



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de Fevereiro de 1808



Monografia

Papel de Eicosanóides na Resposta Inflamatória da Leishmaniose Difusa

Daniela Conceição Santos de Campos

Salvador (Bahia), 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA
UNIVERSITÁRIA DE SAÚDE, SIBI - UFBA.**

C871 Campos, Daniela Conceição Santos de
Papel de eicosanóides na resposta inflamatória da
leishmaniose difusa / Daniela Conceição Santos de Campos. –
Salvador, 2012.

34 f.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Aldina Maria Prado Barral

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) –
Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da
Bahia, 2012.

1. Medicina. 2. Leishmaniose Difusa. 3. Eicosanóides. I.
Campos, Daniela Conceição Santos de. II. Universidade
Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de Fevereiro de 1808



Monografia

Papel de Eicosanóides na Resposta Inflamatória da Leishmaniose Difusa

Daniela Conceição Santos de Campos

Professor-orientador: Dra. Aldina Maria Prado Barral

Monografia de conclusão do componente curricular MED-B60, do currículo médico da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina da FMB-UFBA.

Salvador (Bahia), 2012

Monografia: **Papel de Eicosanóides na Resposta Inflamatória da Leishmaniose Difusa**

Daniela Conceição Santos de Campos
Professor-orientador: Aldina Maria Prado Barral
Co-orientadoras: Dra. Valéria de Matos Borges
Ma. Jaqueline França Costa

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Deboraci Brito Prates, Professora do ICS-UFBA.
- Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira, Professora da FMB-UFBA

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO: Monografia aprovada pela Comissão, e julgada apta à apresentação pública no III Seminário Estudantil da Faculdade de Medicina da Bahia, com posterior homologação do registro final do conceito (apto ou não apto), pela coordenação do Núcleo de Formação Científica. Chefia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMB-UFBA.

Salvador (Bahia), 2012

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho.

A minha família, em especial a minha mãe Marinalva, pelo apoio, carinho e pelo investimento na minha educação.

A minha orientadora, Dra Aldina Barral, pela oportunidade de realizar Iniciação Científica na FIOCRUZ.

As minhas co-orientadoras, Valéria Borges e Jaqueline França, pelas cobranças, pelos conselhos e por me transmitirem uma parte dos seus vastos conhecimentos

A Viviane Boaventura, pelos ensinamentos e contribuições durante esse trabalho.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Aos colegas do LIM/LIP, pelo ambiente de trabalho agradável.

A meus colegas da faculdade, pelo apoio, e a Murilo Oliveira, pela amizade e pelo auxílio fundamental à realização desse trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	02
ABREVIACÕES	03
RESUMO	04
INTRODUÇÃO	05
Aspectos Gerais da Leishmaniose	05
Leishmaniose Cutânea Difusa	07
Resposta macrofágica à infecção por Leishmania	08
Eicosanóides	08
HIPÓTESE E OBJETIVO	11
MATERIAIS E MÉTODOS	12
RESULTADOS	14
Avaliação in situ da COX-2, 5-LO e Arginase	14
Dosagem no soro de mediadores lipídicos e citocinas.	18
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO	22
SUMMARY	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXOS	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de Vida de <i>Leishmania SP</i>	06
Figura 2. Expressão de COX- 2 em pacientes com LCD e LCL	15
Figura 3. Expressão de 5-LO em pacientes com LCD e LCL	16
Figura 4. Expressão de Arginase em pacientes com LCD e LCL	17
Figura 5. Dosagem no soro de mediadores lipídicos e citocinas	19

ABREVIACÕES

COX Cicloxigenase

IFN- γ Interferon- γ

Ig Imunoglobulina

IL-1 β Interleucina 1 β

IL-2 Interleucina 2

IL-4 Interleucina 4

IL-10 Interleucina 10

IL-12 Interleucina 12

iNOS óxido nítrico sintase induzível

LCD Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL Leishmaniose Cutânea Localizada

LCM Leishmaniose Cutânea Mucosa

LO Lipoxigenase

LTA Leishmaniose Tegumentar Americana

LTB Leucotrieno

LV Leishmaniose Visceral

PG Prostaglandina

TGF- β Fator transformante de crescimento β

Th célula T auxiliadora

TNF- α Fator de Necrose Tumoral α

RESUMO

A Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) é uma forma rara de manifestação da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), porém de grande gravidade, devido a sua natureza crônica e maciço comprometimento dérmico. No Brasil, essa forma clínica é causada exclusivamente por *Leishmania (L.) amazonensis*. Imunologicamente, caracteriza-se por um predomínio de resposta com perfil Th2, com presença de inúmeros macrófagos vacuolizados intensamente parasitados. Alguns estudos mostram que eicosanóides podem desempenhar um papel crucial na infecção experimental por *Leishmania*. Entretanto, pouco se sabe da participação desses mediadores inflamatórios na patogênese da LCD. Nesse trabalho investigamos o perfil de eicosanóides, enzimas e citocinas associadas à resposta inflamatória em pacientes com LCD através de imunohistoquímica e dosagens sorológicas. Nossos resultados imunohistoquímicos evidenciaram uma maior expressão de COX-2, 5-LO e arginase na lesão de paciente com LCD, os quais reduziram após tratamento, assemelhando-se à expressão encontrada na lesão de paciente com Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL). A nível sistêmico, observou-se baixa produção de citocinas do perfil Th1 (TNF- α , IFN- γ e IL-12) e concentração elevada de TGF- β e arginase no soro de pacientes com LCD, quando comparados a pacientes com LCL e com controles endêmicos. A razão entre PGE₂ /LTB₄ também se mostrou significativamente elevada nesses pacientes. Nossos achados sugerem que os eicosanóides podem estar envolvidos no estabelecimento de uma resposta imune anti-inflamatória, com desvio do metabolismo da L-arginina para a via da arginase em pacientes com LCD. Esses resultados fornecem uma perspectiva de novos alvos terapêuticos no controle da doença.

INTRODUÇÃO

Aspectos Gerais da Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença parasitária de transmissão vetorial que possui como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania*. Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a doença, e cerca de 2 milhões de novos casos ocorram anualmente (WHO, 2010). Sua relevância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e incapacitantes, com graves repercussões na vida do indivíduo (Gontijo et al, 2003).

As leishmanias apresentam um ciclo de vida digenético: no estágio extracelular, as promastigotas se multiplicam e se desenvolvem dentro do trato digestivo dos insetos vetores, os flebotomíneos, enquanto as amastigotas, formas intracelulares, residem e se multiplicam nos vacúolos fagolisossomais de macrófagos de mamíferos (revisado em Mougneau et al, 2011). A transmissão da leishmania para hospedeiros vertebrados ocorre durante o repasto sanguíneo quando a fêmea do flebótomo infectada com o parasita inocula na pele formas promastigotas metacíclicas. Dentro das células do sistema fagocitário, essas promastigotas se transformam em amastigotas, se multiplicam, rompem essas células e infectam novos macrófagos. Ao picar um hospedeiro vertebrado contaminado, os flebotomos ingerem sangue infectado por células contendo amastigotas. No intestino do inseto, as amastigotas se diferenciam em promastigotas e migram para a probóscide, sendo transmitida para um novo hospedeiro no momento da picada (Fig.1).

A leishmaniose pode se manifestar basicamente em duas formas clínicas: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral (LV). Essa diferença na apresentação depende da espécie de leishmania envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro (Gontijo *et al*, 2003).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma endemia mundialmente negligenciada e constitui-se um importante problema de Saúde Pública atingindo 88 países. Em sete deles concentram-se 90% dos casos: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (Desjeux, 2004). No Brasil, no período de 1988 a 2009, a LTA apresentou média anual de 26.021 casos registrados e coeficiente de detecção médio de 14,1 casos por

100.000 habitantes. Ao longo desse período, observou-se uma tendência de crescimento dessa endemia. (Ministério da Saúde – Portal da Saúde, acessado em março de 2012)

As três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA em humanos no Brasil são a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Ministério da Saúde, 2007). Apresentam como vetores insetos hematófagos da subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia*, conhecidos como flebótomos (Gil *et al*, 2003).

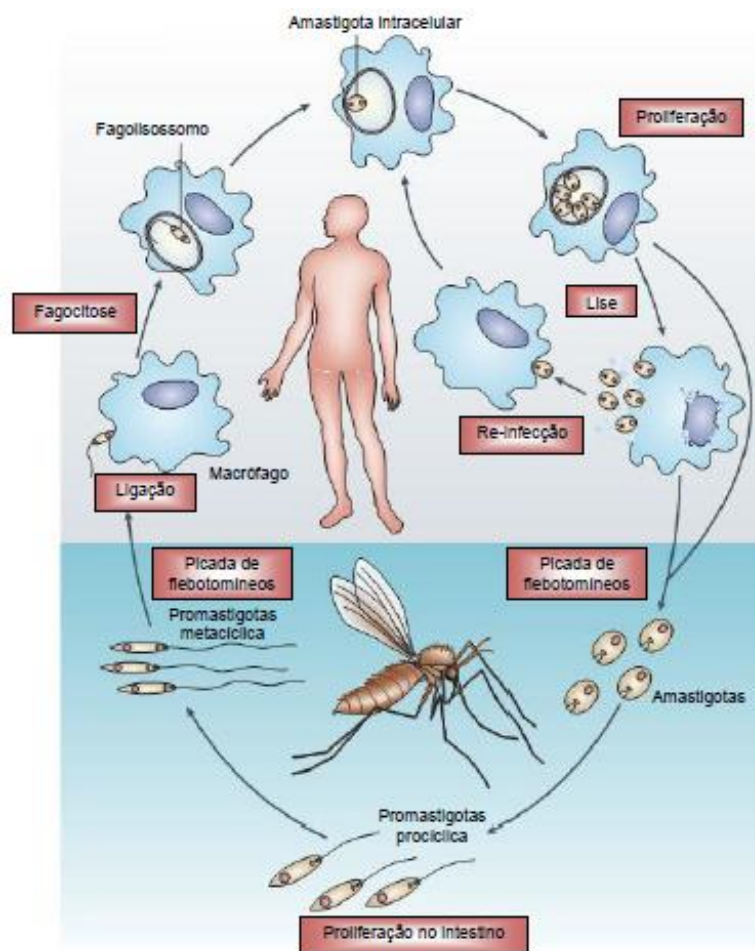


Figura 1. Ciclo de Vida de *Leishmania sp*

Fonte: Adaptada (CHAPPUIS, 2007).

A LTA pode se apresentar como Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM) e Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD). No centro do espectro clínico-imunológico da LTA, a LCL é a forma mais freqüente e pode ser causada por

L. braziliensis, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. É constituída por uma ou mais lesões cutâneas ulceradas, mantidas por uma eficiente resposta de células T, que geralmente favorece uma boa reação à terapia antimonial tradicional. A LCM, o polo hiperérgico da doença, é caracterizada imunologicamente pelo exagero das respostas celulares anti-*Leishmania* e pela escassez de parasitas nas lesões da mucosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Já na forma clínica anérgica, a LCD, as lesões de pele nodulares disseminadas em todo corpo são marcadas por uma elevada produção de IL-4, resultando em um fraco controle imune da infecção pelas células T e uma resolução inadequada ao tratamento tradicional por antimonialato pentavalente (Silveira *et al*, 2009).

Leishmaniose Cutânea Difusa

A LCD representa uma forma rara da LTA. Entretanto, por causa das consequências estigmatizantes para o paciente, é reconhecida como um importante problema de saúde pública (Desjeux, 2004). No Brasil é causada exclusivamente pela *L. amazonensis* (Ministério da Saúde, 2007).

A doença geralmente inicia-se com uma lesão primária e única que em seguida dissemina-se envolvendo outras áreas do corpo (Grevelink *et al*, 1996). As lesões apresentam-se como eritemas, pápulas, tubérculos, nódulos, infiltrações difusas e aspecto tumoral (Costa *et al*, 2009). Suas lesões nodulares e infiltrações cutâneas pronunciadas simulam quadro de hanseníase virchowiana (Pearson *et al*, 1996). Uma característica marcante na LCD é o teste de Intradermo Reação de Montenegro (IDRM) negativo.

A LCD progride lentamente e pode persistir por décadas (Pearson *et al*, 1996). As lesões em geral não cicatrizam de forma espontânea e são classicamente resistentes ao tratamento medicamentoso (Gontijo *et al*, 2003). Após vários esquemas terapêuticos anti-*Leishmania*, os pacientes com LCD apresentam respostas clínicas caracterizadas por significativa redução de lesões cutâneas, mas praticamente todos têm recidiva alguns meses após a terapia (Costa *et al*, 1992).

Alguns trabalhos têm mostrado que na LCD predomina uma resposta imunológica do tipo Th2. Silveira e cols. (2004) evidenciaram baixa expressão de IFN- γ contrastando com a elevada quantidade de mRNA de IL-4 nas mesmas amostras de lesões cutâneas de pacientes com LCD. Bomfim e cols. (1996) demonstraram que durante a doença ativa, células do

sangue periférico de pacientes com LCD não expressam mRNA para IFN- γ , contudo possuem altos níveis de mRNA para IL-2, IL-4 e IL-10. Entretanto observou-se que após indução da cicatrização das lesões cutâneas pós-tratamento, ocorre uma expressão de IFN- γ e diminuição de IL-10. Outras citocinas também estão envolvidas no estado anérgico da LCD. O TNF- α , um importante potencializador do IFN- γ , encontra-se reduzido no soro de pacientes com LCD quando comparados com pacientes com LCM (Castes et al, 1993).

No modelo experimental, Barral-Netto e cols.(1992) demonstraram um aumento na produção de TGF- β por macrófagos peritoneais e em tecidos da pata de camundongos infectados por *L. amazonensis*, assim como um aumento das lesões de camundongos onde foi administrado TGF- β exógeno (revisado em Barral *et al*, 2009)

O estudo microscópico revela nas lesões ativas da LCD um quadro monótono constituído por macrófagos vacuolados e repletos de parasitas, obscurecendo estruturas da derme e da hipoderme (Convit *et al*, 1972). Nas lesões que envolvem espontaneamente ou por ação de tratamento, observa-se acentuação do infiltrado linfoplasmocitário e áreas de fibrose e necrose (Bittencourt, 2009).

Resposta macrofágica à infecção por Leishmania

Os macrófagos são as principais células parasitadas durante a infecção por *Leishmania*. A sobrevivência desse parasita dentro dos macrófagos depende de diversos fatores, dentre os quais se destaca a L-arginina, substrato de duas enzimas que desempenham papéis opostos: a óxido nítrico sintase (iNOS) e a arginase. A iNOS é induzida por citocinas Th1 e oxida a L-arginina em óxido nítrico, responsável pela morte do parasita dentro da célula. As citocinas do perfil Th2 induzem a expressão de arginase, que ao degradar a L-arginina, leva a produção de poliaminas necessárias à sobrevivência das amastigotas dentro dos macrófagos. Dessa forma, esta enzima possui um papel importante na manutenção da infecção por *Leishmania* (revisado em Das *et al*, 2010; Wanasen *et al*, 2008).

Eicosanóides

Eicosanóides são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico liberado de fosfolipídios da membrana celular (Park *et al.*, 2006) após ativação

por trauma, citocinas específicas, complexos imunes e outros mediadores (Funk, 2001). O ácido araquidônico liberado pode ser metabolizado por diversas vias dando origem às prostaglandinas (PGs), tromboxanos, lipoxinas e aos leucotrienos (LTB) (Peters-Golden, 2007). As principais enzimas envolvidas nesse processo são as cicloxigenases (COX) e as lipoxigenases (LO).

O ácido araquidônico é convertido a prostaglandina intermediária PGH₂ pela ação da prostaglandina sintase, mais comumente conhecida como cicloxigenase (COX) (revisado em Harris *et al.*, 2002). Essa enzima pode se apresentar em duas formas: COX-1, expressa constitutivamente, e COX-2, com expressão induzível em processos inflamatórios (Funk, 2001). O produto da ação da COX-2, a PGH₂, pode ser convertido em diversos tipos de prostanóides, sendo a PGE₂ o mais abundante no corpo humano. Esta, dependendo do contexto, pode exercer um papel homeostático, pró-inflamatório ou anti-inflamatório (Park *et al.*, 2006). No tocante à infecção com microorganismos, a produção de prostaglandina E₂ tem sido associada ao aumento da produção de cAMP, supressão da resposta imune do hospedeiro com a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-2 e IL-1 β . Em contrapartida, a PGE₂ é capaz de induzir a produção de citocinas de perfil Th₂, bem como IL-10, IL-4 e imunoglobulinas do tipo IgE e IgG1 (revisado em Harris *et al.*, 2002).

Mediadores lipídicos desempenham um papel crucial na infecção por *Leishmania*. A interação *in vitro* entre macrófagos infectados e neutrófilos apoptóticos no modelo experimental murino (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2005) e em células humanas (Afonso *et al.*, 2008) resultou no sucesso da infecção por *Leishmania* e aumento da carga parasitária por um mecanismo de supressão da resposta imune dependente da produção de PGE₂ e TGF- β . PGE₂ exógeno também foi capaz de aumentar a carga parasitária em macrófagos de BALB/c infectados com *L. amazonensis* (Pinheiro *et al.*, 2009).

Além do metabolismo da COX, o ácido araquidônico também pode ser metabolizado pela via da 5-lipoxigenase, resultando na produção de leucotrienos e lipoxinas. Os leucotrienos possuem um papel tipicamente pró-inflamatório, com o potencial de quimioatrair leucócitos e fagócitos e aumentar a capacidade microbicida dos mesmos (revisado por Peters-Golden, 2005). Em contrapartida, as lipoxinas atuam inibindo a migração de neutrófilos e estimulando a quimiotaxia de macrófagos que, no entanto não geram ânions superóxidos nem degranulam na presença desse mediador (Lawrence, 2002). A presença de pequenas doses de

LTB₄ levou à redução da carga parasitária durante a infecção por *Leishmania amazonensis* em macrófagos peritoneais murinos, em um mecanismo associado ao aumento da produção de óxido nítrico (Serezani et al., 2006).

Embora hajam evidências na literatura da importância de eicosanóides e da enzima arginase na infecção experimental por *Leishmania* (Millano *et al*, 1996), pouco se sabe da participação desses mediadores na patogênese da LCD. Nesse trabalho buscaremos investigar o perfil de eicosanóides, citocinas e enzimas associadas à resposta inflamatória em pacientes com LCD.

HIPÓTESE

Os eicosanóides e enzimas associadas na sua produção participam da patogênese da Leishmaniose Cutânea Difusa.

OBJETIVOS

- 1- Imunolocalizar as enzimas COX-2, 5-LO e Arginase em cortes histológicos de amostras de lesões de pacientes com LCD e LCL.
- 2- Avaliar a produção de PGE₂, LTB₄ e Arginase no soro de pacientes com LCD, LCL e controle da área endêmica
- 3- Averiguar o perfil de citocinas no soro de pacientes com LCD, LCL e controle da área endêmica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

Foram analisados 12 soros e 2 amostras de lesões de pacientes com LCD, provenientes do Maranhão, e 30 soros e 1 amostra de lesão de pacientes com LCL, provenientes do Vale de Jiquiriçá (Ba). As amostras de lesões de LCD são de um mesmo paciente, sendo uma de lesão ativa e a outra de lesão em remissão. A avaliação clínica dos pacientes foi feita nos postos de saúde do município onde os mesmos residem, por uma equipe de médicos coordenada por Dr. Jackson Costa e Dra. Aldina Barral. Também foi analisado o soro de 49 parentes dos pacientes com Leishmaniose Cutânea Difusa, constituindo o controle da área endêmica. Foram realizadas coleta de sangue periférico e de amostras das lesões, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos pacientes ou pelos seus tutores e todos os procedimentos foram aprovados pela Comitê de Ética de Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz licenciado sob número 136/2007.

Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi utilizada para detecção de arginase e enzimas chaves na produção de eicosanóides nas amostras de lesão de pacientes com Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL). Secções em parafina foram obtidas em lâminas ImunoSlide, sendo em seguida realizada desparafinização, que consiste em: 3 lavagens em xilol e 2 em acetona; reidratação gradual, com lavagens em álcool (100%, 70%, 50% e 30%), água corrente e água destilada; e recuperação antigênica com incubação em tampão citrato à 100°C por 30 min. Depois de esfriar em temperatura ambiente no tampão citrato, as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio à 3% por 20 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, foram lavadas com PBS 1X, sendo posteriormente incubadas em leite desnatado à 3% por 60 min para bloqueio de sítios de ligações inespecíficos. As lâminas foram então lavadas com PBS 1X e incubadas overnight à 4°C com anticorpos primários contra Arginase I (2 ug/ml) - Santa Cruz Biotechnology, INC; COX-2 (2 ug/ml) e 5-LO (4 ug/ml) – ambos provenientes da Cayman Chemical, Ann Arbor, MI. IgG de camundongo não imunizado serviu como controle negativo. Após 20 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram lavadas com tampão e incubadas com anticorpo secundário biotinizado Advance HRP-Link (DAKO, Cambridge, UK) por 30 minutos, seguido

de incubação com Advance HRP-Enzyme por mais 30 minutos. Foi realizada revelação com 3,30-diaminobenzidina (DAKO, Cambridge, UK) e contracoloração com Hematoxilina.

Foram obtidas imagens digitais das seções em 5 campos no aumento de 400x, capturadas utilizando microscópio Nikon E600 e câmara digital Q-Color 1 Olympus. Posteriormente foi quantificada a área marcada utilizando o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) e o resultado foi expresso em média da % área marcada/campo \pm desvio padrão.

Dosagens sorológicas

A dosagem de PGE₂, LTB₄, Arginase, TGF- β , TNF- α , IL-12, INF- γ foi realizada no soro de pacientes com LCL, pacientes com LCD e controles da área endêmica. Foi utilizada a técnica de ELISA para a dosagem sérica de PGE₂, LTB₄, Arginase e TGF- β de acordo com as instruções do fabricante (PGE₂ e LTB₄ - Cayman Chemical, Ann Arbor, MI; Arginase – Hycult biotech, Netherland; TGF- β - R&D Systems, Minneapolis, MN). Os níveis séricos de TNF- α , IL-12 e INF- γ foram mensurados utilizando kit Inflamatório Humano Cytometric Bead Array (CBA) de acordo com o protocolo do fabricante (BD Biosciences, California, USA). A concentração foi determinada pela comparação com a curva padrão gerada de cada citocina.

Análise estatística

Os dados da dosagem sorológica são reportados como mediana e intervalo interquartil de experimentos representativos. O resultado da quantificação da porcentagem da área marcada é expresso como média \pm desvio padrão. Ambos os resultados foram analisados utilizando GraphPad Prism 5.0. As diferenças entre os grupos foram calculadas usando teste Mann-Whitney não-paramétrico ou teste de Wilcoxon. A diferença foi considerada estatisticamente significativa com $p < 0.05$.

RESULTADOS

Expressão *in situ* da COX-2, 5-LO e Arginase em pacientes com LCD

A participação dos eicosanóides na patogênese da Leishmaniose Cutânea Difusa foi investigada *in situ* através da realização de imunohistoquímica para as enzimas COX-2 e 5-LO em seções de pele e pacientes com LCL e com LCD (pré-tratamento e pós-tratamento) (Fig. 2, 3 e 4).

Na figura 2 é possível observar que a lesão ativa do paciente com LCD apresentou uma expressão mais elevada de COX-2 em comparação com a lesão do paciente com LCL. Mesmo após o tratamento, a quantidade dessa enzima se mantém maior nos pacientes com LCD. Quando se analisou a expressão de 5-LO, foi observada maior expressão em paciente com LCD em comparação ao paciente com LCL (Fig.3).

Também foi avaliada a expressão da arginase, uma enzima associada à sobrevivência das amastigotas dentro dos macrófagos infectados por *Leishmania* (Fig.4). Foi observada uma maior porcentagem de área marcada expressando essa enzima em pacientes com LCD quando comparados com pacientes com LCL, que possuem uma melhor resposta à presença do parasita. Após o tratamento do paciente com LCD, não houve diminuição da significante da quantidade da enzima expressa no tecido, sugerindo que a presença da mesma na lesão pode ser importante para a manutenção da doença.

Figura 2. Expressão de COX- 2 em pacientes com LCD e LCL

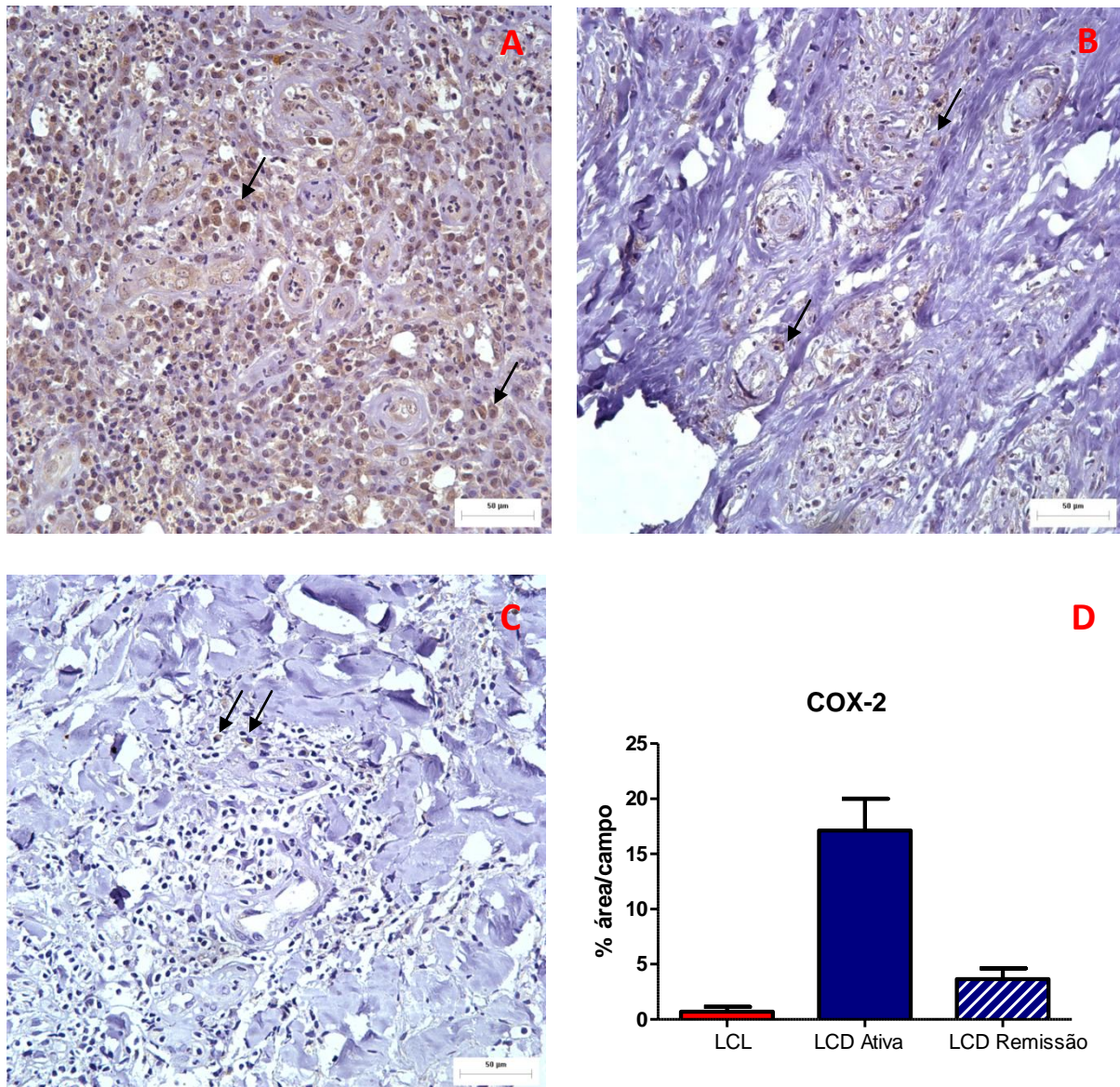


Figura 2. Imunolocalização da enzima COX-2 em paciente com LCD pré-tratamento (A) e pós-tratamento (B) e em paciente com LCL (C). Seções de pele obtida de amostra de lesões de pacientes com LCL e com LCD pré- e pós- tratamento foram preservadas em parafina, e a expressão de COX-2 foi investigada por imunohistoquímica. As lâminas foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) e contrastadas com hematoxilina. A coloração marrom mostra a expressão dessas enzimas. Aumento: 400x. O gráfico (D) representa o percentual de área marcada por campo, realizada utilizando o software Image-Pro Plus e o GraphPad Prism 5.0. As diferenças entre os grupos foram calculadas usando teste Mann-Whitney não-paramétrico ou teste de Wilcoxon, com $p < 0.05$ considerado significativo.

Figura 3. Expressão de 5-LO em pacientes com LCD e LCL

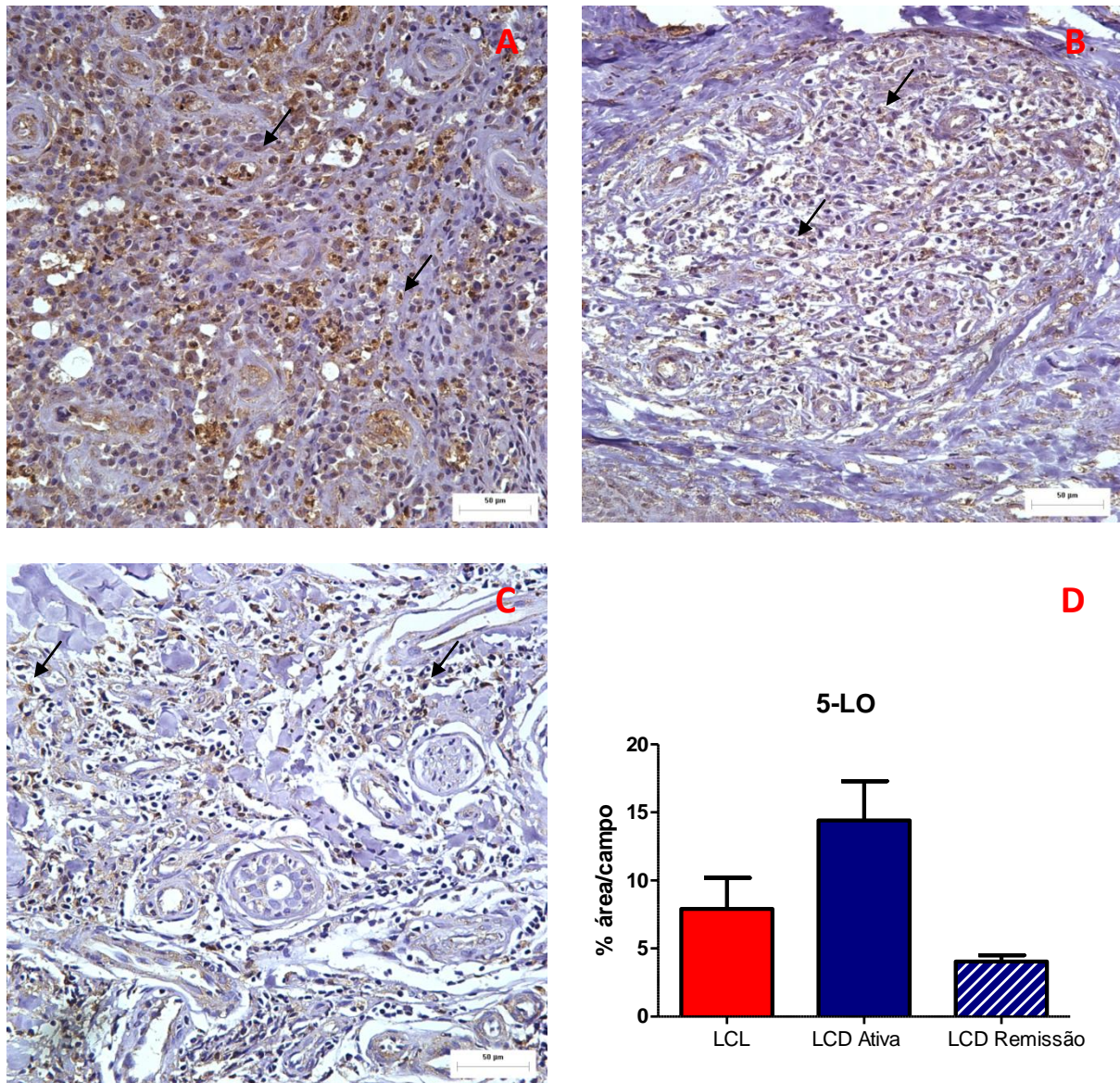


Figura 3. Imunolocalização da enzima 5-LO em paciente com LCD pré-tratamento (A) e pós-tratamento (B) e em paciente com LCL (C). Seções de pele obtida de amostra de lesões de pacientes com LCL e com LCD pré- e pós- tratamento foram preservadas em parafina, e a expressão de COX-2 foi investigada por imunohistoquímica. As lâminas foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) e contrastadas com hematoxilina. A coloração marrom mostra a expressão dessas enzimas. Aumento: 400x. O gráfico (D) representa o percentual de área marcada por campo, realizada utilizando o software Image-Pro Plus e o GraphPad Prism 5.0. As diferenças entre os grupos foram calculadas usando teste Mann-Whitney não-paramétrico ou teste de Wilcoxon, com $p < 0.05$ considerado significativo.

Figura 4. Expressão de Arginase em pacientes com LCD e LCL

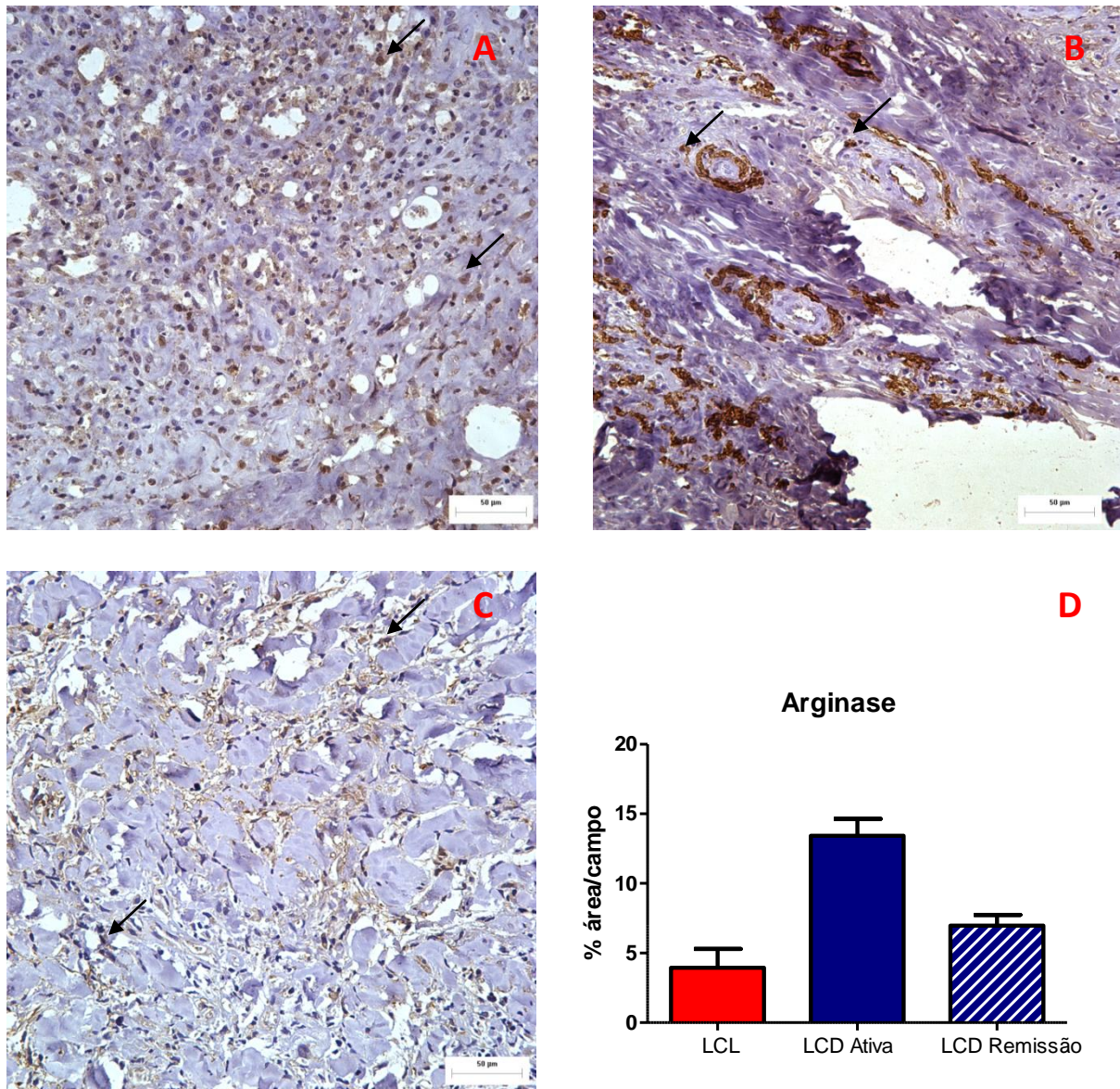


Figura 4. Imunolocalização da enzima Arginase em paciente com LCD pré-tratamento (A) e pós-tratamento (B) e em paciente com LCL (C). Seções de pele obtida de amostra de lesões de pacientes com LCL e com LCD pré- e pós- tratamento foram preservadas em parafina, e a expressão de COX-2 foi investigada por imunohistoquímica. As lâminas foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) e contrastadas com hematoxilina. A coloração marrom mostra a expressão dessas enzimas. Aumento: 400x. O gráfico (D) representa o percentual de área marcada por campo, realizada utilizando o software Image-Pro Plus e o GraphPad Prism 5.0. As diferenças entre os grupos foram calculadas usando teste Mann-Whitney não-paramétrico ou teste de Wilcoxon, com $p < 0.05$ considerado significativo.

Dosagem no soro de mediadores lipídicos e citocinas

Para avaliar a presença sistêmica dos eicosanóides na LCD, foi feita a dosagem de dois produtos do metabolismo do ácido araquidônico, PGE₂ e LTB₄, no soro dos pacientes com leishmaniose e nos controles da área endêmica. A PGE₂ mostrou-se elevada no soro de pacientes com LCD quando comparados aos controles saudáveis da área endêmica (p=0,003) (Fig.5.1-B). Entretanto, não houve diferença significativa na quantidade em pacientes com LCD em relação aos pacientes com LCL (Fig.5.2-B). Quanto ao produto da via da 5-LO, não houve diferença estatisticamente significativa na proporção de LTB₄ no soro de pacientes com LCD confrontada aos outros dois grupos (Fig. 5.1-C e 5.2-C). A razão entre PGE₂ e LTB₄ sérico, por sua vez, apresentou-se maior em pacientes com LCD do que nos outros dois grupos (p=0,0001) (Fig. 5.1-D e 5.2-D).

Na infecção por *Leishmania*, a arginase desempenha um papel essencial na sobrevivência e multiplicação desses protozoários dentro dos macrófagos humanos. Por esse motivo, essa enzima foi determinada no soro dos indivíduos de cada grupo. Observou-se uma proporção mais pronunciada de arginase nos pacientes com LCD quando comparados aos controles da área endêmica (p< 0,0001) (Fig. 5.1-A) ou com pacientes com LCL (p=0,006) (Fig. 5.2-A)

Com o objetivo de analisar sistemicamente o perfil de citocinas na LCD, foi realizada dosagem de citocinas chaves no estabelecimento de uma resposta imunológica contra a infecção por *Leishmania* no soro de pacientes com LCL, LCD e parentes saudáveis destes últimos. Pode-se observar na figura 3 que os pacientes com LCD apresentam baixa concentração de IFN- γ , TNF- α e IL-12, citocinas do perfil de resposta Th1, quando comparados com pacientes com LCL (P< 0,001) (Fig. 5.2- F, G e H). A quantidade de TNF- α e IFN- γ dos pacientes com LCD se assemelha a dos controles saudáveis, não havendo diferença estatística entre eles. Entretanto, a IL-12 mostrou-se significativamente mais elevada no grupo controle (p=0,001) (Fig. 5.1-H). No que se refere à TGF- β , uma citocina tipicamente regulatória, esta se encontra elevada em pacientes com LCD comparados com os seus parentes e com os pacientes com LCL (p<0,0001) (Fig. 5.1-E e 5.2-E).

Figura 5. Dosagem no soro de mediadores lipídicos e citocinas

Figura 5.1

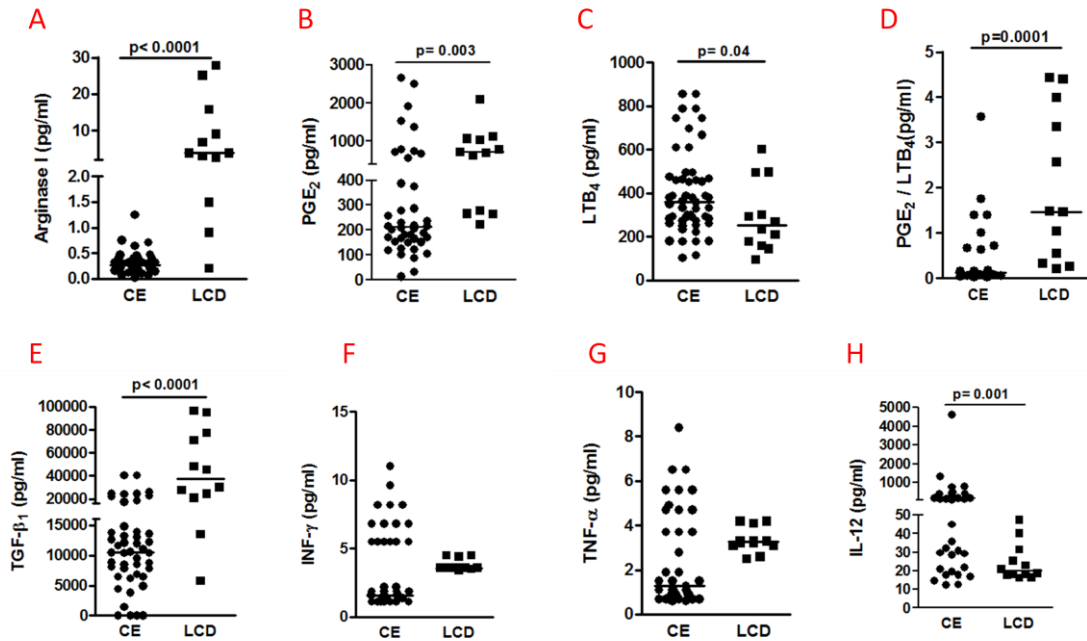


Figura 5.2

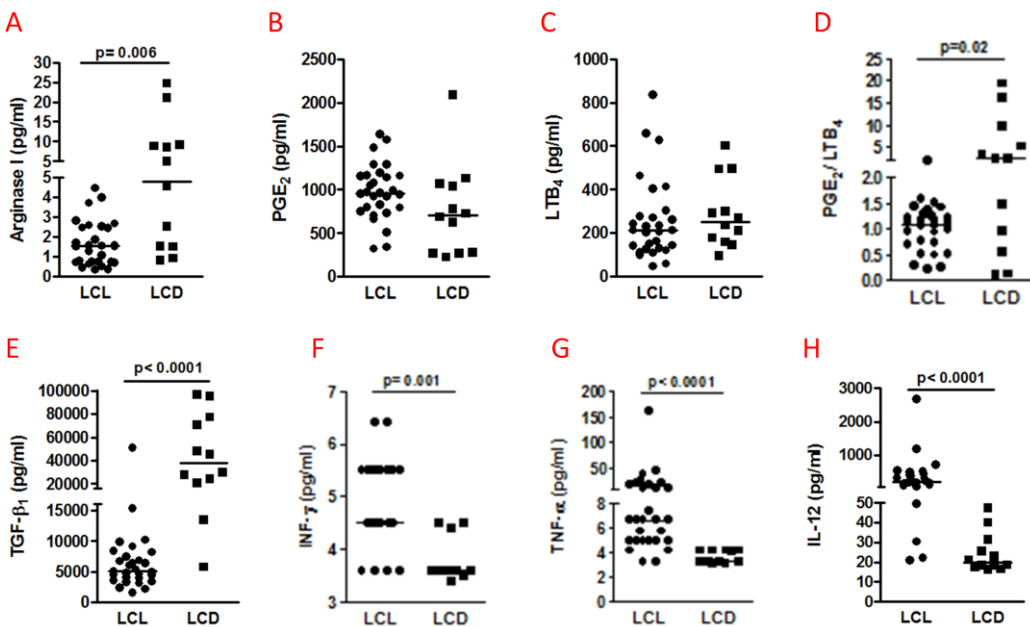


Figura 5. Concentração plasmática de mediadores lipídicos, arginase e citocinas em pacientes com LCD comparados a controle da área endêmica (3.1) e pacientes com LCL (3.2). Níveis plasmáticos de Arginase I (A), PGE₂ (B), LTB₄ (C), TGF-β (E), TNF-α (F), INF-γ (G) e IL-12 (H) foram mensurados por ELISA em controles área endêmica (CE) e pacientes com LCL e LCD. A diferença entre os dois grupos foi calculada usando Mann-Whitney test e $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

DISCUSSÃO

A LCD é uma patologia rara, entretanto, por ser uma doença com potencial de cronificar e causar grandes deformidades nos seus portadores, a investigação de seus mecanismos imunopatogênicos é de grande relevância. Diante disso, os eicosanóides representam um alvo importante de estudo, tendo em vista o seu papel no estabelecimento e manutenção da resposta inflamatória, que pode estar interferindo na infecção pela *Leishmania*. Assim, nesse trabalho foi investigada a presença de eicosanóides e de enzimas chave na resposta inflamatória à infecção por esse parasita tanto na lesão quanto sistemicamente.

Nossos resultados revelaram que na lesão ativa do paciente com LCD há uma expressão significativamente mais elevada da COX-2 em comparação com pacientes com LCL. Sabe-se que a COX-2 é uma enzima essencial na produção de PGE₂, um mediador lipídico que alguns estudos têm mostrado desempenhar um papel importante na infecção por *Leishmania*. Já foi observado que o bloqueio da produção de PGE₂ pela indometacina foi capaz de diminuir a parasitemia em camundongos infectados com *L. amazonensis* (Lonardoní *et al.*, 2000; Guimarães *et al.*, 2006), inibidor das enzimas COX-1 e COX2, também é capaz de induzir a expressão de IL-12 em macrófagos infectados com *L. mexicana* (Shweash *et al.*, 2011). Portanto, nossos achados corroboram a idéia que a COX-2 e o seu produto podem estar relacionados com a persistência da infecção.

Mesmo sem diferença estatística entre os grupos, observou-se uma presença acentuada de 5-LO nos pacientes com LCD, o que parece contraditório, visto que já foi mostrado tanto na leishmaniose (Serezani *et al.*, 2006) como em outros modelos de infecção parasitária (Talvani *et al.*, 2002), que os leucotrienos, os produtos mais estudados dessa via, agem no controle da infecção por um mecanismo dependente de óxido nítrico. Entretanto, vale ressaltar que a 5-LO também é responsável pela síntese de lipoxinas, eicosanóides com propriedades predominantemente anti-inflamatórias (Serhan *et al.*, 2008). Ainda não se sabe como as lipoxinas atuam na leishmaniose, mas a alta expressão de 5-LO em lesões ativas de pacientes com LCD observada em nossos resultados associada à produção não significativa de LTB₄ pode ser um indício de que esteja ocorrendo um desvio da via da 5-LO favorável à produção de lipoxinas ao invés de LTB₄.

De forma semelhante ao padrão observado nos eicosanóides, a arginase também mostrou uma expressão maior na lesão ativa de LCD, reduzindo após o tratamento. Modollel

e cols (2009) mostraram resultado análogo em seu experimento com camundongos infectados com *L. major*. Nesse estudo, a arginase I é altamente expressa no local da lesão causada por *L. major*, interferindo na capacidade das células T de produzirem IFN-g. A inibição da arginase com N^v-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA) reverteu a supressão das células T e resultou no controle da infecção do parasita. Dessa forma, nossos resultados corroboram os achados na literatura de que a presença da arginase, no contexto da infecção por *Leishmania*, é deletéria para o hospedeiro.

No soro, a razão entre PGE₂ e LTB₄ encontra-se significativamente mais elevada em pacientes com LCD, evidenciando um desvio a nível sistêmico do metabolismo do ácido araquidônico para a via da COX. Em modelos experimentais, alguns estudos demonstram que a produção acentuada de PGE favorece a persistência e progressão da infecção por *L. amazonensis* (Matte *et al*, 2001).

Nossos resultados também evidenciaram uma concentração maior de arginase no soro dos pacientes com LCD em relação aos demais grupos. O desvio da utilização da L-arginina para a via da arginase sofre influência da resposta Th2 (Iniesta *et al*, 2005). Em consonância com a literatura, observa-se neste trabalho que a expressão sistêmica acentuada de arginase em pacientes com LCD ocorreu simultaneamente a uma baixa expressão de citocinas da resposta Th1 e aumento da quantidade de TGF-β, citocina do perfil anti-inflamatório.

Com relação às citocinas, nossos dados revelaram menores níveis sorológicos de TNF-α, IFN-γ e IL-12 em pacientes com LCD comparados a pacientes com LCL. Além disso, pacientes com LCD, as concentrações de TNF-α e IFN-γ, citocinas conhecidas por seu papel pró-inflamatório na doença, assemelharam-se a dos controles endêmicos sem infecção. A IL-12 apresentou uma concentração significativamente menor em pacientes com LCD em comparação com os controles saudáveis. Estudos têm demonstrado que esta citocina desempenha um papel importante na resistência contra *Leishmania* e no direcionamento para o polo Th1 em modelo murino (Mattner *et al*, 1997). Por outro lado, o TGF-β, citocina comumente associada a uma resposta anti-inflamatória, encontrava-se acentuadamente mais elevada nos pacientes com LCD em relação aos demais grupos. Esses resultados apontam para uma ineficiência sistêmica em montar uma resposta Th1 contra a infecção por *L. amazonensis*.

CONCLUSÃO

Em conjunto, esses resultados contribuem para o entendimento do papel desempenhado pelos mediadores lipídicos e enzimas chave da resposta inflamatória na patogênese da LCD tanto a nível local quanto sistêmico. Nossos dados sugerem que a enzima COX-2 e o seu principal produto (PGE₂) estão envolvidos no estabelecimento de uma resposta anti-inflamatória, com desvio do metabolismo da L-arginina para a via da arginase. Dessa forma esse estudo levanta perspectivas para investigação de mecanismos que correlacionem esses achados em estudos com PBMC , o que pode possibilitar a descoberta de novos alvos terapêuticos para controlar a disseminação ou até mesmo promover a regressão de lesões ativas.

SUMMARY

Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (LCD) is a rare manifestation of American Tegumentary Leishmaniasis, but high severity, because of its chronic nature and massive dermal involvement. In Brazil, this clinical form is exclusively caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. Immunologically characterized by a predominance of response with Th2 profile, with presence of numerous vacuolated macrophages heavily parasitized. Studies show that eicosanoids may play a key role in experimental infection by *Leishmania*. However, little is known about the involvement of these inflammatory mediators in the LCD's pathogenesis. In this work we investigated the profile of eicosanoids, enzymes and cytokines associated to inflammatory response in LCD's patients by immunohistochemistry and serum dosages. Our immunohistochemical results showed a higher expression of COX-2, 5-LO and arginase in LCD's patient's lesion, which decreased after treatment, resembling to the expression found in the patient's lesion, with Localized Cutaneous Leishmaniasis (LCL). In systemic level, there was low production of Th1's profile's cytokine (TNF- α , IFN- γ and IL-12) and high concentration of TGF- β and arginase in LCD's patient's serum, when compared to LCL's patients and endemic controls. The ratio between PGE₂/LTB₄ was also significantly elevated in these patients. Our findings suggest that eicosanoids may be involved in establishing an antiinflammatory immune response, with deviation of metabolism of L-arginine to the way of arginase in LCD's patients. These results provide an overview of new therapeutic targets for disease control.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, Clarêncio J, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol*. 2008 Aug; 84 (2) :389-96.

Barral A, Barral-Neto M. Immunological aspects of Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL). *Gaz. méd. Bahia* 2009;79 (Supl.3):35-39

Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*. 1992 Jul 24; 257 (5069) :545-8.

Bittencourt AL. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) – Histological and ultrastructural aspects. *Gaz. méd. Bahia* 2009;79 (Supl.3):45-51

Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 1996 Nov; 84 (2) :188-94.

Castes M, Trujillo D, Rojas ME, Fernandez CT, Araya L, Cabrera M, Blackwell J, Convit J. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res*. 1993; 26 (1-2) :233-8

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Nov; 5 (11) :873-82.

Convit J, Pinardi ME, Rondón AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1972; 66 (4) :603-10.

Costa JML, Saldanha ACR, Melo E Silva AC, Neto AS, Galvão CES, Pedrosa e Silva, CMO, Silva AR. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão. II. Aspectos epidemiológicos, clinico-evolutivos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1992 **25**, 115–123.

Costa JML, Costa AAUML, Maia-Elkhoury ANS, Bezerril ACR, Barral A, Saldanha ACR. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) in Brazil after 60 years of your first description. *Gaz. méd. Bahia* 2009;79 (Supl.3):16-24

- Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog.* 2010 Jun 17; 6 (6) :e1000899.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004 Sep; 27 (5) :305-18.
- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001 Nov 30; 294 (5548) :1871-5.
- Gil LH, Basano SA, Souza AA, Silva MG, Barata I, Ishikawa EA, Camargo LM, Shaw JJ. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Sep; 98 (6) :751-5.
- Gontijo B, de Carvalho M de L. [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003 Jan-Feb; 36 (1) :71-80.
- Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol.* 1996 Feb; 34 (2 Pt 1) :257-72.
- Guimarães ET, Santos LA, Ribeiro dos Santos R, Teixeira MM, dos Santos WL, Soares MB. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infect.* 2006
- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 2002
- Iniesta V, Carcelén J, Molano I, Peixoto PM, Redondo E, Parra P, Mangas M, Monroy I, Campo ML, Nieto CG, Corraliza I. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infect Immun.* 2005 Sep; 73 (9) :6085-90.
- Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2002 Oct; 2 (10) :787-95.
- Lonardoni MV, Russo M, Jancar S. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun.* 2000 Nov; 68 (11) :6355-61.
- Matte C, Maion G, Mourad W, Olivier M. *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite Immunol.* 2001 Apr; 23 (4) :177-84
- Mattner F, Di Padova K, Alber G. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infect Immun.* 1997 Nov; 65 (11) :4378-83.

Milano S, Arcoleo F, Dieli M, D'Agostino R, De Nucci G, D'Agostino P, Cillari E. Ex vivo evidence for PGE₂ and LTB₄ involvement in cutaneous leishmaniasis: relation with infection status and cytokine production. *Parasitology*. 1996 Jan; 112 (Pt 1):13-9.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância Tegumentar Americana. 2007 2ª edição atualizada

Ministério da Saúde – Portal da Saúde, acessado em março de 2012 (http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31927)

Modolell M, Choi BS, Ryan RO, Hancock M, Titus RG, Abebe T, Hailu A, Müller I, Rogers ME, Bangham CR, Munder M, Kropf P. Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 Jul 14; 3 (7) :e480

Mougueau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev*. 2011 Mar; 240 (1) :286-96.

Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. *Clin Immunol*. 2006 Jun; 119 (3) :229-40

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 1996 Jan; 22 (1) :1-13.

Petersen EA, Neva FA, Oster CN, Bogaert Diaz H. Specific inhibition of lymphocyte-proliferation responses by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med*. 1982 Feb 18; 306 (7) :387-92.

Peters-Golden M, Henderson WR Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med*. 2007 Nov 1; 357 (18) :1841-54. PubMed PMID:17978293.

Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol*. 2005 Jan 15; 174 (2) :589-94. PubMed PMID:15634873.

Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, Côrte-Real S, Freire-de-Lima CG, DosReis GA. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect*. 2009 Feb; 11 (2) :181-90.

Ribeiro-Gomes FL, Moniz-de-Souza MC, Borges VM, Nunes MP, Mantuano-Barradas M, D'Avila H, Bozza PT, Calich VL, DosReis GA. Turnover of neutrophils mediated by Fas ligand drives *Leishmania major* infection. *J Infect Dis*. 2005 Sep 15; 192 (6) :1127-34

Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol*. 2006 Sep 1; 177 (5) :3201-8

Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008 May; 8 (5) :349-61. PubMed PMID:18437155

Shweash M, Adrienne McGachy H, Schroeder J, Neamatallah T, Bryant CE, Millington O, Mottram JC, Alexander J, Plevin R. *Leishmania mexicana* promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. *Mol Immunol.* 2011 Sep; 48 (15-16) :1800-8.

Silveira FT, Lainson R & Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 239–251.

Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V) braziliensis* and *L (L) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009 Aug; 31 (8) :423-31.

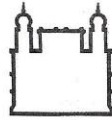
Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, Teixeira MM. Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect Immun.* 2002 Aug; 70 (8) :4247-53.

Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res.* 2008; 41 (1) :15-25.

World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010

ANEXOS

Anexo I. Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

PARECER Nº 136/2007

Protocolo: 229

Projeto de Pesquisa: "Mecanismos imunopatogênicos da vasculite na leishmaniose tegumentar (LT), na insuficiência venosa crônica (IVC) e nas vasculites associadas ao ANCA".

Pesquisador Responsável: Dr. Manoel Barral Netto

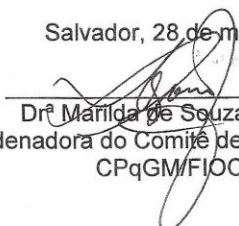
Instituição ou Departamento: LIM1 – Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunorregulação.

Considerações:

Após análise ética do projeto, o CEP/CPqGM considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 28 de maio de 2007.



 Dr^a Mariana de Souza Gonçalves
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 CPqGM/FIOCRUZ

Comitê de Ética em Pesquisa - Rua Waldemar Falcão, nº 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40296-710, Brasil

Tel: (71) 3176-2285 ramal: 285 Fax: (71) 3176-2327
 e-mail: mramos@cpqgm.fiocruz.br

Anexo II. Declaração



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

DECLARAÇÃO

Declaro para a Universidade Federal da Bahia que o projeto TCC desenvolvido pela estudante Daniela Campos intitulado: "Papel de Eicosanóides na Resposta Inflamatória da Leishmaniose Difusa" é um dos sub-projetos do projeto principal intitulado: "Mecanismos imunopatogêncios da vasculite na leishmaniose tegumentar (LT), na insuficiência venosa crônica (IVC) e nas vasculites associadas ao ANCA" coordenado por Dr Manoel Barral Netto, o qual é licenciado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM, FIOCRUZ) sob parecer No 136/2007 (cópia em anexo).

Salvador, 28 de maio de 2012

Valéria Borges

Dra Valéria Borges
Tecnologista em Saúde Pública
CPqGM- FIOCRUZ-BA