INEZ SILVA FERNANDES COSTA

**Ação da molécula doadora de óxido nítrico
S-Nitrosoglutathione (GSNO) na leishmaniose
cutânea experimental**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Ises de Almeida Abrahamssohn

São Paulo

2007

RESUMO

FERNANDES-COSTA, I. S. **Ação da molécula doadora de óxido nítrico S-Nitrosoglutathione (GSNO) na leishmaniose cutânea experimental.** 84 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos da leishmaniose cutânea e visceral. A infecção é transmitida por insetos hematófagos, nos quais os parasitos se desenvolvem sob a forma promastigota. Nos hospedeiros mamíferos, incluindo a espécie humana, as formas encontradas são as amastigotas que proliferam nos macrófagos; estas células podem controlar a infecção produzindo radicais derivados do oxigênio e do nitrogênio. O óxido nítrico (NO) é um dos mais potentes radicais com atividade leishmanicida. Existem várias moléculas já descritas que liberam NO em meio aquoso ou quando adicionadas a suspensões celulares. São chamadas de doadoras de NO. Algumas destas vêm sendo estudadas pelo seu potencial terapêutico no tratamento das leishmanioses cutâneas. A molécula S-nitrosoglutathione (GSNO) pertence a um grupo de moléculas conhecido com S-nitroso-tióis e é um doador de NO relativamente estável. A GSNO havia sido previamente testada em culturas de formas promastigotas de *L. amazonensis* e causou a morte do parasito. O possível uso da GSNO na terapia das leishmanioses cutâneas demanda o conhecimento de suas ações sobre as formas amastigotas encontradas nos hospedeiros mamíferos. Terapias complementares aos antimonialis usados no tratamento da leishmaniose cutânea são necessárias porque estes são apenas injetáveis, têm efeitos colaterais e ocorrem altos índices de desistência do tratamento. O objetivo do trabalho foi analisar o efeito da molécula GSNO nas culturas de células THP-1 (linhagem de monócitos humanos leucêmicos) infectadas com *L. major* e o efeito da sua administração tópica diretamente na lesão ulcerada leishmaniótica de camundongos infectados. Os experimentos com células THP-1 infectadas com *L. major* e tratadas com GSNO, mostram marcada redução do parasitismo intracelular, dose dependente, em comparação às culturas sem tratamento. O tratamento com GSNO foi testado em camundongos Balb/c

infectados com *L. major* e em camundongos C57BL/6 desprovidos do gene de IFN- γ (*Knockout* de IFN – γ ou IFN- γ KO) infectados com *L. braziliensis*. Grupos de animais foram infectados no dorso e após 60 dias iniciou-se o tratamento tópico com GSNO diluída em PBS, em GEL F127 ou com os respectivos veículos, como controles; ainda, outros grupos foram tratados sistemicamente (via endovenosa) com o antibiótico com ação leishmanicida, anfotericina B, ou com anfotericina B associada à aplicação tópica de GSNO. Foram feitas duas medições semanais das lesões. Decorridos aproximadamente 60 dias após o início do tratamento, os animais foram sacrificados e retirados o linfonodo drenante (inguinal superficial) e a lesão para fazer a quantificação parasitária. O tratamento tópico da infecção por *L. major* com a molécula GSNO reduziu o tamanho da lesão cutânea, chegando a se observar fechamento da úlcera em alguns animais; a carga parasitária no linfonodo drenante e/ou na lesão também sofreu redução. Nos camundongos IFN- γ KO infectados por *L. braziliensis*, também ocorreu inibição da progressão da lesão pelo tratamento local com GSNO em comparação ao grupo não tratado. Como conclusão, conseguimos demonstrar que GSNO apresenta efeito leishmanicida sobre formas amastigotas de *L. major* em cultura celular e reduz a lesão cutânea causada por *L. major* ou por *L. braziliensis* em comparação aos grupos controle.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea. Doadores de óxido nítrico. S-nitrosoglutathione – GSNO. *Leishmania major*. *Leishmania braziliensis*.

ABSTRACT

FERNANDES-COSTA, I. S. **Activity of the nitric oxide donor S-nitrosoglutathione (GSNO) on experimental cutaneous leishmaniasis.** 84 p. Master thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Protozoa of the genus *Leishmania* are the etiological agents of cutaneous and visceral leishmaniasis. The infection is transmitted by hematophagous insects in which the parasite multiplies and differentiates as promastigotes. In the mammalian hosts, including man, the parasite proliferates as amastigotes inside macrophages; production of reactive oxygen or nitrogen intermediates (ROI and RNI) by these cells can control the infection. Nitric oxide (NO) is a very toxic RNI active against leishmania. There are many molecules that liberate NO in solution or when added to cellular suspensions. They are collectively called NO donors. A few of them have been studied because of their potential therapeutic use in cutaneous leishmaniasis. The molecule S-nitrosoglutathione (GSNO) belongs to the S-nitroso-thiols and is a relatively stable NO donor. GSNO has been previously tested and caused the death of *L.amazonensis* promastigotes in liquid culture. A putative application of GSNO in the treatment of cutaneous leishmaniasis requires the understanding of its activities on amastigote forms which are the parasite forms found in the mammalian host. Because the classical leishmaniasis treatment relies on injectable antimonial drugs which have many side effects, many patients abandon the treatment. Therefore, additional therapy to accelerate the cure is needed as well as new drugs are much needed. The aim of the present work is to analyze the effect of the molecule GSNO in cultures of THP-1 cells (a leukemia human monocyte cell line) infected with *Leishmania major* as well as the effect of administering it topically into the lesion of infected mice. The experiments done on *L.major*-infected THP-1 cells showed marked dose-dependent reduction of parasitism when compared to untreated infected cells. The topical treatment with GSNO was done in BALB/c mice infected with *L.major* and in C57BL/6 mice deprived of the IFN- γ gene (IFN- γ KO) infected with *L.braziliensis*. Groups of mice were infected in the shaven dorsal skin and 60 days later the topical treatment with

GSNO dissolved in PBS, in GEL F127 was started. Still other groups were treated systemically (i.v.) with Amphotericin B which is leishmanicidal or with Amphotericin B associated to topically applied GSNO. The lesions were measured twice a week. After 60 days the mice were killed and the draining lymph node and the lesion were removed for quantifying the parasite numbers. The topical treatment of *L.major*-induced ulcer with GSNO reduced the size of the ulcer leading in some mice to complete healing; the parasitic loads in the draining lymph node or in the lesion were also reduced. In *L.braziliensis*-infected IFN- γ KO mice, inhibition of lesion growth also occurred in the mice topically treated with GSNO in comparison to the untreated control group. In conclusion we showed that GSNO is leishmanicidal to *L.major* intracellular amastigotes and that the topical treatment reduces the size of the lesion caused in mice by *L.major* or by *L.braziliensis* in comparison to the control groups.

Key words: Cutaneous leishmaniasis. Nitric oxide donors. S-nitrosoglutathione - GSNO. *Leishmania major*. *Leishmania braziliensis*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O parasito *Leishmania* e sua transmissão

Os protozoários flagelados classificados na ordem Kinetoplastida apresentam em comum a organela denominada cinetoplasto que contém DNA sob a forma de mini-círculos. Entre os membros da ordem temos a família Trypanosomatidae que reúne grande número de espécies, todas dotadas de um flagelo em alguma fase de seu ciclo. A esta família pertence o gênero *Leishmania* compreendendo espécies heteroxênicas que apresentam duas fases no seu ciclo de vida, promastigota e amastigota. Cerca de 20 espécies causam um complexo de doenças conhecidas como leishmanioses (HONIGBERG *et al.*, 1964)

O gênero *Leishmania* compreende muitas espécies que apresentam epidemiologia diversificada. O ciclo de vida tem alternância entre um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um hospedeiro invertebrado (insetos flebotomíneos).

Todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas por insetos vetores dípteros da família Psychodidae e subfamília phlebotominae. Apenas dois gêneros são importantes para a transmissão da leishmaniose: *Lutzomyia* que abrange a maioria das espécies transmissoras do Novo Mundo e todas as espécies das Américas; *Phlebotomus* que engloba as espécies encontradas na África, Europa e Ásia. Os insetos vetores da *Leishmania* são pequenos, menores que os pernilongos comuns, são muito pilosos, têm cor de palha ou castanho-claro e caracteristicamente mantêm as asas eretas quando pousam. No Brasil, na região nordeste recebem o nome popular de cangalha, asa dura ou orelha de veado; na região sul são conhecidos como mosquito palha ou birigui; e na Amazônia o seu nome é tatuira. Os insetos colocam os seus ovos em lugares úmidos e após aproximadamente um mês já são insetos adultos. Somente as fêmeas são hematófagas e alimentam-se de sangue de mamíferos silvestres perpetuando o ciclo de vida no ambiente silvestre. Os seres

humanos e animais domésticos, especialmente o cão, podem ser infectados no ambiente silvestre ou na área peridomiciliar quando invadida pelos insetos resultando em elevadas taxas de prevalência da infecção nas áreas endêmicas (REY, 2001).

A forma promastigota (14 a 20 μm de comprimento e 1,5 a 4 μm de largura) vive na luz do tubo digestório do hospedeiro invertebrado (inseto), possui o corpo celular longo com o núcleo situado na sua porção mediana. O cinetoplasto fica próximo à extremidade anterior, por onde sai o flagelo longo e muito móvel. O flagelo origina-se na organela blefaroplasto, é envolto pelo bolso flagelar e emerge para o exterior da célula. As promastigotas dividem-se por divisão binária simples e os parasitos permanecem agrupados, formando aglomerados com aspecto de rosáceas, em geral aderidos à parede do intestino do inseto.

Ao picar o indivíduo ou o animal parasitado o inseto ingere, juntamente com o sangue ou a linfa intersticial, as células do sistema fagocitário infectadas pela *Leishmania* ou formas amastigotas liberadas no meio extracelular após a lise da célula hospedeira. Os parasitos se desenvolvem no tubo digestivo do inseto; no período de 12 a 18 horas as formas amastigotas ingeridas diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas que possuem o corpo celular ovóide, flagelo curto, são móveis e que rapidamente passam a se dividir. Os protozoários invadem as porções anteriores do estômago e o proventrículo do inseto; diferenciam-se então em formas promastigotas metacíclicas infectantes extremamente móveis cujo corpo celular é curto e delgado e são dotadas de um flagelo longo (bem maior que o corpo). O inseto ao picar o hospedeiro vertebrado lesa os capilares da pele e o sangue extravasado não coagula porque a saliva do inseto é rica em anticoagulantes. Forma-se na pele um micro lago sanguíneo de onde o inseto aspira o sangue. O esforço do inseto na sucção do sangue faz com que os seus músculos relaxem e ocorra regurgitação do material aspirado em mistura com as promastigotas metacíclicas infectantes de volta ao "micro lago" decorrente da picada. As formas infectantes presentes no material regurgitado acabam por entrar em células do sistema mononuclear fagocitário e se diferenciam em formas amastigotas.

A forma amastigota (cerca de 2 a 6 μm de comprimento e 1,5 a 3 μm de largura) é a forma intracelular encontrada no hospedeiro vertebrado. O corpo celular é ovóide, achatado, com pouco citoplasma e o núcleo é redondo, relativamente grande e excêntrico. O cinetoplasto é bem visível e localizado perto do núcleo. Embora denominada amastigota (etimologicamente sem flagelo) o flagelo existe embora restrito ao segmento intracelular e por essa razão a amastigota é praticamente imóvel (REY, 2001) (SACKS e KAMHAWI, 2001).

A *Leishmania* na forma amastigota quando internalizada reside em fagossomos que sofrem maturação e fusão com organelas endocíticas formando o vacúolo parasitóforo que morfologicamente é diferente dependendo da espécie da *Leishmania*. Por exemplo, nas espécies *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) mexicana* as formas amastigotas residem em um único vacúolo grande, enquanto que nas espécies *L. (L.) major* ou *L. (L.) donovani* observam-se vários vacúolos pequenos por célula, cada um contendo apenas um parasito ou eventualmente alguns poucos parasitos (SOLBACH e LASKAY, 2000). O processo de multiplicação das amastigotas é por divisão binária simples longitudinal. Desse modo o número de parasitos aumenta no interior do macrófago até que ocorra esgotamento do citoplasma e ruptura da membrana vacuolar e plasmática, liberando as formas amastigotas para o meio extracelular, possibilitando a sua captura por outras células fagocitárias próximas.

1.2 As leishmanioses

A Organização Mundial de Saúde estima que a cada ano, dois milhões de pessoas são contaminadas no mundo com a leishmaniose (1.5 milhão leishmaniose cutânea e 500.000 leishmaniose visceral). A urbanização dos grandes centros e o avanço no desmatamento estão relacionados ao aumento dos casos de leishmaniose (DESJEUX, 2001). As principais áreas endêmicas ocorrem na região tropical ou subtropical como mostra a **figura 1** para a leishmaniose cutânea e a **figura 2** para a leishmaniose visceral.

Figura 1 – Distribuição da leishmaniose cutânea no Novo e Velho Mundo

Fonte: WHO/CSR/EDC-UNAIDS **Map production:** Public Health Mapping Group Communicable Diseases (CDS) World Health Organization, October 2003

Figura 2 – Distribuição da leishmaniose visceral no Novo e Velho Mundo.

Fonte: WHO/CSR/EDC-UNAIDS **Map production:** Public Health Mapping Group Communicable Diseases (CDS) World Health Organization, October 2003

A doença leishmaniose pode apresentar diferentes formas clínicas dependendo da espécie de *Leishmania* infectante, da região geográfica (**Tabela 1**), do grau de imunidade do indivíduo e também do inseto vetor (SACKS e KAMHAWI, 2001). As formas clínicas são classificadas em Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD),

Leishmaniose Mucocutânea (LM) e a Leishmaniose Visceral (LV) (DESJEUX, 2004).

A lesão na LCL inicia-se com uma área de vermelhidão e edema no sítio da inoculação pelo inseto; a lesão inflamada aumenta de tamanho, e depois de 3 a 4 semanas desenvolve-se uma única úlcera rasa, de crescimento lento na qual os parasitos são encontrados principalmente nas bordas da lesão . O parasito pode permanecer no organismo por semanas ou mesmo meses antes do aparecimento da lesão. Na LCD, os indivíduos desenvolvem lesões infiltradas, disseminadas pelo corpo, raramente ulceradas; os pacientes apresentam deficiência na resposta imune celular contra o parasito e não respondem bem ao tratamento com os antimoniais.

A LM é uma das formas da leishmaniose tegumentar americana (LTA) e é também conhecida por Espúndia, Úlcera de Bauru ou Ferida Brava. Caracterizada por lesões cutâneas e por lesões secundárias na região nasal ou na região bucofaríngea que desfiguram a face do indivíduo.

A LV, também conhecida como “Kala azar”, é causada principalmente por *L. donovani* e *L. infantum* no velho mundo e *L. chagasi* no novo mundo. A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença afetando os gânglios linfáticos, baço, fígado e medula óssea. Depois de tratada a forma visceral, os pacientes podem ainda desenvolver uma forma cutânea localizada, a LC chamada de pós Kalazar; essa forma clínica necessita de tratamento mais demorado para sarar (HERWALDT, 1999) (DESJEUX, 2004).

Tabela 1 – Manifestações clínicas da doença leishmaniose causadas por diferentes espécies da *Leishmania*

	Main clinical pathology	Transmission cycle	Main geographical distribution
New World <i>Leishmania</i> spp			
<i>L (Viannia) braziliensis</i>	LCL, mucosal	Zoonotic	South America, parts of Central America, Mexico
<i>L (Viannia) panamensis</i>	LCL, mucosal	Zoonotic	Northern South America and southern Central America
<i>L (Viannia) peruviana</i>	LCL	Zoonotic	Peru
<i>L (Viannia) guyanensis</i>	LCL	Zoonotic	South America
<i>L (Viannia) lainsoni</i>	LCL	Zoonotic	South America
<i>L (Viannia) colombiensis</i>	LCL	Zoonotic	Northern South America
<i>L (Leishmania) amazonensis</i>	LCL, DCL	Zoonotic	South America
<i>L (Leishmania) mexicana</i>	LCL, DCL	Zoonotic	Central America, Mexico, USA
<i>L (Leishmania) pifanoi</i>	LCL	Zoonotic	South America
<i>L (Leishmania) venezuelensis</i>	LCL	Zoonotic	Northern South America
<i>L (Leishmania) garnhami</i>	LCL	Zoonotic	South America
Old World <i>Leishmania</i> spp			
<i>L (Leishmania) aethiopica</i>	LCL, DCL	Zoonotic	Ethiopia, Kenya
<i>L (Leishmania) killicki</i>	LCL	Zoonotic	North Africa
<i>L (Leishmania) major</i>	LCL	Zoonotic	Central Asia, north Africa, middle east, East Africa
<i>L (Leishmania) tropica</i>	LCL	Anthroponotic	Central Asia, middle east, parts of north Africa, southeast Asia
<i>L (Leishmania) donovani</i>	Visceral, LCL	Anthroponotic	Africa, central Asia, southeast Asia
Old and New World <i>Leishmania</i> spp			
<i>L (Leishmania) infantum</i> <i>L (Leishmania) chagasi</i>	Visceral, LCL	Zoonotic	Europe, north Africa, Central America, South America
LCL=localised cutaneous leishmaniasis. DCL=diffuse cutaneous leishmaniasis. *Subgenus is given in parentheses. Southeast Asia includes the Indian subcontinent and China			
Table 1: Species* of <i>Leishmania</i> that cause human disease			

FONTE: REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* [S.l.], v. 7, n. 9, p. 581-96, Sep 2007. Modificado por Fernandes costa, I. S.

1.3 O parasito e a sua interação com o sistema imune do hospedeiro mamífero

Quando os parasitos são introduzidos no hospedeiro mamífero, as formas promastigotas encontram um ambiente constituído por componentes do sangue (células e plasma) extravasados para o tecido durante o repasto sanguíneo do inseto. Nesse ambiente existem complexos de proteínas do sistema complemento e provavelmente muitos parasitos são lisados pela ação dessas proteínas que, ativadas, depositam-se na membrana plasmática do parasito levando à formação do complexo molecular que lisa a membrana e

provoca a morte do parasito (SACKS e PERKINS, 1984). Entretanto existem parasitos que sobrevivem à ação lítica do complemento. As formas promastigotas metacíclicas são mais resistentes à lise pelo complemento do que as formas procíclicas, apesar de ambas ligarem quantidades consideráveis de C3b (PUENTES *et al.*, 1988). Ambas possuem lipofosfoglicanos (LPG) na superfície que dificultam a penetração do complexo lítico C5b-C9 na membrana plasmática constituindo-se possivelmente em um dos fatores responsáveis pela resistência à ação lítica do complemento. Ainda, na forma metacíclica o principal fator que contribui para a resistência ao complemento é a atividade proteolítica da glicoproteína de massa molecular 63 KDa (gp 63); esta cliva rapidamente C3b dando origem a componentes que não fixam C5b-C9 (BRITTINGHAM e MOSSER, 1996). A fixação da C3b na superfície do parasito também é importante para facilitar a adesão dos parasitos às células fagocíticas do sistema imune inato (MOSSER e EDELSON, 1985). Além de C3b, a própria molécula gp 63 na superfície do parasito se liga a receptores nas células fagocíticas facilitando a fagocitose (BRITTINGHAM *et al.*, 1999).

As primeiras células que entram em contato com o parasito no sítio da inflamação e também as células que são recrutadas para esse local são as células do sistema imune inato do hospedeiro mamífero. Essas células desenvolvem papel crucial na resistência ou suscetibilidade à leishmaniose.

As células que migram primeiramente para o sítio da inoculação são os neutrófilos que fagocitam as promastigotas e liberam MIP-1 β para recrutar para o local da inflamação os monócitos sanguíneos circulantes que se diferenciam em macrófagos. Os neutrófilos têm vida muito curta. Morrem por apoptose e são fagocitados por macrófagos ou células dendríticas que assim se infectam com os parasitos (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Quando os neutrófilos são depletados experimentalmente, ocorre cura espontânea da infecção murina em aproximadamente uma semana. Entretanto, animais com depleção dos neutrófilos conseguem recrutar normalmente para o sítio da inflamação macrófagos e células dendríticas (CD) que fagocitam os parasitos (PETERS *et al.*, 2008). Recentemente alguns pesquisadores mostraram que os neutrófilos podem formar redes de cromatina e proteínas nucleares, após a sua morte, conhecidas como "Nets" e que estas redes capturam e matam *L. amazonensis*

promastigotas. O grupo também encontrou a formação das Nets em biopsias das lesões causadas por *Leishmania* em pacientes humanos (GUIMARAES-COSTA *et al.*, 2009). Outras células do sistema imune inato, como as células Natural Killer (NK) possuem atividade citotóxica, desempenham papel importante no controle inicial da infecção por leishmania e aparecem no sítio da infecção já 24 horas depois da inoculação dos parasitos (MULLER *et al.*, 2001).

As células do sistema imune inato possuem receptores que reconhecem padrões moleculares do parasito e podem ativar vários fatores de transcrição desencadeando a produção de citocinas e quimiocinas. Dentre esses receptores, estão os da família *Toll Like Receptors* (TLR). Na infecção por *Leishmania*, receptores do tipo TLR-2 presentes em macrófagos e CD podem ser ativados através das moléculas de lipofosfoglicana (LPG) encontradas em abundância na superfície do parasito (DE VEER *et al.*, 2003). Os receptores TLR-2 também podem sinalizar a ativação do fator de transcrição NF- κ B em células NK para a produção de IFN- γ e TNF- α (BECKER *et al.*, 2003). Essas citocinas são importantes para ativar os macrófagos a destruírem os parasitos intracelulares via produção de radicais de oxigênio e nitrogênio extremamente tóxicos para os parasitos. Receptores TLR-4 também estão envolvidos no controle da infecção por *Leishmania* (KROPF *et al.*, 2004); em outro trabalho, o mesmo grupo demonstrou a importância da sinalização via TLR-4 e pelo receptor para interleucina 12 (IL-12R), na produção de IFN- γ por NK e linfócitos T. Recentemente foi mostrada a ativação para a produção de IL-12 pela interação de TLR-9 e leishmania (ABOU FAKHER *et al.*, 2009). A IL-12 é uma citocina importante para ativar células NK e linfócitos T a produzirem IFN- γ .

Além da IL-12, Moll e colaboradores mostraram que a *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) é importante para ativação de macrófagos durante a infecção por *Leishmania* e também essa citocina age em sinergismo com a IFN- γ (RITTER e MOLL, 2000). Outras citocinas que atuam especialmente na resposta imune inata à infecção por leishmania são os interferons do tipo I (IFN-I) também chamados de interferons, não imunes ou virais entre os quais têm-se os interferons α e β . A sua síntese é deflagrada em praticamente todas as células por mecanismos variados entre os quais

reconhecimento de DNA ou RNA e sinalização via receptores de superfície e/ou interação com receptores intracelulares (DIEFENBACH *et al.*, 1998).

Os macrófagos e as CD ativadas através dos receptores e citocinas liberadas na imunidade inata desempenham papel fundamental para apresentação de antígenos e ativação dos linfócitos do sistema imune adaptativo do hospedeiro e é essa ativação que vai ser importante para controle ou não da infecção causada por *Leishmania*.

Os linfócitos T CD4+ específicos para antígenos do parasito diferenciam-se em subpopulações de linfócitos Th1, Th2 e na recentemente descrita população de Th17 e ocorre a ativação de células T reguladoras. O conjunto equilibrado da produção de citocinas ativadoras de macrófagos, quimiocinas, migração e ativação de células inflamatórias e atividades reguladoras poderá eliminar completamente o parasito ou pelo menos evitar o surgimento de lesão ou doença. A doença humana se manifestará por ineficiência ou excesso de regulação negativa sobre a resposta Th1 nas formas clínicas de LCL ou LCD ou, ao contrário, exacerbação da resposta Th1 acompanhada de excessiva resposta inflamatória nas formas cutâneo-mucosas livres de parasitos. Esta manifestação possivelmente é devida à atividade de células Th17, levando à intensa destruição tecidual.

Em modelos murinos os fatores imunológicos que determinam a resistência e suscetibilidade à *L. major* foram muito bem estudados. Respostas predominantes do tipo Th1 ou Th2 resultam respectivamente na resistência e suscetibilidade à infecção por *L. major* (SCOTT *et al.*, 1988) ou por *L. amazonensis*, embora para esta última a polarização de respostas de células Th e a participação de determinadas citocinas na regulação da suscetibilidade seja menos definida que para *L. major* (LIMA *et al.*, 1998) e (JI *et al.*, 2002).

A presença de citocinas como IL-12, IFN- γ , IL-18 e, no homem, também IFN-I no microambiente tecidual de ativação dos linfócitos leva à diferenciação de linfócitos Th0 para linfócitos do tipo Th1 que são produtores de IFN- γ e TNF- α ; estas citocinas são ativadoras potentes das atividades microbidas de macrófagos e, portanto, a sua eficiente produção e ação estão associadas à resistência às infecções por microorganismos intracelulares incluindo

Leishmania. A diferenciação de linfócitos Th0 em ambiente onde prevalece IL-4 (complementada por IL-13) e onde a síntese de IL-12 é pouco estimulada ou é suprimida, polariza a diferenciação para linfócitos do tipo Th2 que sintetizam de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, citocinas associadas à suscetibilidade à infecção por *L. major* (SCOTT, 1991). Este cenário é influenciado também por linfócitos T CD8+, linfócitos T regulatórios (Treg) e por linfócitos Th17. Esta última população sintetiza a citocina IL-17 que direta e indiretamente estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a inflamação tecidual. Foi verificado que em camundongos deficientes do receptor da citocina IL-27 (IL-27R KO) ocorre maior expansão das células Th17 produtoras de IL-17 observando-se agravamento das lesões causadas por *L. major* (ANDERSON *et al.*, 2009).

Os linfócitos TCD8⁺ atuam na resistência a *L. major* porque podem produzir grande quantidade de IFN- γ que age na ativação de macrófagos (RUIZ e BECKER, 2007) e (BELKAID *et al.*, 2002). Foi mostrado que as células TCD8⁺ de memória desenvolvem papel importante no controle da re-infecção por *Leishmania* (MULLER *et al.*, 1994). Além da síntese de IFN- γ , a atividade citotóxica das células TCD8⁺ lisa a membrana plasmática dos macrófagos infectados por *Leishmania* (RUSSO *et al.*, 1999). Entretanto, outros autores mostram que a granzima produzida e liberada pelas células TCD8⁺ pode ter efeito oposto agravando as lesões na leishmaniose cutânea (FARIA *et al.*, 2009).

As citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β inibem a ativação dos macrófagos e a produção de óxido nítrico (NO) por estas células e consequentemente a destruição dos parasitos intracelulares é reduzida (BALESTIERI *et al.*, 2002). Tanto TGF- β como IL-10 podem ser produzidos pelas células T reguladoras (Treg) além de outras células. As Treg têm descrita a função de regular negativamente o sistema imune e uma sub-população destas células apresenta o fenótipo TCD4⁺, CD25⁺ e fator de transcrição Foxp3⁺; durante a infecção de camundongos por *L. amazonensis*, estas células foram capazes de produzir TGF- β e IL-10, que juntas inibiram a produção da citocina IFN- γ (JI *et al.*, 2005). As células Treg foram encontradas nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e foram capazes de produzir IL-10

(BOURREAU *et al.*, 2009). Ribeiro Sampaio e os seus colaboradores evidenciaram Foxp3 nas lesões de pacientes que apresentavam casos clínicos de LCL, LM e LCD. Nos pacientes com a LCD, forma grave da leishmaniose cutânea, onde há ausência da resposta imune celular, foram encontradas células T reguladoras em maior número. Os autores sugeriram que as células Treg poderiam estar regulando a resposta imune via Fas/FasL, levando as células T efetoras à apoptose (CARNEIRO *et al.*, 2009). Por outro lado, é necessário ressaltar que tanto IL-10 como TGF- β podem exercer sua atividade "regulatória" negativa sobre a ativação linfocitária e sobre os mecanismos microbicidas de macrófagos e não serem provenientes de células Treg e sim de células do sistema imune inato ou de células Th2. De fato, em camundongos infectados por *L. major*, mostrou-se que a IL-10, principal citocina regulatória negativa produzida na fase crônica, se origina de linfócitos Th1 CD4+CD25-Foxp3- sintetizadores também de IFN- γ (ANDERSON *et al.*, 2007).

Além dos linfócitos T, ocorre na leishmaniose expansão da população de linfócitos B e produção de anticorpos parasito-específicos e ativação policlonal, especialmente acentuada na leishmaniose visceral. Linfócitos B reconhecem antígenos do parasito, se ativam e diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos de vários isotipos. Linfócitos B também internalizam, processam e apresentam antígenos para os linfócitos T e são considerados excelentes células apresentadoras (APC). Alguns pesquisadores mostraram que camundongos BALB/c J_H (que têm deleção do locus da cadeia pesada da imunoglobulina e não produzem anticorpos) infectados com *L. major* são relativamente resistentes à infecção se comparados com camundongos BALB/c normais que produzem anticorpos e que são muito suscetíveis à infecção. O mesmo grupo analisou a produção de anticorpos em pacientes com leishmaniose visceral causada por *L. chagasi*; os resultados mostram que os pacientes que tinham agravamento da doença apresentavam maiores níveis de anticorpos (MILES *et al.*, 2005). O grupo de Lynn Soong mostrou resultados similares (WANASEN *et al.*, 2008) nas infecções por *L. amazonensis* de camundongos BALB/c J_H que foram tardias e menos intensas ao se comparar com camundongos BALB/c normais. A relativa resistência dos camundongos

J_H, os quais não produzem anticorpos, estaria relacionada ao menor número de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ encontrados nestes animais. Os autores sugerem que, na ausência de células B, a ativação dos linfócitos T seria menos intensa, e portanto, haveria menos ativação do sistema imune e de linfócitos TC4+, lembrando que na infecção por *L. amazonensis* a ativação de TCD4+ está associada ao agravamento da doença (SOONG *et al.*, 1997). Outro trabalho reforça idéia semelhante para a situação de infecção de camundongos BALB/c pela cepa da *L. major*, LV39; as células B específicas para antígenos do parasito interagem com os linfócitos T e os ativam. Os autores sugerem que aumento das células T ativadas poderia ser responsável pela suscetibilidade dos camundongos BALB/c à infecção por *Leishmania* (RONET *et al.*, 2008).

1.4 Radicais derivados de oxigênio e nitrogênio e sua importância para regular o parasitismo

O controle do crescimento intracelular da *Leishmania* em macrófagos ativados de camundongos depende fundamentalmente da ação de óxido nítrico (NO), sintetizado a partir de L-arginina pela ação de uma NO-sintase (iNOS) induzível por citocinas ativadoras como os interferons do tipo IFN- γ e também do tipo I e TNF- α (LIEW e O'DONNELL, 1993).

Os radicais intermediários de oxigênio e nitrogênio foram eficientes no controle da infecção de macrófagos murinos por *L. donovani*, mostrando eficiente efeito leishmanicida mesmo para a espécie de *Leishmania* que pode determinar a doença visceral (MURRAY e NATHAN, 1999). A produção de NO também desempenha papel importante no controle da fase inicial da leishmaniose cutânea murina causada por *L. mexicana* (DIAZ *et al.*, 2003).

Entretanto, na espécie humana os níveis de produção de NO por macrófagos ativados são relativamente muito reduzidos em comparação aos encontrados nos camundongos, embora haja expressão de mRNA para iNOS após estimulação por IFN- γ . O controle da infecção intracelular por *Leishmania* em macrófagos humanos ativados por citocinas parece depender da geração

de radicais de oxigênio e de H₂O₂, mas também de mecanismos independentes de oxigênio (MURRAY e TEITELBAUM, 1992). A inibição da síntese de NO por um análogo de L-arginina, a N-monometil-L-argininina (NMMA), não alterou a morte intracelular de *L. donovani* em macrófagos humanos ativados (MURRAY e CARTELLI, 1983). Todavia, outros autores descrevem ação parasiticida, aparentemente mediada por NO, exercida por macrófagos humanos sobre *L. infantum* (PANARO *et al.*, 1999). Corroborando estes dados, ainda outros pesquisadores mostraram que, embora não detectassem NO nas culturas de macrófagos humanos infectados com *L. chagasi*, a inibição da iNOS diminuía a atividade parasiticida destas células (GANTT *et al.*, 2001; DIAZ *et al.*, 2003). Macrófagos humanos são capazes de eliminar *L. major* após ligação de IgE no receptor CD23 (low affinity epsilon Fc receptor RII). Esta ligação promove ativação de iNOS em macrófagos e a morte dos parasitas observada é dependente de iNOS (VOULDOUKIS *et al.*, 1995) e (MOSSALAYI *et al.*, 1999). Ainda, biópsias de pacientes com a forma localizada, LCL, apresentaram maior frequência de células positivas para iNOS em comparação a biópsias de pacientes com a forma difusa e grave da doença (QADOUMI *et al.*, 2002).

Tomados em conjunto estes resultados mostram que a participação de NO produzido endogenamente bem como a de outros mecanismos no controle do parasitismo de macrófagos humanos por parasitos do gênero *Leishmania* está ainda longe de ser esclarecida.

1.5 Tratamento das Leishmanioses

A Organização Mundial da Saúde recomenda para o tratamento das leishmanioses os antimoniais pentavalentes como drogas de primeira escolha. Os primeiros antimoniais pentavalentes foram sintetizados por volta de 1945: o estibogluconato de sódio, comercializado como Pentostan® pela Glaxo Smith Kline e o antimoniato de N-metil glucamina, Glucantime® fabricado pela Aventis Pharma S.A. ambos em uso até hoje. Na leishmaniose cutânea é indicado o seu uso administrados pela via endovenosa e ocasionalmente é indicada também a aplicação intralesional (MURRAY *et al.*, 2005). Outras

drogas também são utilizadas como segunda linha para o tratamento das leishmanioses. Entre elas, estão o antifúngico anfotericina B desoxicolato comercializado como Fungizone, ou a sua formulação lipídica comercializada pela United Medical como AmBisome®, a AMPHOCIL fabricado pela Zodiac e a FUNGI –B fabricado pela Eurofarma. Além destes antifúngicos, a Pentamidina (isetionato de pentamidina) é uma diamidina comercializada como Lomidina® também é usada como droga de segunda escolha no tratamento das leishmanioses. Em 2002, o miltefosine, foi aprovado como o primeiro medicamento de uso oral para o tratamento da leishmaniose visceral após alguns ensaios clínicos bem sucedidos na Índia (SUNDAR *et al.*, 2002). O miltefosine (hexadecilfosfocolina) é registrado com o nome comercial Impavido®, sendo que a droga é derivada de alquil-lisofosfolipídicos e primeiramente desenvolvida para o tratamento de neoplasias por causa da sua ação antiproliferativa.

Apesar dos antimoniais serem as drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses muitos pacientes não respondem ao tratamento. Um dos fatores poderia decorrer da resistência do parasito aos antimoniais ou a outros problemas não relacionados à resistência. Os maiores problemas de resistência aos antimoniais têm sido relatados na Índia e, em algumas regiões, 50-65% dos pacientes com leishmaniose visceral não respondem bem ao tratamento com os antimoniais (SUNDAR, 2001).

Existem trabalhos mostrando haver resistência de culturas axênicas de amastigotas ao Glucantime® (SERENO *et al.*, 2000). Outros pesquisadores analisaram *L. major* e *L. tropica* isoladas de pacientes que respondiam ou não ao tratamento com Glucantime®. Esses parasitos isolados foram usados para infectar macrófagos obtidos do peritônio de camundongos e as culturas foram tratadas com Glucantime®: os resultados mostram haver associação entre os isolados provenientes dos pacientes que não responderam ao tratamento e a respectiva resistência ao tratamento *in vitro* com a droga nas culturas de macrófagos (HADIGHI *et al.*, 2006). Entretanto, estudos com parasitos isolados de pacientes infectados com *L. braziliensis* realizados no Brasil, mostram que os promastigotas de cultura axênica e macrófagos infectados com amastigotas de pacientes que não receberam o tratamento adequado e ou

simplesmente não responderam ao tratamento, precisam de doses maiores do Glucantime® para matar os parasitos do que pacientes que responderam bem ao tratamento (AZEREDO-COUTINHO *et al.*, 2007). Portanto, nestes casos, a resistência ao tratamento identificada nos pacientes poderia ter outras causas.

Além da resistência dos parasitos ao tratamento com os antimoniais, os efeitos colaterais podem também inviabilizar o seu uso, dentre eles, a ocorrência de pancreatite na metade dos pacientes tratados com Pentostan® ou Glucantime® (GASSER *et al.*, 1994). O efeito do Glucantime® também foi estudado durante a gravidez e em crianças. Há um relato de uma paciente grávida tratada com Glucantime® que teve o parto no quinto dia de tratamento ocorrendo óbito do recém-nascido após um dia de vida (SILVEIRA *et al.*, 2003). Crianças abaixo de 5 anos tratadas com Glucantime® tiveram baixa porcentagem de cura das lesões de leishmaniose cutânea (PALACIOS *et al.*, 2001). Esses resultados poderiam ser explicados porque a quantidade da droga encontrada no soro de crianças de 3-6 anos de idade é bem menor comparada à dose encontrada no soro de adultos, mesmo com a mesma dose de Glucantime® recebida (20mg/kg); isto resulta em baixa eficácia da droga nessa faixa etária (CRUZ *et al.*, 2007). Entretanto, crianças entre 5 e 14 anos que receberam tratamento com Glucantime® não apresentaram diferenças nos resultados de cura se comparadas com adultos (SCHUBACH ADE *et al.*, 2005).

A anfotericina B tem sido usada no tratamento da leishmaniose visceral com sucesso quando os antimoniais não funcionam, mas também é de administração sistêmica. Entretanto, a anfotericina B possui diversos efeitos colaterais relatados e, portanto, requer cuidados no acompanhamento dos pacientes (THAKUR *et al.*, 1999). A anfotericina B na forma de lipossomas tem mostrado menos efeitos colaterais, pode ser utilizada em doses menores e também tem meia vida mais longa dentro dos macrófagos com conseqüente melhor ação contra os parasitos intra vacuolares (BERMAN *et al.*, 1998). Entretanto, o seu alto custo decorrente da formulação lipossomal inviabiliza o uso rotineiro.

A molécula Miltefosine atua *in vitro* sobre *L. donovani* e é citotóxica para amastigotas residentes no vacúolo de macrófagos (CROFT e COOMBS, 2003). Entretanto, estudos utilizando miltefosine no tratamento da leishmaniose cutânea mostraram a sua eficácia contra *L. (V.) panamensis*, mas não contra *L. (V.) braziliensis* (SOTO *et al.*, 2004). Cabe lembrar ainda que o Miltefosine é contra indicado para o tratamento de mulheres em idade fértil por seus efeitos teratogênicos.

1.6 Moléculas doadoras de óxido nítrico e o seu potencial para tratamento da leishmaniose tegumentar

Moléculas doadoras de óxido nítrico têm sido amplamente testadas e/ou usadas na espécie humana em terapias para doenças das mais variadas etiologias revisto por (BURGAUD *et al.*, 2002).

Na leishmaniose, Salvati e colaboradores mostraram que culturas de promastigotas de *L. infantum* tratadas por uma hora com 1×10^{-4} M da molécula doadora de NO, S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), apresentaram 90 % de redução no número de parasitos móveis (SALVATI *et al.*, 2001). Holzmüller e colaboradores (HOLZMULLER *et al.*, 2002), utilizaram albumina nitrosilada (NO-BSA) como molécula doadora de NO e verificaram que a adição de 4 mg/ml da NO-BSA às culturas axênicas de *L. amazonensis* matou 90% das formas amastigotas após 12h de incubação.

Apesar da ausência de dados experimentais na literatura sobre a ação de doadores de NO sobre formas intracelulares de *Leishmania* em culturas de macrófagos surgiram alguns relatos de aplicação tópica destas moléculas no tratamento de pacientes humanos com lesões causadas por *Leishmanias* do grupo mucocutâneo. Zeina e colaboradores (ZEINA *et al.*, 1997) relatam o caso clínico de um homem com 10 nódulos ulcerados tratado durante 7 dias com trinitrato de glicerina (GTN) como doador de NO; após algumas semanas houve regressão das lesões e não houve recorrência em um período de 6 meses. Lopez-Jaramillo e colaboradores (LOPEZ-JARAMILLO *et al.*, 1998)

trataram 16 pacientes que apresentavam lesões de leishmaniose com um creme contendo SNAP. O creme foi aplicado diariamente a cada 4 horas nas úlceras durante 10 dias. Transcorridos 30 dias a maioria das lesões estava curada e após 8 meses, não houve recorrência das lesões. Na segunda cultura da biopsia das lesões dos pacientes curados não apareceram parasitos. Os efeitos colaterais não foram observados, apenas relatos dos pacientes de que sentiam transitório calor nas lesões após a aplicação do creme.

Outros autores (DAVIDSON *et al.*, 2000), usaram como doador de NO, um creme aquoso de Nitrato de Potássio (KNO_2) acidificado com ácido salicílico, ácido ascórbico ou com cloreto de potássio e testaram as formulações no tratamento tópico de nódulos ulcerados causados por *Leishmania* em grupos variados de pacientes. Os resultados não foram satisfatórios: 28 % dos pacientes tiveram alguma melhora e apenas 12% manifestaram cura. Outro autor, Landazuri, como citado na introdução do ensaio clínico descrito por Lopez-Jaramillo em 2006, tratou as lesões de 35 pacientes com um curativo liberador de NO (NOP - Nitric Oxide Releasing Patch) relatando que 65% dos pacientes tratados melhoraram com o tratamento (SILVA *et al.*, 2006).

A família de doadores de NO denominada S-nitrosotióis possui compostos que tem em comum a estrutura R-SNO. Eles foram sintetizados antes de 1840 e entre 1970 e 1980 começaram a ser usados em pesquisa na área biomédica. Os compostos doadores de NO dessa família possuem maior estabilidade que trinitrato de glicerina e SNAP e tem o potencial de penetrar dentro das células. Dois destes compostos, S-nitrosoglutathione (GSNO) e S-Nitroso-N-acetil-L-cisteína (SNAC), foram testados em culturas axênicas e lesaram irreversivelmente formas promastigotas de *Leishmania* (DE SOUZA *et al.*, 2006).

A GSNO incorporada no Gel F127 também foi utilizada como aplicação tópica em suturas de ratos na fase inicial de reparação tecidual, os resultados mostraram que o tratamento com a molécula acelerou a cura das suturas na pele desses animais (AMADEU *et al.*, 2008).

Os efeitos tóxicos do NO produzido por macrófagos murinos ativados sobre as *Leishmanias* são atribuídos à sua ação preferencial em enzimas cujos grupos prostéticos apresentam Ferro/Enxofre (MAUEL e RANSIJN, 1997) e (LEMESRE *et al.*, 1997) entre as quais várias enzimas contendo o núcleo HEME que participam da cadeia respiratória. O NO pode também degradar DNA e deflagrar apoptose celular (HOLZMULLER *et al.*, 2002).

Entretanto, como discutido no próprio trabalho de Souza e cols. (DE SOUZA *et al.*, 2006), a ação observada da GSNO sobre promastigotas de *L. amazonensis* foi principalmente devida à S-trans-nitrosação de proteínas do parasito e não à liberação de NO na forma gasosa. Em contrapartida, a ação tóxica de SNAC não era devida à S-trans-nitrosação e provavelmente deveu-se às ações de NO liberado sobre o parasito. Portanto, em resumo, a observação de ação citotóxica após tratamento com S-nitrosotióis não é obrigatoriamente devida à ação de NO na forma gasosa, como também foi discutido por (ZHANG e HOGG, 2004).

Não existem trabalhos relatando efeito tóxico ou parasiticida de moléculas doadoras de NO sobre parasitos do gênero *Leishmania* no seu habitat intracelular. Este é, obviamente, um aspecto importante quando se cogita usar moléculas doadoras de NO para o tratamento tópico das lesões, seja como terapia adjuvante à terapia clássica antimonial para o controle do parasitismo ou para facilitar ou acelerar a cicatrização da lesão. Muitos pacientes respondem mal aos antimoniais, o tratamento é prolongado e a cura local é especialmente demorada em lesões localizadas nas mucosas ou sobre cartilagens (orelha e nariz) (OUELLETTE *et al.*, 2004).

Em função do exposto, nós investigamos alguns compostos S-nitrosotióis, em especial GSNO, quanto à sua ação *in vitro* sobre o parasitismo intracelular por *Leishmania* e quanto aos efeitos de sua aplicação tópica sobre a evolução da lesão e da infecção em camundongos.

6 CONCLUSÕES

1. A molécula GSNO tem ação leishmanicida em culturas de células THP-1 infectadas com *L. major*;
2. A GSNO pode nitrosilar proteínas dos parasitos e ou das células THP-1, mas os mecanismos ainda são desconhecidos.
3. A molécula doadora de NO GSNO aplicada topicamente reduziu e/ou controlou as lesões de camundongos infectados com *L. major* ou *L. braziliensis*;

REFERÊNCIAS*

- ABOU FAKHER, F. H. *et al.* TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. *J. Immunol.*, v. 182, n. 3, p. 1386-96, Feb. 2009.
- AMADEU, T. P. *et al.* S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, v. 21, n. 5, p. 629-37, May. 2007.
- _____. Nitric oxide donor improves healing if applied on inflammatory and proliferative phase. *J. Surg. Res.*, v. 149, n. 1, p. 84-93, Sep. 2008.
- ANDERSON, C. F. *et al.* CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.*, v. 204, n. 2, p. 285-97, Feb. 2007.
- _____. IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ cells in nonhealing *Leishmania major* infection. *J. Immunol.*, v. 183, n. 7, p. 4619-27, Oct. 2009.
- AUGUSTO, O. *et al.* Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 29, n. 7, p. 853-62, Jul. 1996.
- AZEREDO-COUTINHO, R. B. *et al.* Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J. Parasitol.*, v. 93, n. 3, p. 688-93, Jun. 2007.
- BALESTIERI, F. M. *et al.* *Leishmania* (L.) *amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect.*, v. 4, n. 1, p. 23-9, Jan. 2002.
- BECKER, I. *et al.* *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 130, n. 2, p. 65-74, Aug. 2003.
- BELKAID, Y. *et al.* CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J. Immunol.*, v. 168, n. 8, p. 3992-4000, Apr. 2002.
- BERMAN, J. D. *et al.* Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull. World Health Organ.*, v. 76, n. 1, p. 25-32, 1998.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOURREAU, E. *et al.* Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect. Immun.*, v. 77, n. 4, p. 1465-74, Apr. 2009.

BRITTINGHAM, A. *et al.* Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect. Immun.*, v. 67, n. 9, p. 4477-84, Sep. 1999.

BRITTINGHAM, A.; MOSSER, D. M. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol. Today*, v. 12, n. 11, p. 444-7, Nov. 1996.

BURGAUD, J. L. *et al.* Nitric-oxide releasing molecules: a new class of drugs with several major indications. *Curr. Pharm. Des.*, v. 8, n. 3, p. 201-13, 2002.

CALVOPINA, M. *et al.* Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* after miltefosine treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 75, n. 6, p. 1074-7, Dec. 2006.

CARNEIRO, F. P. *et al.* Foxp3 expression in lesions of the different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v. 31, n. 10, p. 646-51, Oct. 2009.

CLANCY, R. M.; ABRAMSON, S. B. Novel synthesis of S-nitrosoglutathione and degradation by human neutrophils. *Anal Biochem.*, v. 204, n. 2, p. 365-71, Aug. 1992.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.*, v. 19, n. 11, p. 502-8, Nov. 2003.

CRUZ, A. *et al.* Pharmacokinetics of antimony in children treated for leishmaniasis with meglumine antimoniate. *J. Infect. Dis.*, v. 195, n. 4, p. 602-8, Feb. 2007.

DAVIDSON, R. N. *et al.* A topical nitric oxide-generating therapy for cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 94, n. 3, p. 319-22, May-Jun. 2000.

DE SOUZA, G. F. *et al.* Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: Implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Nitric Oxide*, Mar. 2006.

DE VEER, M. J. *et al.* MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.*, v. 33, n. 10, p. 2822-31, Oct. 2003.

DEA-AYUELA, M. A. *et al.* Changes in the proteome and infectivity of *Leishmania infantum* induced by in vitro exposure to a nitric oxide donor. *Int J Med. Microbiol.*, v. 299, n. 3, p. 221-32, Mar. 2009.

DELLACASAGRANDE, J. *et al.* IFN-gamma-mediated control of *Coxiella burnetii* survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF. *J. Immunol.*, v. 162, n. 4, p. 2259-65, Feb. 1999.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 95, n. 3, p. 239-43, May-Jun. 2001.

_____. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 27, n. 5, p. 305-18, Sep. 2004.

DIAZ, N. L. *et al.* Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.*, v. 28, n. 3, p. 288-93, May. 2003.

DIEFENBACH, A. *et al.* Type 1 interferon (IFN α /beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity*, v. 8, n. 1, p. 77-87, Jan. 1998.

FARIA, D. R. *et al.* Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v. 31, n. 8, p. 432-9, Aug. 2009.

FORRESTER, M. T. *et al.* Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique. *Free Radic Biol. Med.*, v. 46, n. 2, p. 119-26, Jan. 2009.

GANTT, K. R. *et al.* Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.*, v. 167, n. 2, p. 893-901, Jul. 2001.

GASSER, R. A., JR. *et al.* Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 18, n. 1, p. 83-90, Jan. 1994.

GEBRE-HIWOT, A. *et al.* An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Trop.*, v. 51, n. 3-4, p. 237-45, Aug. 1992.

GENESTRA, M. *et al.* In vitro sodium nitroprusside-mediated toxicity towards *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Cell. Biochem. Funct.*, v. 26, n. 6, p. 709-17, Aug. 2008.

GORDGE, M. P. *et al.* Cell-mediated biotransformation of S-nitrosoglutathione. *Biochem. Pharmacol.*, v. 55, n. 5, p. 657-65, Mar. 1998.

GUIMARAES-COSTA, A. B. *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 106, n. 16, p. 6748-53, Apr. 2009.

HADIGHI, R. *et al.* Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med.*, v. 3, n. 5, p. e162, May. 2006.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 354, n. 9185, p. 1191-9, Oct. 1999.

HOLZMULLER, P. *et al.* Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infect. Immun.*, v. 70, n. 7, p. 3727-35, Jul. 2002.

HONGO, F. *et al.* Inhibition of the transcription factor Yin Yang 1 activity by S-nitrosation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 336, n. 2, p. 692-701, Oct. 2005.

HONIGBERG, B. M. *et al.* A Revised Classification of the Phylum Protozoa. *J. Protozool.*, v. 11, p. 7-20, Feb. 1964.

JI, J. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.*, v. 174, n. 11, p. 7147-53, Jun. 2005.

_____. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 66, n. 4, p. 338-45, Apr. 2002.

KROPF, P. *et al.* Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.*, v. 72, n. 4, p. 1920-8, Apr 2004.

LEMESRE, J. L. *et al.* *Leishmania* spp.: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. *Exp. Parasitol.*, v. 86, n. 1, p. 58-68, May. 1997.

LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v. 32, p. 161-259, 1993.

LIMA, G. M. *et al.* Susceptibility and resistance to *Leishmania amazonensis* in H-2q syngeneic high and low antibody responder mice (Biozzi mice). *Scand. J. Immunol.*, v. 48, n. 2, p. 144-51, Aug. 1998.

LOPEZ-JARAMILLO, P. *et al.* Treatment of cutaneous leishmaniasis with nitric-oxide donor. *Lancet*, v. 351, n. 9110, p. 1176-7, Apr. 1998.

MAUEL, J.; RANSIJN, A. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp. Parasitol.*, v. 87, n. 2, p. 98-111, Oct. 1997.

MILES, S. A. *et al.* A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J. Exp. Med.*, v. 201, n. 5, p. 747-54, Mar. 2005.

MOSSALAYI, M. D. *et al.* The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitol. Today*, v. 15, n. 8, p. 342-5, Aug. 1999.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J. Immunol.*, v. 135, n. 4, p. 2785-9, Oct. 1985.

MULLER, I. *et al.* Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania* major. *Infect Immun.*, v. 62, n. 6, p. 2575-81, Jun. 1994.

MULLER, K. *et al.* Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania* major infection in mice. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 190, n. 1-2, p. 73-6, Nov. 2001.

MURRAY, H. W. *et al.* Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v. 366, n. 9496, p. 1561-77, Oct 29-Nov. 2005.

MURRAY, H. W.; CARTELLI, D. M. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J. Clin. Invest.*, v. 72, n. 1, p. 32-44, Jul. 1983.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J. Exp. Med.*, v. 189, n. 4, p. 741-6, Feb. 1999.

MURRAY, H. W.; TEITELBAUM, R. F. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J. Infect. Dis.*, v. 165, n. 3, p. 513-7, Mar. 1992.

NEAL, R. A.; CROFT, S. L. An in-vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 14, n. 5, p. 463-75, Nov. 1984.

OSWALD, I. P. *et al.* NO as an effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, v. 108, n. 1, p. 11-8, May. 1994.

OUELLETTE, M. *et al.* Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat.*, v. 7, n. 4-5, p. 257-66, Aug-Oct. 2004.

PALACIOS, R. *et al.* Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 64, n. 3-4, p. 187-93, Mar-Apr. 2001.

PANARO, M. A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, v. 29, n. 3, p. 122-7, 1999.

PAUL, M. *et al.* Activity of a new liposomal formulation of amphotericin B against two strains of *Leishmania infantum* in a murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 41, n. 8, p. 1731-4, Aug. 1997.

PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 970-4, Aug. 2008.

PUENTES, S. M. *et al.* Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.*, v. 167, n. 3, p. 887-902, Mar. 1988.

QADOUMI, M. *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.*, v. 70, n. 8, p. 4638-42, Aug. 2002.

REY, L. *Parasitologia - Parasitologia e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na Ásia*. Rio de Janeiro , Guanabara Koogan. 2001.

RITTER, U.; MOLL, H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of leishmania major by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *Eur. J. Immunol.*, v. 30, n. 11, p. 3111-20, Nov. 2000.

RONET, C. *et al.* *Leishmania major*-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to L. major LV39 in BALB/c mice. *J. Immunol.*, v. 180, n. 7, p. 4825-35, Apr. 2008.

RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v. 29, n. 12, p. 671-8, Dec. 2007.

RUSSO, D. M. *et al.* *Leishmania*: naive human T cells sensitized with promastigote antigen and IL-12 develop into potent Th1 and CD8(+) cytotoxic effectors. *Exp. Parasitol.*, v. 93, n. 3, p. 161-70, Nov. 1999.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 55, p. 453-83, 2001.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, v. 223, n. 4643, p. 1417-9, Mar. 1984.

SALVATI, L. *et al.* NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1545, n. 1-2, p. 357-66, Feb. 2001.

SCHUBACH ADE, O. *et al.* Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, n. 3, p. 213-7, May-Jun. 2005.

SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.*, v. 147, n. 9, p. 3149-55, Nov. 1991.

SCOTT, P. *et al.* Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.*, v. 168, n. 5, p. 1675-84, Nov. 1988.

SEABRA, A. B. *et al.* Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin. *Br. J. Dermatol.*, v. 151, n. 5, p. 977-83, Nov. 2004.

SERENO, D. *et al.* Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Trop.*, v. 74, n. 1, p. 25-31, Jan. 2000.

SHISHIDO, S. M. *et al.* Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release. *Biomaterials*, v. 24, n. 20, p. 3543-53, Sep. 2003.

SILVA, S. Y. *et al.* Double blind, randomized controlled trial, to evaluate the effectiveness of a controlled nitric oxide releasing patch versus meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis [NCT00317629]. *Trials*, v. 7, p. 14, 2006.

SILVEIRA, B. P. *et al.* [Premature birth after the use of pentavalent antimonial: case report]. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, n. 4, p. 523-5, Jul-Aug. 2003.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. *Adv. Immunol.*, v. 74, p. 275-317, 2000.

SOLOMON, M. *et al.* Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 56, n. 4, p. 612-6, Apr. 2007.

SOONG, L. *et al.* Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.*, v. 158, n. 11, p. 5374-83, Jun. 1997.

SOTO, J. *et al.* Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 38, n. 9, p. 1266-72, May. 2004.

STAMLER, J. S. S-nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v. 196, p. 19-36, 1995.

STOLF, B. S.; ULIANA, S. R. Um resumo do congresso WorldLeish4. *SBI na rede*. n. 76, p.1-2, março 2009. Disponível em: <<http://www.sbi.org.br/sbinarede/SBINarede76/aconteceu.php>>. Acesso em: 05 nov. 2009.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health*, v. 6, n. 11, p. 849-54, Nov. 2001.

SUNDAR, S. *et al.* Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.*, v. 347, n. 22, p. 1739-46, Nov. 2002.

_____. Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 31, n. 4, p. 1110-3, Oct. 2000.

_____. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet*, v. 352, n. 9143, p. 1821-3, Dec. 1998.

THAKUR, C. P. *et al.* Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 93, n. 3, p. 319-23, May-Jun. 1999.

TUON, F. F. *et al.* Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. *Int. J. Dermatol.*, v. 47, n. 2, p. 109-24, Feb. 2008.

VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J. Immunol.*, v. 173, n. 11, p. 6521-5, Dec. 2004.

VOULDOUKIS, I. *et al.* The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 92, n. 17, p. 7804-8, Aug. 1995.

WANASEN, N. *et al.* Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int. J. Parasitol.*, v. 38, n. 3-4, p. 417-29, Mar. 2008.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, v. 13, n. 4, p. 243-8, Feb. 2000.

ZEINA, B. *et al.* Topical glyceryl trinitrate: a possible treatment for cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.*, v. 22, n. 5, p. 244-5, Sep. 1997.

ZERPA, O. *et al.* Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br. J. Dermatol.*, v. 156, n. 6, p. 1328-35, Jun. 2007.

ZHANG, Y.; HOGG, N. The mechanism of transmembrane S-nitrosothiol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, v. 101, n. 21, p. 7891-6, May. 2004.