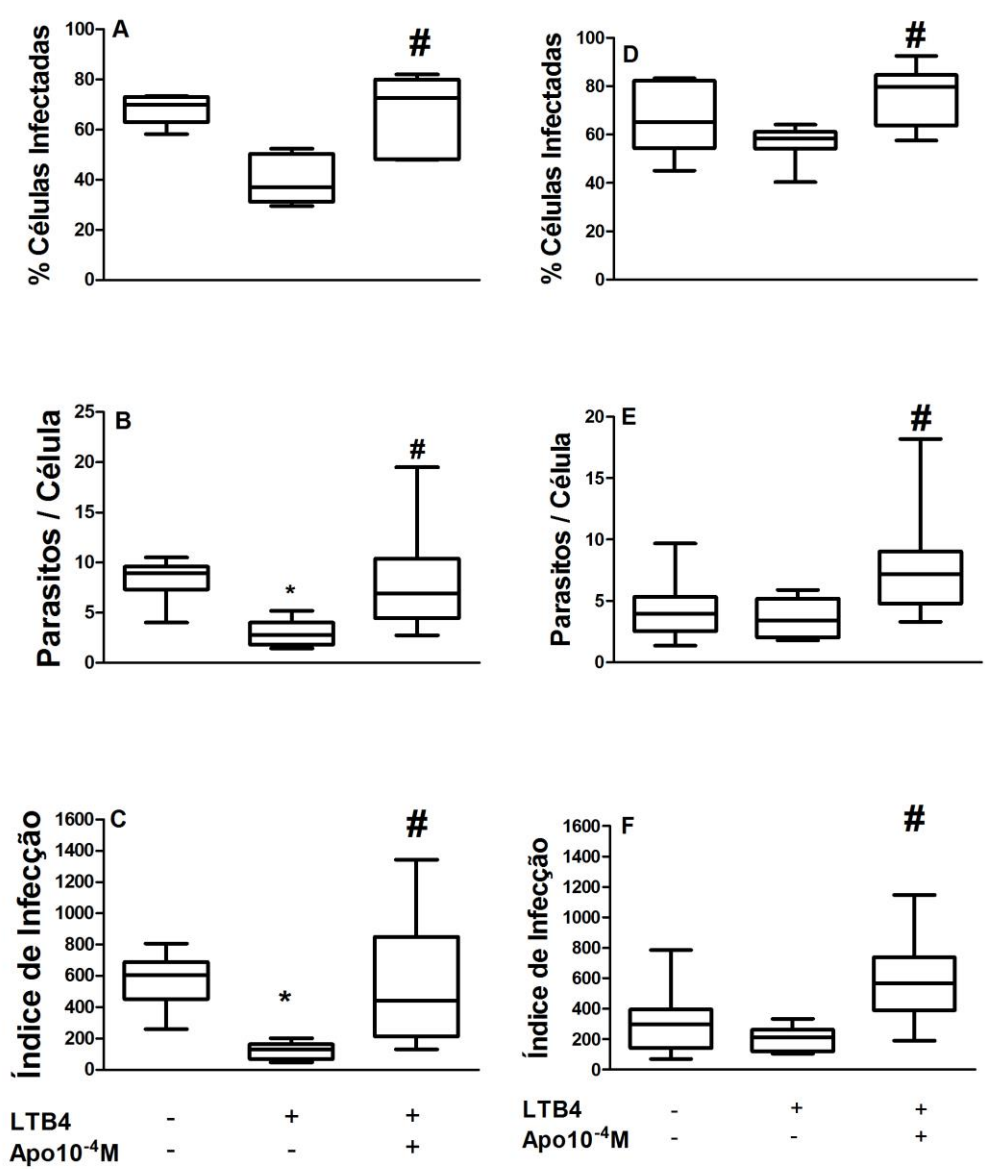


Figura 9.

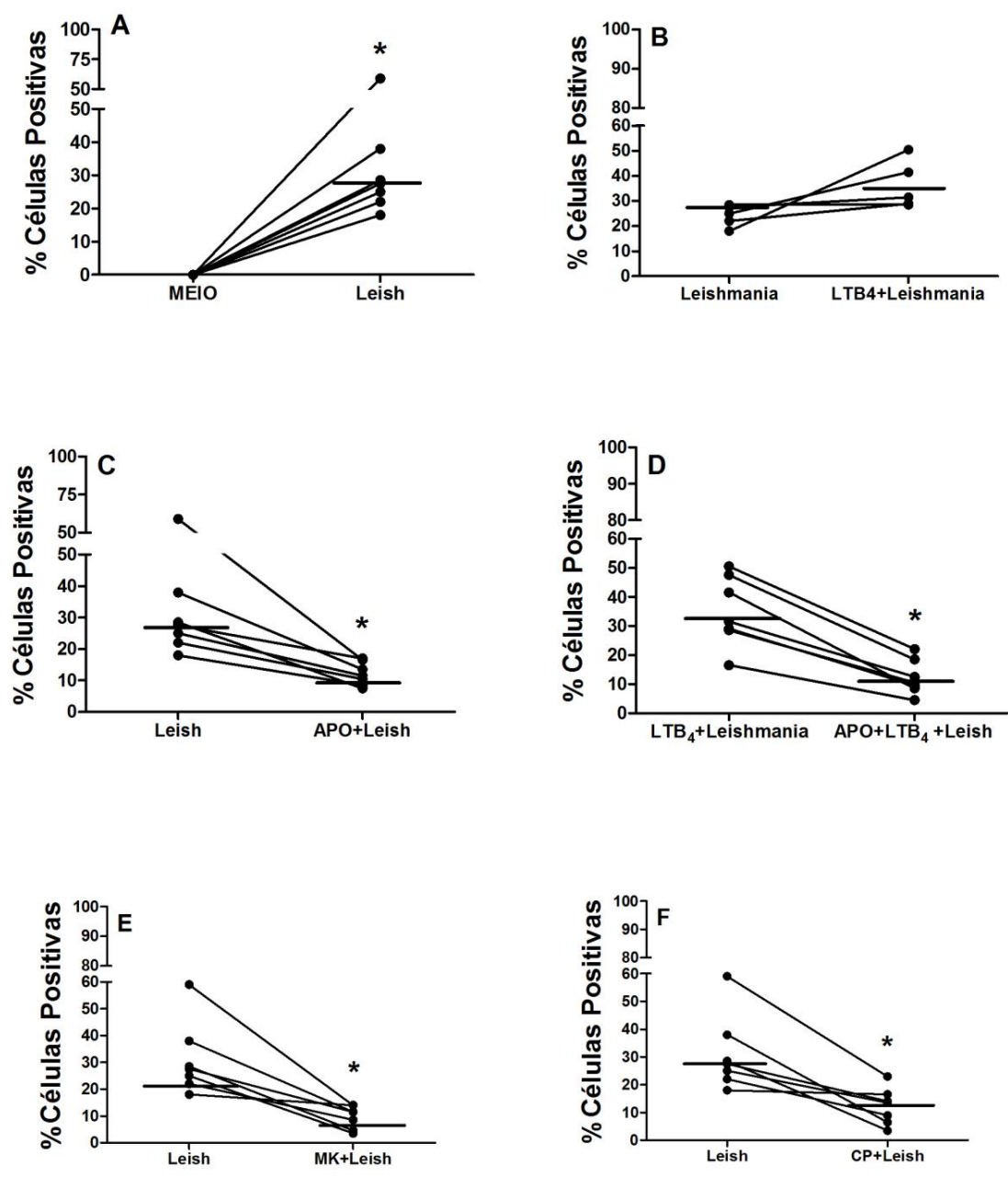


Figura 10.

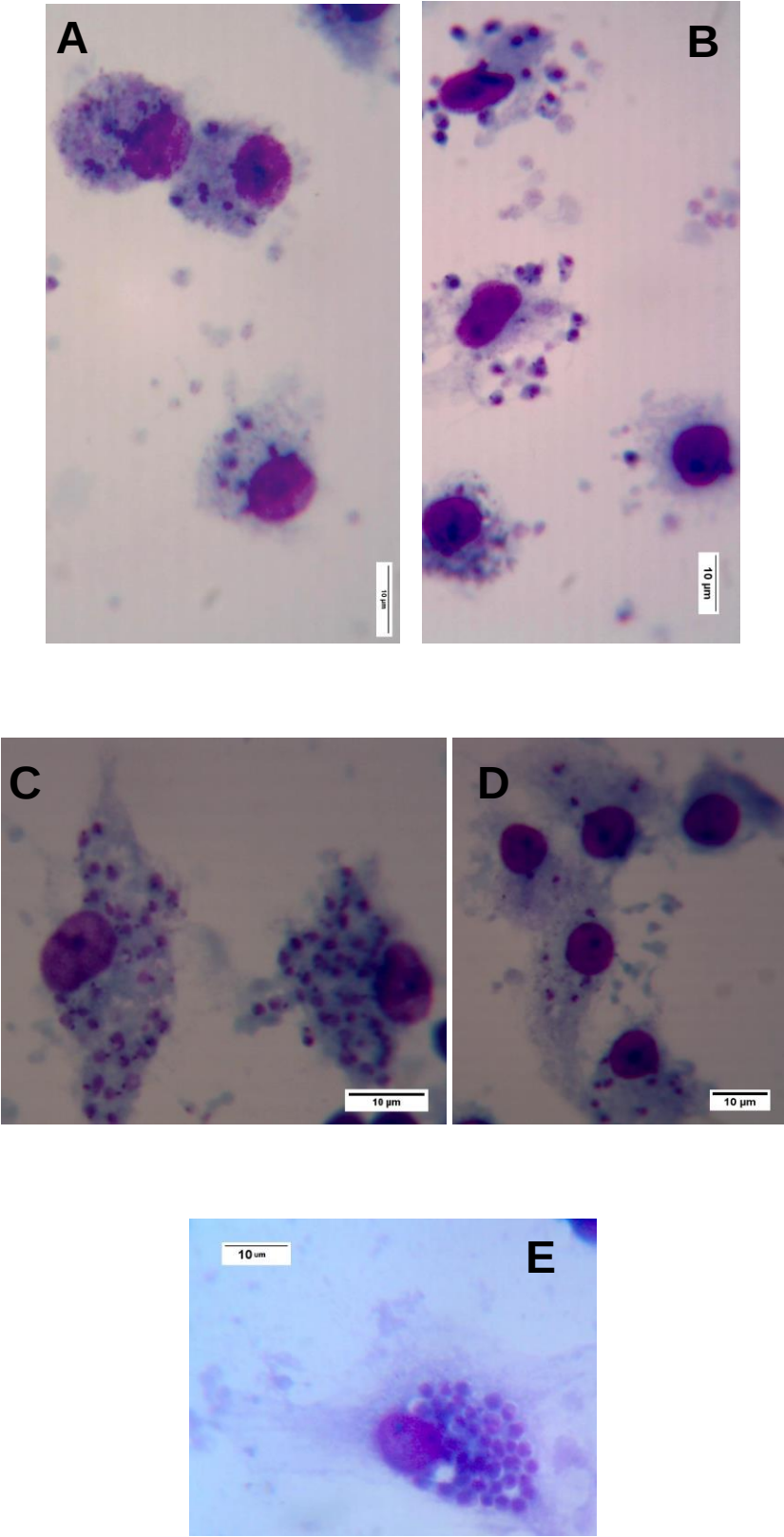
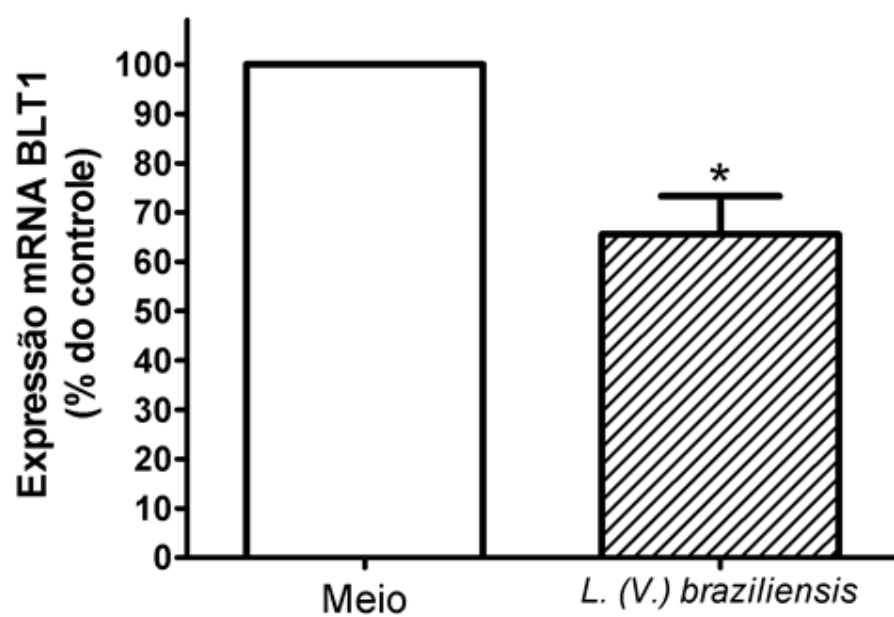
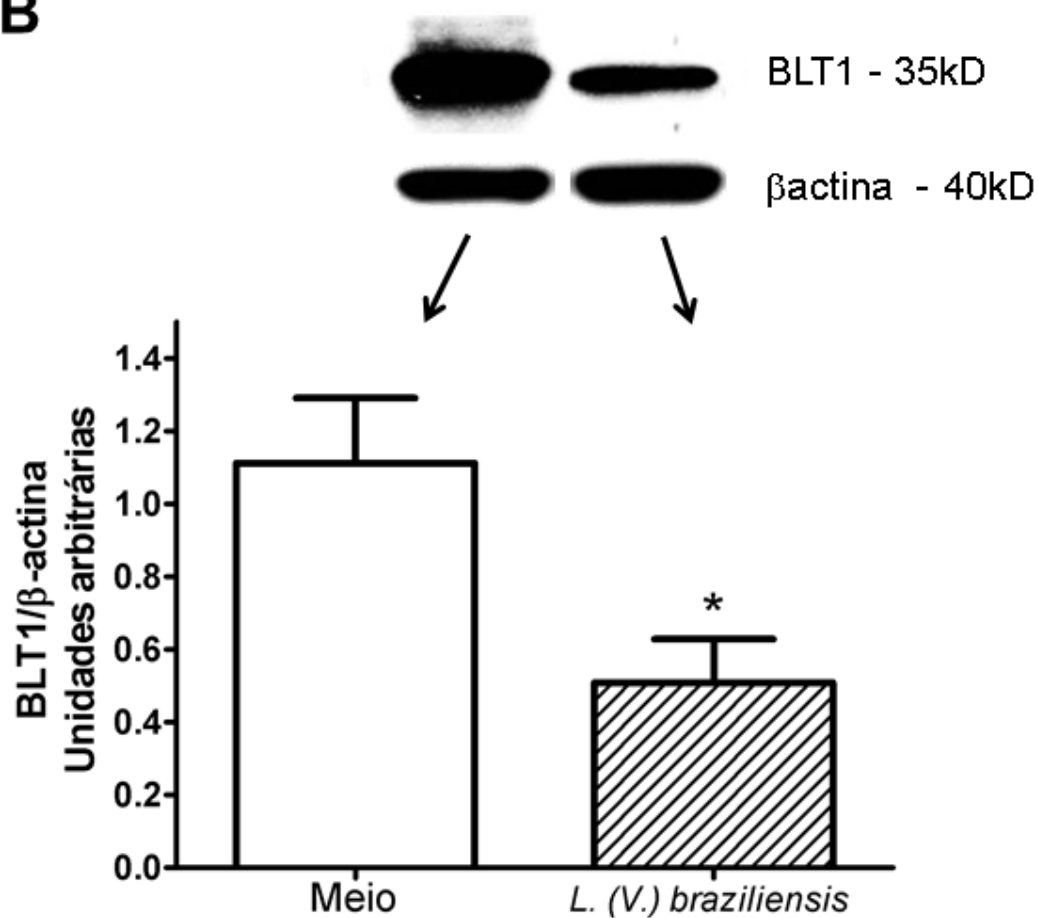


Figura 11

A



B



Legendas

Figura 1. Infecção de macrófagos humanos *in vitro* com *L. (V.) braziliensis*.

Macrófagos derivados de monócitos (2×10^5 células mononucleares, 5 dias) foram cultivados por 4 h com os parasitos (2×10^6 parasitos; 6º dia de cultivo). Após lavagem e reposição do meio, os macrófagos foram incubados por 4 h ou 48 h, a 36°C (5% CO₂). Em **A**, a porcentagem de macrófagos infectados; Em **B**, o número de parasitos por célula; Em **C**, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo avaliado, em testes realizados em duplicatas (n = 4 experimentos independentes); as linhas horizontais são as medianas. *p < 0,05.

Figura 2. Inibição da síntese de leucotrienos e bloqueio do receptor BLT1 aumenta

a infecção de macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis*.

Os macrófagos foram tratados 30 min antes da infecção com diferentes concentrações de MK0591 (**A, B, C**), CP-105,696 (**D, E, F**) ou cultivados na ausência de tratamento (Meio). As culturas de parasitos e macrófagos (~10:1), após 4 h de incubação, foram lavadas, o meio foi repostado e as culturas foram incubadas por até 48 h. Em **A** e **D**: a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B** e **E**, o número de parasitos por célula infectada. Em **C** e **F**, o índice de infecção. São apresentados as medianas, os interquartis e os valores mínimos e máximos (**A, B, C** : n = 8 doadores, **D, E, F**: n = 9 doadores avaliados em experimentos realizados em duplicatas). Foram realizados 3 experimentos independentes. *p < 0,05 (10⁻⁶ M vs Meio).

Figura 3. Inibição de leucotrienos endógenos e bloqueio do receptor BLT1

aumenta a infecção com *L. (V.) braziliensis* nas primeiras horas (4 h).

Os macrófagos humanos foram tratados, 30 min antes da infecção, com MK0591 10⁻⁶ M (**A, B, C**), CP-105,696 10⁻⁶ M (**D, E, F**) ou cultivados na ausência de tratamento (Meio). As

culturas de parasitos e macrófagos (~10:1) foram incubadas por 4 h. Em **A** e **D**, a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B** e **E**, o número de parasitos por macrófago. Em **C** e **F**, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata (**A**, **B**, **C**: n = 14; **D**, **E**, **F**: n = 17), sendo realizados 4 experimentos independentes. As linhas horizontais são as medianas. *p < 0,05.

Figura 4. *Leishmania (V.) braziliensis* induz a produção de LTB₄ em macrófagos humanos. Os macrófagos foram incubados na ausência ou na presença de MK0591 10⁻⁶ M, 30 min antes da adição dos parasitos (~10:1). Após 30 min e 4 h, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de LTB₄. Em **A**: curso temporal da produção de LTB₄. Em **B**, inibição da síntese de LTB₄. São apresentados as medianas, os interquartis e os valores mínimos e máximos (n = 6). *p < 0,05 (Meio vs Parasitos 30 min, vs Parasitos 4 h); [#]p < 0,05 (Parasitos 30 min vs Parasitos 4 h) ; ^ξp < 0,05 (Meio vs Parasitos) ; ^δp < 0,05 (Meio vs Parasitos + MK0591).

Figura 5. Tratamento com LTB₄ diminui a infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis*. Os macrófagos foram incubados com os parasitos (~10:1), a 36 °C, na ausência (Meio) ou na presença de diferentes concentrações de LTB₄ (**A**, **B**, **C**), ou LTB₄ 10⁻⁷ M (**D**, **E**, **F**), por 4 h. Em seguida, as culturas foram lavadas e incubadas por até 48 h. Em **A** e **D**: a porcentagem de macrófagos infectados (**A**, 48 h; **B**, 4 h). Em **B** e **E**, o número de parasitos por célula infectada (**B**, 48 h; **E**, 4 h). Em **C** e **F**, o índice de infecção (**C**, 48 h; **F**, 4 h). São apresentados as medianas, os interquartis e os valores mínimos e máximos (**A**, **B**, **C**: n = 18) indivíduos avaliados em duplicatas). Foram realizados 6 experimentos independentes. *p < 0,05 (Meio vs 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M). Em **D**, **E**, **F**, cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata (n = 9) e as

linhas horizontais são as medianas, sendo realizados 3 experimentos independentes.

*p < 0,05 (Meio vs LTB₄)

Figura 6. Tratamento com LTB₄ após 4 h de infecção ainda diminui a infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis*. Os macrófagos foram incubados com os parasitos (~10:1), por 4 h, a 36 °C. Em seguida, as culturas foram lavadas e o LTB₄ 10⁻⁷ M foi adicionado ou não (Meio) às culturas. As culturas foram incubadas por 48 h. Em **A**: a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B**, o número de parasitos por célula infectada. Em **C**, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata (n = 9) e as linhas horizontais são as medianas, sendo realizados 3 experimentos independentes. *p < 0,05

Figura 7. Inibição da produção de ROI aumenta a infecção de macrófagos humanos com *L. (V.) braziliensis* Os macrófagos foram tratados 30 min antes da infecção com Apocinina 10⁻⁴ M. As culturas de parasitos e macrófagos (~10:1), após 4 h de incubação, foram lavadas e a apocinina foi repostada, sendo, em seguida, incubadas por até 48 h. Em **A**, a porcentagem de macrófagos infectados. Em **B**, o número de parasitos por macrófago. Em **C**, o índice de infecção. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata e as linhas horizontais são as medianas (n = 11), sendo realizados 3 experimentos independentes. *p < 0,05.

Figura 8. Inibição da produção de ROI reverte o efeito inibidor na atividade microbicida causado pelo LTB₄ em macrófagos humanos infectados com *L. (V.) braziliensis*. Os macrófagos foram tratados 30 min antes da infecção com Apocinina 10⁻⁴ M (Apo). Os parasitos foram adicionados juntamente com LTB₄ às culturas e após 4 h de incubação (Em: **A**, **B**, **C**), foram lavadas e tratadas novamente (Apocinina e LTB₄), sendo, em seguida, incubadas por até 48 h (Em **D**, **E**, **F**). Em **A** e **D**, a

porcentagem de macrófagos infectados. Em B e E, o número de parasitos por macrófago. Em C e F, o índice de infecção. São apresentados as medianas, os interquartis e os valores mínimos e máximos. Foram realizados 3 experimentos independentes, em duplicatas (Em: **A, B, C**, n = 7; Em **D, E, F**, n = 9). *p < 0,05 (sem tratamento vs LTB₄); #p < 0,05 (LTB₄ vs LTB₄ + Apo 10⁻⁴ M).

Figura 9. Produção de ânion superóxido pela redução de NBT. Macrófagos humanos foram pré-tratados com apocinina, MK0591, CP 105-696 e em seguida infectados e tratado com LTB₄, e incubados por 1h , depois foi adicionado uma solução de Hanks-Tris 0,05% de NBT e incubados por 20 minutos, a 36°C (5% CO₂), as células foram fixadas e coradas com safranina . De A-F são demonstradas as células porcentagem de positivas. Cada ponto representa um indivíduo avaliado em duplicata e as linhas horizontais são as medianas (n = 7), sendo realizado 2 experimentos independentes

Figura 10. Fotomicrografias de macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis*, sob diferentes tratamentos. Macrófagos humanos foram derivados de monócitos (2 x 10⁵ células mononucleares, 5 dias), sendo em seguida cultivados por 4 h com os parasitos (2 x 10⁶ parasitos; 6º dia de cultivo). Após a retirada do excesso de parasitos extracelulares, os macrófagos foram incubados por 48 h a 36°C (5% CO₂). Em A: macrófagos cultivados na ausência de tratamento, Meio; Em B: macrófagos tratados com MK0591, inibidor de síntese de leucotrienos; Em C: macrófagos tratados com CP-105,696, bloqueador de BLT1, receptor para LTB₄; Em D: macrófagos tratados durante a infecção com LTB₄; Em E: macrófagos tratados com apocinina;

Figura 11. Expressão do receptor BLT1 está diminuída em macrófagos humanos infectados *in vitro* com *Leishmania (V.) braziliensis*. Os macrófagos derivados de monócitos humanos foram incubados ou não com os parasitos, a 36 °C, durante 6 h (avaliação da expressão de RNAm por qRT-PCR) ou 24 h (avaliação da expressão de BLT1 por western blotting). Em **A**, são mostrados os valores da média do $2^{-\Delta\Delta CT}$ da expressão relativa do RNAm para BLT1/GAPDH (% do controle), após 6 h de incubação. Em **B**, expressão proteica do receptor BLT1 após 24 h de infecção. Os dados são mostrados como unidade arbitrária da relação entre as densidades óticas obtidas para BLT1/ β -actina (% do controle). Foram realizados 9 experimentos independentes (n = 9 doadores). *p < 0,05