LUANA DIAS DE SOUZA

**Efeito do fator de crescimento insulina-símile-I em
promastigota e amastigota intracelular de *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis* de pacientes com diferentes formas
clínicas de leishmaniose tegumentar americana**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Hiro Goto

SÃO PAULO

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Luana Dias de

Efeito do fator de crescimento insulina-símile-I em promastigota e amastigota intracelular de *Leishmania (Viannia) braziliensis* de pacientes com diferentes formas clínicas de leishmaniose tegumentar americana / Luana Dias de Souza. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Hiro Goto.

Descritores: 1.*Leishmania (Viannia) braziliensis* 2.Fator de crescimento insulina símile-I 3.Leishmaniose cutânea 4.Leishmaniose mucosa 5.Leishmaniose disseminada 6.Arginase

USP/FM/DBD-208/12

*Aos meus amados pais
Nilse e Jesus, pelo amor
incondicional, dedicação e por
me tornarem quem hoje sou.*

*A querida amiga e mestre
Célia, pelos ensinamentos,
motivação, companheirismo, e
amizade verdadeira. Agradeço
de todo coração!*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à Profa. Dra. Hiro Goto pela disposição em me orientar, por todo seu conhecimento, competência, profissionalismo e pela viabilização deste estudo. Sobretudo, agradeço a sua compreensão com minha indisponibilidade de horários devido ao meu vínculo empregatício.

Agradeço especialmente à amiga e mestre Célia Maria Vieira Vendrame, que para mim será sempre um exemplo; de caráter, profissionalismo e companheirismo. Obrigada pela constante transmissão de conhecimento científico e pessoal, pelo incentivo, por sua disponibilidade, amizade e doação. Meu eterno agradecimento, pois sem você não teria concretizado este sonho.

Aos membros da minha banca de qualificação José Angelo Lauletta Lindoso, Beatriz Simonsen Stolf e Francisco José Oliveira Rios pelas sugestões e críticas construtivas.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, especialmente Amanda Castanheira, Luiza Reis, Sandra Regina Castro Soares, Edna Barbosa Souza, Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro, por toda ajuda nos experimentos, pelo incentivo constante, amizade e momentos de descontração.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo consentimento de minha bolsa de estudos no início deste estudo.

Ao Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia representado pelo Prof. Dr. Edgar M. Carvalho pelo fornecimento dos isolados utilizados neste estudo.

A Comissão de Pós Graduação do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e as secretárias, em especial Roseli Antonia Santo por toda paciência, ajuda e profissionalismo.

Aos meus colegas de trabalho da Supervisão de Vigilância em Saúde Mooca/Aricanduva pelo apoio, incentivo e compreensão.

As amigas do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical pela amizade, carinho e momentos de descontração: Tasciane Yamasaki, Amanda Neves, Isabel Cristina Alves, Roseli dos Santos Malafronte.

Aos meus pais Nilse e Jesus, as minhas irmãs Danila, Patricia e Isabelle aos meus sobrinhos Luan, Breno e Pedro e ao meu namorado Caio, obrigada pelo amor, pelo apoio e compreensão principalmente nos muitos momentos de ausência devido ao desenvolvimento deste estudo. Agradeço especialmente à minha mãe e minha irmã Isabelle por cederem seus notebooks, já que o meu resolveu pifar em “ótimos momentos”.

E a Deus por ter me dado força de vontade, perseverança e condições para alcançar meu objetivo.

Por fim agradeço de coração todos aqueles que passaram pela minha vida durante a concretização deste sonho, sempre acrescentando algo, me incentivando e contribuindo para a realização deste trabalho.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed.São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SÚMÁRIO

	Resumo	
	Summary	
1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Leishmanioses	2
1.1.1	Classificação das leishmânias	4
1.2	Leishmaniose Tegumentar Americana	6
1.2.1	Formas Clínicas da LTA por <i>L. (V.) braziliensis</i>	7
1.2.2	Imunopatogênese da LTA	10
1.3	Resposta TH1 e TH2	12
1.4	Mecanismos leishmanicidas em macrófagos	15
1.5	Fatores de crescimento e leishmaniose	18
1.6	Características do parasito e a manifestação clínica da LTA	20
2	OBJETIVOS	24
3	MATERIAL E METÓDOS	26
3.1	Parasito	27
3.2	Curva de crescimento	28
3.3	Efeito de IGF-I ao longo da curva de crescimento	29
3.4	Crescimento parasitário sob estímulo de IGF-I	30
3.5	Avaliação da atividade da enzima arginase em promastigotas de <i>L.(V.) braziliensis</i>	31
3.6	Células THP-1	32
3.6.1	Infecção das Células THP-1 com promastigotas de <i>L.(V.) braziliensis</i> provenientes de isolados LC, LM e LD	33
3.6.2	Avaliação da taxa de infecção	34
3.6.3	Avaliação da atividade da arginase pela produção de ureia	34
3.6.4	Determinação da produção de nitrito (NO_2^-)	35
3.7	Análise Estatística	36
4	RESULTADOS	37
5	DISCUSSÃO	64

6	CONCLUSÕES	74
7	ANEXOS	77
7.1	Anexo A - Documento de Aprovação da CAPPesq	78
7.2	Anexo B - Documento de Aprovação do Instituto de Medicina Tropical	79
7.3	Anexo C - Artigo Publicado	80
8	REFERÊNCIAS	96

RESUMO

Souza, LD. Efeito do fator de crescimento insulina-símile-I em promastigota e amastigota intracelular de *Leishmania (Viannia) braziliensis* de pacientes com diferentes formas clínicas de leishmaniose tegumentar americana [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e se apresentam sob forma tegumentar ou visceral. No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada, na sua maioria, por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e conhecem-se principalmente as formas cutânea (LC), mucosa (LM) e disseminada (LD) da doença. Na LTA as formas clínicas tem sido atribuídas a diferenças na resposta imune do hospedeiro, mas recentemente vinculam-se também à variabilidade intraespecífica da *L. (V.) braziliensis*. Neste estudo avaliamos se haveria variabilidade biológica nos isolados de *L. (V.) braziliensis*, provenientes de pacientes com LC, LM e LD, principalmente em resposta a fator de crescimento insulina-símile-I (IGF-I). Os fatores de crescimento do hospedeiro tem sido alvo de estudos no desenvolvimento das leishmanioses, sendo IGF-I um deles. Havíamos demonstrado em estudos anteriores, utilizando *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, que IGF-I induz proliferação, aumentando a atividade da arginase, com geração de poliaminas e diminuindo a síntese de óxido nítrico. No presente estudo analisamos o efeito de IGF-I em *L.(V.) braziliensis*, espécie prevalente no Brasil. Avaliamos inicialmente as características dos diferentes isolados enquanto promastigota e no prosseguimento enquanto amastigota em células de linhagem monocítica humana THP-1, com e sem estímulo de IGF-I. Nossos dados sugerem que há diferenças na atividade da arginase basal entre os isolados de *L. (V.) braziliensis*, sendo maior naqueles provenientes de pacientes com LM. IGF-I aumentou a atividade da arginase nos isolados de LC e LD, mas não de LM. Nos isolados em forma amastigota nas células de linhagem monocítica humana THP-1, o efeito de IGF-I foi de aumento do parasitismo nos isolados de LC e LM e de diminuição com os de LD. Nos isolados de LD a atividade da arginase basal foi menor que nos de LC. Por outro lado, a produção de óxido nítrico tendeu a ser maior em isolados de LD quando sob estímulo de IGF-I. Os dados sugerem que diferenças nas características biológicas dos parasitos podem contribuir na apresentação clínica dos casos da LTA.

Descritores: 1.*Leishmania (Viannia) braziliensis*; 2.Fator de crescimento insulina símile-I; 3.Leishmaniose cutânea; 4.Leishmaniose mucosa; 5.Leishmaniose disseminada; 6.Arginase.

SUMMARY

Souza, LD. Effect of Insulin-like growth factor-I on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from patients with different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis [dissertation]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2012.

Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* that may manifest as cutaneous or visceral disease. In Brazil, *American tegumentary leishmaniasis* (ATL) is caused mostly by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and cutaneous (CL), mucosal (ML) and disseminated (DL) forms of the disease are known. The diversity of clinical manifestations has been attributed to differences in the host immune response, but recently it has also been related to intraspecific variability of *L. (V.) braziliensis*. In the present study we evaluated whether there were biological variability in different isolates of *L. (V.) braziliensis* from patients with CL, ML, and DL, mainly in response to insulin-like growth factor-I (IGF-I). Growth factors of the host have been investigated in the development of leishmaniasis including IGF-I. In previous studies using *Leishmania (Leishmania) amazonensis* IGF-I was shown to induce proliferation, to increase the activity of arginase, generating polyamines and to decrease the synthesis of nitric oxide. In this study we analyzed the effect of IGF-I in *L. (V.) braziliensis*, a species prevalent in Brazil. Initially we evaluated the characteristics of individual isolates as promastigote and further as amastigote within human macrophage cell line THP-1 with and without IGF-I stimulation. Our data suggest that there are differences in the basal arginase activity amongst isolates of *L. (V.) braziliensis*, being higher in those from patients with ML. IGF-I increased the activity of arginase in the isolates of CL and DL, but not of ML. In isolates in the form of amastigotes within THP-1 cells, IGF-I induced the increase of parasitism of isolates from CL and ML, and decrease of those from DL. In isolates of DL the basal arginase activity was lower than in those of CL. Moreover, the production of nitric oxide tended to be higher with isolates of DL upon IGF-I stimulation. The data suggest that differences in the biological characteristics of parasites may contribute to the diversity of clinical presentation of ATL.

Keywords: 1. *Leishmania (Viannia) braziliensis*; 2. insulin like growth factor I; 3. cutaneous leishmaniasis, 4. mucosal leishmaniasis, 5. disseminated leishmaniasis; 6. arginase.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. A infecção se estabelece nas células do sistema fagocítico mononuclear e são conhecidas formas clínicas: tegumentar e visceral (Lainson e Shaw, 1987).

São doenças infecciosas que acometem primariamente animais silvestres, domésticos, e secundariamente o homem que é considerado hospedeiro acidental. Representa importante problema de saúde pública já que possui distribuição mundial (principalmente em países em desenvolvimento), com cerca de dois milhões de casos novos anualmente, sendo que 350 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair a doença (WHO, 2010).

Uma variedade de mamíferos pode ser considerada como hospedeiros vertebrados, sendo os mais comuns: roedores, canídeos e equinos, havendo também edentados, marsupiais e primatas, entre estes o homem (Michalick, 2002).

Os hospedeiros invertebrados compreendem insetos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos como flebotomíneos. Apenas dois gêneros de flebotomíneos são importantes na epidemiologia das leishmanioses: *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da leishmaniose tegumentar americana (LTA) são *Lutzomyia whitmani*, *L. intermedia*, *L. umbratilis*, *L. wellcomei*, *L. flaviscutellata*, e *L. migonei* (Rangel e Lainson, 2009).

O parasito infecta células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) e durante o ciclo vital apresenta-se sob duas formas: amastigota em seus hospedeiros vertebrados e promastigota no hospedeiro invertebrado e em alguns meios de cultura artificiais (Rey, 2001).

A sua transmissão ao hospedeiro vertebrado ocorre quando a fêmea do flebotomíneo infectada, ao realizar o repasto sanguíneo no vertebrado, inocula as formas promastigotas metacíclicas. Estas formas dentro de 4 a 8 horas serão fagocitadas por macrófagos teciduais e irão se diferenciar em amastigotas, iniciando o processo de reprodução no interior do vacúolo parasitóforo. Após o rompimento do macrófago, ocorre a liberação de amastigotas e estas serão novamente fagocitadas por outros macrófagos. Caso o inseto vetor realize o repasto sanguíneo neste vertebrado infectado, ele poderá ingerir os macrófagos parasitados que chegando a seu tubo digestivo se romperão liberando as amastigotas. Essas se diferenciarão em

promastigotas, que se reproduzirão por divisão binária e, dependendo da espécie, terão distribuições diferentes no tubo digestivo no interior do inseto vetor. Essas formas flageladas migrarão para a probóscide do inseto, onde poderão ser inoculadas no hospedeiro vertebrado por regurgitação durante o repasto sanguíneo completando assim o ciclo vital heteroxeno destes parasitos (Sacks et al., 1993; Rey, 2001).

1.1.1 Classificação das leishmânias

Com exceção de pequenas diferenças em tamanho, as espécies do gênero *Leishmania* apresentam uma morfologia similar, por esta razão as primeiras classificações foram baseadas em critérios extrínsecos, distribuição geográfica, características epidemiológicas, morfológicas, e manifestações clínicas da doença (Lainson e Shaw, 1987). Entretanto, desde os anos 80, os critérios intrínsecos como estudos bioquímicos, imunológicos e genéticos foram utilizados para aprimorar a classificação do gênero *Leishmania* (WHO, 2010). As novas técnicas confirmaram a divisão nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* proposta por Lainson e Shaw (1987), a qual foi baseada na localização das formas promastigotas do protozoário no interior do tubo digestivo do vetor. A análise de isoenzimas foi utilizada para definição dos complexos de espécies dentro dos subgêneros (Rioux et al.,

1990). A partir das concordâncias entre os critérios a Organização Mundial de Saúde publicou um novo esquema taxonômico (Figura 1).

* Espécies em discussão. *L. chagasi* no Novo Mundo é a mesma espécie que *L. infantum*.

Figura 1 - Taxonomia de *Leishmania* (WHO, 2010).

1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA é uma das principais doenças transmitidas por vetores no mundo e apresenta grande magnitude e distribuição territorial. O foco mais importante é o continente sul-americano (Lainson e Shaw, 2005).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar ocorre em praticamente todo o território, apresentando diferentes magnitudes e diferenças locais quanto às espécies, hospedeiros e vetores envolvidos. As principais espécies de leishmânia responsáveis pela LTA no Brasil são: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* (Ministério da Saúde, 2007).

No período de 1994 a 2007 registraram-se no Brasil em média 29.150 casos de leishmaniose tegumentar (figura 2). Em 2006 foram notificados 22.164 casos, e em 2007 foram 21.332 casos, representando um número bem menor do que aqueles registrados nos anos anteriores indicando uma possível redução da transmissão da doença. A maior prevalência da doença ocorre nas regiões Norte e Nordeste (Ministério da Saúde, 2007).

Figura 2 - Número de casos e coeficiente de detecção de LTA no Brasil de 1989 a 2008 (Ministério da Saúde, 2007).

1.2.1 Formas Clínicas da LTA por *L. (V.) braziliensis*

A variedade de espécies de *Leishmania*, vetores e reservatórios vertebrados em diferentes ambientes geográficos influencia na diversidade das apresentações clínicas da LTA.

A leishmaniose tegumentar americana por *L. (V.) braziliensis* apresenta-se sob as seguintes formas: leishmaniose cutânea (LC),

leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose disseminada (LD) e ainda infecção subclínica ou assintomática.

Leishmaniose cutânea é forma mais comum de apresentação da doença. As lesões aparecem nas partes mais expostas do corpo como braços, pernas e rosto. O período de incubação varia de duas semanas a vários meses. A lesão inicia-se habitualmente com uma área de vermelhidão e edema no sítio de inoculação pelo inseto e depois de 3 a 4 semanas desenvolve-se na maioria dos casos, uma única úlcera com bordas elevadas, endurecidas e eritematosa. Nas fases iniciais da infecção, a densidade de parasitos nas bordas da úlcera é grande e não há envolvimento mucoso. O diagnóstico é definido pela detecção de parasitos na cultura do aspirado da lesão ou no exame histopatológico, ou por uma lesão típica e positividade em dois dos seguintes testes: reação de hipersensibilidade tardia ou teste sorológico com antígeno de leishmânia.

A forma mucosa da doença, que ocorre em aproximadamente 3 a 4% dos pacientes, inicia-se geralmente com envolvimento da mucosa nasal, podendo atingir o palato, amígdala, gengiva e lábio superior. As lesões mucosas são infiltradas, com ulcerações que podem causar extensa destruição do septo nasal e o espessamento do lábio superior e nariz, resultantes da infiltração, conferindo aspecto tumoral (Carvalho et al., 1995). O envolvimento da mucosa pode ocorrer simultaneamente ou após a lesão cutânea, existindo casos raros de LM em indivíduos sem história pregressa

de LC. O diagnóstico de LM é confirmado pelos mesmos critérios definidos para LC.

A leishmaniose cutânea disseminada pode ser observada em 1 a 3% dos casos, provavelmente devida à disseminação hematogênica dos parasitos. Essa forma clínica é caracterizada por lesões acneiformes, pápulas e pequenas úlceras (Carvalho et al., 1994). A distribuição das lesões é predominante na face e em grandes extensões na superfície dos membros e tórax, geralmente com distribuição simétrica (Barral-Netto e Barral, 1994). O diagnóstico é confirmado pelos mesmos critérios definidos para LC.

A infecção subclínica é observada em indivíduos residentes em área endêmica de leishmaniose. Esses indivíduos apresentam reação de hipersensibilidade tardia (*delayed-type hypersensitivity* = DTH), ao antígeno de leishmania positivo, mas não desenvolvem doença (Follador et al., 2002).

Inicialmente, a manifestação clínica da LTA era considerada um reflexo da resposta imune do hospedeiro, mas a participação da variação intraespecífica do parasito vem sendo cada vez mais considerada.

1.2.2 Imunopatogênese da LTA

A partir da inoculação das formas promastigotas na pele, inicia-se uma complexa interação entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro. Esses eventos iniciais, ainda pouco elucidados, são cruciais no estabelecimento ou não da infecção e fatores específicos e inespecíficos do hospedeiro estão envolvidos no controle ou progressão da doença (Bogdan e Rollinghoff, 1998).

Os neutrófilos são as primeiras células a se estabelecerem no sítio da infecção e posteriormente, morrem por apoptose e são fagocitados por macrófagos e células dendríticas que assim se infectam com os parasitos. Outras células do sistema imune inato são as células natural killer (NK), que possuem atividade citotóxica, desempenham papel importante no controle da infecção por *Leishmania* e aparecem no sítio da infecção 24 horas depois da inoculação pelos parasitas (Van Zandbergen et al., 2004).

Apesar de várias células fagocitarem *Leishmania* sua sobrevivência e multiplicação parecem ocorrer apenas nos macrófagos. Inicialmente quando o parasito entra em contato com o macrófago, ocorrem várias interações entre moléculas de superfície do parasito como as metaloproteínas de massa molecular 63 (gp63), o glicolípido lipofosfoglicano (LPG) e outras moléculas de ligação de fundamental importância na interação

parasito/hospedeiro (Bogdan et al., 2000). No macrófago uma série de receptores também atua nessa interação como o receptor de fibronectina, de manose e os receptores de fragmento do complemento CR1 e CR3 (Mosser e Brittingham, 1997). Mesmo com fatores que favoreçam o parasito, apenas uma pequena fração do inoculo inicial consegue ser fagocitado e infectar os macrófagos para estabelecer a infecção (Hill et al., 1983).

No processo de fagocitose, as células emitem extensões filamentosas que englobam o parasito formando o vacúolo parasitóforo que se fundem aos lisossomas das células, formando o fagolisossomo modificando seu microambiente, induzindo a transformação da forma promastigota para amastigota, que é mais resistentes ao pH ácido, as hidrolases lisossomais, ao óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) do fagolisossomo facilitando assim sua sobrevivência (Murray, 1981).

A sobrevivência das leishmânias está ligada aos mecanismos de evasão desses parasitos, isto é, da capacidade em escapar da destruição extracelular e se localizar em células fagocíticas, resistindo à resposta imune celular do hospedeiro e aos mecanismos microbicidas (Bogdan e Rollinghoff, 1998; Cunningham, 2002). Vários mecanismos foram desenvolvidos e adaptados por esses parasitos, entre eles as moléculas presentes na membrana do parasito como LPG e gp63, a utilização de substâncias produzidas pelo hospedeiro como o fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (Granulocyte-monocyte-colony stimulating factor =

GM-CSF) que atuam como fator de crescimento para o parasito, protegendo-o de mudanças bruscas de temperatura durante o inóculo do vetor no hospedeiro vertebrado (Barcinski et al., 1992).

O parasito também atua na modulação de citocinas promovendo inibição ou desativação de macrófagos, levando à diferentes tipos de resposta celulares (Th1/Th2) que terão papel crucial na resistência ou suscetibilidade e também na patogênese.

1.3 Resposta TH1 e TH2

A importância da resposta celular no controle da leishmaniose tem sido demonstrada em infecção experimental em camundongos, gerando o conhecimento dos aspectos da relação parasito-hospedeiro na leishmaniose. Um dos modelos mais estudados são os camundongos infectados com promastigotas de *L. (Leishmania) major*, onde observou-se que os linfócitos T auxiliares (*T helper* = Th) CD4⁺ estão subdivididos em duas subpopulações funcionalmente diferentes no que se refere a secreção de citocinas, diretamente correlacionadas com a resistência ou a susceptibilidade à infecção por *Leishmania (L.) major* em camundongos de linhagens definidas (Sacks e Noben, 2002).

Na infecção experimental com *L. (L.) major* verificou-se que algumas linhagens de camundongos como C57BL/6, CBA e C3H, são resistentes desenvolvendo uma doença autolimitada, cujas lesões se curam espontaneamente em 10-12 semanas e se tornam resistentes a nova inoculação de parasitos. Neste caso, apresentam uma forte resposta imune celular, onde há o aumento na produção de interleucina (IL)-12 que ativa as células NK e as células T CD4⁺ e CD8⁺ para produzirem interferon (IFN)- γ , necessário para o desenvolvimento da resposta Th1. Diferentemente deste perfil, as linhagens de camundongos BALB/c demonstraram-se susceptíveis, apresentando doença progressiva e severa, com aumento na expressão de mRNA para IL-4 e na produção de IL-5, IL-10 e IL-13 (Sacks e Noben, 2002).

O IFN- γ é considerado a principal citocina na defesa de patógenos como *Leishmania*, pois ativam macrófagos e estimulam a liberação de outras citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) que também é responsável pela ativação policlonal de células B (Sacks e Noben, 2002).

Apesar dessa dicotomia de resposta Th1/Th2 ser claramente definida em modelo murino de leishmaniose (BALB/c e C57BL/6) infectados com *L. (L.) major*, no homem a resposta imune não é tão dicotomizada como na resposta em camundongos, possivelmente pela sua grande complexidade de elementos e interações.

Os pacientes que contraem a forma cutânea localizada, de modo geral, desenvolvem a resposta do tipo Th1 no nível das lesões, a qual está associada com o controle da infecção e proliferação dos parasitos. Entretanto, esse tipo de resposta inflamatória que é benéfica ao hospedeiro em primeira instância, por promover o controle da infecção, se não modulada pode causar dano tecidual. As lesões mucocutâneas caracterizam-se por uma concomitância de resposta dos tipos Th1 e Th2. Entretanto, a resposta do tipo Th1 é exacerbada com produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , acarretando severa destruição tecidual em razão de uma forte resposta inflamatória ao lado da escassez de parasitos nas lesões. Já os pacientes com a forma disseminada produzem menos TNF- α e IFN- γ frente à estimulação com antígenos de leishmânia que aquelas de pacientes de LC (Carvalho et al., 1994; Bacellar et al., 2002; Turetz et al., 2002). Em contraste com estas formas clínicas de infecção causada por *L. (V.) braziliensis*, cerca de 10% dos indivíduos residentes em uma área de transmissão de *L. (V.) braziliensis*, mesmo com a exposição ao parasito, não apresentam evidências de doença clínica. No entanto, estes apresentam o DTH positivo (teste de Montenegro) e são considerados como tendo uma forma subclínica da doença (Follador et al., 2002). Até o momento não é claro porque os indivíduos com a forma subclínica da infecção por *L. (V.) braziliensis* tem a capacidade de controlar a doença.

A resposta imunológica humana também é influenciada pelas proteínas salivares do inseto vetor. Além de serem anticoagulantes e vasodilatadores, atuam na supressão da resposta inflamatória e na modulação de citocinas (Gillespie et al., 2000).

1.4 Mecanismos leishmanicidas em macrófagos

Diversos mecanismos do sistema imunológico são ativados durante a infecção, mas os macrófagos desempenham papel chave na infecção por *Leishmania*, podendo atuar como célula apresentadora de antígeno, como célula hospedeira onde os parasitos se estabelecem e multiplicam-se ou como células efetoras, podendo atuar tanto na fase inespecífica quanto na fase específica da resposta imune (Sacks et al., 1993). É nos macrófagos que o parasito estabelece a infecção e é através da ativação do metabolismo oxidativo e de geração de reativos de nitrogênio que a infecção poderá ser conduzida para a cura (Cunningham, 2002).

Os dois principais mecanismos efetores contra leishmânias em macrófagos são a produção de produtos tóxicos: reativos de oxigênio principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), anions hidroxila (OH_2^-) e superóxido (O_2^-) e também de produtos reativos de nitrogênio como o óxido nítrico (NO) (Bogdan e Rollinghoff, 1998).

Os produtos reativos de oxigênio parecem ser importantes nas fases iniciais da infecção, entretanto o controle do crescimento intracelular da *Leishmania* em macrófagos ativados de camundongos depende fundamentalmente do balanço de duas enzimas a sintase induzível do óxido nítrico (*inducible nitric oxide synthase* = iNOS) e arginase. Ambas utilizam o mesmo substrato, a L-arginina, e essa competição é regulada por citocinas secretadas por células Th1 e Th2 (Munder et al., 1998).

As citocinas pro-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α produzidas durante a resposta Th1 induz a expressão de iNOS, produzindo óxido nítrico (nitric oxide = NO) o qual contribui na morte dos parasitos. O óxido nítrico é catalizado por uma das três isoformas da NOS: NOS-I (neuronal ou nNOS), NOS-III (endotelial ou eNOS) e NOS-II (induzível ou iNOS). As duas primeiras são constitutivas e a terceira isoforma, a iNOS, é conhecida por ser expressa durante a resposta imune contra patógenos estando presente nos macrófagos. Estudos realizados em camundongos infectados por *Leishmania* demonstraram que os macrófagos ativados controlam o crescimento intracelular do parasita pela produção de NO (Liew et al., 1990).

As citocinas IL-4 e IL-10, produzidas durante a resposta Th2, induzem a expressão de arginase que hidrolisa L-arginina em ornitina e ureia, sendo a ornitina o aminoácido precursor para a síntese de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina). As poliaminas são pequenas moléculas catiônicas necessárias para o crescimento celular de leishmânias, desta

forma a sua produção favorece a proliferação dos parasitos (Corraliza et al., 1995; Roberts et al., 2004).

Estudos já demonstraram que a utilização de um inibidor fisiológico da enzima arginase, denominado N^ω-hidroxi-L-arginina controla a proliferação de *L. major* nos macrófagos (Iniesta et al., 2001).

A enzima arginase é integrante do ciclo da ureia nos animais ureotélicos e é expressa em alguns tripanossomatídeos como a *Leishmania* (Yoshida e Camargo, 1978). Duas isoformas de arginase foram identificadas em mamíferos: a arginase tipo I, citosólica, altamente expressa no fígado como componente do ciclo da ureia; e a arginase tipo II, mitocondrial, expressa em baixas concentrações em muitos tipos celulares como do rim, cérebro, intestino delgado, glândulas mamárias e macrófagos (Wu e Morris, 1998).

O interesse no estudo da arginase tem sido evidente principalmente por seu papel imunoregulatório já que pode reduzir concentrações de NO produzido por macrófagos ativados e limitar a disponibilidade de L-arginina, favorecendo a resistência de alguns patógenos aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Mori e Gotoh, 2000, Iniesta et al., 2001).

1.5 Fatores de Crescimento e leishmaniose

Diversos fatores de crescimento atuam na fase inicial da interação parasito/hospedeiro. Na leishmânia e nas leishmanioses, esses fatores assumem papel importante na resolução ou agravamento da doença, entre eles o fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (*granulocyte-monocyte-colony stimulating factor* = GM-CSF) que tem participação importante na infecção por leishmânia (Barcinski et al., 1992) e o fator de transformação de crescimento (*transforming growth factor-beta* = TGF- β); apontado por ter um papel supressor importante na leishmaniose murina (Barral-Netto e Barral, 1994), e também fatores constitutivos como o fator de crescimento insulina símile (*insulin-like growth fator* = IGF) (Goto et al., 1998).

O IGF-I é um membro da família dos hormônios de crescimento da insulina, filogeneticamente bem conservado, com massa molecular de aproximadamente 7,5 kDa. O IGF-I está presente na circulação e a maior parte encontra-se ligada a proteínas ligantes de IGF-I, as *IGF-bindings proteins* (IGF-BPs) 1-6 que mantêm a biodisponibilidade desta molécula (Jones e Clemmons, 1995) e está presente na maioria dos tecidos, particularmente em monócitos e macrófagos (Nagaoka et al., 1990). A maior fonte de IGF-I na pele são os fibroblastos (Tavakkol et al., 1999), ele também é produzido por células dendríticas (Sharp et al., 2005) e

macrófagos (Jones e Clemmons, 1995) que têm papel importante no início da resposta imune na leishmaniose (Baldwin et al., 2004). Sendo produzido por estes diversos tipos celulares da pele, o IGF-I deve ser um dos primeiros fatores encontrados pela leishmânia na pele do hospedeiro nos focos iniciais da infecção, além de ser expresso constitutivamente, sua expressão encontra-se aumentada na inflamação após injúria na epiderme, com pico de concentração após três dias (Tavakkol et al., 1999).

O IGF-I vem despertando grande interesse, nos últimos anos, por sua ação diversificada e pleiotropismo. Estudos precedentes vêm demonstrando a importância biológica de IGF-I para a leishmânia e nas leishmanioses. Já se observou que em concentrações fisiológicas o IGF-I induz aumento na proliferação in vitro de formas promastigotas e amastigotas de diferentes espécies de leishmânia (Gomes et al., 1998; Goto et al., 1998), induz fosforilação em resíduos de tirosina e de serina-treonina em promastigotas e amastigotas, com efeito estágio-específico (Gomes et al., 1998). Em camundongos BALB/c infectados com leishmânias pré-tratadas com IGF-I observam-se aumento do número de parasitos, do tamanho da lesão e do infiltrado inflamatório com IGF-I favorecendo claramente o crescimento do parasito intracelular (Goto et al., 1998; Gomes et al., 2000).

Em estudo mais recente in vitro, macrófagos de camundongos BALB/c infectados com promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, IGF-I induziu aumento da expressão e atividade da arginase e uma

diminuição da produção de óxido nítrico (NO) e diminuição da expressão da sintase induzível do NO (iNOS) (Vendrame et al., 2007). Além disso, IGF-I induziu aumento da expressão e atividade da arginase de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Vendrame et al., 2007). O papel da iNOS é comprovado como catalisador na produção de NO, sendo bem conhecidos os efeitos protetores desse mecanismo em macrófagos infectados com leishmânia (Augusto et al., 1996).

Visto que o IGF-I é produzido na pele por fibroblastos e por várias células do sistema imune (Baldwin et al., 2004; Sharp et al., 2005) e tem efeito na interação leishmânia-macrófago experimentalmente, o IGF-I pode ser também um fator importante na patogênese das leishmanioses por *L. (V.) braziliensis*.

1.6 Características do parasito e a manifestação clínica da LTA

Embora exista ligação entre as diferentes espécies de parasitos e apresentações clínicas (Lainson e Shaw, 1987), outros fatores relacionados ao hospedeiro contribuem na evolução da infecção (Scott e Farrel, 1998). No entanto, é importante salientar que tanto as diferenças inter-espécies como intra-espécies de leishmânias podem ser importantes na determinação do espectro clínico da doença. Estudos já demonstraram que há diferença

genética entre isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes com formas clínicas de LC, LM e LD, utilizando a técnica de *Randon Amplification of Polimorphic DNA* (RAPD), com associação entre clado de parasitos e formas clínicas da doença (Schriefer et al., 2004).

Indiani et al. (2004) e Teixeira et al. (2005) demonstram a importância da variabilidade intraespecífica da *L. (V.) braziliensis* no curso da LTA, demonstrando que os isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de diferentes formas da doença humana ou provenientes de diferentes áreas geográficas, podem apresentar comportamentos biológicos e clínicos distintos na infecção experimental.

Nesta linha de investigação focando as características biológicas do parasito com possível contribuição na apresentação clínica, propomos avaliar as características biológicas de isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de pacientes com diferentes formas clínicas.

Propomos analisar as diferenças na proliferação e atividade da enzima arginase basal e sob o efeito do fator de crescimento insulina-símile-I (IGF-I) nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares de isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, provenientes de pacientes com diferentes formas clínicas de leishmaniose tegumentar americana: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD).

Para o estudo do efeito sobre amastigotas intracelulares, utilizamos a linhagem mononócita humana (THP-1) ativada com phorbol-miristate acetate (PMA) infectada com diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*. Essas células são provenientes de linhagem de monócitos humanos leucêmicos e em estudos comparativos com macrófagos derivados de monócitos humanos verificou-se que em células THP-1 diferenciadas com PMA há aumento citoplasmático, mitocondrial e lisossomal e alteração dos marcadores de superfície semelhante ao que ocorre com macrófagos derivados de monócitos humanos, além de um perfil de citocinas similar (Daigneault et al., 2010).

Assim, optamos em utilizar a linhagem celular ao invés de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humano para evitar a variação de resposta de macrófagos dependente da fonte/doador destas células.

Os isolados de *L. (V.) braziliensis* utilizados neste estudo são provenientes de pacientes residentes na Vila de Corte de Pedra, município de Tancredo Neves, localizado a 280 km de Salvador, Bahia. A região é caracterizada por Mata Atlântica, a 600-800 m de altitude e temperatura de 18 a 30°C.

Dados da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (1998) mostram que esta vila pertence a uma região com maior taxa de prevalência de leishmaniose cutânea no estado da Bahia (316,3/100.000).

O Posto de Saúde na Vila de Corte de Pedra foi estabelecido desde 1980 e desde então médicos do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia visitam a área a cada duas semanas. Este posto é ponto de referência para o diagnóstico e tratamento de leishmaniose de doze municípios vizinhos. Anualmente são diagnosticados cerca de 800 casos de leishmaniose, 3 - 5% dos casos LM, e 2-3% LD e o restante LC.

Estudos epidemiológicos, clínicos e imunológicos vêm sendo realizados por investigadores do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgar Santos por mais de 25 anos. Neste serviço mais de 100 isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de pacientes com as diversas formas clínicas de LTA estão armazenados em nitrogênio líquido dos quais selecionamos alguns para o presente estudo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Avaliar diferenças na proliferação e atividade da enzima arginase basal e sob o efeito do fator de crescimento insulina-símile-I (IGF-I) nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares de isolados de *L. (V.) braziliensis*, provenientes de pacientes com diferentes formas clínicas de leishmaniose tegumentar americana (LTA): leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD).

Objetivos Específicos:

- Avaliar os efeitos in vitro do IGF-I na proliferação e atividade da arginase em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* provenientes de pacientes com diferentes formas clínicas da LTA;
- Avaliar os parâmetros basais e sob efeito de IGF-I na proliferação intracelular e atividade da arginase em células da linhagem monocítica humana (THP-1) infectadas com isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes com diferentes formas clínicas da LTA;
- Correlacionar o grau de proliferação e a atividade de arginase de promastigotas e amastigotas intracelulares dos isolados de *L. (V.) braziliensis* com as formas clínicas de LTA dos pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parasito

Os 22 isolados de *L. (V.) braziliensis* utilizados neste estudo são provenientes de pacientes do Município de Corte de Pedra, Bahia, apresentando diferentes formas clínicas da doença: leishmaniose cutânea (n=8), leishmaniose mucosa (n=7) e leishmaniose disseminada (n=7). Foram gentilmente cedidos pelo grupo do Prof. Dr. Edgar M. Carvalho da Universidade Federal da Bahia. Os pacientes com LC, LM e LD foram selecionados baseados em critérios de avaliação clínica, epidemiológica e laboratorial com o diagnóstico definido pela detecção de parasitos na cultura do aspirado da lesão ou no exame histopatológico, ou por uma lesão típica e positividade em dois dos seguintes testes: reação de hipersensibilidade tardia ou teste sorológico com antígeno de leishmânia. O isolamento foi realizado por meio de aspirado de lesão, as amostras foram cultivadas em meio LIT/NNN a 25°C, e após crescimento os parasitos foram transferidos para o meio Schneider (Gibco, Carlsbad, CA, USA) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cripion Biotecnologia, Brasil), e criopreservados em nitrogênio líquido em uma solução de congelamento (40% de RPMI 1640 (Gibco, EUA) (pH 7,2) suplementado com HEPES 10mM, 100 UI/mL de penicilina cristalina, 10 µg/mL de gentamicina, L-glutamina 2 mM (Sigma, EUA), 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) e 50% SFB) no Serviço de Imunologia do

Hospital Universitário da Universidade Federal da Bahia. Todos os isolados foram identificados como *L. (V.) braziliensis* no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ, Brasil pelos padrões observados na eletroforese de isoenzimas (Cupolillo et al., 1994).

Os isolados de *L. (V.) braziliensis* foram adequadamente transportados de Salvador para São Paulo (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - IMTSP), dentro das normas aéreas de biossegurança vigentes no País e após o transporte foram expandidas em meio Schneider suplementado com 10% de SFB e adequadamente armazenadas em nitrogênio líquido em um número de alíquotas suficiente para o desenvolvimento do trabalho.

A realização deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - CEP-IMT sob número 029/08/08 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob número 0792/09.

3.2 Curva de crescimento

Após descongelamento, os parasitos foram mantidos em meio Schneider suplementado com 10% SFB em incubadora climatizada (*biochemical oxygen demand* = BOD) modelo 111M (EletroLab, São Paulo,

BR) a 26°C. Para os experimentos subsequentes se fez necessária a análise da curva de crescimento de cada isolado para conhecimento da fase estacionária, onde temos uma maior proporção de promastigotas infectivas. Os parasitos foram lavados com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M pH 7,2 (*phosphate buffered saline* = PBS) a 2100 x g por 30 minutos em uma centrífuga refrigerada Eppendorf 5810R (Hamburg, Alemanha) e ressuspendidos em meio Schneider com 10% SFB. A concentração foi acertada após contagem em câmara de Neubauer para 5×10^5 parasitos/mL e colocados em frascos de cultura de 25 cm² (Costar, EUA), em incubadora BOD a 26°C. Após 24 horas realizamos as contagens de cada frasco com os parasitos diluídos em violeta cristal 1 mg/mL em ácido acético 30% em microscópio óptico Carl Zeiss (Göttingen, Alemanha), esse procedimento foi repetido durante nove dias. Todas as contagens foram realizadas por dois observadores independentes. Em todos os experimentos foram utilizados parasitos na fase estacionária, somente até o quarto repique após o descongelamento.

3.3 Efeito de IGF-I ao longo da curva de crescimento

Para avaliar o efeito do fator de crescimento insulina símile-I (recombinante humano produzido em *Escherichia coli* da R & D, Systems, EUA) ao longo da curva de crescimento o mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado com acréscimo de IGF-I 50ng/ml em frascos de

cultura, mantendo-se controles somente com o meio em paralelo (Goto et al., 1998), incubamos a 26°C na BOD e após 24 horas procedeu-se nova contagem dos parasitos e esse procedimento foi repetido por nove dias, desta forma, obtivemos uma curva de proliferação dos 22 isolados estimulados ou não com IGF-I.

3.4 Crescimento parasitário sob estímulo de IGF-I

Para avaliarmos o efeito de IGF-I em diferentes concentrações nos isolados de *L. (V.) braziliensis* utilizamos promastigotas em início de fase estacionária, as quais foram lavadas com PBS a 2100 x g por 30 minutos em centrífuga refrigerada e posteriormente ressuspensos em meio RPMI 1640 (Gibco, EUA) (pH 7,2) suplementado com HEPES 10mM, 100 UI/mL de penicilina cristalina, 10 µg/mL de gentamicina, L-glutamina 2 mM (Sigma, EUA) suplementado com 4% de SFB.

A concentração foi acertada, após contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico, para 5×10^5 parasitos/mL e colocado 1 mL em tubos eppendorf e estimulados com 3 concentrações de IGF-I (25ng/mL, 50ng/mL e 100ng/mL) mantendo-se controles somente com o meio e incubados a 26°C na BOD. Após 72 h procedeu-se nova contagem dos parasitos. O resultado da proliferação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi expresso como a quantidade de parasito por mL. Todas as contagens dos parasitos

em microscópio foram realizadas por dois observadores que desconheciam as condições experimentais.

3.5 Avaliação da atividade da enzima arginase em promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

Suspensão de *L. (V.) braziliensis* 1×10^7 parasito/mL em fase estacionária de crescimento foram estimuladas com IGF-I (50 ng/mL, 100 ng/mL) por 5 minutos ou controles sem estímulo. Após este período os parasitos foram lavados com meio Schneider e centrifugados a $3200 \times g$ por 10 minutos a 4°C , o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lisado com tampão de lise (NaCl 150mM, Tris HCl 10mM, Nonidet[®] P40 substitute 2%, leupeptina 5 μM , 10 μL do coquetel inibidor de proteases Sigma (P8340)), e submetido a dez ciclos de congelamento rápido em nitrogênio líquido e descongelamento em banho de água a 37°C . A atividade da arginase no lisado foi avaliada pela produção de ureia, segundo Corraliza et al. (1994). Em 25 μL do lisado celular foi induzida a ativação da enzima com 25 μL de solução contendo MnCl_2 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 a 56°C por 10 min. Em seguida adicionaram-se 50 μL de L-arginina 0,5 M, pH 9,7 no lisado ativado. A incubação para a hidrólise da arginina se deu a 37°C por 60 min; após este tempo a reação foi bloqueada pela adição de 400 μL de uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido fosfórico (H_3PO_4) e H_2O a 1:3:7 (vol:vol:vol). A seguir, adicionaram-se 25 μL de 1-fenil-1,2-

propanodione-2-oxime 9% dissolvidos em metanol e a solução incubada em banho a 100°C por 45 min. Após este período, a reação foi deixada 10 minutos no escuro.

Uma curva padrão de ureia foi utilizada para cálculo da atividade. A ureia formada foi avaliada por leitura espectrofotométrica a 540 nm em aparelho Multiskan MCC/340 P versão 2.20 (Labsystems, Finlândia). Uma unidade da atividade da enzima definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1µmol de ureia por minuto.

3.6 Células THP-1

Células da linhagem monocítica humana (THP-1) foram cultivadas e replicadas a cada 4 dias em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e mantidas em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂ modelo CB150 (Binder, Tittlingen, Alemanha). A viabilidade foi avaliada por teste de exclusão com corante azul Tripan (Sigma-EUA) a 0,02% em PBS. Foram colocadas em cultura, amostras com viabilidade superior a 95%. A concentração de células foi acertada de acordo com a necessidade de cada experimento. Utilizamos a linhagem macrofágica ao invés de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico para evitar a variação da resposta celular que ocorreria se obtidos de indivíduos diferentes.

3.6.1 Infecção das Células THP-1 com promastigotas de *L. (V.) braziliensis* provenientes de isolados LC, LM e LD

Para os experimentos de infecção, realizamos testes para padronizar a melhor proporção de leishmania/macrófago e tempos de infecção e escolhemos a proporção de 10:1 por 4 horas. Desta forma, 2×10^5 células em RPMI 1640 com 2% de SFB em 500 µl foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços em triplicatas contendo ou não lamínulas redondas estéreis de 13mm dependendo do tipo de experimento. A diferenciação das células THP-1 em macrófagos foi induzida pela adição de 20ng/mL de phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA) a cultura e incubadas por 24 horas a 37°C, 5% CO₂ (Tsuchiya et al., 1982). Após a incubação, as células não aderentes foram removidas por aspiração do sobrenadante e lavadas com PBS morno. O meio RPMI 1640 foi repostado e as células deixadas em repouso por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂. A infecção com os respectivos isolados LC, LM e LD de *L. (V.) braziliensis* foi realizada com ou sem estímulo de IGF-I (50ng/mL) em incubadora úmida modelo 3158 (Forma Scientific, Inc, Marietta, Ohio, EUA) a 33°C, 5% CO₂ (Callahan et al., 1996). Após 4 horas de incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS morno para a remoção dos parasitos não internalizados e repostado o meio RPMI 1640 2 % e IGF-I. Após diferentes tempos de incubação (24 e 48 horas) o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C para dosagens posteriores (ureia e nitrito), as lamínulas coradas e as placas sem lamínulas processadas para coleta do lisado. Os experimentos foram realizados em

triplicata, e controles só com macrófagos estimulados ou não com IGF-I foram mantidos em todos os experimentos.

3.6.2 Avaliação da taxa de infecção

Para a avaliação da taxa de infecção, após diferentes tempos de incubação, as lamínulas foram lavadas em PBS e coradas com o Kit Instant Prov (NewProv), depois de secas foram montadas com PermOUNT e analisadas em microscópio óptico. Em cada lamínula foram contadas 300 células para cada condição analisada, o resultado é apresentado como: Número total de parasitos por 100 células = porcentagem de THP-1 infectada x número médio de parasitos por célula. Toda análise microscópica foi realizada por dois observadores independentes que desconheciam as condições experimentais.

3.6.3 Avaliação da atividade da arginase pela produção de ureia

A avaliação da atividade da arginase foi realizada no lisado obtido segundo o seguinte procedimento: retiramos o sobrenadante de cada poço e centrifugamos a 210 x g por 5 minutos. Enquanto isso colocamos 120µl de tampão de lise (NaCl 150mM, Tris HCl 10mM, Nonidet® P40 substitute 2%,

leupeptina 5 μ M, fluoreto de fenilmetilsulfonila 100mM, α -p-tosil-L-lisina clorometil 100 μ g/mL, fluoreto de aminoetilbenzenosulfonil 1mM, pH 7,6) em todos os poços e deixamos agitando por 5 minutos, seguido de retirada do conteúdo com raspagem de cada poço para conseguirmos o máximo de células. Acrescentamos este conteúdo ao sedimento formado na centrifugação do sobrenadante descrita anteriormente. Essa mistura foi homogeneizada e centrifugada a 3200 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi guardado em duplicata a -20°C e avaliado segundo Corraliza et al. (1994). A ureia formada foi avaliada por leitura espectrofotométrica a 540 nm em aparelho Multiskan MCC/340 P versão 2.20 (Labsystems, Finlândia). Controles só com THP-1 ou THP-1 infectada, sem ou com estímulo de IGF-I, foram mantidos em todos os experimentos.

3.6.4 Determinação da produção de nitrito (NO_2^-)

A produção de óxido nítrico, foi determinada a partir da concentração de nitritos nos sobrenadantes de culturas das infecções com as células THP-1 com os diferentes isolados LC, LM e LD, foi avaliada por uma reação padrão utilizando reagente de Griess segundo Grenn et al. (1982).

Resumidamente, alíquotas de 50 μ L do sobrenadante de cultura foram incubados com igual volume do reagente de Griess (1% sulfanilamida / 0,1% dihidrocloreto de N-1-naftiletileno diamina / 2,5% ácido fosfórico) à

temperatura ambiente, por 10 minutos. A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio em meio de cultura (1,25 a 40 μM de NaNO_2^-) contra branco constituído por meio de cultura e reagente de Griess v/v. Os resultados foram avaliados por leitura espectrofotométrica a 540 nm em aparelho Multiskan MCC/340 P versão 2.20 (Labsystems, Finlândia) e expressos em μM de NO_2^- obtidos de dosagens realizadas em triplicatas.

3.7 Análise Estatística

Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão. Os resultados submetidos ao teste ANOVA com pós-teste de contraste Student Newman-Keuls. Para a comparação entre as espécies de *Leishmania* utilizamos o Teste t de student . As análises foram realizadas pelo Programa GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Um erro alfa de 5% ($p = 0,05$) será considerado para determinar a significância estatística.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Neste estudo avaliamos inicialmente o efeito do IGF-I em diferentes espécies de *Leishmania* pela medida da atividade da arginase. Observando que esse fator de crescimento tinha efeito em *L. (V.) braziliensis* passamos a estudar o comportamento biológico dos isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de diferentes formas clínicas, leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD) com e sem efeito do fator de crescimento IGF-I. Foi analisada a proliferação das promastigotas e atividade da enzima arginase. Posteriormente avaliamos o efeito in vitro do IGF-I em isolados sob forma amastigota intracelular dentro do macrófago. Nesta parte do estudo, utilizamos a linhagem de célula monócítica humana THP-1 infectada com os isolados e analisamos o parasitismo, atividade da enzima arginase e produção de óxido nítrico.

4.1 Efeito de IGF-I em diferentes espécies de *Leishmania*

Utilizamos cepas padrão da *Leishmania* (V.) *braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) comparada a *Leishmania* (L.) *amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), e *Leishmania* (L.) *chagasi* (MHOM/BR/72/c46) para avaliar o comportamento destas espécies frente o estímulo de IGF-I. Na figura 3 podemos observar um comportamento diversificado entre as espécies estudadas quanto à atividade da arginase tanto na atividade basal quanto após estímulo de IGF-I.

Em *L. (V.) braziliensis* a atividade da arginase basal foi menor do que em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*. Quando promastigotas foram submetidas ao estímulo com o fator de crescimento IGF-I, verificamos que em *L. (V.) braziliensis* houve aumento da atividade da arginase, porém em *L. (L.) amazonensis* esse aumento foi bem maior, diferente de *L. (L.) chagasi* que apresentou diminuição acentuada na atividade da enzima pós estímulo com IGF-I.

Figura 3 - Efeito de IGF-I na atividade da arginase em diferentes espécies de leishmania. Promastigotas em fase estacionária de crescimento, *L. (V.) braziliensis* (A), *L. (L.) amazonensis* (B) e *L. (L.) chagasi* (C) foram mantidas em cultura com ou sem o estímulo de IGF-I (50ng/ml) por 5 minutos e após lavadas e lisadas. A atividade da arginase foi medida como concentração de ureia. Resultado representativo de 2 experimentos (média $\pm$ desvio padrão). Uma unidade da atividade da arginase = a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de ureia por minuto. O resultado é apresentado como: mU de arginase por 10⁷ parasitos. Teste t de student com * $p < 0,05$ e # $p < 0.001$ em relação ao controle de promastigota sem IGF-I.

4.2 Efeito do IGF-I em *L. (V.) braziliensis*

4.2.1 Curva de Crescimento de *L.(V.) braziliensis* in vitro

Inicialmente realizamos as culturas de promastigotas para analisar o comportamento dos 22 isolados estudados, para que o uso das formas promastigotas na cultura fosse sempre de parasitos na fase estacionária de crescimento. Assim, os isolados foram avaliados quanto à cinética de crescimento durante nove dias. Os resultados de dois experimentos independentes realizados em triplicata mostram que em média os parasitos alcançavam a fase estacionária entre o quinto e sexto dia de crescimento.

Utilizamos para os 22 isolados estudados sua fase estacionária que sabe-se ser constituída de maior porcentagem de parasitos na fase metacíclica infectiva. Na figura 4 temos um exemplo de uma curva de crescimento de um isolado de LC (figura 4A) LM (figura 4B). e LD (figura 4C).

Figura 4 - Curvas de crescimento de *L. (V.) braziliensis*. Leishmânias provenientes das diferentes formas clínicas foram cultivadas na concentração inicial de 5×10^5 parasitos/mL em meio Schneider 26°C por um período de nove dias. Leishmaniose cutânea (A), leishmaniose mucosa (B) e leishmaniose disseminada (C). A cada 24hs foi realizada contagens em microscópio óptico. Dados representativos de 1 experimento em triplicata (médias $\pm$ desvio padrão) de dois experimentos independentes.

4.2.2 Efeito de IGF-I (25, 50, 100 ng/mL) sobre promastigotas em cultura

Avaliamos também o efeito de IGF-I em diferentes concentrações (25, 50 e 100 ng/mL) na proliferação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* nos isolados de LC (figura 5A), de LM (figura 5B) e de LD (figura 5C). Optamos pelo uso de 50ng/mL de IGF-I nas etapas seguintes do nosso estudo por ser esta a que corresponde a concentrações fisiológicas, além de ter sido padronizada anteriormente em trabalhos realizados (Gomes et al., 1998).

Figura 5 - Efeito de diferentes concentrações de IGF-I na proliferação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. 5×10^5 parasitos/mL provenientes de pacientes com leishmaniose cutânea (A), leishmaniose mucosa (B) e leishmaniose disseminada (C) foram estimuladas ou não com IGF-I (25, 50, 100ng/ml) em meio Schneider com 2% de soro fetal bovino e após 72 horas de cultura foram avaliados por contagem em microscópio óptico. Resultados estão representados como média $\pm$ desvio padrão de um isolado de cada forma clínica em triplicata de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação a promastigotas sem IGF-I. Teste ANOVA com pós-teste de contraste de Student Newman-Keuls.

4.2.3 Efeito de IGF-I sobre promastigotas ao longo da curva de crescimento de *L. (V.) braziliensis*

Para a avaliação do efeito de IGF-I na proliferação dos parasitos, realizamos a cultura de promastigotas com acréscimo de IGF-I 50ng/ml, mantendo-se controles somente com o meio de cultura. As formas promastigotas foram contadas durante nove dias consecutivos e observamos uma tendência ao aumento da proliferação de promastigotas em todas as culturas que receberam o estímulo de IGF-I comparada a cultura sem estímulo. Quando comparamos o efeito de IGF-I nos 22 isolados provenientes das formas clínicas LC, LM e LD não observamos diferença significativa entre os isolados de parasitos provenientes de pacientes com formas clínicas diferentes. As curvas de um isolado de cada forma clínica estão apresentadas na figura 6 (A, B e C).

Figura 6 - Efeito de IGF-I no crescimento de *L. (V.) braziliensis* no período de nove dias. Leishmânias provenientes das diferentes formas clínicas foram cultivadas na concentração inicial de 5×10^5 parasitos/mL em meio Schneider e foram estimulados ou não com IGF-I (50ng/ml) e incubadas a 26°C. O crescimento parasitário foi avaliado por contagem diária por microscopia óptica. Um isolado de cada forma clínica está representado. Leishmaniose cutânea (A), leishmaniose mucosa (B) e leishmaniose disseminada (C). Dados representativos de 1 experimento em triplicata (médias $\pm$ desvio padrão) de dois experimentos independentes.

4.2.4 Avaliação da atividade da enzima arginase nos isolados de *L. (V.) braziliensis*

Os isolados foram avaliados quanto à atividade da enzima arginase basal e frente ao estímulo com IGF-I. Os experimentos foram realizados na fase estacionária de crescimento da cada isolado, sendo de leishmaniose cutânea (n=8), de mucosa (n=7) e de disseminada (n=7).

Quando comparamos a atividade da arginase, nós observamos diferenças nas características biológicas dos isolados derivados de pacientes com LM (figura 7B). A atividade basal destes pacientes foi significativamente maior que aqueles provenientes de pacientes com LC e LD (figura 7A e 7C). Após estímulo de IGF-I, os isolados de pacientes com LM tiveram comportamento diferente daqueles oriundos de LC e LD. Enquanto nós detectamos um aumento na atividade da arginase em LC (figura 7A) e LD (figura 7C) após 5 minutos de estímulo com diferentes concentrações de IGF-I, parasitos provenientes de LM exibiram uma atividade reduzida da arginase (figura 7B). Este aumento da atividade da enzima arginase foi detectado principalmente nos isolados de LD, chegando a níveis similares à atividade basal de arginase dos isolados de LM.

Figura 7 - Atividade da arginase em isolados de *L. (V.) braziliensis* sob efeito de IGF-I. Promastigotas em fase estacionária de crescimento provenientes de pacientes com forma clínica cutânea LC (A; n = 8), mucosa LM (B; n = 7) e disseminada LD (C; n = 7) foram mantidas em cultura com ou sem o estímulo de IGF-I (50 ou 100 ng/ml) por 5 minutos e após lavadas e lisadas. A atividade da arginase foi medida como concentração de ureia. Resultado representativo de 2 experimentos (média $\pm$ desvio padrão). Uma unidade da atividade da arginase = a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de ureia por minuto. O resultado é apresentado como: mU de arginase por 10⁷ parasitos. * $p < 0,05$ em relação ao controle de promastigota sem IGF-I no mesmo grupo. # $P < 0.05$ em relação aos valores basais de arginase entre as amostras de LC, LM e LD.

4.3 Efeito do IGF-I em *L. (V.) braziliensis* em forma amastigotas intracelulares em células THP-1

Após análise do efeito do IGF-I no parasito, avaliamos o efeito do IGF-I em amastigotas intracelulares. Avaliamos o parasitismo, atividade da enzima arginase e dosagem de NO de células THP-1 infectadas com *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes com diferentes formas clínicas: cutânea (n=8), mucosa (n=7) e disseminada (n=7). Avaliamos o efeito sobre a forma amastigota, após diferenciação de promastigotas que foram utilizadas na infecção. Os experimentos foram repetidos de duas a três vezes em triplicata, utilizando 10 parasitos por macrófago. Os resultados foram expressos em % de células infectadas e número de parasito em 100 células e razão estimulado/basal.

4.3.1 Avaliação da taxa de infecção e número de parasitos/100 células basal

Avaliando a porcentagem de infecção basal, isto é as infecções que não receberam o estímulo de IGF-I, observamos que a porcentagem de infecção com os isolados de *L. (V.) braziliensis* de LD tende a ser menor do que os de LC e LM nos períodos de incubação de 24 e 48 horas (figura 8).

Avaliando o número de amastigotas/100 células na infecção basal, observamos que o número de amastigotas em LC tende a ser maior do que dos isolados de LM e LD em ambos os períodos de incubação: 24 e 48 horas (figura 9).

Figura 8 - Avaliação da porcentagem de infecção basal de células THP-1 infectadas com isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes com diferentes apresentações clínicas em dois tempos pós infecção. Células THP-1 foram infectadas na proporção de 10 leishmânias/macrófago com *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes com a forma clínica de leishmaniose cutânea (LC n=8), mucosa (LM n=7) e disseminada (LD n=7). A porcentagem de macrófagos infectados foi avaliada por microscopia óptica com 24 e 48 horas após a infecção. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de todos os isolados de cada forma clínica.

Figura 9 - Avaliação da número de parasitos/100 células em infecção basal células THP-1 com isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes com diferentes apresentações clínicas em dois tempos pós infecção. Células THP-1 foram infectadas com isolados provenientes de pacientes com formas cutânea (LC n=8), mucosa (LM n=7) ou disseminada (LD n=7) de *L. (V.) braziliensis* e foram avaliadas no período de cultura de 24 ou 48h. Resultado representativo de 2 experimentos realizados com cada isolado de cada forma clínica em triplicata. O parasitismo foi avaliado por microscopia óptica e o resultado é representado como N° total de parasitos por 100 células = % de macrófagos infectados x número médio de parasitos por macrófago.

4.3.2 Avaliação do efeito de IGF-I na taxa de infecção e número de parasitos/ 100 células

Quando avaliamos o efeito do fator de crescimento IGF-I na porcentagem de infecção por 24 e 48 horas (figura 10) e número de amastigotas/100células por 24 e 48 horas (figura 11) nos diferentes isolados observamos que em ambos os períodos estudados o IGF-I parece não ter efeito significativo nas infecções com *L. (V.) braziliensis*.

Na análise global, IGF-I (50ng/ml) parece não ter efeito no grau de parasitismo de células, mas como a tendência pode não ser homogênea, analisamos a tendência de isolados individualmente nos tempos de 24 e 48 horas de cultura em condições basais e sob estímulo de IGF-I. Tanto em condições basais quanto sob estímulo de IGF-I, os isolados mostram de forma geral, tendências semelhantes de aumento ou diminuição nos tempos avaliados (figura 12, A, B e C). Com essa observação passamos a avaliar o efeito de IGF-I individualmente em isolados.

Figura 10 - Avaliação da porcentagem de infecção sob efeito de IGF-I em células THP-1 com isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes com diferentes apresentações clínicas em dois tempos pós infecção. Células THP-1 infectadas com isolados provenientes de pacientes com formas cutânea (LC n=8), mucosa (LM n=7) ou disseminada (LD n=7) de *Leishmania (V.) braziliensis* foram estimuladas ou não com IGF-I (50 ng/mL) durante todo período de cultura de 24 ou 48 h. Resultado representativo de 2 experimentos realizados com cada isolado testado em triplicata. O parasitismo foi avaliado por microscopia óptica. O resultado representado como porcentagem de células considerando a média das triplicatas.

Figura 11- Número de amastigotas em células THP-1 sob efeito de IGF-I com isolados de *L. (V) braziliensis* provenientes de pacientes com diferentes apresentações clínicas em dois tempos pós infecção. Células THP-1 infectadas com isolados provenientes de pacientes com formas clínicas cutânea (LC n=8), mucosa (LM n=7) ou disseminada (LD n=7) de *Leishmania (V.) braziliensis* foram estimuladas ou não com IGF-I (50 ng/mL) durante todo período de cultura de 24 ou 48h. Resultado representativo de 2 experimentos realizados com cada isolado de cada forma clínica em triplicata. O parasitismo foi avaliado por microscopia óptica e o resultado é representado como Nº total de parasitos por 100 células = % de macrófagos infectados x número médio de parasitos por macrófago.

Figura 12 - Avaliação do parasitismo (número de parasitos/100 células) em cada isolado de *L. (V.) braziliensis* em dois tempos pós-infecção. Células THP-1 infectadas com isolados provenientes de pacientes (LC; n= 8), A, mucosa (LM; n= 7) B ou disseminada (LD; n=7) C de *Leishmania (V.) braziliensis* foram estimuladas ou não com IGF-I (50 ng/mL) durante todo período de cultura de 24 ou 48h. Resultado representativo de 2 experimentos realizados com cada isolado de cada forma clínica em triplicata. O parasitismo foi avaliado por microscopia óptica. O resultado é representado como N° total de parasitos por 100 células = % de macrófagos infectados x número médio de parasitos por macrófago.

Para melhor avaliar o efeito do IGF-I nas infecções calculamos a razão do número de amastigotas/100 de cultura estimulada com IGF-I em relação a cultura basal, considerando aumento do parasitismo quando a razão for maior que 1,0 (figura 13). Nesta razão verificamos que no período de cultura de 24 horas, com isolados de LC o aumento o parasitismo sob efeito de IGF-I ocorreu em 87,5% (7 em 8 isolados) , enquanto que com os de LM foi de 71,4% (5 em 7 isolados) e com os de LD apenas 14,3% (1 em 7).

No período de cultura de 48 horas verificamos que com isolados de LC o aumento do parasitismo sob efeito de IGF-I foi de 62,5% (5 em 8 isolados), enquanto que com os de LM foi de 85,7% (6 em 7 isolados) e com os de LD apenas 42,8% (3 em 7) aumentaram o parasitismo com IGF-I.

Vale salientar que, principalmente os isolados de LD a razão mostra efeito negativo de IGF-I no parasitismo, isto é, diminuição do crescimento na presença de IGF-I.

Figura 13 - Razão entre infecção basal e sob efeito de IGF-I em THP-1 infectadas com *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes com as diferentes formas clínicas, em dois tempos pós-infecção. Células THP-1 infectadas com isolados provenientes de pacientes com formas clínica cutânea (LC n=8), mucosa (LM n=7) ou disseminada (LD n=7) de *Leishmania (V.) braziliensis* foram estimuladas ou não com IGF-I (50 ng/mL) durante todo período de cultura de 24 ou 48h. O parasitismo foi avaliado por microscopia óptica e o resultado N° de amastigotas/100 células = % de macrófagos infectados x número médio de parasitos por macrófago e a razão foi calculada como: N° total de amastigotas dos isolados estimulados com IGF-I/ N° total de amastigotas sem estímulo.

De maneira geral observamos que as infecções foram heterogêneas dentro de uma mesma forma clínica tanto em LC, LD e LM. Esta diversidade está representada na figura 14 onde podemos observar infecções provenientes de quatro isolados de pacientes com leishmaniose cutânea com uma grande diversidade da % de infecção e no número de amastigotas por célula.

Figura 14 – Parasitismo de células THP-1 infectadas com isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de diferentes pacientes com leishmaniose cutânea. A diferenciação das células THP-1 em macrófagos foi induzida pela adição de 20ng/mL de phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA) a cultura e incubação por 24 horas a 37°C, 5% CO₂ seguido de período de 24 horas de repouso antes da infecção com os diferentes isolados. Aumento original x1000.

4.3.3 Avaliação da atividade da arginase pela produção de ureia

Sabendo que a ativação do macrófago pode levar à ativação de duas vias metabólicas no macrófago dependentes de um mesmo substrato a L-arginina, sendo a primeira via com a produção de NO, potente agente leishmanicida e a segunda com a ativação da arginase que leva a produção de poliaminas, avaliamos a atividade enzimática da arginase pela dosagem da ureia, um dos produtos da hidrólise promovida pela enzima.

Na análise da arginase basal quanto com o uso de IGF-I comparando as três formas clínicas estudadas observamos valores mais baixos da atividade da arginase em LD que em LC e LM (figura 15).

Figura 15 - Atividade da arginase sob efeito de IGF-I em células THP-1 infectadas por *L. (V.) braziliensis* isolada de pacientes com diferentes apresentações clínicas em dois tempos pós-infecção. Células THP-1 foram infectados com isolados provenientes de pacientes com formas cutânea (LC n = 8), mucosa (LM n = 7) e disseminada (LD n=7) de *Leishmania (V.) braziliensis* e estimuladas ou não com IGF-I (50 ng/mL) durante todo período de cultura de 24 h. Resultado representativo de 2 experimentos realizados (média $\pm$ desvio padrão). Uma unidade da atividade da arginase = a quantidade de enzima que catalisou a formação de 1 μ mol de ureia/minuto. Resultado é apresentado como: mU de arginase/1 x 10⁶ células).

4.3.4 Determinação da produção de nitrito (NO_2^-)

Avaliamos o efeito de IGF-I na produção de óxido nítrico por células THP-1 infectadas por *L. (V.) braziliensis*, dosando o nitrito que reflete a sua produção. A figura 16 representa a análise do efeito de IGF-I na produção de óxido nítrico quando células THP-1 foram infectadas com promastigotas provenientes de isolados LC, LM e LD. Observamos uma tendência à diminuição das concentrações de nitrito nas infecções que receberam o estímulo de IGF-I, em relação ao controle não estimulado nos isolados LC e LM no tempo de 48 horas. Entretanto na análise dos isolados LD há uma tendência a aumento pós estímulo de IGF-I.

Figura 16 - Determinação da produção de nitrito (NO_2^-) sob estímulo de IGF-I em células THP-1 infectadas com *Leishmania (V.) braziliensis* isolada de pacientes com diferentes apresentações clínicas em dois tempos pós-infecção. Células THP-1 foram infectados com isolados provenientes de pacientes com formas cutânea (LC n=8), mucosa (LM n=7) ou disseminada (LD n=7) de *Leishmania (V.) braziliensis*. As culturas de células foram estimuladas ou não com IGF-I (50 ng/mL) durante o período de 24 e 48 h. No sobrenadante foi avaliado o óxido nítrico pela detecção de nitrito pelo método de Griess e os resultados expressos como μM de nitrito. Resultado representativo de 2 experimentos realizados com um isolado de cada forma clínica em triplicata (média $\pm$ desvio padrão).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A leishmaniose causada por *L. (V.) braziliensis* é responsável por manifestações clínicas diversas que compreende desde formas cutâneas simples autoresolutivas até formas disseminadas com comprometimento mucoso (Goto e Lauletta Lindoso, 2012). O papel do parasito na diversidade de manifestações clínicas não é claro, podendo estar ou não associado com polimorfismo genotípico e fenotípico do parasito (Cuervo et al., 2004; Schriefer et al., 2004).

Estudo realizado por Teixeira et al. (2005) compara a resposta inflamatória em modelos murinos infectados com isolados de *L. (V.) braziliensis*, oriundos de pacientes com leishmaniose cutânea de duas regiões geográficas diferentes, Ceará e Bahia, localizados no Nordeste Brasileiro. Este estudo demonstra que os isolados induzem diferentes padrões de expressão de quimiocinas, levando ao recrutamento de diferentes tipos de células, ocasionando respostas inflamatórias distintas. Em outro estudo realizado por Pereira et al. (2009) também demonstram que diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* induzem características histopatológicas distintas em modelo murino.

Desta forma, estudos que comparam características biológicas e genéticas dos isolados são importantes, principalmente pela possibilidade de encontrar marcadores genotípicos ou fenotípicos que possam ser associados a uma forma clínica específica da doença.

A hipótese deste estudo foi verificar se nos isolados oriundos de pacientes com as diferentes formas clínicas de leishmaniose tegumentar por *L. (V.) braziliensis* há diferenças biológicas nas formas promastigotas e nas formas amastigotas intracelulares na interação parasito/macrófago além de avaliar neste contexto o efeito do fator de crescimento IGF-I. Para isso foi analisado o comportamento biológico de 22 isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes do Município de Corte de Pedra, Bahia, apresentando diferentes formas clínicas da doença: leishmaniose cutânea (n=8), leishmaniose mucosa (n=7) e leishmaniose disseminada (n=7).

Estudos realizados com IGF-I já demonstraram seu efeito na proliferação de formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* (Goto et al., 1998); além da indução do aumento da expressão e atividade da enzima arginase de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Vendrame et al., 2007).

A partir dos achados grupo da Profa. Hiro Goto do fator de crescimento IGF-I atuar na via da L-arginina de *L. (L.) amazonensis*, iniciamos o nosso estudo comparando o efeito de IGF-I na atividade da arginase em promastigotas de diferentes espécies; *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis* e verificamos comportamentos biológicos distintos, tanto comparando a atividade basal entre as espécies como quando estimuladas com IGF-I. Em *L. (V.) braziliensis* temos um comportamento distinto de *L. (L.) amazonensis* já descrito anteriormente (Vendrame et al., 2007) com atividade basal menor e pós estímulo aumento

menos expressivo: entretanto em *L. (L.) chagasi* temos arginase basal alta porém uma diminuição na atividade da enzima pós estímulo de IGF-I.

A atividade da arginase de *Leishmânia* tem sido diretamente relacionada ao crescimento do parasito em cultura e a seu papel na infectividade na interação parasito-hospedeiro, atuando no crescimento parasitário e desenvolvimento da lesão (Inieta, 2001, Kropf et al., 2005, Gaur et al., 2007, Wanasen et al., 2008).

Em *L.(V.) braziliensis* a atividade da arginase foi distinta das demais espécies estudadas e como temos dentro dessa mesma espécie uma diversidade de manifestações clínicas e uma alta incidência de casos no Brasil, a seguir averiguamos se havia diferenças entre os isolados oriundos de pacientes com diferentes formas clínicas, leishmaniose cutânea, mucosa e disseminada provenientes de uma importante área endêmica.

Observamos que os isolados provenientes de pacientes LM apresentaram atividade da enzima arginase aumentada em relação aos isolados de pacientes com LC e LD. O fato desses pacientes com LM apresentarem lesões mais destrutivas em relação às outras formas clínicas gera suspeita que esses isolados de *L. (V.) braziliensis* já apresentem diferença no início da doença o que sugere que esta característica favoreça o desenvolvimento da lesão mucosa e contribua para a sobrevivência e proliferação do parasito em um meio ambiente hostil, na mucosa.

Nos isolados do LC e LD a atividade da arginase foi semelhante, sendo que quando esses isolados receberam estímulo de IGF-I houve aumento da atividade em ambos os casos, mas o aumento foi maior em

parasitos provenientes de isolados de LD, chegando a níveis similares à atividade de arginase basal de LM. Isso é importante, pois 30% dos pacientes com LD eventualmente desenvolvem LM (Turetz et al., 2002), sugerindo um papel de IGF-I no desenvolvimento da doença.

Na avaliação do efeito de IGF-I na proliferação das promastigotas em cultura com ou sem estímulo de IGF-I 50ng/ml, apesar de sutil observamos tendência ao aumento da proliferação das formas promastigotas nas culturas que receberam o estímulo de IGF-I, similar aos observados em trabalhos anteriores com outras espécies (Gomes et al., 1998; Goto et al., 1998; Vendrame et al., 2007).

Depois da avaliação das formas promastigotas em cultura, passamos a estudar as formas amastigotas intracelulares em macrófagos. Os macrófagos desempenham papel fundamental na infecção por leishmânia, pois são as principais células onde as leishmânias podem sobreviver e além disso, podem atuar como células apresentadoras de antígeno, secretar moléculas que induzem a morte do parasito e contribuir para o processo inflamatório.

Para a avaliação da interação leishmânia-macrófago, utilizamos a linhagem monocítica humana (THP-1) como fonte de macrófagos, essa célula tem sido utilizada como modelo de crescimento intracelular de varias espécies de leishmânia (Gebre-Hiwot et al., 1992, Sereno et al., 2003; Dasgupta et al., 2003), com a grande vantagem de disponibilidade e homogeneidade das mesmas, evitando assim variações como as ocorridas

com o uso macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de diferentes doadores.

Utilizando as células THP-1 em nosso estudo comprovamos que esta célula é um bom modelo de estudo da interação macrófago-*Leishmania (V.) braziliensis* com boa taxa de infectividade com todos os isolados estudados.

Avaliando a porcentagem de infecção e o número de amastigotas/100células basal, sem estímulo de IGF-I, nos períodos de 24 e 48 horas observamos que tanto a porcentagem de infecção quanto o número de amastigotas/100células são menores em LD comparado com isolados de LC e LM. Por outro lado, na avaliação quando o fator de crescimento estava presente nas culturas, analisando a porcentagem de infecção e número de amastigotas/100células observamos uma tendência a aumento entre a infecção basal e quando estimulados com o fator de crescimento IGF-I. Em uma análise mais detalhada de cada isolado utilizando o número de amastigotas/100células em 24 e 48 horas podemos observar que nos isolados provenientes de LC e LM há efeito de IGF-I, porém esta análise fica mais clara quando usamos a razão do número de amastigotas dos isolados estimulados/isolados não estimulados. Pudemos assim observar que tanto em LC quanto em LM um comportamento semelhante do efeito de IGF-I com aumento do número de amastigotas intracelular enquanto que em LD este efeito parece ser negativo. Estes dados assume importância quando confrontados com um estudo em andamento em nosso laboratório (comunicação pessoal) com análise sérica de IGF-I. Neste estudo em que os pacientes desta mesma área endêmica

com as três formas clínicas apresentam nível sérico de IGF-I variado, com pacientes com LC apresentando concentrações séricas de IGF-I similares aos controles sadios enquanto que os pacientes com LM e LD que tem concentrações menores. Estes dados podem sugerir que a *L. (V.) braziliensis* é possivelmente uma espécie menos adaptada a se favorecer do fator de crescimento durante a infecção. Em outros termos, baixos níveis de IGF-I sejam talvez favoráveis à manutenção do parasito na lesão. Esta diferença poderia explicar a escassez de parasitos encontrados nas lesões ocasionadas por esta espécie, em contraste com as lesões ocasionadas por *L. (L.) amazonensis* onde há maior quantidade de parasitos (Silveira et al., 2004).

Nos estudos anteriores com *L. (L.) amazonensis* também foi observado que o fator de crescimento IGF-I atuava no aumento do parasitismo de macrófagos que foi atribuído ao seu efeito no metabolismo de L-arginina, promovendo principalmente o aumento da expressão e ativação da arginase do parasito e do macrófago infectado, levando a uma produção de poliaminas e, reciprocamente levando à diminuição da produção de NO e da expressão de NOS2, que favorecem o seu crescimento (Vendrame et al., 2007). Assim, IGF-I aumentaria o crescimento de leishmânias (Gomes et al., 2000) e provavelmente por seu efeito na via da L-arginina (Vendrame et al., 2007) e sua expressão tem sido descrita como importante fator na interação leishmânia-hospedeiro devido a sua ação direta no aumento da produção de poliaminas que são nutrientes para o parasito, com possível efeito no parasitismo e evolução da doença (Roberts

et al., 2004). Desta forma fomos avaliar a atividade da arginase nas infecções de THP-1 com os diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*. Nesta análise verificamos que o fator de crescimento IGF-I não teve efeito significativo na atividade da arginase na interação leishmânia-macrófago com *L. (V.) braziliensis* diferentemente do que foi encontrado em estudos anteriores realizados por Vendrame et al. (2007), onde observou-se que em macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c infectados com promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* onde IGF-I induziu aumento da expressão e atividade da arginase.

Contudo, não podemos afirmar que *L. (V.) braziliensis* teve um comportamento diferente de *L. (L.) amazonensis*, já que a linhagem celular utilizada não foi a mesma. Nos questionamos então, se o modelo utilizado estaria influenciando no efeito de IGF-I na atividade da arginase.

Uma das questões levantadas foi sobre os transportadores de L-arginina, já que para que ocorra o aumento na atividade da enzima arginase deve haver necessariamente um aumento do fluxo de L-arginina na célula hospedeira (Yeramian et al., 2006), sendo que o transporte de L-arginina ocorre por meio de transportadores e aminoácidos catiônicos da família CAT (*cationic amino acid transporter*) que se comportam como o sistema y⁺ clássico de transporte de aminoácido (Hatzoglou et al., 2004). Entretanto, Barilli et al. (2011) demonstraram que a diferenciação da linhagem monocítica humana THP-1 em macrófago induzida com PMA aumenta a expressão de mRNA de SLC7A7 e da proteína y⁺ LAT1 (*large neutral amino acid transporter*) e conseqüentemente da atividade do sistema y⁺ que

medeia o transporte de L- arginina, tornando esta célula apta a ser utilizada neste contexto.

A partir daí analisamos os efeitos de IGF-I em um mecanismo microbicida de grande importância no macrófago, o óxido nítrico, cujo papel é de grande importância na resposta imunológica e controle das leishmanioses. Observamos que os níveis de nitrito basal em LC e LM estavam mais altos que em LD, entretanto sob o estímulo do fator de crescimento IGF-I, LC e LM tendem a diminuir as concentrações, diferente de LD onde há uma tendência ao aumento.

A dosagem de nitrito nas infecções foi baixa, entretanto no homem a detecção do NO por macrófagos ativados é controversa e relativamente reduzida em comparação aos encontrados em camundongos, embora haja expressão de mRNA para iNOS após estimulação com IFN- γ (Balestieri et al., 2002).

A arginase tem um papel regulatório em iNOS de macrófagos, como ambos utilizam o mesmo substrato a arginase modularia a concentração de L-arginina (Wang et al., 1995), podendo comprometer assim o papel de defesa do macrófago. Entretanto, no nosso estudo conseguimos observar esse balanço apenas em LC e LM, mas não em LD.

Portanto, neste estudo nós mostramos que IGF-I estimula a proliferação dos isolados de *L. (V.) braziliensis* e atua na atividade da arginase que difere entre os isolados provenientes de diferentes formas clínicas da doença e que estas diferenças podem ter um papel importante na patogenia da doença. Na análise de amastigotas intracelulares há efeito

diverso com aumento da infectividade na maioria dos isolados LC e LM e um efeito negativo em isolados LD.

Assim nossos dados demonstram uma interessante diversidade no comportamento dos parasitos provenientes de pacientes com manifestações clínicas diferentes que podem ter papel na evolução para essas formas da doença. As diferenças observados foram de atividade da enzima arginase de *L. (V.) braziliensis* e variabilidade no crescimento intracelular de amastigotas frente ao estímulo de IGF-I. Esses dados indicam e estimulam o prosseguimento do estudo da diversidade biológica do parasito ligada à apresentação clínica e o aprofundamento do papel de IGF-I no contexto da evolução da doença no homem.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Analizamos as características dos diferentes isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* provenientes de diferentes formas clínicas enquanto promastigota e amastigota em células de linhagem monocítica humana THP-1, com e sem estímulo de IGF-I para avaliarmos se essas características teriam papel na determinação do quadro clínico dos pacientes.

- Analisando as promastigotas, observamos diferenças na atividade da arginase basal entre os isolados de *L. (V.) braziliensis*, sendo maior naqueles provenientes de pacientes com LM. IGF-I aumentou a atividade da arginase nos isolados de LC e LD, mas não de LM.
- Analisando as formas amastigotas nas células de linhagem monocítica humana THP-1, o efeito de IGF-I foi de aumento do parasitismo nos isolados de LC e LM e de diminuição com os de LD.
- Em amastigotas, avaliando a atividade da arginase, observamos que nos isolados de LD a atividade da arginase basal foi menor que nos de LC. Por outro lado, a produção de óxido nítrico tendeu a ser maior em isolados de LD sob estímulo de IGF-I. O fator de crescimento IGF-I possivelmente não favorece os isolados de LD.

Os dados do presente estudo demonstram que a célula THP-1 é um bom modelo de estudo de parasitismo com as espécies *L. (V.) braziliensis*.

Com base nas diferenças observadas nas características biológicas dos parasitos, com e sem estímulo de IGF-I, podemos concluir que estas podem contribuir na apresentação clínica dos casos da LTA.

ANEXOS

7. ANEXOS

7.1 Anexo A - Documento de Aprovação da CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 02/09/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0792/09**, intitulado: **"EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO INSULINA SÍMILE I (IGF-I) NA ATIVIDADE DA ARGINASE DE CEPAS DE LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS DE PACIENTES COM AS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)"** apresentado pelo Departamento de **MEDICINA TROPICAL**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Hiro Goto**

Pesquisador (a) Executante: **Luana Dias de Souza**

CAPPesq, 03 de Setembro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

7.2 Anexo B - Documento de Aprovação do Instituto de Medicina Tropical

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 15 de setembro de 2008.

Ilma. Sra.
Profª. Dra. Hiro Goto

Prezada Doutora:

Em reunião na presente data o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza ética, o projeto de pesquisa, classificado sob número 029/08/08 e intitulado “Efeito do fator de crescimento insulina-símile (IGF-I) na atividade da arginase de cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* de pacientes com diferentes formas clínicas de *Leishmaniose tegumentar americana (LTA)*”, encaminhado por Vossa Senhoria.

Atenciosamente

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa
IMTSP-USP

Coordenador do CEP-IMT

7.3 Anexo C – Artigo Publicado

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 104 (2010) 566–568

Contents lists available at ScienceDirect

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

Journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/trstmh>

Short Communication

Insulin-like growth factor-I induced and constitutive arginase activity differs among isolates of *Leishmania* derived from patients with diverse clinical forms of *Leishmania braziliensis* infectionCélia M.V. Vendrame^{a,b}, Luana D. Souza^a, Márcia D.T. Carvalho^a, Kátia Salgado^b, Edgar M. Carvalho^b, Hiro Goto^{a,c,*}^a Laboratório de Soroprevalência e Parasitologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar n° 470, prédio II, 4° andar, CEP 05403-000, São Paulo, SP, Brazil^b Serviço de Dermatologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil^c Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 September 2009

Received in revised form 25 March 2010

Accepted 25 March 2010

Available online 6 May 2010

Keywords:

Leishmania braziliensis

Cutaneous leishmaniasis

Mucosal leishmaniasis

Disseminated leishmaniasis

Arginase

Insulin-like growth factor I

ABSTRACT

Arginase activity has been related to leishmaniasis development, thus we studied the constitutive and insulin-like growth factor (IGF) I-induced arginase activity of *Leishmania (Vianna) braziliensis* isolates from patients with different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis (ATL). Isolates from mucosal leishmaniasis presented higher basal levels of arginase activity than isolates from other clinical forms of ATL. Isolates from disseminated leishmaniasis that present mucosal lesion in some cases reached the arginase activity similar to that of isolates from mucosal leishmaniasis upon IGF-I stimulation. Differences in arginase activity may influence disease outcomes such as evolution to mucosal lesion in patients with *L. (V.) braziliensis* infection.

© 2010 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Brazil is mostly caused by *Leishmania (Vianna) braziliensis*, which may present as cutaneous (CL), mucosal (ML) and disseminated (DL) leishmaniasis. Factors/mechanisms leading to this diversity of clinical presentations are not known, but parasite factors have lately been recognised as important.¹ *Leishmania* expresses its own arginase² and we have shown that insulin-like growth factor (IGF) I induces *Leishmania* proliferation, accelerates lesion progression³ and affects arginase activity in *Leishmania amazonensis*.² Since arginase activity has been found to be closely related to

parasitism and the development of infection,^{4,5} we focused our study on the basal and IGF-I-induced activity of this enzyme in *L. (V.) braziliensis* isolates from patients as a possible parasite-related factor that could influence the clinical presentation of ATL.

2. Materials and methods

Twenty two parasite isolates were obtained before treatment from patients with CL ($n=8$), ML ($n=7$) and DL ($n=7$) from Corte de Pedra, Bahia, northeastern Brazil, an endemic area for leishmaniasis. The isolates were obtained from 2002 to 2007 and were characterized as *L. (V.) braziliensis* by multilocus enzyme electrophoresis and cultivated in Schneider's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Cripion Biotecnologia, Andradina, SP, Brazil) at 26 °C. Stationary growth phase

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3061 7023; fax: +55 11 3061 8270.
E-mail address: hgoto@usp.br (H. Goto).

10^7 promastigotes were maintained in culture for 5 min either with or without 50 ng/ml or 100 ng/ml of recombinant human IGF-I (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). They were then washed twice with ice cold phosphate-buffered saline 0.01 M pH 7.2 and lysed for 10 min using ice cold lysis buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 2% NP-40 substitute (octylphenoxypolyethoxyethanol), 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and 5 μ M leupeptin]. Arginase was activated in the lysate using MnCl_2 and then it was added to L-arginine solution, and the arginase activity determined by measuring urea production (one unit of enzyme activity = amount of enzyme needed to catalyze the formation of 1 μ mol of urea per minute).² The data were analyzed using ANOVA and Student-Newman-Keuls tests. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

We initially analyzed the parasite growth curves of each of the 22 isolates. The stationary phase was observed around 4–6 days of culture in all isolates (data not shown), in which time period the arginase activity was evaluated.

When we compared the arginase activity of the isolates, we observed marked differences in the biological characteristics of isolates derived from ML patients (Figure 1B). The baseline arginase activity of these parasites was significantly greater than that of those derived from CL and DL patients (Figures 1A and 1C). Upon IGF-I stimulation, parasites from ML patients also behaved differently from parasites derived from CL and DL patients. While we detected an increase in arginase activity in parasites from CL (Figure 1A) and DL (Figure 1C) patients after 5 min of stimulation with different concentrations of IGF-I, parasites derived from ML patients exhibited a reduction in arginase activity upon IGF-I stimulation (Figure 1B).

4. Discussion

Interestingly, the basal arginase activity of *L. (V.) braziliensis* isolates derived from ML patients, presenting more destructive lesions, was greater than those from CL and DL patients. We suspect that the majority of *L. (V.) braziliensis* isolates that were present in ML patients were different from the beginning. However high arginase activity was not found in any of CL samples in the present study as may be expected. This was probably due to the relatively small sample size since it is known that only 3% of CL patients will develop mucosal disease. High arginase activity of isolates from ML cases suggests that this characteristic favored the development of mucosal lesions and contributed to the survival and proliferation of *Leishmania* in a hostile environment. Interestingly, in isolates from ML cases, no increase, and in some cases, even a reduction in arginase activity, was documented upon IGF-I stimulus, and it may be that they were already maximally activated limiting further stimulation.

In DL cases, the arginase activity of *Leishmania* isolates was similar to that of CL cases. Addition of IGF-I increased arginase activity in both CL and DL isolates, but it increased

Figure 1. Arginase activity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolates from patients with cutaneous (A), mucosal (B) and disseminated (C) leishmaniasis with and without insulin-like growth factor (IGF) I-stimulus. Stationary phase *Leishmania* promastigotes were maintained in culture with or without IGF-I stimulus (50 or 100 ng/ml) for 5 min then washed and lysed. The arginase activity was then measured as the urea concentration. Data (mean $\pm$ SD) are presented as units of enzyme activity, which are equal to the amount of enzyme that is needed to catalyze the formation of 1 μ mol urea/min. Results are from one representative experiment (two similar experiments were performed). * $P < 0.05$ in relation to the arginase values of controls (isolates not exposed to IGF-I stimulation) in the same group. # $P < 0.05$ in relation to the basal arginase values of other groups.

more in parasites from DL isolates, and it reached levels similar to the basal arginase activity of ML isolates. This is important because up to 30% of patients with DL eventually develop mucosal disease⁶ suggesting a role of IGF-I to this outcome.

In this study, we showed that arginase activity differs among clinical isolates of the *L. (V.) braziliensis* species and that these differences may influence disease outcome in

patients with *L. (V.) braziliensis* infection. As far as we know, this is the first time a parasite factor has been identified that is thought to be related to the different clinical presentations that occur in ATL.

Authors' contributions

CMVV, EMC and HG conceived and designed the study; KS isolated, cultivated and characterized the isolates; CMVV, LDS and MDTC performed the experiments; CMVV, HG, LDS and MDTC analyzed and interpreted the data; CMVV, EMC and HG drafted and revised the article. All authors contributed to and read and approved the final manuscript, CMVV and HG are guarantors of the paper.

Funding: This study was supported by FAPESB (research fellowship 1780-2007 to CMVV), FAPESP (fellowship 2008/2209-6 to LDS), CNPq (fellowship to EMC and HG, and grant 484499/2006) and the Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia LIM/38 (HC-FMUSP).

Conflicts of interest: None declared.

Ethical approval: This study was approved by the ethical committee of Maternidade Clémio de Oliveira-Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil. Signed informed consent was obtained from all patients.

References

- Schriefer A, Schriefer AL, Gons-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, et al. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Immun* 2004;72:508–14.
- Vendrame CM, Carvalho MD, Rios FJ, Maruli ER, Petito-Alexis F, Goto H. Effect of insulin-like growth factor-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage in vitro. *Scand J Immunol* 2007;66:287–96.
- Goto H, Gomes CM, Corbett CE, Monteiro HP, Gillund M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13211–6.
- Kropf P, Fuentes JM, Fahrnich E, Arpa L, Herath S, Weber V, et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *Parasit* 2005;119:1000–2.
- Wanawen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res* 2008;41:15–25.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 2002;186:1829–34.

REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

Augusto O, Linares E, Giorgio S. Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29: 853-862.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro De Jesus A, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002; 70:6734-6740.

Baldwin T, Henri S, Curtis J, O'Keeffe M, Vremec D, Shortman K, et al. Dendritic cell populations in *Leishmania* major-infected skin and draining lymph nodes. *Infect Immun.* 2004; 72:1991-2001.

Balestieri FM, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Netto M, Abrahamsohn IA. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes and Infection.* 2002; 4(1):23-29.

Barcinski MA, Schechtman D, Quintão LG, Costa DA, Soares LRB, Moreira, MEC, Charlab R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the infectivity of *L. amazonensis* by protecting promastigote from heat-induced death. *Infect Immun.* 1992; 60(9):3523-3527.

Barilli A, Rotoli BM, Visigalli R, Bussolati O, Gazzola GC, Dall'Asta V. Arginine transport in human monocytic leukemia THP-1 cells during macrophage differentiation. *J Leukoc Biol.* 2011; 90(2):293-303.

Barral-Netto M, Barral A. Transforming growth factor-beta in tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1994; 27:1-9.

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

Callahan HL, Portal IF, Besinger SJ, Grogl M. *Leishmania* spp: temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for tropism in vivo. *Exp Parasitol.* 1996; 84(3): 400-409.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and disseminated immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 1994; 56: 315-325.

Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53(3): 273-277.

Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods.* 1994; 174:231-235.

Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M. Arginase Induction by Suppressors of Nitric Oxide Synthesis (IL-4, IL-10 and PGE₂) in Murine Bone-Marrow-Derived Macrophages. *Biochem and Biophys Res Commun.* 1995; 206 (2):667-673.

Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O. *Leishmania (Viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Exp Parasitol.* 2004; 108: 59-66.

Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol.* 2002; 72:132-141.

Cupolillo E, Grimaldi GJr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50:296-311.

Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 2010; 5(1):e8668.

Dasgupta B, Roychoudhury K, Ganguly S, Akbar MA, Das P, Roy S. Infection of human mononuclear phagocytes and macrophage-like THP1 cells with *Leishmania donovani* results in modulation of expression of a subset of chemokines and a chemokine receptor. *Scand J Immunol.* 2003; 57(4):366-374.

- Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*. 2002; 34(11):E54-58.
- Gaur U, Roberts SC, Dalvi RP, Corraliza I, Ullman B, Wilson ME. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*. 2007; 179(12):8446-8453.
- Gebre-Hiwot A, Tadesse G, Croft SL, Frommel D. An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Trop*. 1992; 51:237-245.
- Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol*. 2000; 22: 319-331.
- Gomes CMC, Monteiro HP, Gidlund M, Corbett CEP, Goto H. Insuline-like growth factor-1 (IGF)-I induces phosphorylation in *Leishmania (Leishmania) mexicana* promastigotes and amastigotes. *J Euk Microbiol*. 1998; 45:352-355.
- Gomes CMC, Goto H, Ribeiro Da Matta VL, Laurenti MD, Gidlund M, Corbett CEP. Insulin-like growth factor (IGF)-I affects parasite and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *Int J Exp Path*. 2000; 81:249-255.
- Goto H, Gomes CMC, Corbett CEP, Monteiro HP, Gidlund M. Insulin-like growth factor (IGF)-1 is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Proc Natl Acad Sci*. 1998; 95:13211-13216.
- Goto H, Lauletta Lindoso, JA. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis *Infect Dis Clin North Am*. 2012; 26(2):293-307.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannanbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126:131-138.
- Hatzoglou M, Fernandez J, Yaman I, Closs E. Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter. *Annu Rev Nutr*. 2004; 24:377-399.

Hill JO, North RJ, Collins FM. Advantages of measuring changes in the number of viable parasites in murine models of experimental cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 1983; 39(3):1087–1094.

Indiani de Oliveira C, Teixeira MJ, Teixeira CR, Ramos de Jesus J, Bomura Rosato A, Santa da Silva J, et al. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect*. 2004; 6(11):977-984.

Iniesta V, Gómez-Nieto C, Corraliza I. The inhibition of arginase by N^ω-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med*. 2001; 193(6):777-783.

Jones JI, Clemmons D. Insulin-like Growth Factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Rev*. 1995; 16:03-34.

Kropf P, Fuentes JM, Fahnrich E, Arpa L, Herath S, Weber V, et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J*. 2005; 19(8):1000-1002.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick, R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987, p. 1-120.

Lainson R, Shaw J J. New World Leishmaniasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, Topley and Wilson's. *Microbiology and Microbial Infections: Parasitology*. London: Hodder Arnold, 2005. v. 2, cap. 17, p. 314-349.

Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*. 1990; 144(12):4794-4797.

Michalick MSM. Gênero *Leishmania*. In: Neves DP. *Parasitologia Humana*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2002. cap. 7, p. 31-35.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.

- Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275(3):715-719.
- Mosser DM, Brittingham A. *Leishmania*, macrophages and complement of subversion and exploitation. *Parasitology.* 1997; 115:S9-23.
- Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol.* 1998; 160(11):5347-5354.
- Murray HW. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *J. Exp. Med.* 1981; 153 (5): 1302-1315.
- Nagaoka I, Trapell BC, Crystal RG. Regulation of insulin-like growth factor-I gene expression in the human macrophage cell line U937. *J Clin Invest.* 1990; 85:448-455.
- Pereira CG, Silva AL, de Castilhos P, Mastrantonio EC, Souza RA, Romão RP, Rezende RJ, Pena JD, Beletti ME, Souza MA. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Vet Parasitol.* 2009;165(3-4):231-240.
- Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:937-954.
- Rey L. *Parasitologia.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990; 65(3):111-125.
- Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (22):23668-23678.
- Sacks DL, Louis JA, Wirth DF. Immunology and molecular biology of parasitic infections. In: Warren KS. *Leishmaniasis*. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1993. p. 237-268.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(11):845-858.

Schriefer A, Schriefer AL, Goes-Neto A, Guimaraes LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun*. 2004; 72(1): 508-514.

Scott P, Farrel JP. Experimental Cutaneous Leishmaniasis: Induction and Regulation of T Cells following Infection of Mice with *Leishmania major*. *Chem Immunol*. 1998; 70:60-80.

Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A, Lemesre JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(12):3097-3102.

Sharp LL, Jameson JM, Cauvi G, Havran WL. Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor I. *Nat Immunol*. 2005; 6:73-9.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(3): 239-251.

Tavakkol A, Varani J, Elder JT, Zouboulis CC. Maintenance of human skin in organ culture: role for insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor. *Arch Dermatol Res*. 1999; 291:643-651.

Teixeira MJ, Fernandes JD, Teixeira CR, Andrade BB, Pompeu ML, Santana da Silva J, et al. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infection and Immunity*. 2005; 73: 1191-1195.

Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by a Phorbol Diester. *Câncer Research*. 1982; 1530-1536.

- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002; 186(12):1829-1834.
- van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 2004; 73(11):6521-6525.
- Vendrame CMV, Carvalho MDT, Rios FJO, Petito F, Manulli ER, Goto H. Effect of insulin-like growth factor (IGF)-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage in vitro. *Scand Journal of Immun.* 2007; 66:287-296.
- Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res.* 2008; 41(1):15-25.
- Wang WW, Jenkinson CP, Griscavage JM, Kern RM, Arabolos NS, Byrns RE, et al. Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 210(3):1009-1016.
- World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva. 2010.
- Wu G, Morris Jr, SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998; 336:1-17.
- Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, McLeod C, et al. Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. *Eur J Immunol.* 2006; 36(6):1516-1526.
- Yoshida N, Camargo P. Ureotelism and Ammonotelism in Trypanosomatids. *J of Bacteriology.* 1978; 136 (3) 1184-1186.