



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Francilene Capel Tavares de Carvalho

**Perfil de citocinas do padrão Th1, Th2, Th17 e o
estado redox de indivíduos com leishmaniose
visceral pré e pós tratamento**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sueli Aparecida Calvi
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lucilene Delazari dos Santos

**Botucatu
2016**

Francilene Capel Tavares de Carvalho

Perfil de citocinas do padrão Th1, Th2, Th17 e o estado redox de indivíduos com leishmaniose visceral pré e pós tratamento

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli Aparecida Calvi
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Lucilene Delazari dos Santos

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carvalho, Francilene Capel Tavares de.

Perfil de citocinas do padrão Th1, Th2, Th17 e o estado redox de indivíduos com leishmaniose visceral pré e pós tratamento / Francilene Capel Tavares de Carvalho. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Sueli Aparecida Calvi
Coorientador: Lucilene Delazari dos Santos
Capes: 21104000

1. Leishmaniose visceral. 2. Citocinas. 3. Sistema imune. 4. Reação de oxidação-redução.

Palavras-chave: Citocinas; Estado Redox; Leishmaniose Visceral; Sistema imune.



Dedicatória



Dedico este trabalho aos meus pais, que são responsáveis por esse momento tão valioso em minha vida. Vocês acreditaram em mim, me dando todo o amor carinho e apoio nas minhas tomadas de decisão. Essa vitória também é de vocês.

À minha irmã, a quem eu amo infinitamente, um ser iluminado por Deus, de alma pura e coração sincero, que sempre está ao meu lado.

Ao meu esposo, meu companheiro que sempre me incentivou e acreditou no meu trabalho.



Agradecimentos



Agradeço, primeiramente, a Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse, realizando meus sonhos pessoais e profissionais. Grandes foram as lutas, maiores as vitórias. Meu amado Deus, sou muito grata por esse momento maravilhoso. Quem tem Deus, tem tudo.

Aos meus pais, Luiz Tavares e Rosely Capel Tavares, com vocês aprendi a essência do viver seguindo seus exemplos. Muitos foram os momentos em que meu cansaço e preocupação foram divididos com vocês e, procurando amenizar minhas ansiedades, vocês me deram força para vencer todos os obstáculos e me incentivaram a prosseguir. O momento que vivo agora é fascinante e vocês são responsáveis por essa trajetória pois, muitas vezes, se doaram por inteiro, renunciando seus próprios sonhos para que o meu se realizasse. Não tenho palavras para expressar essa emoção, um sentimento que dificilmente as palavras traduzem. A vocês dois, o meu profundo e eterno agradecimento.

A minha irmã, Francielen Capel Tavares, não há palavras no mundo que eu consiga explicar o meu amor por você, meu presente de Deus. Você alegria minha vida, você ilumina meus dias, você me faz enxergar o mundo com outros olhos. Cada dia ao seu lado é um aprendizado. Basta receber seu sorriso contagiante para melhorar meu interior. Nessa correria da vida, meu pensamento sempre esteve voltado pra você, meu anjo da guarda, que me inspirava mesmo a quilômetros de distância, com um simples “oi” no telefone, isso já era o suficiente para continuar a caminhada. Deus é tão maravilhoso, Ele faz tantas obras na nossa vida, que eu só tenho a agradecer cada evolução sua. Obrigada minha irmã pelos melhores momentos da minha vida.

Ao meu esposo, Francisco Carvalho, obrigada pelo amor, preocupação, paciência em entender a minha constante ausência, por dividir comigo planos e sonhos para o futuro e por sempre me fazer sentir segura e completa. A vida é feita de momentos, foi num desses momentos que te conheci e que te amei. E hoje, você faz parte do meu dia a dia. Amar é andar de mãos dadas por esse labirinto estranho e mágico que é a vida. É não perder o outro de vista, mas deixá-lo respirar quando preciso for. É enfrentar o medo do abismo, da verdade, da dúvida, da certeza. É abraçar apertado para curar as dores, tristezas, insucessos. É acreditar no outro, dividir sonhos, perdoar, compreender, aceitar. É querer estar junto, e se separados, unidos pelo pensamento, pelos objetivos e pelos mesmos desejos.



Aos meus avós, Vicente Salles e Clarice Capel, que guardam no olhar e na pele as marcas de toda uma vida. Guardam em si uma infinidade de conhecimentos que nos transmitem. É com vocês que eu aprendo. Devolver-lhes o amor é o mínimo que posso fazer. Obrigada por acreditarem em mim e torcer pelo meu sucesso.

Agradeço também, as pessoas que ao longo do tempo, desde a infância, fazem parte da minha trajetória de vida, pela companhia constante e tão querida, sacrifício ilimitado em todos os sentidos, orações, palavras, abraços e aconchego. Muito obrigada, meus tios, primos, em especial, Hellen, Geovana, Hugo e Hiaço, que torceram e acreditaram na conclusão desse trabalho. Fico muito grata.

Aos meus sogros, que sempre desejaram o melhor na minha vida. Obrigada pelo carinho.

À minha orientadora, profª. Drª. Sueli Aparecida Calvi, obrigada por acreditar em mim. Você ouviu pacientemente as minhas considerações, partilhando comigo suas idéias, conhecimento e experiências e que sempre me motivou. Nunca estamos sós, é verdade. Tem gente que Deus coloca na nossa vida para nos guiar para o caminho do bem. Que bom que te encontrei. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional e minha gratidão pela sua amizade.



À minha coorientadora, profª. Drª. Lucilene Delazari dos Santos, obrigada pelo aprendizado e dedicação por esses meses que trabalhamos juntas. Você sempre se fez presente em minha vida por palavras de encorajamento através de sua experiência e vivência pessoal e acadêmica. Agradeço pelas lições de vida que foram essenciais nesse percurso, onde rimos, choramos e nos ajudamos mutuamente.

À minha querida, profª. Drª. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares, se não fosse você, esse trabalho não teria sucesso. Você é essencial nessa jornada. Essa é a oportunidade ideal para agradecer pela convivência harmoniosa, pelas trocas de conhecimento e experiências que foram tão importantes na minha vida.

À minha adorável, profª. Drª. Camila Renata Côrrea, o que seria de mim sem você? Sempre disposta a me ajudar em todos os momentos, minha amiga e eterna companheira. Aquela que quando tudo está difícil, abre um sorriso e diz: calma, você vai conseguir. Sou grata pela sua compreensão e carinho. Sem teu apoio, nada teria alcançado.

À profª. Drª. Cilmary Kurokawa, agradeço por transmitir seus conhecimentos, estando sempre do meu lado, me orientando e dedicando parte do seu tempo a mim.



*As meninas do Laboratório de Citometria de Fluxo, Hemocentro:
Léia, Aline, Caroline, Luana, obrigada pelo apoio e dedicação
durante todo o período de estágio. À Dr^a. Marjorie de Assis Golim,
obrigada pelos ensinamentos que levarei para sempre.*

*À Dr^a. Érika Pellison e Dr^o. Paulo Câmara, que sempre se
preocuparam comigo e com o andamento do projeto, me apoiando e
me incentivando em cada circunstância.*

*Ao prof^o. Dr^o. Rodrigo Mattos, é um privilégio poder te reencontrar
no mesmo ambiente de trabalho, depois de alguns anos. Meu eterno
professor, que me proporcionou a base necessária para eu chegar até
aqui. Obrigada por sempre ter acreditado e depositado sua
confiança em mim ao longo de todos esses anos que se iniciaram
ainda na graduação.*

*Ao prof^o. Dr^o. Marcus Vinícius Pimenta Rodrigues, que me guiou
para o sucesso, o grande responsável pela escolha da área que
seguirei. Exemplo que tomarei por toda a vida.*

*À minha amiga, Mariana Gatto, autora principal desse trabalho.
Sem a sua ajuda, esse trabalho não teria acontecido. Obrigada pelo
compartilhamento das amostras, pelas importantes sugestões,
tornando o projeto mais completo. Você sempre me estendeu a mão
na hora em que mais precisei. Você transmite uma energia positiva a
todas as pessoas e isso acaba aliviando nossos corações, sabendo que
no fim, “tudo dá certo”.*

À minha amiga mais que especial, Nayara Cavassan, você é mais que uma amiga, nunca pensei que pudesse encontrar uma pessoa como você. Você lê os meus olhos e sabe o que eu estou sentindo. Para cada palavra que eu digo, você sabe o verdadeiro significado.

Nós compartilhamos todos os momentos. Ao longo dessa caminhada, você me ensinou, me encorajou, esteve disposta a enfrentar comigo todos os desafios. Jamais vou esquecer, a madrugada em que esteve comigo para levar minhas amostras a serem analisadas, foi fantástico. Você entrou na minha vida de uma forma especial, me trazendo alegria e me mostrando que uma verdadeira amizade existe, nossa amizade é de Deus. Sou grata por todas as vezes que você me fez rir quando eu estava triste, por todas as vezes que me defendeu, pelos dias inesquecíveis que saímos juntas, por todas as nossas lembranças que vão ficar pra sempre dentro de mim. Obrigada por tudo.

À minha querida amiga, Karen Tasca, que de forma carinhosa me deu força e coragem. Obrigada pelo companheirismo nos momentos em que a tarefa parecia grande, quase impossível, mas você estava lá pra deixar tudo mais tranquilo. Seu jeitinho é único. Você, com sua simplicidade e seu carisma conquistou a todos nós. Obrigada por me ensinar cada vez mais. Que na sua nova fase, você possa desfrutar o máximo. Que Deus te abençoe a todo instante. E que quem estiver ao seu lado seja tão maravilhosa quanto você. A razão porque a despedida dói tanto, é que nossas almas estão ligadas. Vou sentir sua falta.

À minha companheira, Laura Mendes, pela inigualável convivência. Uma pessoa disposta a ajudar em qualquer momento. Obrigada por tudo, não é o bastante para te agradecer por ter sido tão especial. Agradeço a Deus, por ter feito os nossos caminhos se cruzarem e assim me presentear com a sua amizade. Somos a dupla dinânima perfeita, passamos por cada situação, rimos, choramos, mas o que prevalecia eram as inúmeras gargalhadas entre uma pausa e outra do estudo. Trabalhar ao seu lado, faz as tarefas parecerem mais simples e prazerosas. Sentiremos saudades de todas as conversas, descobertas que fizemos, dos sonhos que tivemos, saudades até dos momentos de lágrimas, das vésperas de qualificação, dos prazos chegando, enfim, do companheirismo vivido. Sempre estarei ao seu lado.

À minha amiga do coração, Patrícia Borim, minha companheira de república, de laboratório, de compras, de guloseimas, de passeios. Você está sempre presente na minha vida. Obrigada por ser aquela, que se faz inesquecível, e mais importante a cada dia. Obrigada por me entender, justamente quando nem eu me entendo. Obrigada por me ajudar quando eu preciso. Você é uma amiga especial, que me ajuda a crescer quando exalta minhas qualidades, fazendo com que eu me orgulhe delas. Quando me estende a mão, me mostra o caminho que devo seguir. Sei que posso contar com você. Bons amigos sempre ficam de modo especial em nossos pensamentos. Fazem parte do nosso dia a dia, mesmo não estando presente, pois as experiências que foram uma vez compartilhadas, estarão sempre vivas em nossa lembrança.



À minha amiga especial, Thaysa Carvalho, obrigada por me ajudar muitas vezes a achar soluções, quando elas pareciam não aparecer. Você é quem eu posso recorrer a qualquer hora do dia e em qualquer momento, para qualquer coisa. Nós compartilhamos o mesmo sonho e foi através deste que nos conhecemos. Para mim, é um privilégio poder falar da pessoa maravilhosa que você representa pra mim.

Você surgiu como um anjo, para iluminar e aliviar o fardo tão pesado. Jamais esquecerei suas palavras confortadoras. Na vida damos muitas voltas e, durante esses giros, encontramos muitas pessoas que nos marcam e que nos deixam alguma coisa especial.

Com você foi assim. Desejo que sua vida seja abençoada por vibrações de paz e amor. Que a nossa cumplicidade seja eterna.

À minha grande amiga, Andréia Amaral, menina meiga com um coração enorme. Minha companheira pra tudo. Trabalhar com você foi algo inesquecível, como eu sinto falta. Sua amizade é um conforto indescritível e, tem se tornado, cada vez mais importante na minha vida. Gostaria de poder estar mais com você, para compartilhar a sua constante alegria. Quando eu penso em você, eu sinto uma mistura de orgulho e gratidão. Você é um exemplo do que é ser amiga de verdade, pelos momentos que passamos juntas e pelo seu apoio incondicional. Você se mostra interessada com minhas preocupações e tem sempre um conselho para me orientar. Nossa amizade representa uma prioridade pra mim.

À minha amiga encantadora, Beatriz Pereira, conhecer você, foi uma das mais gratas surpresas que a vida me proporcionou e eu confesso, que estou feliz por isso. Obrigada pelas palavras sinceras, pela companhia do dia a dia. Você estará sempre em meu coração.



À minha amiga, Lariza Maza, tenho orgulho de ser sua amiga. Você é sensacional, uma pessoa guerreira e batalhadora. Sei que sempre torce por mim e saiba que é recíproco. Obrigada pela sua amizade.

À futura mamãe, Vanessa Manfio, que dividiu comigo todas as emoções durante essa jornada da pós-graduação.

À minha amiga, Elaine Navarro, talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permita agradecer você. Sua ajuda e seu apoio foram para mim, de valor inestimável. Obrigada pela sua amizade.

Aos meus amigos de laboratório, Caio Cavassan, Adrielle, Thaty, Alícia, Jéssica, Leonardo, que me apoiaram e que sempre estiveram ao meu lado durante esta longa caminhada.

Aos meus amigos da Unipex, Carlinhos, Michele, Telma, Elisete, Marta, Paulinho, Sueli, Jura, Carlos Martins, Felipe, que encerraram comigo esta jornada, obrigada pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos de hoje, que viram meu crescimento enquanto pessoa, enquanto amigo, enquanto estudante, Maria Fernanda, Mirian, Larissa Ragozo, Eliana Peresi, Talísia, Vanessa Silva, Micaela, Meire, Gabriela, Ticiane, Juliana, Elaine Moio.



Enfim, aos amigos, colegas e a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para que este trabalho acontecesse. Àqueles que acreditaram em mim, muito obrigada.

*Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP, Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB*

Seção de Pós-Graduação da FMB.

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem.

Aos pacientes e doadores de sangue que aceitaram participar desse estudo. Vocês foram fundamentais para a realização desse trabalho.

À banca do Exame Geral de Qualificação, Prof.^o Dr.^o Carlos Magno e a Dr.^a Daniela Rodrigues, que cedeu uma parte de seu tempo precioso para poder contribuir com meu trabalho.

Aos membros da banca de Defesa, prof.^a Dr.^a Lisiane de Almeida Martins e o Prof.^o Dr.^o Carlos Magno, por aceitarem meu convite e por dividir comigo este momento tão importante e esperado.

Aos meus queridos suplentes, Dr.^a Daniela Rodrigues e prof.^o Dr.^o Igor Minatel, pela disposição para avaliar meu trabalho.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste Mestrado.



Epígrafe





Sem sonhos, a vida não tem brilho.

Sem metas, os sonhos não têm alicerces.

Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.

*Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades
e corra riscos para executar seus sonhos.*

(Augusto Cury)



Resumo

A leishmaniose visceral (LV) é causada pelos protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* (*L.donovani*). O sucesso na cura da LV depende principalmente do estado imunitário do hospedeiro em combinação com os efeitos das drogas leishmanicidas. Nesse sentido, a resistência do hospedeiro a leishmaniose está associada à produção de citocinas envolvidas na indução e efetuação de uma resposta do tipo Th1, como IL-12, IFN- γ e TNF- α . Essa resposta culmina na ativação de macrófagos com conseqüente aumento na produção de metabólitos do estresse oxidativo com atividade leishmanicida. Por outro lado, a suscetibilidade à infecção e a progressão da doença estão relacionadas com o direcionamento de uma resposta do tipo Th2, com produção de IL-4 e de outras citocinas como a IL-10, que desativam macrófagos. A subpopulação de células Th17 vem ganhando importância na resposta contra a *Leishmania*, entretanto não se sabe até o momento se está envolvida na resistência ou suscetibilidade à infecção. Apesar desses resultados, são raros os trabalhos que tenham objetivado avaliar de forma sistemática, os perfis de resposta de células CD4⁺ em pacientes com LV, antes e após o tratamento. Desta forma, um dos objetivos do presente estudo foi quantificar as citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 nestas duas fases da evolução da doença. Outro objetivo foi avaliar o estado redox desses pacientes, uma vez que ao tentar eliminar o parasita através do processo de ativação de macrófagos, os mesmos podem liberar quantidades exageradas de metabólitos leishmanicidas, que podem levar a um estresse oxidativo envolvido na patogênese da doença. Foi observada uma tendência dos pacientes apresentarem um aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-17 e IFN- γ antes do tratamento com diminuição após o tratamento. Diferenças significantes, foram detectadas em relação aos níveis de IL-6 e IL-10. Pacientes antes do tratamento apresentaram uma

produção mais alta das duas citocinas em relação aos indivíduos controles. No entanto, após o tratamento, essa produção abaixou de forma significativa, atingindo novamente níveis semelhantes aos dos indivíduos controles. Em relação ao estado redox detectamos que pacientes com a doença ativa apresentaram um aumento da substância malondialdeído (MDA), um indicador de peroxidação lipídica, associado a uma diminuição de carotenóides antioxidantes como o licopeno e a luteína o que revela a presença de um desequilíbrio oxidativo nesses pacientes. As associações entre os achados imunológicos e os relativos ao estado redox dos pacientes e as suas implicações para a patogênese da leishmaniose são discutidos.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, Resposta Imune, Estresse oxidativo



Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is caused by obligatory intracellular protozoa belonging to *Leishmania donovani* (*L. donovani*) complex. The success in LV cure depends mainly on the immune status of the host in combination with the effects of antileishmanial drugs. Accordingly, leishmaniasis host resistance is associated with production of cytokines involved in Th1 response induction and its effector functions, such as IL-12, IFN- γ and TNF- α . This response culminates in macrophages activation, that begin to release higher levels of oxygen and nitrogen reactive species that have potent leishmanicidal activities. In contrast, susceptibility to infection and disease progression are linked to a predominant Th2 response that produces IL-4 and other cytokines such as IL-10 that deactivate macrophages. The importance of Th17 subset in host response to leishmania has also been studied, however it is not established yet if it is involved in resistance or susceptibility to infection. Despite these findings, few studies have aimed to evaluate the predominant profiles of CD4 + cells that are activated in patients with LV before and after treatment. Thus, one of the objectives of the present study was to quantify the cytokines typical of Th1, Th2 and Th17 profiles in these two stages of disease progression. In addition, we aimed to evaluate the redox status of these patients, since by trying to eliminate the parasite through the macrophage activation process, they can release excessive amounts of metabolites which may lead to oxidative stress involved in the pathogenesis of the disease. Patients before treatment trended to release higher IL-17 and IFN- γ in comparison to after treatment. Significant differences were detected in IL-6 and IL-10 levels. Patients before treatment presented higher production of both cytokines when compared to control subjects. However, after treatment, this production was significantly lowered, reaching levels similar to those of control subjects. Regarding redox state, patients with active disease exhibited an

increase in the levels of malondialdehyde (MDA), an indicator of lipidic peroxidation, associated with a decrease in antioxidant carotenoids such as lycopene and lutein, which reveals the presence of an oxidative imbalance in these patients. Associations between immunological findings and those relating to the redox status of patients and their implications for the pathogenesis of leishmaniasis are discussed.

Keywords: Visceral leishmaniasis, Immune response, Oxidative stress



Sumário

Sumário

Resumo

Abstract

CAPÍTULO I

Revisão da Literatura.....	1
Histórico da Doença.....	1
Etiologia.....	2
Vetor.....	3
Reservatórios.....	3
Ciclo biológico.....	4
Epidemiologia.....	5
Tratamento.....	6
Leishmaniose e Resposta Imunológica.....	7
Leishmaniose e Estresse Oxidativo.....	10
Objetivos	
Objetivo Geral.....	13
Objetivos Específicos.....	13
Referências Bibliográficas.....	14

CAPÍTULO II

Artigo (a ser submetido): Perfil de citocinas do padrão Th1, Th2, Th17 e o estado redox de indivíduos com leishmaniose visceral pré e pós tratamento.....	23
Resumo.....	24
1. Introdução.....	26
2. Casuística e Métodos.....	29
3. Análise Estatística.....	33
4. Resultados.....	34
5. Discussão.....	38
6. Referências Bibliográficas.....	44
CONCLUSÃO.....	52

ANEXOS

Anexo I: Artigo submetido.....	53
Anexo II: Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da FMB.....	73
Anexo III: Mudança de Título em Projeto de Pesquisa.....	77



Capítulo I

Revisão da Literatura

Histórico da Doença

Na Grécia em 1835, surgiu a primeira descrição da Leishmaniose Visceral (LV). Anteriormente era conhecida como “ponos”, que na mitologia grega quer dizer, “Deus da dor”. Em 1869, na Índia, foi nomeada de “Kala-jwar” (febre negra) ou “Kala-azar” (Calazar) por causa do escurecimento da pele ocorrido durante a doença ⁽¹⁾.

Em Bengal na Índia, no ano de 1900, William Boog Leishman identificou no baço de um soldado, a presença de um protozoário em decorrência da febre “Dum Dum”. Em 1903, o agente etiológico foi descrito por Donovan que confirmou a presença dos parasitos em aspirados esplênicos de uma criança que apresentava febre irregular. O primeiro a cultivar o parasita em sangue citratado a 22°C, foi Rogers, em 1904. Ele observou que nas culturas o parasita se apresentava na forma flagelada. Nicolle e colaboradores encontraram parasitos em cães no ano de 1908, na Tunísia, sugerindo o papel destes animais como reservatórios. Apenas no ano de 1931 é que os flebotomíneos foram incriminados como vetores, quando a transmissão da doença ficou conhecida através de xenodiagnóstico em hamsters. Henrique Penna relatou os primeiros casos da infecção no Brasil em 1934, a partir de lâminas histológicas de fígado examinadas *post mortem* para diagnóstico de febre amarela. Evandro Chagas estudando a epidemiologia da doença suspeitou que o mosquito responsável pela transmissão aos humanos fosse o flebotomíneo *L. longipalpis* devido a sua constante presença ao redor e no interior das residências de pacientes doentes ^(2,3,4,5,6).

Etiologia

As leishmanioses são causadas por protozoários intracelulares obrigatórios que pertencem à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatida* e ao gênero *Leishmania* ⁽⁷⁾. Existem mais de 21 espécies de *Leishmania*, que podem ser transmitidas ao homem por aproximadamente 30 diferentes espécies de flebotomíneos ⁽⁸⁾. As espécies de parasitas responsáveis pela leishmaniose visceral são divididas em três gêneros: *Leishmania chagasi*, *Leishmania donovani* e a *Leishmania infantum*. A *L. infantum* e a *L. donovani* são os agentes causadores da doença nas áreas do mar Mediterrâneo e do Oriente Médio e a *L. chagasi* é responsável pela forma clínica da leishmaniose visceral nas Américas Central e do Sul, incluindo o Brasil ^(9,10). O protozoário *Leishmania* apresenta-se sob duas formas evolutivas: promastigotas (Figura 1A), forma flagelada livre, encontrada no tubo digestório do hospedeiro invertebrado, e amastigotas (Figura 1B), intracelulares, predominante no hospedeiro vertebrado, cujo flagelo está restrito a bolsa flagelar ⁽¹¹⁾.

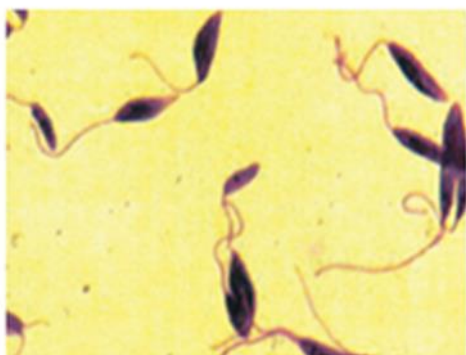


Figura 1 A. Formas promastigotas ou flageladas do parasita

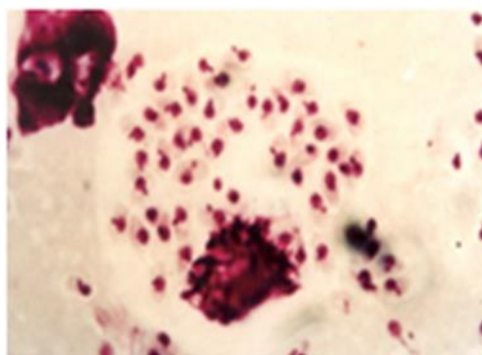


Figura 1 B. Formas amastigotas ou aflageladas do parasita

Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

Vetor

Os vetores relacionados com a dispersão do agente são os mosquitos da família dos flebotomídeos, do gênero *Lutzomyia*. A espécie *Lutzomyia longipalpis*, também conhecida por mosquito-palha, birigui ou tatuquiras, se constitui no principal vetor brasileiro. O inseto vetor mede de 2 a 3 milímetros (Figura 2) e vive em ambientes peri-domésticos, sendo amplamente distribuído em toda a América Latina ^(12,13). Os vetores vivem em habitats variados, mas as formas imaturas desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e de baixa densidade luminosa ^(14,15).



Figura 2. Inseto vetor (*Lutzomyia longipalpis*)

Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lutzomyia_longipalpis-sandfly.jpg

Reservatórios

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose, tendo o cão (Figura 3A) como principal reservatório animal nos centros urbanos e raposas (Figura 3B) e outros mamíferos em ambientes silvestres ^(16,17,18). Sabe-se que fatores genéticos, desnutrição e presença de animais infectados no ambiente são grandes contribuintes para a manutenção do alto índice dessa doença ^(19,20,21).



Figura 3 A. Cão (reservatório centros urbanos)



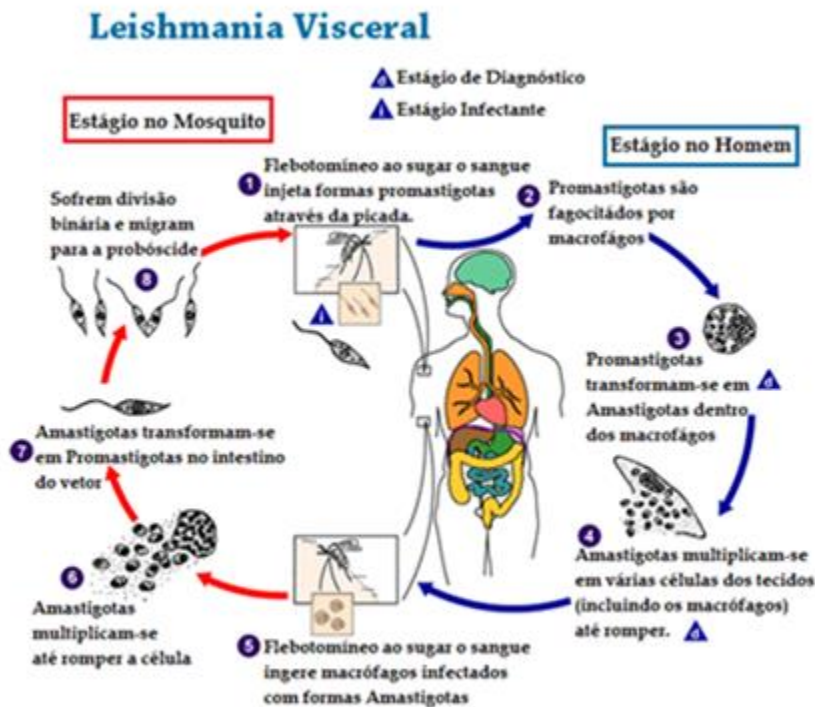
Figura 3 B. Raposa (reservatório silvestre)

Fonte: <http://brasilecola.uol.com.br/doencas/leishmaniose-visceral.htm/>
Fonte: http://www.cstr.ufcg.edu.br/grad_med_vet/mono2010_1/mono_gilzane.pdf

Ciclo Biológico

Os reservatórios são infectados a partir da picada das fêmeas dos flebotomídeos. Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomídeo ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* sp. Estas sofrem divisão binária, multiplicação e diferenciação em formas paramastigotas, as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo. Diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes. O ciclo biológico completa-se com a picada do flebótomo infectado e subsequente inoculação de formas promastigotas do parasita na corrente sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado. As formas infectantes são liberadas na epiderme do hospedeiro e fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos diferenciam-se em formas amastigotas, que se multiplicam intensamente por divisão binária. Os macrófagos, repletos de amastigotas, tornam-se desvitalizados e rompem-se liberando essas formas, que serão fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo. Ocorre então a disseminação hematogênica e

linfática para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário ⁽²²⁾.

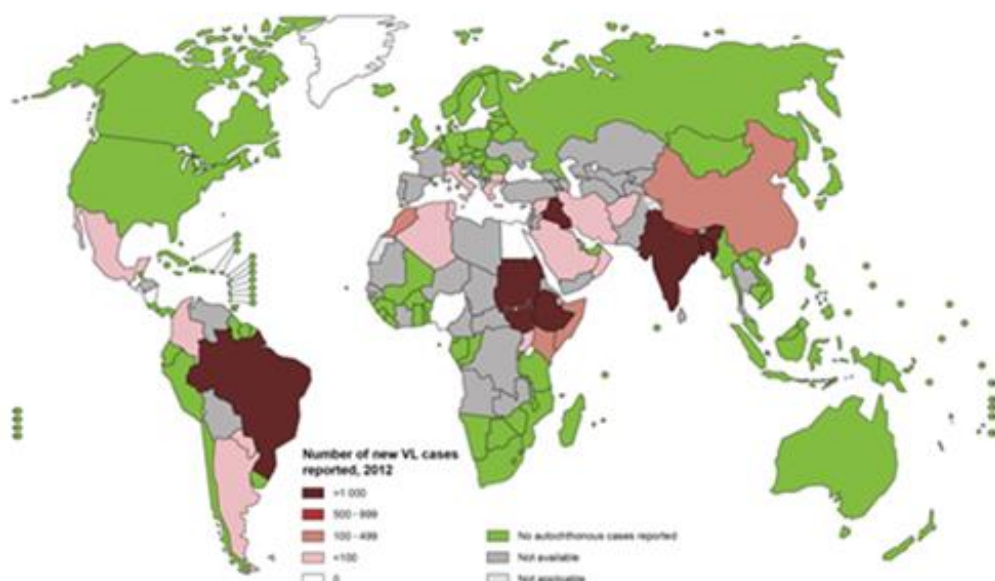


Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Epidemiologia

A LV é endêmica em 62 países, com 500.000 casos por ano e cerca de 200 milhões de pessoas estão vivendo em áreas de risco ^(23,24,25). Nos últimos dez anos, as regiões endêmicas da doença têm expandido juntamente com aumento do número de casos. No entanto, uma grande parcela de casos não é reportada e apenas 32 dos 88 países afetados consideram a leishmaniose uma doença de notificação compulsória ⁽²⁶⁾. No Brasil, a doença que era antigamente restrita às áreas rurais do nordeste, hoje já alcança os centros urbanos. A partir dos anos 90, as regiões Centro-oeste, Norte e Sudeste também começaram a fazer parte das estatísticas, sendo que em 2011 ocorreram

3.894 casos no país e 262 óbitos ^(27,28,29). No Estado de São Paulo, o primeiro caso humano foi em 1999 e desde então tem ocorrido uma expansão da área de transmissão da doença ⁽³⁰⁾. No período de 1999 a 2009 foram confirmados 1750 casos e entre 2010 a 2012 houve 484 casos de LV ^(31,32). No intervalo de 2012 a 2014, segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), foram confirmados no Estado de São Paulo 517 casos de LV e 39 óbitos ⁽³³⁾.



Fonte: WHO, 2014

Tratamento

Quanto ao tratamento da doença, os antimonaispentavalentes (SbV) são o tratamento de primeira escolha, no entanto, certos mecanismos de ação ainda não são completamente entendidos e seu uso é contraindicado em alguns casos ^(34,35). Alguns estudos mostram que SbV possui atividade leishmanicida e aumenta a produção dos

reativos do oxigênio. Na década passada foram registrados casos de resistência aos antimoniais e falhas terapêuticas ⁽³⁶⁾. A anfotericina B é usada desde os anos 1960 como o medicamento de segunda escolha, o qual exibe uma taxa de cura de 90 a 95% ⁽³⁷⁾. É indicada também em casos de toxicidade ou resposta insatisfatória aos antimoniais, e é a primeira escolha para tratar pacientes grávidas e casos terminais da doença ⁽³⁴⁾. Formulações lipídicas da anfotericina B como a lipossomal, complexo lipídico e dispersão de colesterol são a primeira escolha de tratamento indicada pelo Ministério da Saúde em certos casos como, crianças, pacientes acima de 50 anos ou aqueles diagnosticados com complicações cardíacas, doenças no fígado, rim ou positivos para a doença de Chagas ^(38,39,40,41). As anfotericinas lipossomais são seletivamente absorvidas pelo retículo endoplasmático, e além de possuírem ação leishmanicida elevada, possuem menor toxicidade ^(39,40,41,42). É a primeira escolha de tratamento em países endêmicos da Europa e em países desenvolvidos por apresentar alta taxa de cura e um regime curto ^(38,39,40,41).

Leishmaniose e Resposta Imunológica

No que se refere à resposta imune do hospedeiro os estudos têm mostrado que a resistência a leishmaniose está associada à produção de citocinas com capacidade de ativar macrófagos, particularmente o IFN- γ , cuja produção é garantida pelo desenvolvimento de uma resposta específica do tipo Th1, que depende de uma instrução dada pela interação do microrganismo com células da resposta imune inata. Assim, em um primeiro contato, as formas promastigotas da *Leishmania* spp interagem com receptores presentes em células da resposta imune inata como células dendríticas (DCs) e macrófagos, que liberam IL-12, que por sua vez estimula as células NK a secretarem

IFN- γ . Juntas, a IL-12 e o IFN- γ induzem a diferenciação e proliferação de linfócitos CD4⁺ em células Th1, que por sua vez produzem mais IFN- γ . Essa citocina é considerada como a principal responsável pela indução da atividade leishmanicida por macrófagos, uma vez que induz a expressão da iNOS e produção de NO, que atua na eliminação dos parasitas e consequentemente na resolução da infecção ^(8,43,44). Além do IFN- γ , macrófagos infectados secretam TNF- α , que age em sinergismo com o IFN- γ no processo de ativação macrofágica que culmina em aumento da atividade leishmanicida mediada pela produção de NO ^(45,46,47). Os achados em pacientes têm confirmado esse mecanismo. Crianças infectadas com *L. chagasi*, vivendo em área endêmica, exibiram alta produção de IFN- γ quando células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram estimuladas com antígeno de *Leishmania*, e conseguiram controlar a infecção, enquanto que aquelas que apresentavam baixos níveis desta citocina progrediram para a doença ⁽⁴⁸⁾. Ao contrário, foi observada uma baixa resposta proliferativa de linfócitos contra o parasita e baixa produção de IFN- γ *in vitro*, associada com alta carga parasitária ⁽⁴⁹⁾. Em experimentos com células de pacientes com LV, a administração exógena de IL-12 induziu a produção de IFN- γ por PBMCs, restaurou a resposta proliferativa de linfócitos e diminuiu a apoptose espontânea ou induzida de PBMCs ⁽⁵⁰⁾. Pacientes com lesões cutâneas graves e aqueles com LV apresentam altos níveis de TNF- α ⁽⁵¹⁾. Além das células Th1, as células T CD8⁺ estão envolvidas na defesa contra a *Leishmania*, principalmente devido à produção de IFN- γ e da lise de células infectadas ^(51,52). Camundongos Balb/c infectados com *L. donovani* foram capazes de controlar a infecção devido ao aumento desse subtipo celular ⁽⁵³⁾. Ao contrário, a suscetibilidade à infecção e a progressão da leishmaniose estão relacionadas com a produção de citocinas, como a

IL-4 e a IL-10 e o TGF- β cuja principal função é a desativação de macrófagos^(46,47,54).

A liberação de IL-4 ocorre devido a uma indução preferencial de células Th2, já a de IL-10 pode ocorrer tanto por células Th2 como por células T reguladoras (Tregs) que são uma subpopulação de células T CD4+ que expressam o fator de transcrição Foxp3 (Fork head Box P3) e CD25, além de produzirem citocinas como a IL-10 e o TGF- β ^(55,56,57). Além da Th2 e da Treg, uma outra fonte importante de IL-10 é o próprio macrófago infectado.

Além das subpopulações Th1, Th2 e Treg, as células Th17 vêm ganhando destaque na resposta contra a *Leishmania*, apresentando, no entanto, resultados contraditórios. Em camundongos Balb/c infectados com *L. major* foi detectada alta produção de IL-17, acompanhada por gravidade da doença, destruição tecidual e grande carga parasitária. Camundongos Balb/c, deficientes de IL-17, desenvolveram lesões menores, sem acúmulo de CXCL2 e presença de poucos neutrófilos⁽⁵⁸⁾. Estudo realizado por Bacellar, *et al*⁽⁵⁹⁾ mostrou que tanto PBMCs quanto células T CD4+, presentes nas lesões de pacientes infectados com *L. braziliensis*, produzem altas quantidades de IL-17. Além disso, foi observado que esta citocina juntamente com TNF- α contribuiu para a patogênese da doença. Entretanto, em pacientes com Kala azar a produção de IL-17 e IL-12 foram associadas com resistência à doença, sugerindo que essas citocinas desenvolveram papel complementar às citocinas de padrão Th1 protegendo contra a doença⁽⁶⁰⁾. Estudo experimental com *L. donovani* mostrou que curdlan, um polissacarídeo com propriedades imunomoduladoras, é capaz de induzir citocinas Th17 como IL-17 e IL-23, o que contribuiu para a diminuição da carga parasitária⁽⁶¹⁾.

Leishmaniose e Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é classicamente definido como um evento resultante do desequilíbrio de magnitude entre substâncias oxidantes e antioxidantes ^(62,63). Ambas as substâncias (oxidantes e antioxidantes) são geradas em um cenário de reações de óxido-redução, onde a oxidação implica em ganho de elétron e a redução, em perda. Visto que a geração e a ação de substâncias oxidantes e antioxidantes dependem desse sistema de óxido-redução, muitos autores têm usado o termo desequilíbrio do sistema redox para se referir ao estresse oxidativo. Popularmente denominadas radicais livres, as substâncias oxidantes incluem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ^(64,65,66).

Em condições normais essas espécies são produzidas pelo organismo por serem essenciais em reações consideradas vitais para o organismo, como pelo sistema imunológico na destruição de micro-organismos, quimiotaxia de células inflamatórias, e pela enzima NADPH oxidase para participarem de reações químicas intracelulares ^(67,68).

Dentre as espécies mais comuns temos o hidroxil, hidroperóxil, superóxido, óxido nítrico, H_2O_2 , dentre outros. Todos esses, apresentam um elétron livre, por isso, a presença de antioxidantes é essencial para que essa espécie seja neutralizada e o organismo ficar em equilíbrio. Porém por algum motivo quando essas espécies são produzidas em abundância (estresse oxidativo) elas oxidam moléculas mais vulneráveis como os lipídeos, gerando produtos tóxicos como o malondialdeído os quais são produtos secundários do estresse oxidativo que atacam as proteínas e DNA, afetando suas estruturas fazendo com que percam sua função ⁽⁶⁹⁾.

As alterações observadas no estresse oxidativo podem ser encontradas em indivíduos saudáveis, contudo podem ser controladas pelos mecanismos antioxidantes os qual é composto por antioxidantes hidrofílicos como catalase, superóxido dismutase,

bilirrubina, ácido úrico, albumina e vitamina C e antioxidantes lipofílicos como os carotenóides, α -tocoferol. Por outro lado, indivíduos que se encontram doentes, em sua grande maioria, apresentam um desequilíbrio no sistema redox, favorecendo um intenso estresse oxidativo no organismo, que resulta na presença de grandes concentrações de espécies reativas do oxigênio e consequentemente na oxidação de moléculas vulneráveis e lesões teciduais. Neste contexto, os estudos têm proposto que o stress oxidativo pode estar envolvido na patogênese de várias doenças infecciosas e parasitárias, incluindo a leishmaniose. Como mencionado, o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra a leishmania, envolve a ativação de macrófagos e a consequente liberação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio que possuem atividade leishmanicida. No entanto, durante o processo de ativação, em uma tentativa de melhor eliminar os parasitas, essas células podem liberar concentrações elevadas destes metabólitos com consequente desenvolvimento de stress oxidativo. Existem poucos estudos avaliando se este processo pode estar associado com a patogênese da leishmaniose. Neste sentido, Neupane e colaboradores (2008) avaliaram, em eritrócitos de pacientes com leishmaniose, níveis de MDA (uma substância indicativa da peroxidação lipídica causada por excesso de espécies reativas), bem como os níveis de glutathione, um antioxidante endógeno. Observou-se um aumento de MDA, mas diminuição da glutathione, que revela um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes. Dois outros estudos realizados em cães infectados com leishmania também observaram um aumento nesse indicador da peroxidação lipídica e diminuição de carotenóides. Um outro estudo, em hamsters, confirma que a doença provoca aumento nos níveis de MDA, mas consumo de vitaminas antioxidantes. Neupane e colaboradores (2008) também observaram um aumento de MDA e diminuição de

antioxidantes tais como alfa-caroteno, criptoxantina, alfa-tocoferol e retinol em doentes com doença activa. No entanto, após o tratamento, houve uma diminuição nos níveis de MDA e aumento nos níveis de alguns destes antioxidantes, mostrando que o tratamento pode reverter parcialmente o stress oxidativo desenvolvido durante a doença. Os trabalhos acima apontam para a necessidade de se elaborar estudos que visem aprofundar o nosso conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do stress oxidativo na leishmaniose ^(70,71,72,73,74).

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a produção de citocinas de padrão Th1, Th2 e Th17 e mediadores do estresse oxidativo no plasma de pacientes com leishmaniose visceral antes e após tratamento.

Objetivos Específicos

- Avaliar a produção das citocinas IFN γ , IL-6, TNF- α , IL17, IL-10 e TGF- β , pela técnica de CBA.
- Avaliar as concentrações de malondialdeído (MDA), um indicador de peroxidação lipídica.
- Avaliar o sistema antioxidante pela aferição das concentrações de carotenóides, α -tocoferol e retinol por HPLC, e a capacidade antioxidante hidrofílica (CAH) das amostras.

Referências Bibliográficas

- 1- Marzochi MCA, Coutinho SG, SouzaWJS, Amendoeira MRR. Leishmaniose Visceral (Calazar). *Jornal Brasileiro de Medicina* 1981; 41:69-84.
- 2- Michalick MSM, Genaro O. Leishmaniose visceral americana. *In* D Neves, AL Melo, PM Linardi, RWA Vitor. *Parasitologia humana*. 11th ed. Atheneu, São Paulo; 2005. p. 56-72.
- 3- Chagas E. Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Science* 1936; 84(2183):397-8.
- 4- Genaro O. Leishamniose visceral americana. *In*: Neves DP, Melo AL, Linardi PM. *Parasitologia Humana*. Atheneu, São Paulo; 2000. p. 56-72.
- 5- Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. *In*: FEG Cox, D Wakelin, SH Gillespie, DD Despommier (eds), *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections. Parasitology*. 10th ed. ASM Press London; 2005. p. 313-349.
- 6- Rangel EF, Lainson R. Ecologia das leishmanioses. *In*: Rangel EF, Lainson R. (org.). Editora FIOCRUZ. *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro; 2003. p.291-309.
- 7- Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research* 2006; 123:311-30.
- 8- Cunningham AC. Parasitic adaptative mechanisms in infection by Leishmania. *Experimental and Molecular Pathology* 2002; 72:132-41.
- 9- Fraser CM. Manual Merck de Veterinária: um manual de diagnostico, tratamento, prevenção e controle de doenças para veterinária. 9 ed. São Paulo: Roca; 2008. p. 543-544.
- 10- Almeida MAO, et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology* 2005; 127: 227-232.

- 11- Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis - The Neotropical Leishmania species. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D (Eds.). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology 1998; 242-266.
- 12- Lainson R, Rangel EF. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100:811–27.
- 13- Carrasco J, Morrison A, Ponce C. Behaviour of Lutzomyia longipalpis in an area of southern Honduras endemic for visceral/atypical cutaneous leishmaniasis. Ann Tropical Medicine Parasitology 1998; 92:869–76.
- 14- Camargo JB, Troncarelli MZ, Ribeiro MG, Langoni H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. Clínica Veterinária 2007; (71)86-92.
- 15- Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba. Clínica Veterinária 2000; (28)36-44.
- 16- Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. Parasitology 1997; 115(2):143–56.
- 17- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Dye C. Low infectiousness of a wildlife host of Leishmania infantum: the crab-eating fox is not important for transmission. Parasitology 2002; 125:407–14.
- 18- Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Gonçalves A, et al. Didelphis marsupialis, an important reservoir of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi and Leishmania (Leishmania) chagasi in Colombia. Am J Trop Med Hyg 1994; 50:557–65.
- 19- Jeronimo SM, Duggal P, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Cabral AP, et al. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan Leishmania

chagasi: a genomewide scan. *Journal of Infectious Diseases* 2007; 196:1261–69.

20- Malafaia G. Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review. *Parasite Immunology* 2000; 31:587-96.

21- Oliveira CD, Diez-Roux A, Cesar CC, Proietti FA. A case-control study of microenvironmental risk factors for urban visceral leishmaniasis in a large city in Brazil, 1999–2000. *Revista Panamericana Salud Pública* 2006; 20:369–76.

22- Ikeda-Garcia FA, Marcondes M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clínica Veterinária* 2007; (71)34-42.

23- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*.1999; 354: 1191–99.

24- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunology Microbiology Infectious Diseases* 2004; 27:305–18.

25- Unicef/Undp/World Bank/WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Leishmaniasis: Disease Information [Acesso em 20 dez 2013]. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>.

26- WHO-World Health Organization. Leishmaniasis: Magnitude of Problem [Acesso em 18 dez 2013]. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html.

27- Ministério da Saúde (Brasil). Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Bol Epidemiol*. 2001; 6:1-11.

28- Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral. Casos confirmados de leishmaniose visceral. Brasil, Grandes regiões e Unidades Federadas 1990-2011. Brasília: Ministério da Saúde; 2012 [acesso em 18 dez 2013]. Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_casos_de_lv_entre_1990_e_2011_final.pdf.

29- Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral. Óbitos por leishmaniose visceral. Brasil, Grandes regiões e Unidades Federadas-1990-2011. Brasília: Ministério da Saúde; 2012 [acesso em 18 dez 2013].

Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_obitos_por_lv_entre_1990_e_2011_final.pdf.

30- Neves VLFC. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: Situação Atual. Boletim Epidemiológico Paulista 2004; 6:1-4.

31- Centro de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral Americana - Distribuição do número de casos e óbitos de LVA segundo município e CVE de infecção. Estado de São Paulo, 1999 a 2009 [acesso em 19 fev 2013]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah9909_lpi.htm.

32- Centro de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral Americana - Distribuição do número de casos e óbitos de LVA segundo município e CVE de infecção. Estado de São Paulo, 2010 a 2013 [acesso em 19 dez 2013]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_lpi.htm.

33- Centro de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral Americana - Distribuição do número de casos e óbitos de LVA segundo município e CVE de infecção. Estado de São Paulo, 2012 a 2014 [acesso em 19 jan 2016]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/dados/lv1214_sh_gve.pdf.

34- Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Vigilância Epidemiológica.

Leishmaniose Visceral Grave. Normas e Condutas. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

35- Maltezou HC, Siafas C, Mavrikou M, Spyridis P, Stavrinadis C, Karpathios T, et al. Visceral leishmaniasis during childhood in Southern Greece. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31(5):1139–43.

36- Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31(4):1104–07.

37- Lachaud L, Bourgeois N, Plourde M, Leprohon P, Bastien P, Ouellette M. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfectd with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. *Clinical Infectious Diseases* 2009; 48(2):e16–e22.

38- Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 2007; 77(2):266–74.

39- Gradoni L, Soteriadou K, Louzir H, Dakkak A, Toz SO, Jaffe C, et al. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. *American Journal Tropical Medicine Int Health* 2008; 13(10):1272–76.

40- Thakur CP, Pandey AK, Sinha GP, Roy S, Behbehani K, Olliaro P. Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1996; 90(3):319–22.

41- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Mishra M, Singh VR, Buffels R. Low-dose liposomal amphotericin B in refractory Indian visceral leishmaniasis: a multicenter study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; 66(2):143–46.

- 42- Singh N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Indian Journal of Medical Research* 2006; 123(3):411–22.
- 43- Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, AlMusawi T, Duarte MI, Neto VM. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infection and Immunity* 2008; 76(3):886-72.
- 44- Amato VS, de Andrade HF, Duarte MI. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Tropical* 2003; 85:39–49.
- 45- Ray M, Gam AA, Boykins RA. Inhibition of interferon- γ signaling by *Leishmania donovani*. *Journal of Infectious Diseases* 2000; 181:1121-8.
- 46- Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology and Medical Microbiology* 2007; 51(2):229–42.
- 47- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2 (11):845–58.
- 48- Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Régis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN- γ production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology* 1994; 152:5949–56.
- 49- Khalil EAG, Ayed NB, Musa AM, Ibrahim ME, Mukhtar MM, Zijlstra EE, et al. Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. *Clinical Experimental Immunology* 2005; 140(2):349–53.
- 50- Bacellar O, Brodskyn C, Guerreiro J, Barral-Netto M, Costa CH, Coffman RL, et al. Interleukin-12 restores interferon- γ production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 1996; 173(6):1515-18.
- 51- Mary C, Auriault V, Faugere B, Dessein AJ. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8 (+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing

CD4(+) antigenspecific T cells. *Infection and Immunity* 1999; 67:5559-66.

52- Kharazmi A, Kemp K, Ismail A, Gasim S, Gaafar A, Kurtzhals JAL, et al. T-cell response in human leishmaniasis. *Immunology Lett* 1999; 65:105–8.

53- Stern JJ, Oca MJ, Rubin BY, Anderson SL, Murray HW. Role of L3T4 and LyT-21 cells in experimental visceral leishmaniasis. *Journal Immunology* 1988; 140: 3971-77

54- Reed SG. TGF- β in infections and infectious diseases. *Microbiology Infection* 1999; 1(15):1313–25.

55- Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Dhao ZM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunology Reviews* 2006; 212:60–73.

56- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002; 420:502–07.

57- Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *Journal of Experimental Medicine* 2004; 200(2):201–210.

58- Kostka SL, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, Stebut E. IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. *Journal of Immunology* 2009; 182:3039–3046.

59- Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO et al. Interleukin 17 production among patients with american cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 2009; 200:75-8.

60- Pitta MGR, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania*

donovani. *Journal of Clinical Investigation* 2009; 119(8):2379–87.

61- Ghosh K, Sharma G, Saha A, Kar S, Das PK, Ukil A. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines. *Journal of Infectious Diseases Adv* 2013.

62- Ferreira ALA, Salvatori DMF, Nascimento MCMO, Rocha NS, Correa CR, et al. Tomatooleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutation Research* 2007; 631:26-35.

63- Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch. Biochemistry and Biophysics* 2004; 430:97-103.

64- Ralser M, Wamelink MM, Kowald A. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology* 2007; 6:1-18.

65- Grant CM. Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *Journal of Biology* 2008; 7:1.

66- Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Medicine Research Review* 2008; 28:569-631.

67- Albert van der Vliet. NADPH oxidases in lung biology and pathology: Host defense enzymes, and more. *Free Radical Biology & Medicine* 2008; 938–955.

68- Heme on innate immunity and inflammation Fabianno F. Dutra and Marcelo T. Bozza. *Pharmacology* 2014; 27(5):115.

69- Mandelker L. Oxidative Stress, Free Radicals, and Cellular Damage. *Studies on Veterinary Medicine. Part of the series Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*; 2011. p.1-17.

- 70- Sardar AH, Kumar S, Kumar A, et al. Proteome changes associated with *Leishmania donovani* promastigote adaptation to oxidative and nitrosative stresses. *Journal of Proteomics* 2013; 81:185-99.
- 71- Neupane DP, Majhi S, Chandra L, Rijal S, Baral N. Erythrocyte glutathione status in human visceral leishmaniasis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2008; 23:95-7.
- 72- Bildik A, Kargin F, Seyrek K, Pasa S, Ozensoy S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. *Research Veterinary Sci* 2004;77:63-6.
- 73- Heidarpour M, Soltani S, Mohri M, Khoshnegah J. Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. *Parasitology Research* 2015; 111:1491-6.
- 74- Oliveira FJ, Cecchini R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. *Journal Parasitology* 2000; 86:1067-72.



Capítulo II

Perfil de citocinas do padrão Th1, Th2, Th17 e o estado redox de indivíduos com leishmaniose visceral pré e pós tratamento

Francilene Capel Tavares de Carvalho¹, Mariana Gatto¹, Karen Ingrid Tasca¹, Marjorie de Assis Golim², Camila Renata Correa³, Laura Denise Mendes da Silva¹, Nayara Vieira Cavassan¹, Patrícia Aparecida Borim¹, Ângela Maria Victoriano de Campos Soares⁴, Rodrigo Mattos dos Santos¹, Lucilene Delazari dos Santos¹, Sueli Aparecida Calvi¹

¹ Departamento de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil.

² Laboratório de Citometria de Fluxo, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil

³ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil.

⁴ Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Brasil.

Autor correspondente: francilene_capel@hotmail.com

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é causada pelos protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao complexo *L. donovani*. O sucesso na cura na LV depende principalmente do estado imunitário do hospedeiro em combinação com os efeitos das drogas leishmanicidas. Nesse sentido, a resistência do hospedeiro a leishmaniose está associada à produção de citocinas envolvidas na indução e efetuação de uma resposta do tipo Th1, como IL-12, IFN- γ e TNF- α . Essa resposta culmina na ativação de macrófagos com conseqüente aumento na produção de metabólitos do estresse oxidativo com atividade leishmanicida. Por outro lado, a suscetibilidade à infecção e a progressão da doença estão relacionadas com o direcionamento de uma resposta do tipo Th2, com produção de IL-4 e de outras citocinas como a IL-10, que desativam macrófagos. A subpopulação de células Th17 vem ganhando importância na resposta contra a *Leishmania*, entretanto não se sabe até o momento se está envolvida na resistência ou suscetibilidade à infecção. Apesar desses resultados, são raros os trabalhos que tenham objetivado avaliar de forma sistemática, os perfis de resposta de células CD4⁺ em pacientes com LV, antes e após o tratamento. Desta forma, um dos objetivos do presente estudo foi quantificar as citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 nestas duas fases da evolução da doença. Outro objetivo foi avaliar o estado redox desses pacientes, uma vez que ao tentar eliminar o parasita através do processo de ativação de macrófagos, os mesmos podem liberar quantidades exageradas de metabólitos leishmanicidas, que podem levar a um estresse oxidativo envolvido na patogênese da doença. Foi observada uma tendência dos pacientes apresentarem um aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-17 e IFN- γ antes do tratamento com diminuição após o tratamento. Diferenças significantes, foram detectadas em relação aos níveis de IL-6 e IL-10.

Pacientes antes do tratamento apresentaram uma produção mais alta das duas citocinas em relação aos indivíduos controles. No entanto, após o tratamento, essa produção abaixou de forma significativa, atingindo novamente níveis semelhantes aos dos indivíduos controles. Em relação ao estado redox detectamos que pacientes com a doença ativa apresentaram um aumento da substância malondialdeído (MDA), associado a uma diminuição de carotenóides antioxidantes como o licopeno e a luteína o que revela a presença de um desequilíbrio oxidativo nesses pacientes. As associações entre os achados imunológicos e os relativos ao estado redox dos pacientes e as suas implicações para a patogênese da leishmaniose são discutidos.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, Sistema immune, Citocinas, Estado redox.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do complexo *Leishmania donovani* que pode ser manifestada sob duas formas, a cutânea e a visceral. A forma visceral da leishmaniose, também chamada Kala Azar, é letal se não tratada, por comprometer o baço, fígado (esplenomegalia e hepatomegalia) e linfonodos, além de causar febre, anemia, perda de peso, hiperglobulinemia e pancitopenia ^(1,2,3,4,5). Embora os fatores de risco para essa doença não sejam totalmente conhecidos, sabe-se que fatores genéticos, desnutrição e presença de animais infectados no ambiente são grandes contribuintes para a manutenção do alto índice dessa doença ^(6, 7, 8).

Para defender o organismo desse protozoário, a resposta imunológica tem papel decisivo na interação patógeno-hospedeiro. Quando a infecção ocorre, as formas promastigotas da leishmaniose interagem com receptores presentes em células da resposta imunológica inata como células dendríticas (DCs) e macrófagos, o que permite sua fagocitose e o desencadeamento sucessivo de mecanismos efetores da resposta adaptativa. Estudos têm mostrado que a resistência à leishmaniose está associada a produção de citocinas capazes de ativar macrófagos, particularmente o *interferon gamma* (IFN- γ), cuja indução é proveniente, principalmente, pelo desenvolvimento de uma resposta específica do tipo T *helper* 1 (Th1). Esta citocina é secretada, também, por células T CD8+, que estão envolvidas, inclusive, na lise de células infectadas ^(9,10,11). Ao contrário, a suscetibilidade à infecção e a progressão da leishmaniose estão relacionadas com a produção de citocinas do perfil Th2 e T reguladoras (Tregs), como as interleucinas 4 e 10 (IL-4 e a IL-10) e o TGF- β que desempenham a função de desativação de macrófagos ^(12,13,14,15,16,17). Outra população de células que vêm ganhando

destaque na resposta contra a *Leishmania* é a Th17 que, na literatura, apresenta resultados contraditórios frente ao seu papel na patogênese da doença. Em camundongos Balb/c infectados com *L. major* foi detectada alta produção de IL-17, acompanhada por gravidade da doença, destruição tecidual e grande carga parasitária. Camundongos Balb/c, deficientes de IL-17, desenvolveram lesões menores, sem acúmulo da quimiocina CXCL2 e presença de poucos neutrófilos ⁽¹⁸⁾. Estudo realizado por Bacellar, *et al* ⁽¹⁹⁾ mostrou que tanto células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) quanto células T CD4+, presentes nas lesões de pacientes infectados com *L. braziliensis*, produzem altas quantidades de IL-17. Além disso, foi observado que esta citocina juntamente com o fator de necrose tumoral *alpha* (TNF- α) contribuiu para a patogênese da doença. Entretanto, em pacientes com Kala-zar a produção de IL-17 e IL-12 foram associadas com resistência à doença, sugerindo que essas citocinas desenvolveram papel complementar às citocinas de padrão Th1 protegendo contra a doença ⁽²⁰⁾. Estudo experimental com *L. donovani* mostrou que curdlan, um polissacarídeo com propriedades imunomoduladoras, é capaz de induzir citocinas do perfil Th17 como IL-17 e IL-23, o que contribuiu para a diminuição da carga parasitária ⁽²¹⁾. Apesar desses estudos, são raros os trabalhos que tenham objetivado avaliar de forma sistemática, os perfis de resposta de células auxiliares (CD4+) em pacientes com LV, antes e após o tratamento. Essa abordagem se torna necessária para o estabelecimento mais definitivo dos mecanismos de resistência e suscetibilidade à infecção.

No que se refere ao tratamento da leishmaniose as drogas de primeira escolha, estão os antimonais pentavalentes (SbV), o qual é contraindicado em alguns casos devido a certos mecanismos de ação que ainda não são completamente entendidos ⁽²²⁾. Em casos de toxicidade ou resposta insatisfatória aos antimonais, a anfotericina B é

indicada. Ela é considerada, também, droga de primeira escolha para tratar pacientes grávidas e casos terminais da doença ^(23,24). Já as anfotericinas lipossomais são seletivamente absorvidas pelo retículo endoplasmático e possuem, além de menor toxicidade, ação leishmanicida elevada ^(22,24,25,26). Esses tratamentos têm sido eficazes, porém não está bem estabelecido como o estado redox e o sistema imunológico se comportam perante eles.

Baseado nesses relatos fica claro que a resposta imunológica e os diferentes perfis Th1, Th2 e Th17 estão envolvidos na tentativa de eliminar o hospedeiro, porém o mecanismo pelo qual as células eliminam esse microorganismo tem sido muito investigado.

Estudos têm demonstrado que diversas células inflamatórias utilizam a formação de espécies reativas para eliminar parasitas tanto intracelulares como extracelulares ^(27,28,29). Entretanto, a produção dessas espécies em excesso, fenômeno conhecido como estresse oxidativo, passa a ser tóxica para o organismo, pois elas têm a capacidade de oxidar moléculas vitais como proteínas, lipídeos e o DNA, podendo levar a várias complicações e até ao desenvolvimento de outras doenças ⁽³⁰⁾. Um dos fatores que retarda ou até impede o desenvolvimento do estresse oxidativo, é o sistema antioxidante que neutraliza essas espécies impedindo que afetem biomoléculas ⁽³¹⁾. Esse sistema é composto por algumas enzimas produzidas endogenamente, mas principalmente pelas vitaminas e os carotenóides os quais são encontrados em frutas e hortaliças como a luteína, criptoxantina, alfa e beta caroteno e licopeno ⁽³²⁾.

Baseados nos relatos acima podemos hipotetizar que na leishmaniose, durante o desenvolvimento do principal mecanismo de defesa do hospedeiro que é a ativação de macrófagos, ocorreria uma produção excessiva de metabólitos do oxigênio e do

nitrogênio com capacidade leishmanicida, que levariam os pacientes a desenvolverem um estresse oxidativo envolvido na patogênese da doença.

Diante do exposto, objetivamos avaliar no plasma de pacientes com leishmaniose visceral, antes e após o tratamento, os níveis de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17, assim como de mediadores do estresse oxidativo e antioxidantes.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1. Casuística

Foram estudados 13 indivíduos com leishmaniose visceral pré e pós-tratamento. Também, foram avaliados 18 indivíduos controles, todos doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os pacientes foram atendidos no Hospital Estadual de Bauru – São Paulo e no Hospital das Clínicas (Unidade II) da Faculdade de Medicina de Marília. Foram incluídos apenas os pacientes e controles que concordaram em participar do estudo, após o devido esclarecimento e assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sob protocolo nº 531.834/2014.

2.2. Métodos

2.2.1. Formação dos grupos de estudo

Foram formados 3 grupos:

Grupo 1 (G1): 13 pacientes com leishmaniose visceral antes do tratamento (considerado o primeiro momento do estudo, M1).

Grupo 2 (G2): 11 dos pacientes que participaram do M1, analisados cerca de 3

meses após o tratamento (Segundo momento, M2).

Grupo 3 (G3): 18 indivíduos sem a infecção, saudáveis, doadores de sangue e, sem queixas clínicas. Estes indivíduos foram avaliados apenas uma vez para estabelecer o padrão de normalidade das variáveis estudadas (grupo controle).

Critérios de inclusão no estudo: idade maior ou igual a 18 anos, ambos os sexos, diagnóstico de leishmaniose visceral comprovado.

Critérios de exclusão no estudo: gestantes, doenças de origem granulomatosa e sorologia positiva para HIV.

2.2.2. Diagnóstico de leishmaniose visceral

O diagnóstico de leishmaniose visceral foi realizado por exame parasitológico, através de aspirado de medula óssea.

2.2.3. Caracterização dos pacientes

A tabela 1 contém os dados coletados de 13 pacientes com LV e 18 indivíduos do grupo controle, com os respectivos valores de p. A idade média dos indivíduos do G1 (grupo controle) foi de 31,3 anos e de G2 (pacientes) foi de 36,3 anos (faixa de 23 a 72 anos). O hábito de fumar ou o etilismo foram observados apenas no grupo G2, com uma porcentagem de 38,6% para o tabagismo e 7,6% para o etilismo. Nesta tabela ainda são mostrados os 3 tipos de tratamento adotados para os pacientes.

Tabela1. Caracterização dos pacientes com leishmaniose visceral e grupo controle.

Variáveis	Pacientes (n=13) G1 e G2	Controles (n=18) G3	Valor de p
Gênero Masculino – n (%)	11 (84,6%)	13 (72,2%)	0,667
Gênero Feminino – n (%)	2 (15,4%)	5 (27,8%)	0,667
Média da Idade (anos)	36,3±11,59	35,18±10,13	0,862
Tabagismo - n (%)	5 (38,6%)	0 (0%)	0,008
Etilismo - n (%)	1 (7,6%)	0 (0%)	0,419
Tratamento com Anf. B* - n (%)	4 (30,8%)	-	-
Tratamento com Anf. L** - n (%)	7 (53,8%)	-	-
Tratamento com Gluc.*** - n (%)	2 (15,4%)	-	-

* AnfotericinaB → 1mg/ kg/ dia por 20 dias

**Anfotericina B Lipossomal→ 5mg/ kg/ dia por 5 dias

***Glucantime→ 20mg/ kg/ dia por 20 dias

2.2.4. Coleta de sangue

A coleta de 20 mL de sangue em tubo hepaninizado, foi realizada em um único momento para os indivíduos controles e, em dois momentos nos pacientes (pré e pós-tratamento). Em seguida, os tubos foram centrifugados para separação da fração plasmática, que foram alíquotas e armazenadas a -80° C até a realização das análises.

2.2.5. Avaliação da produção de citocinas

A dosagem plasmática das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17, IL-6 e TGF- β foi realizada pela técnica CBA, e analisadas em citômetro de fluxo modelo FACSCALIBUR™ (Becton Dickinson) usando o programa “Cell Quest” (Becton Dickinson) de acordo com as indicações do fabricante. Os resultados foram expressos

em pg/mL.

2.2.6. Avaliação do estresse oxidativo

Para avaliar o estresse oxidativo utilizou-se o indicador de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA) e, à partir de 100µL de plasma de cada indivíduo do estudo, a técnica de cromatografia de alta eficiência (HPLC) foi realizada ⁽³³⁾. A fase móvel foi composta de 20mM tampão fosfato: acetonitrila (80:20). O fluxo PE 0,8mL/min. Para a quantificação dos cromatogramas foi realizada a comparação entre as relações área da substância/área do padrão, obtidas na análise. Os resultados foram expressos em µmol/mL.

2.2.7. Medida da capacidade antioxidante hidrofílica (CAH)

A medida da capacidade antioxidante hidrofílica foi determinada fluorometricamente, conforme protocolo descrito por Beretta e colaboradores (2006) ⁽³⁴⁾ utilizando leitor VICTOR X2 (Perkin Elmer –Boston, MA) . A capacidade antioxidante foi quantificada por meio de comparação da área sobre a curva relativa à cinética de oxidação da suspensão fosfatidilcolina (PC), o qual foi usado como referência de matriz biológica. O 2',2 Azobis (2- amino-propano)- dihydroclorado (AAPH) foi usado como iniciador de radical peroxil. Os resultados representam a porcentagem de inibição do (4,4-difluoro-5-(4-fenil-1-3butadienil)-4-bora-3^a,4^a-diazas-indaceno-3-cidoundecanóico (BODIPY) 581/591 no plasma com relação ao que ocorreu na amostra controle do BODIPY 581/591 em lipossoma PC. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram apresentados em porcentagem de proteção.

2.2.8. Avaliação de vitaminas (carotenóides, α -tocoferol e retinol)

Os carotenóides, α -tocoferol e retinol e foram medidos por HPLC, em coluna C30 (Waters –YMCcarotenoid: 4,6 x 150mm; 3,0µm). Foram extraídos duas vezes do

soro (100µL) os carotenoides com clorofórmio: metanol (2:1 v/v) e hexano em seguida secos em nitrogênio e ressuspendido em 100uL de etanol em 20 uL dessa amostra injetado no HPLC. Padrão interno *echinenona* foi adicionado na amostra antes da extração. Um detector de fotodiodo foi utilizado para quantificar carotenóides (leitura a 455 nm), retinol (325 nm) e α -tocoferol (290 nm)⁽³⁵⁾. Para a quantificação dos cromatogramas foi realizada a comparação entre as relações área da substância pela área do padrão interno, obtidas na análise. Os valores das substâncias da solução padrão foram corrigidos por seus coeficientes de extinção molar, e expressos em µmol/mL.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A dosagem das citocinas foi analisada pelo teste de Wilcoxon para dados assimétricos entre dois grupos dependentes. Dados assimétricos entre dois grupos independentes foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. Todas as análises foram realizadas usando o software Graphpad Prims 5.01 e foram considerados significativos dados com $p < 0,05$.

Os dados categóricos foram avaliados por teste de χ^2 quadrado ou teste exato de Fisher, quando o número de observação foi inferior a 5.

Realizou-se também um teste de normalidade para verificar a distribuição dos dados, para as dosagens de vitaminas, de indicador de peroxidação lipídica malonildialdeído (MDA) e medida da capacidade antioxidante hidrofílica. Como, os mesmos apresentaram uma distribuição assimétrica, optou-se por ajustar um Modelo Linear Generalizado com Distribuição Gamma seguida do Teste de comparação múltipla de Wald. Considerou-se $p < 0,05$ como nível de significância. O programa utilizado para realizar as análises foi o programa SAS for windows, versão 9.2.

4. RESULTADOS

4.1. *Quantificação de citocinas*

Os níveis das citocinas IL-17, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-6 e IL-10 detectados nos plasmas de indivíduos controles, e pacientes com LV antes e após o tratamento podem ser analisados nas Figuras 1 A,B, C, D, E e F, respectivamente. Observamos que, de uma forma geral, foram detectados níveis bastante baixos das citocinas no plasma dos 3 grupos. Em relação às citocinas pró-inflamatórias IL-17, TNF- α e principalmente IFN- γ houve uma tendência de os pacientes após o tratamento apresentarem uma diminuição dos níveis. No entanto, diferenças importantes foram detectadas em relação aos níveis de IL-6 e IL-10. Pacientes antes do tratamento apresentaram uma produção significativamente mais alta em relação aos indivíduos controles. Após o tratamento essa produção abaixou de forma significativa, atingindo novamente níveis semelhantes aos dos indivíduos controles.

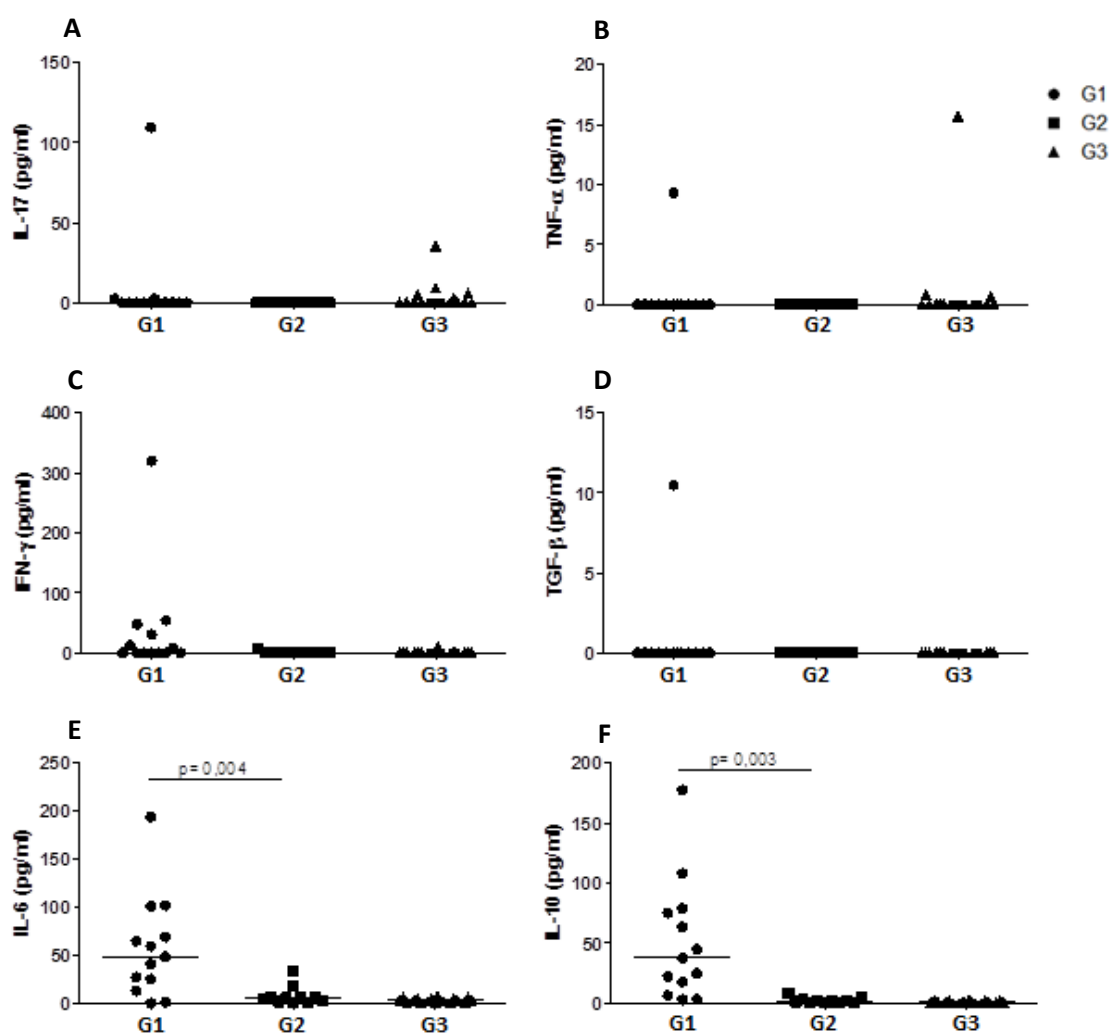


Figura 1 (A,B,C,D,E,F). Quantificação das citocinas IL-17, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-6 e IL-10 no plasma de indivíduos controles e pacientes com LV antes e após o tratamento. A linha horizontal representa a mediana. G1= grupo antes do tratamento, G2= após o tratamento, G3= grupo controle. Testes utilizados: Wilcoxon para comparações entre G1 e G2 e Mann-Whitney para comparações entre G3 e os demais grupos ($p \leq 0,05$).

4.2. Avaliação do estresse oxidativo

Os níveis de MDA foram maiores no G1 quando comparados com o grupo G2 e G3, conforme demonstrado na figura 2.

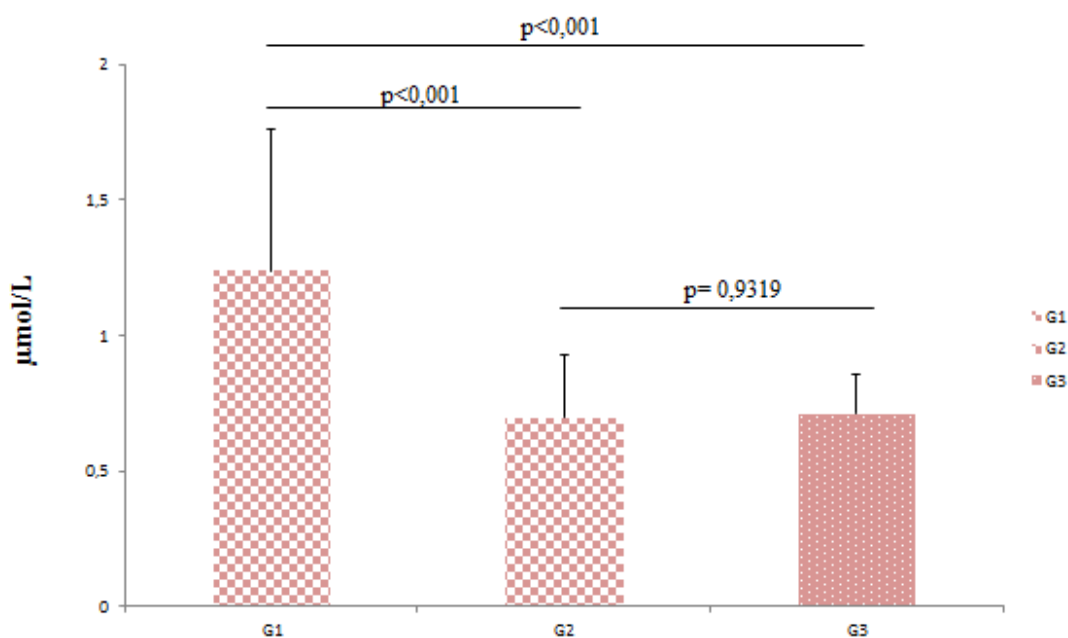


Figura 2. Níveis de malondialdeído nos indivíduos do estudo. G1= grupo antes do tratamento, G2= após o tratamento, G3= grupo controle. Testes utilizados: Modelo Linear Generalizado com distribuição Gama seguido do Teste de comparação múltipla de Wald. ($p \leq 0,05$).

4.3. Capacidade antioxidante hidrofílica

O grupo controle G3 apresentou menor porcentagem de capacidade antioxidante hidrofílica que os grupos G1 e G2 ($p < 0,05$), como mostra a figura 3.

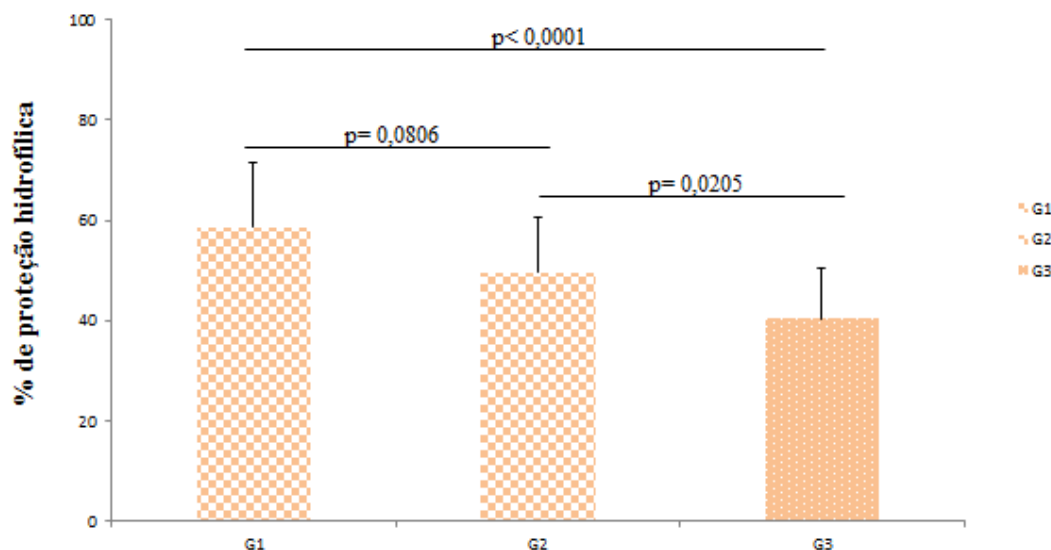


Figura 3. Capacidade Antioxidante Hidrofílica dos pacientes com LV e grupo controle. G1= grupo antes do tratamento, G2= após o tratamento, G3= grupo controle Testes utilizados: Modelo Linear Generalizado com distribuição Gama seguida do Teste de comparação múltipla de Wald ($p \leq 0,05$).

4.4. Níveis de vitaminas

Em relação às vitaminas estudadas, houve diferença na dosagem de luteína apenas entre o G1 e G3 ($0,1 \pm 0,3$ e $0,01 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente, $p = 0,0019$). Para a criptoxantina, houve diferença entre os grupos G1 e G2 ($0,02 \pm 0,01$ e $0,06 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/mL}$, $p = 0,0006$) e G1 e G3 ($0,02 \pm 0,01$ vs $0,05 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/mL}$, $p = 0,0003$). Verificou-se, também, que os níveis de α -caroteno foram diferentes entre os grupos G1 e G2 ($0,01 \pm 0,01$ vs $0,03 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/mL}$, $p = 0,0028$) e G1 e G3 ($0,01 \pm 0,01$ vs $0,02 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/mL}$, $p = 0,0001$). Já para o licopeno, a diferença ocorreu apenas entre os grupos G1 e G3 ($0,12 \pm 0,18$ vs $0,4 \pm 0,46$ $\mu\text{mol/mL}$, $p = 0,0014$). O G2 apresentou dosagem mais elevada de retinol ($9,97 \pm 4,75$ $\mu\text{mol/mL}$) em comparação ao G1 ($1,08 \pm 0,62$, $p < 0,0001$) e G3 ($0,65 \pm 1,67$, $p = 0,0008$) e, níveis mais elevados de α -tocoferol ($27,52 \pm 18,56$

$\mu\text{mol/mL}$) que G1 ($9,16 \pm 3,85$, $p= 0,0024$) e G3 ($2,77 \pm 11,14$). Não foi observada diferença na dosagem do β - caroteno (tabela 2).

Tabela 2. Níveis plasmáticos de vitaminas nos indivíduos do estudo (G1: antes do tratamento/ G2: depois do tratamento/ G3: controle) de acordo com os grupos.

Vitaminas ($\mu\text{mol/L}$)	G1	G2	G3
Luteína	$0,1 \pm 0,3^a$	$0,04 \pm 0,03^{ab}$	$0,01 \pm 0,03^b$
Criptoxantina	$0,02 \pm 0,01^a$	$0,06 \pm 0,09^b$	$0,05 \pm 0,07^c$
α -Caroteno	$0,01 \pm 0,01^a$	$0,03 \pm 0,04^b$	$0,02 \pm 0,04^b$
β -Caroteno	$0,14 \pm 0,34^a$	$0,07 \pm 0,13^a$	$0,07 \pm 0,14^a$
Licopeno	$0,12 \pm 0,18^a$	$0,19 \pm 0,27^a$	$0,4 \pm 0,46^{ab}$
Retinol	$1,08 \pm 0,62^a$	$9,97 \pm 4,75^b$	$0,65 \pm 1,67^a$
α -Tocoferol	$9,16 \pm 3,85^a$	$27,52 \pm 18,56^b$	$2,77 \pm 11,14^a$

Dados são expressos em média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significante ($p<0,05$). Teste estatístico: Distribuição Gamma.

5. DISCUSSÃO

Um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar a produção de citocinas de padrão Th1, Th2 e Th17 no plasma de pacientes com leishmaniose visceral antes e após tratamento. Diferenças significativas foram obtidas nos níveis das citocinas IL-6 e IL-10. O grupo de pacientes apresentou elevação antes do tratamento com diminuição significativamente após o tratamento, sugerindo uma associação dessas citocinas com a doença ativa e consequentemente com a imunopatogênese da mesma.

Um ponto inicial de discussão refere-se às fontes celulares responsáveis pelos

altos níveis de IL-10 e IL-6 detectados. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória com um papel importante na inflamação aguda e crônica, atuando em muitos tipos de células diferentes⁽³⁵⁾. Ela induz a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, produção de anticorpos por células B, a diferenciação de monócitos em macrófagos e o desenvolvimento de células-tronco hematopoiéticas⁽³⁶⁾. Apesar deste perfil pró-inflamatório outros estudos consideraram esta citocina como um indutor importante da resposta Th2 enquanto que, simultaneamente, inibe a resposta Th1⁽³⁷⁾. No entanto, em anos recentes, esta citocina tem emergido como uma importante indutora de Th17^(38,39). Já, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida por vários tipos celulares incluindo células Th2, monócitos/ macrófagos e células Tregs^(40,41).

Assim, estamos sugerindo que nos pacientes estudados antes do tratamento, que durante a interação inicial da leishmania com os macrófagos, haveria uma grande produção de IL-10 e de IL-6. Os altos níveis de IL-6 resultariam em uma indução preferencial de células Th2 que liberariam mais IL-10, que na leishmaniose está associada a suscetibilidade à infecção^(13,15,37). Os altos níveis de IL-6 podem também estar associados a uma indução de Th17, pois houve uma tendência de os pacientes antes do tratamento apresentarem níveis mais altos de IL-17 em relação aos tratados. O papel da Th17 na leishmaniose ainda é controverso, alguns estudos demonstram o seu papel na suscetibilidade a doença, enquanto outros relacionam a proteção^(18,19,20,21). Assim, no presente estudo, a associação dos altos níveis de IL-6 com uma possível indução de Th17 em pacientes com LV ativa, permite considerar que essa subpopulação possa estar envolvida na suscetibilidade a infecção. Ainda em relação à IL-10, os macrófagos ou mesmo células dendríticas produzindo preferencialmente IL-10 durante a resposta imune inata instruiriam uma resposta adaptativa mediada por células Tregs

que produziriam ainda mais IL-10. Alguns estudos confirmam a ativação dessas células na leishmaniose. Na infecção experimental com *L. major*, essas células foram as responsáveis por manter a sobrevivência do parasita nas lesões controlando a expressão de mecanismos efetores ^(16,42). Pacientes com LV apresentaram aumento de células Tregs na medula óssea com consequente aumento da produção de IL-10 e supressão de células T efectoras locais, o que contribuiu para a persistência do parasita ⁽⁴³⁾. Outro estudo mostrou diferenciação dessas células a partir de PBMCs de pacientes com LV ativa. Essa diferenciação, no entanto, diminuiu significativamente após a cura desses pacientes ⁽⁴⁴⁾.

Outro objetivo do presente trabalho foi avaliar o estado redox dos pacientes, antes e após o tratamento, uma vez que ao tentar eliminar o parasita através do processo de ativação de macrófagos, os mesmos podem liberar quantidades exageradas de metabólitos leishmanicidas, que podem levar a um estresse oxidativo envolvido na patogênese da doença. Observamos que a doença proporcionou aumento do MDA quando comparado aos indivíduos do grupo controle o que reflete em desequilíbrio oxidativo com consequente oxidação de lipídeos. Observamos também que houve uma diminuição significativa, de alguns carotenóides, os quais são potentes antioxidantes como o licopeno e a luteína, o que pode ter diminuído a capacidade antioxidante global desses indivíduos. Em situação de estresse oxidativo ocorre uma ativação da capacidade antioxidativa através de uma interação entre os vários antioxidantes os quais com a função de desativar as espécies se consomem quando doam elétrons, formando outras moléculas que são inertes e inofensivas ao organismo. São escassos os trabalhos que avaliam os antioxidantes e indicadores de peroxidação lipídica, durante o desenvolvimento da leishmaniose. Nesse sentido, Neupane e colaboradores (2008),

avaliando em eritrócitos os níveis de glutathione, um antioxidante endógeno e MDA, observaram resultados semelhantes aos nossos, isto é, um aumento no MDA e uma diminuição na glutathione na doença ativa. Outros dois trabalhos realizados em cães portadores ou não de leishmaniose, também observaram aumento desse indicador de peroxidação lipídica e diminuição de carotenóides nos animais infectados. Outro estudo realizado em hamster confirma que a doença desencadeia aumento no MDA e consumo de vitaminas antioxidantes. Após o tratamento, detectamos uma diminuição do MDA e aumento de alguns antioxidantes como criptoxantina e alfa caroteno, alfa tocoferol e retinol. Assim o tratamento de certa forma consegue reverter o estresse oxidativo presente durante a doença ativa. São raros os trabalhos que realizaram esse estudo comparativo, antes e após tratamento. Encontramos apenas o trabalho de Neupane e colaboradores (2008) cujos resultados estão parcialmente de acordo com os nossos uma vez que após o tratamento ocorreu uma diminuição no MDA e aumento de antioxidantes. Outros parâmetros como capacidade antioxidante, retinol, criptoxantina permaneceram elevados, sugerindo que o medicamento não conseguiu reverter totalmente o stress oxidativo ^(45,46,47,48,49,50).

Conjuntamente, os nossos resultados mostraram uma associação entre LV ativa, altos níveis de IL-10 e de IL-6 e desenvolvimento de estresse oxidativo. Essa associação de início parece controversa, particularmente em relação a IL-10 e estresse oxidativo, uma vez que altos níveis dessa citocina se relacionam com maior suscetibilidade a infecção justamente pelo seu papel de desativar macrófagos e inibir a produção de metabólitos do oxigênio e nitrogênio. Nesse sentido, camundongos deficientes de IL-10 ou camundongos tratados com anticorpos anti-receptor de IL-10 apresentaram uma diminuição das lesões cutâneas e não apresentaram reativação ⁽⁵¹⁾.

PBMCs de indivíduos com leishmaniose aguda visceral expressam altos níveis de mRNA para IL-10 em resposta a estimulação *in vitro* com antígenos da *Leishmania*. No entanto, administração de anticorpos monoclonais anti IL-10 aumenta a resposta proliferativa dessas células em resposta a esses mesmos antígenos⁽⁵²⁾. Pacientes com doença ativa apresentaram altos níveis séricos de IL-10 e aumento do seu mRNA no tecido lesionado⁽⁵³⁾. Em pacientes com LV em atividade, no Sudão e Índia, foi detectada expressão elevada de mRNA de IL-10 na medula óssea, linfonodos, PBMCs e células esplênicas, que diminuíram após o tratamento⁽⁵⁴⁾. A adição de IL-10 recombinante em macrófagos humanos inibiu a destruição, mediada por NO, da *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis*⁽⁵⁵⁾.

No entanto, quando analisamos os resultados de IFN- γ , TNF- α e IL-17, apesar de não revelarem diferenças estatisticamente significativas, podemos sugerir que durante a doença ativa, detectamos concomitantemente a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Esse achado pode ser explicado por alguns estudos mostrando que um padrão Th1 ou Th2 dominante não pode ser considerado para a leishmaniose visceral humana, uma vez que nos tecidos linfóides de pacientes com infecção aguda foram detectadas igualmente, tanto citocinas de padrão Th1 como Th2^(56,57). A concomitante presença de IFN- γ e IL-10 também foi detectada em camundongos suscetíveis durante a leishmaniose ativa^(58,59). Assim, estamos sugerindo que no caso dos nossos pacientes não tratados apesar da produção de IL-10, que desativa macrófagos e inibe uma resposta do tipo Th1, ainda tivemos uma substancial produção de IFN- γ , TNF- α que ao final resultou em uma ainda excessiva produção de radicais livres do oxigênio e nitrogênio e consequente estabelecimento do estresse oxidativo. Em relação especificamente a IL-17, a presença dessa citocina pode ter levado a uma ativação de neutrófilos o que

resultou em uma produção adicional de metabólitos do oxigênio e nitrogênio. No caso dos pacientes tratados, independentemente de não haver a produção de IL-10, foram detectados níveis muito baixos de IFN- γ , TNF- α e IL-17, o que pode ter determinado uma não ativação exagerada de macrófagos e neutrófilos e uma diminuição na produção de metabólitos tóxicos. Concluimos que no caso dos pacientes com LV estudados, o desenvolvimento do estresse oxidativo parece ter sido preponderante para a patogenia da doença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Arevalo J. *et al.* Influence of leishmania (viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with american tegumentary leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 2007; 195:1846–1851.
- 2- Dedet J P, Pratlon F in *Manson's Tropical Diseases* (eds Cook, G. C. & Zumla, A. I.). Elsevier, London; 2003. p.1339–1364.
- 3- Lukes J. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007; 104:9375–9380.
- 4- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* 2000; 16:188–189.
- 5- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Parasites- Leishmaniasis [Acesso em 25 nov 2015]. Disponível em:
http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/.
- 6- Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin AF, Lima VMF. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). *Veterinary Parasitology*. 2007; 150: 283-290.
- 7- Leishmaniose Visceral Americana. Centro de Vigilância Epidemiológica. Casos autóctones e Óbitos de LVA, no Estado de São Paulo, 1999 a 2010 [Acesso em 28 jan 2013]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_auto9904.htm.
- 8- Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral Grave. Normas e Condutas. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- 9- Cunningham AC. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*.

Experimental and Molecular Pathology 2002; 72: 132-41.

10- Mary C, Auriault V, Faugere B, Dessein AJ. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigenspecific T cells. *Infection and Immunity* 1999; 67: 5559-66.

11- Kharazmi A, Kemp K, Ismail A, Gasim S, Gaafar A, Kurtzhals JAL, et al. T-cell response in human leishmaniasis. *Immunology Lett* 1999; 65:105–8.

12- Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology and Medical Microbiology* 2007; 51(2):229–42.

13- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2(11):845–58.

14- Reed SG. TGF- β in infections and infectious diseases. *Microbiology Infection* 1999; 1(15):1313–25.

15- Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Dhao ZM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunological Reviews* 2006; 212:60–73.

16- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002; 420:502–07.

17- Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *Journal of Experimental Medicine* 2004; 200(2):201–210.

18- Kostka SL, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, Stebut E. IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. *Journal of Immunology* 2009; 182:3039–3046.

- 19- Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO et al. Interleukin 17 production among patients with american cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 2009; 200:75-8.
- 20- Pitta MGR, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *Journal of Clinical Investigation* 2009; 119(8):2379–87.
- 21- Ghosh K, Sharma G, Saha A, Kar S, Das PK, Ukil A. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines. *Journal of Infectious Diseases Adv* 2013.
- 22- Chulay JD, Fleckenstein L, Smith DH. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hyg* 1998; 82:69-72.
- 23- Kothari H, Kumar P, Sundar S, Singh N. Possibility of membrane modification as a mechanism of antimony resistance in *Leishmania donovani*. *Parasitology International* 2007; 56(1):77–80.
- 24- Lachaud L, Bourgeois N, Plourde M, Leprohon P, Bastien P, Ouellette M. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. *Clinical Infectious Diseases* 2009; 48(2):e16–22.
- 25- Singh N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Indian Journal Medicine Research* 2006; 123(3):411–22.
- 26- Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31(4):1104–07.

- 27- Chowdhury KD, Sen G, Sarkar A, Biswas T. Role of endothelial dysfunction in modulating the plasma redox homeostasis in visceral leishmaniasis. *Biochemistry and Biophysics Acta*; 1810:652-65.
- 28- Sardar AH, Kumar S, Kumar A, et al. Proteome changes associated with *Leishmania donovani* promastigote adaptation to oxidative and nitrosative stresses. *Journal of Proteomics*; 81:185-99.
- 29- Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biology Medicine*; 51:337-51.
- 30- Kocyigit A, Keles H, Selek S, Guzel S, Celik H, Erel O. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutation Research* 2005; 585:71-8.
- 31- Aldini G, Dalle-Donne I, Facino RM, Milzani A, Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Medicine Research Review* 2007; 27:817-68.
- 32- Yeum KJ, Booth SL, Sadowski JA, et al. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am Journal of Clinical Nutrition* 1996; 64:594-602.
- 33- Yeum K-J, Aldini G, Johnson EJ, Russell RM, Krinsky NI. Effect of Feeding and then depleting a high fruit and vegetable diet on oxidizability in human serum. Champaign, IL: AOCS Press; 2005.
- 34- Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russell RM, Krinsky NI, Yeum KJ. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochemistry* 2006; 354:290-8.
- 35- Yeum K, Ahn S, Alberto S, Paiva R De, Lee-kim YC, Krinsky NI, et al. Human

Nutrition and Metabolism Correlation between Carotenoid Concentrations in Serum and Normal Breast Adipose Tissue of Women with Benign Breast Tumor or Breast Cancer 1–4. American Society Nutrition Science 1998; 1920–6.

35- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annu Review Pharmacology Toxicology* 2012; 52:199–219.

36- Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *International Review Immunology* 1998; 16:249-84.

37- Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology* 2002; 39:531-6.

38- Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nature Immunology* 2008; 9:641–649.

39- Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, Soumelis V. A critical function for transforming growth factor- β , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human TH-17 responses. *Nature Immunology* 2008; 9:650–657.

40- Saraiva M, O Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology* 2010; 10(3):170–81.

41- O Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature medicine* 2004; 10(8):801–5.

42- Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4⁺ regulatory T cells to sites of *Leishmania* major infection favors pathogen persistence. *Journal of Experimental Medicine* 2006; 203(11):2451-60.

- 43- Rai AK, Thakur CP, Singh A, Seth T, Srivastava SK, Singh P, Mitra DK. Regulatory T cells Suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. *Plos One* 2012; 7(2):e31551.
- 44- Saha S, Mondal S, Ravindran R, Bhowmick S, Modak D, Mallick S, et al. IL-10- and TGFbeta- mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. *Journal of Immunology* 2007; 179:5592–603.
- 45- Neupane DP, Majhi S, Chandra L, Rijal S, Baral N. Erythrocyte glutathione status in human visceral leishmaniasis. *Indian journal of clinical biochemistry IJCB* 2008; 23(1):95-7.
- 46- Bildik A, Kargin F, Seyrek K, Pasa S, Ozensoy S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. *Research in veterinary science* 2004; 77(1):63-6.
- 47- Heidarpour M, Soltani S, Mohri M, Khoshnegah J. Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. *Parasitology research*; 111(4):1491-6.
- 48- Oliveira FJ, Cecchini R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. *The Journal of parasitology* 2000; 86(5):1067-72.
- 49- Sardar AH, Kumar S, Kumar A, Purkait B, Das S, Sen A, et al. Proteome changes associated with *Leishmania donovani* promastigote adaptation to oxidative and nitrosative stresses. *Journal of proteomics*; 9(81):185-99.
- 50- Mandelker L. Oxidative Stress, Free Radicals, and Cellular Damage. *Studies on Veterinary Medicine. Part of the series Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice* 2011. p. 1-17.

- 51- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 194:1497-506.
- 52- Ghalib HW¹, Piuvezam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el- Hassan M, Russo DM, Reed SG. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 92(1):324-9.
- 53- Mege JL, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infectious Diseases* 2006; 6:557–69.
- 54- Holaday BJ, Pompeu MM, Jeronimo S, Texeira MJ, Sousa AA, Vasconcelos AW, et al. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala-azar. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 92: 2626-32.
- 55- Vouldoukis I, Becherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debre P, et al. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur Journal of Immunology* 1997; 27: 860-5.
- 56- Karp CL¹, el-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, Hashim FA, Hag-Ali M, Neva FA, Nutman TB, Sacks DL. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91(4):1644-8.
- 57- Kemp M¹, Kurtzhals JA, Bendtzen K, Poulsen LK, Hansen MB, Koech DK, Kharazmi A, Theander TG. *Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. *Infection Immunology* 1993; 61(3):1069-73.

- 58- Morris L¹, Troutt AB, Handman E, Kelso A. Changes in the precursor frequencies of IL-4 and IFN-gamma secreting CD4⁺ cells correlate with resolution of lesions in murine cutaneous leishmaniasis. *Journal of Immunology* 1992; 149(8):2715-21.
- 59- M. Barral-Netto, J. S. da Silva, A. Barral, S. Reed. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. *American Journal of Pathology* 1995; 146(3):635–642.



Conclusão

Conclusão

A produção de citocinas mostrou diferença entre os momentos pré e pós-tratamento para IL-6 e IL-10, que foram maiores no pré-tratamento. Observou-se, também, que os níveis de MDA foram estatisticamente maiores neste grupo, em comparação ao pós e controle. Em relação à CAH, o grupo controle apresentou a menor porcentagem de proteção que os demais grupos, e menor luteína que o grupo pré-tratamento. Ainda, no perfil de vitaminas, verificou-se que o grupo pós-tratamento revelou os maiores níveis de criptoxantina, licopeno, retinol e α -tocoferol e, para o α -caroteno, o pré-tratamento foi menor em comparação aos demais grupos.

Estes resultados sugerem que o parasita, ao invadir os macrófagos e induzirem a produção de espécies reativas para sua eliminação, podem exacerbar esta resposta e aumentar estas espécies reativas. Isso poderia refletir no aumento do MDA e possível diminuição do perfil vitamínico, contribuindo com maior estresse oxidativo.

Diante deste cenário inflamatório, a IL-10 é produzida com a função de desativar os macrófagos, diminuindo, assim, a produção dessas espécies e das citocinas inflamatórias. No entanto, considerando esta citocina, a infecção macrofágica poderia estar associada à indução, tanto de Th2 quanto de Treg. Porém, há de se considerar que, na fase ativa da infecção, de acordo com os discretos valores de IFN- γ encontrados no presente estudo, a resposta poderia se diferenciar, inclusive, para o perfil Th1, o que induziria novamente a ação dos macrófagos no hospedeiro.

Assim, este estudo permitiu concluir que, além de existir uma relação entre resposta imunológica e oxidativa na patogênese da leishmaniose visceral, o tratamento contribuiu para a eliminação do parasita e melhora nos parâmetros de estresse oxidativo e inflamatório dos pacientes investigados.



Anexos

Anexo I

Visceral leishmaniasis: a brief review

Leishmaniasis and review

Francilene Capel Tavares de Carvalho¹, Mariana Gatto¹, Karen Ingrid Tasca¹, Laura Denise Mendes da Silva¹, Rodrigo Mattos dos Santos¹, Camila Renata Corrêa², Ângela Maria Victoriano de Campos Soares³, Sueli Aparecida Calvi¹

¹ Department of Tropical Diseases, Faculty of Medicine of Botucatu, UNESP, Sao Paulo, Brazil.

² Department of Pathology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

³ Department of Microbiology and Immunology, Bioscience Institute – UNESP – Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

Corresponding author

Francilene Capel Tavares de Carvalho: Department of Tropical Diseases, Faculty of Medicine of Botucatu, UNESP. Avenue Professor Montenegro, Rubião Junior District, no number, Zip Code 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil. Tel: (14) 3880-1641 / (14) 98154-4828 Email: francilene_capel@hotmail.com

Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is an emerging public health problem, and one of the major neglected diseases in Brazil and in worldwide, where 88 countries are affected with the occurrence of 500,000 new cases annually. It is caused by the protozoan *L. donovani* complex.

The success LV cure depends primarily on factors related to the host immune status in combination with antileishmanial drugs effect.

In this review we describe basic aspects of the disease such as history, epidemiology, causative agent, vector characteristics and treatment. In addition, particular attention will be given to the the host immune response mechanisms, as well as other factors involved in susceptibility and resistance to infection, such as oxidative stress that has been assigned to the pathogenesis of various infectious and parasitic diseases.

Keywords: Visceral leishmaniasis, Immune response, Oxidative stress

Historic

The first description of Visceral Leishmaniasis (VL) came from Greece, 1835. Previously it was known as "ponos" which in Greek mythology means, "God of pain." In India, 1869, it was named "Kala-Jwar" (black fever) or "Kala-azar" (kala-azar) because of skin darkening that occurs during illness⁽¹⁾.

In Bengal (India, 1900) William Boog Leishman identified the presence of a parasite in a soldier spleen who was presenting the fever "Dum Dum". In 1903, the etiologic agent was described by Donovan, who confirmed the presence of parasites in splenic aspirates of a child who had irregular fever. Roger, was the first to cultivate the parasite in blood citrate at 22 °C, in 1904. He observed that in cultures, the parasite presents in the flagellate form. Nicolle and colleagues, in Tunisia (1908), found parasites in dogs suggesting the role of these animals as disease reservoirs. However, only in 1931, when the transmission of the disease became known by making xenodiagnosis in hamsters, the sandflies were incriminated as vectors. Henrique Penna, in 1934, reported the first cases of infection in Brazil by examining, pos mortem, liver histological slides from patients diagnosed with yellow fever. Evandro Chagas, studying the disease epidemiology, suspected that the mosquito responsible for transmission to humans was the sandfly *L. longipalpis* due to his constant presence around and inside the homes of sick patients^(2,3,4,5,6).

Etiology

Leishmaniasis is caused by an obligate intracellular protozoan belonging to *Kinetoplastida* order, *Trypanosomatida* family and the genus *Leishmania*⁽⁷⁾. There are over 21 species of *Leishmania*, which can be transmitted to humans by about 30

different species of sandflies ⁽⁸⁾. The parasite species responsible for visceral leishmaniasis are divided in three genres: *Leishmania chagasi*, *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. The *L. infantum* and *L. donovani* are the causative agents of the disease in areas of the Mediterranean and the Middle East and *L. chagasi* is responsible for the clinical presentation of visceral leishmaniasis in Central and South America, including Brazil ^(9,10). *Leishmania* is presented in two evolutionary forms: promastigotes, a free plagued form, found in the digestive tract of the invertebrate host, and amastigotes, intracellular, predominantly in the vertebrate host, whose scourge is restricted to flagellar pocket ⁽¹¹⁾.

Vector

The vectors related to the agent dispersion belongs to a family of mosquitoes phlebotomine, genus *Lutzomyia*. The species *Lutzomyia longipalpis*, also known as sandfly, birigui or tatuquiras, is the main Brazilian vector. The insect vector that measures 2-3 millimeters and lives in peri-domestic environment is widely distributed throughout Latin America ^(12,13). Vectors live in various habitats, but immature forms grows on damp ground, environments rich in organic matter and low luminous density ^(14,15).

Reservoirs

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis, which has the dog (Figure 3A) as the main animal reservoir in urban centers and foxes and other mammals in wild environments ^(16,17,18). Although the risk factors for this disease are not fully understood, it is known that genetic factors, malnutrition and presence of infected animals in the

environment are major contributors for the maintenance of high levels of this disease (19,20,21).

Biological Cycle

The reservoirs are infected by a phlebotomine female bite. During the blood meal in an infected vertebrate host, phlebotomine ingests macrophages infected with amastigotes of *Leishmania* sp. These suffer binary division, multiplication and differentiation in paramastigote forms which colonize the esophagus and pharynx vector, by remaining attached to the epithelium by the scourge. In the next stage, they differentiate into metacyclic promastigote forms, which are the infective forms. The life cycle is completed with the bite of an infected sandfly and subsequent inoculation of promastigotes of the parasite in the bloodstream of a new vertebrate host. The infective forms are released into the host skin and phagocytosed by the mononuclear phagocyte system cells. Inside the macrophages, they differentiate to amastigotes, which strongly multiply by binary division. The macrophages filled with amastigotes become devitalized and break up releasing these forms which are phagocytosed by macrophages in a new continuous process., which results in blood and lymphatic spread to other tissues rich in these cells ⁽²²⁾.

Epidemiology

LV is endemic in 62 countries, with 500,000 cases per year and about 200 million people are living in hazardous areas ^(23,24,25). Over the past decade, the endemic areas of the disease have expanded along with increasing number of cases. However, a large proportion of cases are not reported and only 32 of the 88 affected countries

consider leishmaniasis as a reportable disease ⁽²⁶⁾. In Brazil, the disease that was formerly restricted to rural areas of the Northeast, in recent years has reached the urban centers. From the 90s, the disease was reported in the Midwest, North and South regions and in 2011, 3,894 cases were diagnosed with 262 deaths ^(27,28,29). In São Paulo State, the first patient was reported in 1999 and since then there has been an expansion of disease transmission area ⁽³⁰⁾. From 1999 to 2009, and 2012-2014, 1750 and 484 cases of the disease were respectively confirmed ^(31,32). In the interval 2012 to 2014 according to the Epidemiological Surveillance Center (CVE), 517 VL cases and 39 deaths were confirmed in São Paulo ⁽³³⁾.

Treatment

The most used drugs for leishmaniasis treatment are the pentavalent antimonials (SbV). Some studies show that SbV have antileishmanial activity and increases the reactive oxygen production. However, certain mechanisms of action of these drugs are not completely understood and their use are contraindicated in some cases ^(34,35). Over the past decade, cases of resistance to antimonials and therapeutic failures had been recorded ⁽³⁶⁾. Amphotericin B is used since the 1960s as the second choice drug, since exhibits a cure rate of 90 to 95% ⁽³⁷⁾. It is also indicated in cases of toxicity or unsatisfactory response to antimonials, and is the first choice for treating pregnant patients and cases of terminal disease ⁽³⁴⁾. Amphotericin B Lipid formulations such as liposome, lipid complex and cholesterol dispersion are the first choice of treatment indicated by the Ministry of Health in certain cases, such as children, patients over 50 years or those diagnosed with cardiac complications, liver disease, kidney or positive for Chagas Disease ^(38,39,40,41). Liposomal amphotericins are selectively absorbed by the

endoplasmic reticulum, and besides having high leishmanicidal action, show lower toxicity^(39,40,41,42). It is the first choice of treatment in endemic countries in Europe and in developed countries due to high cure rates and by requiring a short period of treatment of up to five days^(38,39,40,41).

Leishmaniasis and Immune Response

Regarding the host immune response, studies have shown that the resistance to leishmaniasis depends on the production of cytokines able to activating macrophages, particularly the IFN- γ , whose production is guaranteed by the development of a specific Th1 type response which, in turn, depends on an instruction given by the microorganism interaction with cells of the innate immune response. Thus, in a first contact, promastigote forms of *Leishmania* interact with receptors present in cells of the innate immune response, such as dendritic cells (DCs) and macrophages, which release IL-12, that stimulates NK cells to secrete IFN- γ . Together, IL-12 and IFN- γ induces differentiation and proliferation of CD4 + T cells into Th1 cells, which in turn produces more IFN- γ . This cytokine is considered the main responsible for iNOS expression, the enzyme involved in NO production, the major macrophage metabolite with leishmanicidal activity^(8,43,44). In addition, infected macrophages secrete TNF- α , which by acting in synergy with IFN- γ in macrophage activation induce further NO production and increased leishmanicidal activity^(45,46,47). Findings in patients have confirmed this mechanism. Children infected with *L. chagasi* living in an endemic area, that produced higher IFN- γ production when peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stimulated with *Leishmania* antigen, were able to control the infection, whereas those releasing low levels of this cytokine developed progressive disease⁽⁴⁸⁾.

In another study, low lymphocyte proliferative response against the parasite and low *in vitro* IFN- γ production was associated with high parasitic load ⁽⁴⁹⁾. In experiments with LV patients cells, the exogenous administration of IL-12 to PBMC cultures induced production of IFN- γ by these cells, restored the lymphocytes proliferative response, and decreased spontaneous or induced apoptosis ⁽⁵⁰⁾. In addition to Th1 cells, CD8 + T cells are involved in the defense against *Leishmania*, due both, their capacity to producing IFN- γ and by lysing infected cells ^(51,52). Accordingly, BALB / c mice infected with *L. donovani* were able to control the infection due to increase in this cell subtype ⁽⁵³⁾.

In contrast to the mechanisms mentioned above susceptibility to infection and progression of leishmaniasis are attributed to the predominant production of cytokines, such as IL-4 and IL-10 and TGF- β , whose primary function is the deactivation of macrophages ^(46,47,54).

IL-4 is released by Th2 cells, while IL-10 can be produced by both Th2 cells and regulatory T cells (Tregs) that consists of a CD4 + T cells subpopulation expressing the FoxP3(Fork head box P3) transcript factor and CD25, and that besides IL-10 produce TGF- β ^(55,56,57). In addition to the Th2 and Treg, another important source of IL-10 are the infected macrophages.

In addition to Th1, Th2 and Tregsubpopulations, the role of Th17 has been highlighted in the response to *Leishmania*. The studies however, have shown conflicting results. In Balb/c mice infected with *L. major* it was detected a high production of IL-17, accompanied by severity of disease, tissue destruction and high parasitic load. IL-17 deficient BALB / c mice, developed minor lesions associated to low expression of CXCL2 and presence of few neutrophils ⁽⁵⁸⁾. A study by Bacellar, et al ⁽⁵⁹⁾ showed that both PBMCs and CD4 + T cells, present in the lesions of patients infected with *L.*

braziliensis produce high amounts of IL-17. The studies above mentioned strongly suggest the role of IL-17 in disease susceptibility. However, in Kala azar patients, IL-17 and IL-12 production was associated with disease resistance, suggesting that these cytokines play a complementary role to Th1 pattern cytokines ⁽⁶⁰⁾. An experimental study with *L. donovani* showed that curdlan, a polysaccharide with immunomodulating properties, can induce Th17 cytokines such as IL-17 and IL-23, what contributed to the decrease in parasite load ⁽⁶¹⁾.

Leishmaniasis and Oxidative Stress

Oxidative stress is classically defined as an event resulting from the imbalance between production of oxidants and antioxidants substances. ^(62,63). Both, oxidants and antioxidants are generated in a scenario of oxidation-reduction reactions, that imply in gain and loss of electrons respectively. Since the generation and actions of these substances depend on this oxidation-reduction system, many authors have used the term imbalance of redox system to refer to the oxidative stress. Popularly named as free radicals, the oxidants include oxygen and nitrogen reactive species ^(64,65,66).

These species are produced by the organism under normal conditions, as they are essential for vital mechanisms such as for the immune system destroy micro-organisms, inflammatory cells chemotaxis as well as for the NADPH oxidase enzyme to participate in intracellular chemical reactions ^(67,68). The most common species are hydroxyl, hidroperoxila, superoxide, nitric oxide, H₂O₂, among others. As all of these radicals present a free electron, their presence in excess can oxidize more vulnerable molecules such as lipids, generating toxic products such as malondialdehyde which are by-products of oxidative stress that attacks proteins and DNA, affecting their structures and

functions ⁽⁶⁹⁾. Thus, reactive oxigens actions must be controlled by antioxidant mechanisms which comprises hydrophilic antioxidants such as catalase, superoxide dismutase, bilirubin, uric acid, albumin and vitamin C and lipophilic antioxidants such as carotenoids and α –tocopherol. In healthy individuals, normally this equilibrium exists, which avoiding lesive reactions. On the other hand, individuals undergoing some diseases may show an imbalance in redox system, favoring an intense oxidative stress that results in the excessive presence of reactive species and consequently in oxidation of vulnerable molecules and tissue lesions. In this context, it has been proposed that oxidative stress may be involved in the pathogenesis of various nfectious and parasitic diseases that may include the leishmaniais. As mentioned, the main host defense mechanism against leishmania involves the activation of macrophages and the consequent release of oxygen and nitrogen reactive species that have leishmanicidal activities. However, during macrophage activation process, in an attempt to better eliminate the parasites an excessive release of these metabolites may occur, which may lead to oxidative stress. There are few studies that assess whether this process can be associated with the pathogenesis of leishmaniasis. Accordingly, Neupane et al (2008), evaluated in erythrocytes of patients with leishamniasis the levels of MDA (a substance indicative of lipid peroxidation caused by excess reactive species), as well as glutathione levels, an endogenous antioxidant. It was observed an increase in MDA, but decrease in glutathione, which reveals an imbalance between oxidizing and antioxidant agents. Two other studies conducted in dogs infected with leishmania also observed an increase in this indicator of lipid peroxidation and decrease of carotenoids. Another study in the hamsters disease confirms that the disease triggers increase in MDA levels, but consumption of antioxidant vitamins. Neupane and collaborators (2008) also observed

an increase of MDA and a decrease of antioxidants such as alpha-carotene, cryptoxanthin, alpha tocopherol and retinol in patients with active disease. However, after treatment there was a decrease in MDA levels but an increase in the levels of some of these antioxidants, showing that the treatment can partially reverse the oxidative stress developed during the disease^(70,71,72,73,74).

These studies show that oxidative stress can actually be involved in the pathogenesis of the disease. However further studies are needed to better understand the mechanisms that lead to the development of this process during leishmaniasis. Studies focusing this question are in process in our laboratory.

Final considerations

This review aims to show the main aspects involved in visceral leishmaniasis, such as the history of the disease, etiology, the vector and reservoir characteristics, the biological cycle, epidemiology and treatment. The immune response mechanisms involved in susceptibility and resistance to infection are also highlighted as well as the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of the disease.

References

- 1- Marzochi MCA, Coutinho SG, SouzaWJS, Amendoeira MRR. Leishmaniose Visceral (Calazar). *Jornal Brasileiro de Medicina* 1981; 41:69-84.
- 2- Michalick MSM, Genaro O. Leishmaniose visceral americana. *In* D Neves, AL Melo, PM Linardi, RWA Vitor. *Parasitologia humana*. 11th ed. Atheneu, São Paulo; 2005. p. 56-72.
- 3- Chagas E. Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Science* 1936; 84(2183):397-8.
- 4- Genaro O. Leishamniose visceral americana. *In*: Neves DP, Melo AL, Linardi PM. *Parasitologia Humana*. Atheneu, São Paulo; 2000. p. 56-72.
- 5- Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. *In*: FEG Cox, D Wakelin, SH Gillespie, DD Despommier (eds), *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections. Parasitology*. 10th ed. ASM Press London; 2005. p. 313-349.
- 6- Rangel EF, Lainson R. Ecologia das leishmanioses. *In*: Rangel EF, Lainson R. (org.). Editora FIOCRUZ. *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro; 2003. p.291-309.
- 7- Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123:311-30.
- 8- Cunningham AC. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 2002; 72:132-41.
- 9- Fraser CM. *Manual Merck de Veterinária: um manual de diagnostico, tratamento, prevenção e controle de doenças para veterinária*. 9 ed. São Paulo: Roca; 2008. p. 543-544.
- 10- Almeida MAO, et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology* 2005; 127:227-232.

- 11- Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis - The Neotropical Leishmania species. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D (Eds.). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology; 1998. p. 242-266.
- 12- Lainson R, Rangel EF. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100:811–27.
- 13- Carrasco J, Morrison A, Ponce C. Behaviour of Lutzomyia longipalpis in an area of southern Honduras endemic for visceral/atypical cutaneous leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 1998; 92:869–76.
- 14- Camargo JB, Troncarelli MZ, Ribeiro MG, Langoni H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. Clínica Veterinária 2007; (71):86-92.
- 15- Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). Clínica Veterinária 2000; (28):36-44,
- 16- Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. Parasitology 1997; 115(2):143–56.
- 17- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Dye C. Low infectiousness of a wildlife host of Leishmania infantum: the crab-eating fox is not important for transmission. Parasitology 2002; 125:407–14.
- 18- Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Gonçalves A, et al. Didelphis marsupialis, an important reservoir of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi and Leishmania (Leishmania) chagasi in Colombia. Am J Trop Med Hyg 1994; 50:557–65.
- 19- Jeronimo SM, Duggal P, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Cabral AP, et

- al. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. *J Infect Dis* 2007;196:1261–69.
- 20- Malafaia G. Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review. *Parasite Immunol* 2008; 31:587-96.
- 21- Oliveira CD, Diez-Roux A, Cesar CC, Proietti FA. A case-control study of microenvironmental risk factors for urban visceral leishmaniasis in a large city in Brazil, 1999–2000. *Rev Panam Salud Publica* 2006; 20:369–76.
- 22- Ikeda-Garcia FA, Marcondes M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clínica Veterinária* 2007; (71):34-42.
- 23- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*.1999; 354:1191–99.
- 24- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27:305–18.
- 25- Unicef/Undp/World Bank/WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Leishmaniasis: Disease Information [Acesso em 20 dez 2013]. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>.
- 26- WHO - World Health Organization. Leishmaniasis: Magnitude of Problem. [Acesso 18 dez 2013]. Disponível em:
www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html
- 27- Ministério da Saúde (Brasil). Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Bol Epidemiol*. 2001; 6:1-11.
- 28- Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral. Casos confirmados de leishmaniose visceral. Brasil, Grandes regiões e Unidades Federadas 1990-2011. Brasília: Ministério da Saúde; 2012 [acesso em 18 dez

2013]. Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_casos_de_lv_entre_1990_e_2011_final.pdf.

29- Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral. Óbitos por leishmaniose visceral. Brasil, Grandes regiões e Unidades Federadas-1990-2011. Brasília: Ministério da Saúde; 2012 [acesso em 18 dez 2013].

Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_obitos_por_lv_entre_1990_e_2011_final.pdf.

30- Neves VLFC. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: Situação Atual. Bol Epidemiol. Paulista 2004; 6:1-4.

31- Leishmaniose Visceral Americana. Centro de Vigilância Epidemiológica. Distribuição do número de casos e óbitos de LVA segundo município e CVE de infecção. Estado de São Paulo, 1999 a 2009 [acesso em 19 fev 2013]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah9909_lpi.htm

32- Leishmaniose Visceral Americana. Centro de Vigilância Epidemiológica. Distribuição do número de casos e óbitos de LVA segundo município e CVE de infecção. Estado de São Paulo, 2010 a 2013 [acesso em 19 dez 2013]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_lpi.htm

33- Leishmaniose Visceral Americana. Centro de Vigilância Epidemiológica.. Distribuição do número de casos e óbitos de LVA segundo município e CVE de infecção. Estado de São Paulo, 2012 a 2014 [acesso em 19 jan 2016]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/dados/lv1214_sh_gve.pdf

34- Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de

Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral Grave. Normas e Condutas. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

35- Maltezou HC, Siafas C, Mavrikou M, Spyridis P, Stavrinadis C, Karpathios T, et al. Visceral leishmaniasis during childhood in Southern Greece. *Clin Infect Dis* 2000; 31(5): 1139–43.

36- Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 2000; 31(4): 1104–07.

37- Lachaud L, Bourgeois N, Plourde M, Leprohon P, Bastien P, Ouellette M. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. *Clin Infect Dis* 2009; 48(2):e16–e22.

38- Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(2):266-74.

39- Gradoni L, Soteriadou K, Louzir H, Dakkak A, Toz SO, Jaffe C, et al. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. *Trop Med Int Health* 2008; 13(10):1272–76.

40- Thakur CP, Pandey AK, Sinha GP, Roy S, Behbehani K, Oliaro P. Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90(3):319-22.

41- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Mishra M, Singh VR, Buffels R. Low-dose liposomal amphotericin B in refractory Indian visceral leishmaniasis: a multicenter study. *Am J*

Trop Med Hyg 2002; 66(2):143–46.

42- Singh N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. Indian J Med Res 2006; 123(3):411–22.

43- Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, AlMusawi T, Duarte MI, Neto VM. Toll-like receptors and leishmaniasis. Infect Immun 2008; 76(3):886-72.

44- Amato VS, de Andrade HF, Duarte MI. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. Acta Trop 2003; 85:39–49.

45- Ray M, Gam AA, Boykins RA. Inhibition of interferon- γ signaling by *Leishmania donovani*. J Infect Dis 2000; 181:1121-8.

46- Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. Immunol Med Microbiol 2007; 51(2):229–42.

47- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat Rev Immunol 2002; 2 (11):845–58.

48- Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Régis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN- γ production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. J Immunol 1994; 152: 5949–56.

49- Khalil EAG, Ayed NB, Musa AM, Ibrahim ME, Mukhtar MM, Zijlstra EE, et al. Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. Clin Exp Immunol 2005; 140(2): 349–53.

50- Bacellar O, Brodskyn C, Guerreiro J, Barral-Netto M, Costa CH, Coffman RL, et al. Interleukin-12 restores interferon- γ production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. J Infect Dis 1996; 173(6):1515-18.

51- Mary C, Auriault V, Faugere B, Dessein AJ. Control of *Leishmania infantum*

infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigenspecific T cells. *Infect Immun* 1999; 67: 5559-66.

52- Kharazmi A, Kemp K, Ismail A, Gasim S, Gaafar A, Kurtzhals JAL, et al. T-cell response in human leishmaniasis. *Immunol Lett* 1999; 65:105–8.

53- Stern JJ, Oca MJ, Rubin BY, Anderson SL, Murray HW. Role of L3T4 and LyT-21 cells in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1988; 140: 3971-77

54- Reed SG. TGF- β in infections and infectious diseases. *Microb Infect* 1999; 1(15):1313–25.

55- Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Dhao ZM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; 212:60–73.

56- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 2002; 420:502–07.

57- Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 2004; 200(2):201–210.

58- Kostka SL, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, Stebut E. IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. *J Immunol* 2009; 182:3039–3046.

59- Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO et al. Interleukin 17 production among patients with american cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 2009; 200:75-8.

60- Pitta MGR, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17

and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest* 2009; 119(8):2379–87.

61- Ghosh K, Sharma G, Saha A, Kar S, Das PK, Ukil A. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines. *J Infect Dis Adv* 2013.

62- Ferreira ALA, Salvatori DMF, Nascimento MCMO, Rocha NS, Correa CR, et al. Tomatooleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutat Res* 2007; 631:26-35.

63- Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys* 2004; 30:97-103.

64- Ralser M, Wamelink MM, Kowald A. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J Biol* 2007; 6:1-18.

65- Grant CM. Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *Journal of Biol* 2008; 7:1.

66- Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 2008; 28:569-631.

67- Albert van der Vliet. NADPH oxidases in lung biology and pathology: Host defense enzymes, and more. *Free Radical Biology & Medicine* 2008; 938–955.

68- Heme on innate immunity and inflammation Fabianno F. Dutra and Marcelo T. Bozza. *Pharmacology* 2014; 27;5:115.

69- Mandelker L. Oxidative Stress, Free Radicals, and Cellular Damage. *Studies on Veterinary Medicine. Part of the series Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice* 2011. p. 1-17.

70- Sardar AH, Kumar S, Kumar A, et al. Proteome changes associated with *Leishmania*

donovani promastigote adaptation to oxidative and nitrosative stresses. *J Proteomics* 2013; 81:185-99.

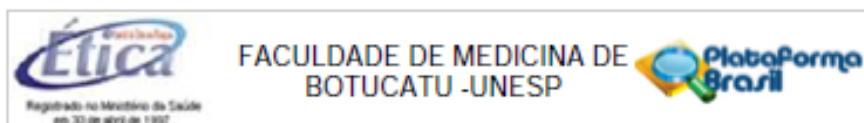
71- Neupane DP, Majhi S, Chandra L, Rijal S, Baral N. Erythrocyte glutathione status in human visceral leishmaniasis. *Indian J Clin Biochem* 2008; 23:95-7.

72- Bildik A, Kargin F, Seyrek K, Pasa S, Ozensoy S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. *Res Vet Sci* 2004; 77:63-6.

73- Heidarpour M, Soltani S, Mohri M, Khoshnegah J. Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. *Parasitol Res* 2015; 111:1491-6.

74- Oliveira FJ, Cecchini R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. *J Parasitol* 2000; 86:1067-72.

Anexo II



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do perfil de citocinas e proteômico em pacientes com leishmaniose visceral antes e após tratamento.

Pesquisador: Francilene Capel Tavares

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 24627313.7.0000.5411

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

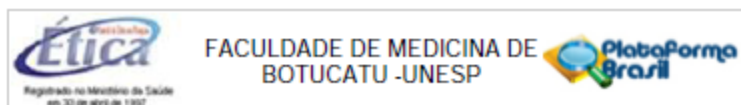
Numero do Parecer: 531.834

Data da Relatoria: 17/02/2014

Apresentação do Projeto:

A leishmaniose visceral (LV) é um problema emergente de saúde pública, sendo uma das principais doenças negligenciadas no Brasil e no mundo, onde 88 países são afetados com 500.000 casos novos anualmente. É causada pelo agente etiológico *L. donovani* e *L. chagasi/infantum*. O sucesso na cura depende do estado imunitário do hospedeiro em combinação com os efeitos das drogas leishmanicidas. A resistência à infecção está associada com direcionamento de uma resposta do tipo Th1, com produção de citocinas e ativação de diferentes tipos celulares como células NK, CD, macrófagos e células T, como as CD4, CD8. Por outro lado, a suscetibilidade à infecção e a progressão da doença estão relacionadas com o direcionamento de uma resposta do tipo Th2, com produção de IL-4 e de outros componentes que desativam macrófagos. A literatura mostra que a subpopulação de células Th17 vem ganhando importância na resposta contra a Leishmania, entretanto não se sabe até o momento se está envolvida na resistência ou suscetibilidade à infecção. A proteômica permite identificar e quantificar o número de proteínas que influenciam diretamente a bioquímica celular, e promover uma análise do estado celular, ou mudanças que ocorrem durante o crescimento, desenvolvimento ou resposta a fatores ambientais, mostrando-se como uma tecnologia útil no estudo de sistemas biológicos altamente dinâmicos e

Endereço: Chacara Butignoli, s/n
Bairro: Rubiao Junior CEP: 18.618-970
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 531.834

complexos. Investigações prévias examinando alterações no proteoma da leishmania enfatizaram principalmente os eventos associados com a diferenciação da forma promastigota para a amastigota. No entanto, os eventos relacionados com as interações celulares entre o hospedeiro e a leishmania têm recebido pouca atenção. Acredita-se que a exploração de dados proteômicos, assim como do perfil de citocinas de padrão Th1, Th2 e Th17 no soro de pacientes com leishmaniose visceral, antes e após o tratamento, contribuirão para o melhor entendimento da imunopatogênese envolvida nesta doença. Em fluidos corporais a análise proteômica detalhada tem resultado na identificação de potenciais candidatos a biomarcadores para várias condições. A hipótese da pesquisa é que pacientes com leishmaniose visceral ativa produzem perfil de citocinas e do proteoma com padrão diferente dos indivíduos tratados.

Objetivo da Pesquisa:

Geral

-Avaliar a produção de citocinas de padrão Th1, Th2 e Th17 e o perfil proteômico no soro de pacientes com leishmaniose visceral antes e após tratamento. Relacionar a produção das citocinas com o perfil proteômico obtido.

Específicos

-Avaliar a produção sérica das citocinas IL12, IFN γ , IL-6, TNF α , IL17, IL22, IL10 e TGF β , pela técnica de CBA.

-Quantificação das proteínas do soro pelo método de Bradford;

-Separação das proteínas do soroporo Eletroforese Bidimensional;

-Identificação das proteínas por Espectrometria de Massas e Bioinformática proteômica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

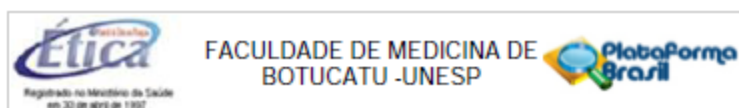
Riscos:

Não há riscos envolvidos diretamente na realização da pesquisa desde que garantido o sigilo e confidencialidade das informações.

Benefícios:

Acreditamos que a exploração desses dados proteômicos, assim como do perfil de citocinas de padrão Th1, Th2 e Th17 no soro de pacientes com leishmaniose visceral, antes e após o tratamento, contribuirão para o melhor entendimento da imunopatogênese envolvida nesta doença, assim como a descoberta de novos marcadores de diagnóstico e prognóstico.

Endereço: Chacara Butignoli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubiao Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608	E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 531.834

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de mestrado em que serão estudados 13 indivíduos com leishmaniose visceral pré-tratamento e 11 indivíduos pós-tratamento, cujas amostras estão estocadas no laboratório de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Também, serão avaliados 16 indivíduos controles, todos doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, cujas amostras estão estocadas no Laboratório de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os pacientes foram atendidos no Hospital Estadual de Bauri e no Hospital das Clínicas (Unidade II) da Faculdade de Medicina de Marília.

Para comprovar a hipótese serão formados dois grupos, sendo:

Grupo 1 (G1): constituído de amostras de 16 indivíduos normais, sem queixas clínicas. Estes indivíduos serão avaliados apenas uma vez para estabelecer o padrão de normalidade das variáveis estudadas (grupo controle).

Grupo 2 (G2): Amostras de 24 pacientes com leishmaniose visceral, sendo 13 pacientes no momento M1) antes do tratamento e 11 no momento (M2) após o tratamento.

Serão incluídos pacientes com idade maior ou igual a 18 anos, ambos os sexos, diagnóstico de leishmaniose visceral comprovado. Serão excluídas gestantes, doenças de origem granulomatosas e sorologia positiva para HIV. No que se refere ao tratamento pacientes de 18 a 50 anos foram tratados com N -metilglucamina (glucantime), anfotericina-B desoxicolato ou anfotericina-B lipossomal. E os acima de 50 anos com anfotericina-B lipossomal.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Este tudo ficou pendente em virtude da necessidade de readequação do TCLE, apresentação de autorização do HEB e de Marília, uma vez que as amostras de sangue que serão utilizadas nesta pesquisa foram coletadas nestas instituições.

Recomendações:

A pesquisadora apresentou o TCLE com as modificações sugeridas e as autorizações institucionais.

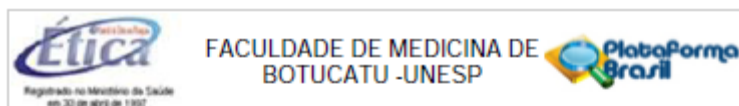
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa tem fundamentação científica e o projeto está adequado a Resolução CNS/MS 466/12. Sugiro sua aprovação sem necessidade de envio à Conep.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Chacara Butignoli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608	E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 531.834

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO DE PESQUISA APROVADO EM REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA DO CEP REALIZADA EM 17/02/2014.

OBS: AO TÉRMINO DESTE ESTUDO É NECESSÁRIO POSTAR O RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES.

BOTUCATU, 17 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador)

Endereço: Chacara Butignoli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3890-1608	E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Página 04 de 04

Anexo III



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA

Objetivo Acadêmico:

- () Pós Doutorado
() Tese Doutorado
(X) Dissertação de Mestrado
() Trabalho científico
() Outros: Especificar

Título Inicial:

Análise do perfil de citocinas e proteômico em pacientes com leishmaniose visceral antes e após o tratamento

Título Final:

Perfil de citocinas do padrão Th1, Th2, Th17 e o estado redox de indivíduos com leishmaniose visceral pré e pós tratamento

Data da reunião do CEP que aprovou o parecer inicial: 17/02/14

Declaro que o trabalho não sofreu alterações nos objetivos e/ou conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.


Nome e Assinatura do Orientador(a)
Avalone Delagari dos Santos


Nome e Assinatura do Orientado(a)

- **Projetos submetidos via Plataforma Brasil:** Preencher o formulário, digitalizar, protocolar no CEP e postar no sistema Plataforma Brasil.
- **Projetos submetidos anteriormente à Plataforma Brasil:** Preencher o formulário em duas vias e protocolar no CEP que emitiu o parecer inicial de aprovação.