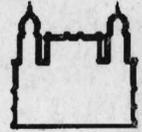




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ**



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

FIOCRUZ

Dissertação de Mestrado

**ESTUDO COMPARATIVO DAS INFECÇÕES POR
Leishmania major e *Leishmania amazonensis*
EM CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS CBA**

VALDERES LEMOS DE SOUZA

**Salvador - Bahia
1998**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO COMPARATIVO DAS INFECÇÕES POR
Leishmania major e *Leishmania amazonensis*
EM CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS CBA**

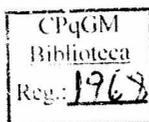
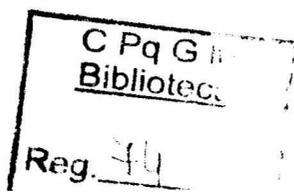
Mestranda: Valderes Lemos de Souza

Orientador: Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre em
Patologia Experimental.

Salvador-Bahia

1998



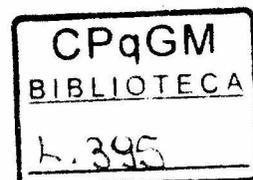
Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ
Salvador – Bahia

S725 Souza, Valderes Lemos
Estudo comparativo das infecções por *Leishmania major* e
Leishmania amazonensis em camundongos isogênicos CBA /
Valderes Lemos de Souza. _ Salvador: UFBA/Faculdade de
Medicina da UFBA / FIOCRUZ / CPqGM, 1998.
xii + 119p.: il.

Dissertação (Mestrado em Patologia) - UFBA - FIOCRUZ,
1998.

1. Camundongo CBA. 2. Leishmaniose. 3. Histologia. 4.
Imunologia. 5. *Leishmania amazonensis*. 6. *Leishmania major*.
I. Título.

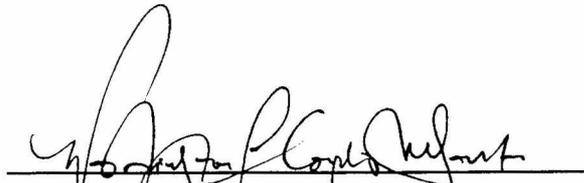
CDU 599.323.4:616.993.161



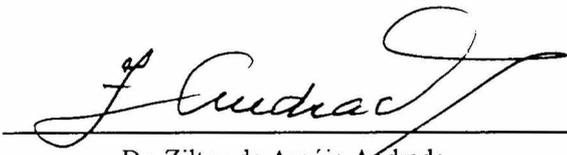
599.323.4:616.993.161
S729e

FOLHA DE APROVAÇÃO

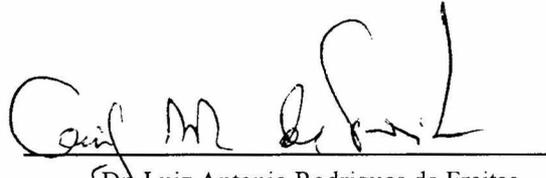
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Washington Luiz Conrado dos Santos
Pesquisador Adjunto
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

Fontes de Financiamento:
PAPES - 0250.250.354
CNPq – 523005/96-2

Aos meus pais, Nicolau e Zélia
meus filhos Tiago e Isabel
meu esposo Paulo
por toda dedicação, amor, compreensão,
paciência e alegria.

AGRADECIMENTOS

A minha gratidão a todas as pessoas que além de terem contribuído para a execução deste trabalho, me fizeram consciente de que a harmonia e a grandiosidade criativa não podem existir se o princípio não for a ordem e para tanto, sempre significa, um investimento de esforço.

Obrigado:

Dr. Luiz A. R. de Freitas pelo incentivo e orientação

Dra. Patrícia Veras, pela orientação e acompanhamento em várias etapas deste estudo,

Dra. Tânia Correia, orientação no estudo morfológico

Juliana Assunção, Maria Lúcia Moreno, Cláudia Dias, Marcus Welby, Cláudio, Ivana Gomes, Eduardo, Paulo Sérgio, Tânia Silva, Keilan, Ana Paula, Rafael pelo entusiasmo e auxílio nas atividades do laboratório,

Dra. Milena Soares pela colaboração no estudo imunológico,

Cristina Vasconcelos Mota e Creuza Vasconcelos pelo processamento do material de histologia,

Ana Fiscina pela orientação na normatização das referências bibliográficas,

Tânia de Farias e Itamar Crispim pela documentação fotográfica do material,

Albert Ko pelo auxílio na correção do texto em inglês.

Dr. Manoel Barral e Rosália pela atenção, respeito e dedicação,

Aos diretores deste Centro de Pesquisas pela oportunidade,

Aos companheiros de turma do mestrado pelo incentivo e companheirismo,

Aos amigos Ana Carvalho, Paulo e Cecília pelo grande afeto que nos une.

SUMÁRIO

LISTA ABREVIATURAS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	1
1.2 O PARASITO.....	3
1.3 AS FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE E SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS.....	7
1.3.1 A Leishmaniose Cutânea (LC).....	9
1.3.2 A Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM).....	9
1.3.3 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD).....	10
1.3.4 Leishmaniose Visceral.....	11
1.4 MODELO MURINO.....	12
1.4.1 A importância do modelo murino.....	12
1.4.2 A resposta imune dos camundongos.....	19
1.4.3 O estudo morfológico das lesões em modelos murinos de leishmaniose tegumentar.....	33
2 OBJETIVO GERAL	39
3 JUSTIFICATIVAS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 ANIMAIS.....	43
4.2 PARASITO.....	43
4.3 INFECÇÃO.....	43
4.4 ACOMPANHAMENTO DO TAMANHO DAS LESÕES.....	44
4.5 ESTUDOS MORFOLÓGICOS.....	44
4.5.1 Histologia.....	44
4.5.2 Imunohistoquímica.....	45
4.6 CULTURA DE CÉLULAS DO LINFONODO.....	47
4.7 DOSAGENS DOS NÍVEIS DE CITOCINAS NOS SOBRENADANTES DE CULTURA DE LINFÓCITOS.....	48
4.8 DOSAGEM DE ÓXIDO NITRICO.....	49
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5 RESULTADOS	51
5.1 DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES: O TAMANHO DAS LESÕES FOI ACOMPANHADO EM CAMUNDONGOS CBA E BALB/c INFECTADOS COM DIFERENTES ESPÉCIES DE LEISHMÂNIA.....	51
5.2 PESQUISA DE PARASITOS ATRAVÉS DO MÉTODO IMUNOHISTOQUÍMICO.....	57
5.2.1 Na pele: local da infecção.....	57
5.2.2 Nos linfonodos poplíteos de drenagem.....	61
5.3 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	66
5.3.1 Na pele: local da infecção.....	66
5.3.2 No linfonodo poplíteo.....	73
5.4 O PERFIL DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA INFECÇÃO POR <i>L. major</i> OU <i>L. amazonensis</i>	76
5.4.1 Produção de IFN- γ	76
5.4.2 Produção de IL-4.....	77
5.4.3 Produção de IL-10.....	79
5.5 A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA INFECÇÃO POR <i>L. major</i> OU <i>L. amazonensis</i>	79
6 DISCUSSÃO	81
7 RESUMO DOS RESULTADOS	96
8 CONCLUSÕES	97
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
10 APÊNDICE	117

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC - "antigen-present cells" (células apresentadoras de antígeno)
- Con A - concanavalina A
- DAB - diaminobenzidina
- DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium (meio de cultivo de células)
- DTH - "delayed type hypersensitivity" (reação de hipersensibilidade do tipo tardia)
- ELISA - ensaio imunoenzimático
- H-E - hematoxilina-eosina
- HEPES - N-2hidroxiethylpiperazina-N'-2-etano ácido sulfônico
- IMC - imunidade mediada por célula
- IL- "interleukin" (interleucina)
- IFN - "interferon"
- iNOS - "inducible nitric oxide synthase" (óxido nítrico sintetase induzível)
- LCL - Leishmaniose cutânea localizada
- LCD - Leishmaniose cutânea difusa
- LCM - Leishmaniose cutânea-mucosa
- LIT - liver infusion tryptose
- LPS - lipopolissacarídeo
- LV - Leishmaniose visceral
- MHC - "major histocompatibility complex" (complexo de histocompatibilidade principal)
- NM - Novo Mundo
- NO - "nitric oxide" (óxido nítrico)
- NO₂ - nitrito
- NRAMP 1 - "natural resistance-associated macrophage protein"
- PBS - "phosphate buffer saline" (salina fosfatada a 150mM, pH 7,4)
- PGE- prostaglandina
- PIV - "priming in vitro stimulation" (estimulação primária *in vitro*)
- SCID - "severe combined immunodeficiency"

SFB - soro fetal bovino

Th - "T helper" (linfócitos T auxiliares)

TGF - "transforming growth factor" (fator de crescimento tumoral)

TMB - 3',3', 5-5-Tetramethyl-benzidine

TNF - "tumor necrosis factor" (fator de necrose tumoral)

VM - Velho Mundo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 01: Os agentes etiológicos da leishmaniose no Novo Mundo (NM) e do Velho Mundo (VM) e seus respectivos aspectos clínicos.....	06
Figura 01: A progressão da infecção em camundongos BALB/c inoculados com <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i>	53
Figura 02: A progressão da infecção em camundongos CBA inoculados com <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i>	54
Figura 03: A progressão da infecção por <i>L. major</i> em camundongos CBA ou BALB/c	55
Figura 04: A progressão da infecção por <i>L. amazonensis</i> em camundongos CBA ou BALB/c.	56
Figura 05: Identificação de formas amastigotas na pata de camundongos CBA com 7 dias após a infecção	59
Figura 6: Identificação de formas amastigotas na pata de camundongos CBA com 42 dias após a infecção	60
Figura 7: Identificação de formas amastigotas no linfonodo poplíteo de camundongos CBA com infectados por <i>L. major</i> com 3 dias após a infecção	62
Figura 8: Identificação de formas amastigotas no linfonodo poplíteo de camundongos CBA com 7 dias após a infecção	63
Figura 9: Identificação de formas amastigotas no linfonodo poplíteo de camundongos CBA com 42 dias após a infecção	64
Figura 10: Identificação de formas amastigotas no linfonodo poplíteo de camundongos CBA com 42 dias após a infecção	65
Tabela 2: Principais aspectos histopatológicos da pele observados no curso da infecção por <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i> nos camundongos CBA	68
Figura 11: Comparação do padrão tissular no sítio de inoculação nos camundongos CBA com 14 dias após a infecção.	69
Figura 12: Comparação do padrão tissular no sítio de inoculação nos camundongos CBA com 21 dias após a infecção.	70

Figura 13: Comparação do padrão tissular no sítio de inoculação nos camundongos CBA com 42 dias após a infecção	71
Figura 14: Comparação do padrão tissular no sítio de inoculação nos camundongos CBA com 70 dias após a infecção	72
Figura 15: Comparação do padrão tissular no linfonodo popliteo de camundongos CBA com 42 dias após infecção	74
Figura 16: Padrão tissular no linfonodo popliteo de camundongos CBA infectados por <i>L. amazonensis</i> após 70 dias de infecção	75
Figura 17: Produção de IFN- γ nas células do linfonodo popliteo de camundongos CBA infectados por <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i>	78
Figura 18: Produção de IL-4 nas células do linfonodo popliteo de camundongos CBA infectados por <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i>	78
Figura 19: Produção de IL-10 nas células do linfonodo popliteo de camundongos CBA infectados por <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i>	80
Figura 20: Produção de óxido nítrico nas células do linfonodo popliteo de camundongos CBA infectados por <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i>	80
Tabela 03: Valores obtidos no acompanhamento do tamanho da lesão dos camundongos CBA e BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i>	117
Tabela 04: Produção de IFN- γ nas células do linfonodo popliteo dos camundongos CBA infectados por <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i>	118
Tabela 05: Produção de IL-4 nas células do linfonodo popliteo dos camundongos CBA infectados por <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i>	118
Tabela 06: Produção de IL-10 nas células do linfonodo popliteo dos camundongos CBA infectados por <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i>	119
Tabela 07: Produção de NO nas células do linfonodo popliteo dos camundongos CBA infectados por <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i>	119

RESUMO

ESTUDO COMPARATIVO DAS INFECÇÕES POR *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis* EM CAMUNDONGO ISOGÊNICOS CBA. VALDERES LEMOS DE SOUZA. A maioria dos trabalhos sobre o modelo murino na leishmaniose tegumentar utiliza diferentes linhagens de camundongos que são resistentes ou susceptíveis a uma determinada espécie de leishmânia ou trata de manipulações da resposta imune tornando camundongos susceptíveis, resistentes a determinada leishmânia, ou tornando resistentes, susceptíveis. No presente estudo avalia-se comparativamente, resistência e susceptibilidade à infecção por leishmânia, utilizando o modelo de infecção de camundongos isogênicos CBA infectados com *L. amazonensis* (*L.a.*), para as quais são susceptíveis, e infectados com *L. major* (*L.m.*), para as quais são resistentes. Nós comparamos a resposta imune-inflamatória nesses dois grupos através da avaliação do curso da infecção pelo monitoramento do tamanho das lesões e avaliação da quantidade de parasitos em cortes histológicos através de imunohistoquímica. A resposta tissular foi estudada em cortes histológicos das patas e dos linfonodos de drenagem no intervalo de três a 70 dias após a infecção. A produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 foi avaliada pelo método ELISA e a produção de NO pelo método de Griess, em sobrenadantes de culturas de células do linfonodo de drenagem. Os camundongos CBA infectados por *L.m.* controlam a infecção e curam, enquanto os infectados por *L.a.* exarcebam a infecção e morrem. Os padrões de resposta tissular no local da infecção e no linfonodo de drenagem são distintos. Nos animais resistentes ocorre inflamação mista com formação de granuloma e fibrose, enquanto nos susceptíveis ocorre reação macrofágica monomórfica, sem granulomas e fibrose. O IFN- γ foi predominante produzido pelas células do linfonodo dos animais infectados por *L.m.*, enquanto que os níveis de IL-4 foram mantidos mais alto no grupo de animais infectados por *L.a.*, após o 7^o dia de infecção. Os perfis distintos de resposta correspondem a padrões distintos de resposta tissular e estão relacionados com a produção aumentada de IFN- γ ou IL-4, ou seja perfis predominantemente Th1 ou Th2 da resposta imune celular. O padrão morfológico de resposta tecidual comporta-se como correlato da resposta imune. Os dados apresentados indicam que, no contexto do camundongo CBA, fatores relacionados com o parasito são determinantes do tipo da resposta imune-inflamatória.

1.Camundongo CBA 2.Leishmaniose 3.Histologia 4.Imunologia 5.*Leishmania amazonensis* 6. *Leishmania major*

ABSTRACT

COMPARATIVE STUDY OF INFECTIONS WITH *L. major* OR *L. amazonensis* CBA MICE. VALDERES LEMOS DE SOUZA. Resistance and susceptibility in experimental leishmaniasis have been well characterized in comparison studies of mice with different genetic backgrounds infected with a specific parasite species, such as *Leishmania major*. However, there is evidence that several mouse strains can demonstrate resistance to infection with certain species of *Leishmania* and susceptibility to others. In order to investigate the induction of parasite specific resistance or susceptibility, we compared the patterns of tissular and immune responses in CBA mice against infection with *L. major* (*L.m.*) or *Leishmania amazonensis* (*L.a.*). During infections with *L.m.*, lesions in CBA mice healed within 4 weeks of infections. In contrast, during infection with *L.a.*, CBA mice developed progressive lesions that ulcerated by 9th week post-infection. Histologic studies demonstrated, that CBA mice infected with *L.m.*, develop a mixed-mononuclear cell infiltrate. Parasitized macrophages were rarely observed, the number of lymphocytes increased progressively in the footpad, and fibrosis, fibrinoid necrosis foci and granulomas appeared after infection. In mice infected with *L.a.* there was a monotonous, "virchowian" infiltrate of heavily-parasitized macrophages. Necrosis, micro-abscess and skin ulceration were seen late in the course of infection. The profile of cytokine production differed in both groups. Cells from *Lm*-infected CBA mice produced high levels of IFN- γ at all time points throughout infection. High levels of IL-4 were produced by cells obtained from *L.a.*-infected CBA mice. Such levels were maintained through the course of infection. The differing profiles of parasite induced resistance and susceptibility was associated with the type of inflammatory reaction and the levels of IFN- γ or IL-4 production. This results strongly suggest that in CBA mice, factors related with *Leishmania* species drive immune response to a predominately Th1 or Th2 pattern.

1.CBA mice 2.Leishmaniasis 3.Histology 4.Imunology 5.*Leishmania amazonensis*
6. *Leishmania major*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A leishmaniose é uma doença com ampla distribuição no Velho Mundo e no Novo Mundo, conhecida desde a antigüidade, e que pode deixar seqüelas desfigurantes. É uma doença inflamatória crônica que compromete a pele, mucosas (a forma tegumentar) e as vísceras (a forma visceral). O curso da infecção por leishmânia apresenta características clínicas variadas, dependente da virulência da espécie do parasito e da capacidade de resposta imune do hospedeiro ao parasito (GRIMALDI, 1982).

A leishmaniose representa um importante problema de saúde pública e está incluída entre as seis mais importantes endemias do mundo. Ocorre predominantemente nas regiões tropicais: América Latina, África, Índia, Oriente Médio e Sul da Ásia. Sua incidência é de 600 mil novos casos/ano e sua prevalência é de cerca de 12 milhões de casos (MODABBER, 1987 apud BARRAL-NETTO et al., 1995). Tem sido relatado também a persistência do parasito no estado quiescente em pacientes anos após a cura clínica, em indivíduos que nunca foram sintomáticos ou em pacientes com infecção concomitante por leishmânia e síndrome da imunodeficiência adquirida-AIDS (COURA et al., 1987).

No Brasil, os relatórios epidemiológicos, apesar de incompletos, mostram que a incidência das leishmanioses vem aumentando, e apresenta características endemo-epidêmicas. Os surtos epidêmicos ocorrem geralmente em regiões que sofreram modificações ecológicas importantes. Por exemplo, aquelas provocadas pelo desmatamento, expansão da pecuária, construção de

estradas de ferro e rodovias. E também pelo processo migratório e de urbanização freqüente, na sua grande maioria por ocupações recentes sem infra-estrutura sanitária, acarretando a expansão de novos focos e conseqüentemente a ocorrência de epidemia (MERCHÁN-HAMANN, 1997).

No período de 1985 a 1995, o Ministério da Saúde/ Fundação Nacional de Saúde (MS/FNS) mostrou aumento na incidência leishmaniose tegumentar de 10,45 para 22,81 casos/100.000 habitantes (SILVA et al., 1997). Em 1995, foram registrados 35.583 casos, sendo que o maior índice foi verificado nas regiões norte e nordeste com 36,6% e 38%, respectivamente. No Estado da Bahia, a FNS registrou um total de 2.877 casos em 1989 e de 4.105 casos em 1994, sendo que o distrito de Ilhéus foi o mais atingido, com um percentual médio neste período de 70,89% (MERCHÁN-HAMANN, 1997).

Os casos notificados de leishmaniose visceral (LV) no período de 1984-1994, somam 14.964, sendo que 70,4% ocorrem nos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (BRASIL, 1996). Em 1995, foram registrados 3.783 casos no Brasil, sendo 3.417 (90%) notificados pela região nordeste. O coeficiente de incidência desta região foi de 7,6 casos/100.000 habitantes, enquanto que a média para o Brasil no mesmo período foi de 2,4 casos/100.000 habitantes (MERCHÁN-HAMANN, 1997). Dois inquéritos epidemiológicos recentes realizados na Bahia, confirmam o grave problema de saúde pública nas cidades de Feira de Santana, onde foi registrado entre agosto de 1994 a dezembro de 1996, 110 casos de LV, com prevalência de 22,8 por 100.000 habitantes e taxa de letalidade de 8% (OLIVEIRA et al., 1997). E em Jequié, foram notificados 317 casos entre o período de 1992 a 1996, ocorrendo um

aumento progressivo no número de casos nos últimos quatro anos (NASCIMENTO et al., 1997). Os dois estudos confirmaram que a incidência maior da doença ocorre na faixa etária de 0 a 6 anos de idade.

1.2 O PARASITO

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários da ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*. As espécies de leishmânias são parasitos digenéticos ou dimórficos que se diferenciam e se multiplicam em formas amastigotas (intracelulares) no interior de macrófagos e em formas promastigotas (extracelulares) no interior do trato digestivo dos vetores flebotomíneos. Estes realizam a transmissão do parasito para os hospedeiros vertebrados (LAINSON & SHAW, 1987; REY, 1991).

No ciclo de vida, a transmissão do parasito ocorre quando o flebótomo fêmea infectado, ao picar o homem ou outros animais (domésticos e selvagens) na tentativa de se alimentar, injeta junto com a saliva as formas promastigotas (flageladas) infectantes denominadas metacíclicas. A partir daí, as promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos residentes na derme via receptores e ligantes específicos. As leishmânias se instalam no compartimento fagolisossomal dos macrófagos do hospedeiro, denominado vacúolo parasitóforo e se diferenciam na forma de amastigota (não flagelada), onde têm capacidade de sobreviver e de se multiplicar por divisão binária. A habilidade para sobreviver no interior de células dos hospedeiros vertebrados reflete a adaptação evolutiva desses parasitos para evadir-se e resistir aos mecanismos efetores imunes do hospedeiro (HOWARD et al., 1980; MOSSER & ROSSENTHAL, 1994).

As formas promastigotas de leishmânia expressam moléculas de superfície como o lipofosfoglicano (LPG) e a protease gp63, que estão implicados na ligação aos receptores do macrófago e são reconhecidos como fatores de virulência. A molécula de LPG é um glicoconjugado constituído por dois segmentos altamente conservados entre as espécies; uma âncora lipídica que se liga a membrana do parasito e um núcleo de carboidratos. O outro segmento é constituído por unidades repetitivas de disacarídeos fosforilados e apresenta polimorfismo interspecífico. A molécula de LPG protege o parasito da lise mediada pelo complemento, da degradação causada pelo ataque oxidativo e modula a transdução de sinal nos macrófagos. A gp63 é uma glicoproteína altamente conservada entre as espécies de leishmânias e possui atividade proteolítica (BEVERLEY & TURCO, 1998; MOSSER & ROSSENTHAL, 1994).

A progressão da doença ocorre quando as amastigotas são liberadas no meio extracelular devido a ruptura dos macrófagos infectados e infectam outras células. O ciclo continua quando o flebótomo torna a sugar sangue do hospedeiro infectado, ingerindo macrófagos contendo amastigotas. Após a ingestão, as amastigotas se transformam em formas promastigotas. Estas se diferenciam no intestino do flebótomo da forma procíclica para a forma metacíclica infectante (SACKS & PERKINS, 1984).

Existem poucas diferenças morfológicas entre as espécies de leishmânia e talvez por esta razão tenha sido tão difícil a separação taxonômica. Os critérios para a identificação e classificação das espécies correlacionando com as diferentes formas clínicas da doença, mesmo levando

em consideração os critérios biológicos, epidemiológicos e geográficos são questionáveis. Com o desenvolvimento dos métodos bioquímicos (eletroforese de isoenzimas, determinação da densidade flutuante de DNA nuclear e do cinetoplasto, análise dos fragmentos de endonucleases de restrição, composição protéica e lipídica) e imunológicos (uso de anticorpos monoclonais espécies-específicas), foi possível agrupar mais precisamente as diferentes espécies. E assim, demonstrar que uma única espécie de parasito pode causar mais de um tipo de manifestação clínica da doença em função da resposta imune do hospedeiro (GRIMALDI JUNIOR, 1993; LAINSON & SHAW, 1987), vide tabela 1.

Atualmente, a maioria dos autores concorda quanto a classificação que agrupa as espécies patogênicas para o homem em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. Esta classificação é baseada no local de desenvolvimento do parasito no trato digestivo do vetor. Assim no subgênero *Leishmania*, os parasitos apresentam desenvolvimento limitado à porção suprapilórica (regiões anterior e médio) do intestino dos flebotomídeos. E no subgênero *Viannia*, os parasitos apresentam desenvolvimento na porção peripilórica (região posterior) do intestino. Esses caracteres taxonômicos utilizados são intrínsecos dos parasitos e portanto não sofrem interferência do hospedeiro e do ambiente (LAINSON & SHAW, 1987).

TABELA 1: Os agentes etiológicos da leishmaniose no Novo Mundo (NM) e do Velho Mundo (VM) e seus respectivos aspectos clínicos (segundo Lainson e Shaw, 1987)

Subgênero	Complexo	Subespécie	Aspectos clínicos
Viannia	Leishmania Braziliensis	<i>L. (Viannia) braziliensis</i> (NM)	LC e LCM com lesões graves e de longa duração
		<i>L. (Viannia) guyanensis</i> (NM)	Freqüentemente causa múltiplas úlceras. Tendência a cura espontânea. Ocasionalmente ocorrer a forma linfática.
		<i>L. (Viannia) panamensis</i> (NM)	Lesão única ou de número limitado. Ocasionalmente ocorrer a forma linfática
		<i>L. (Viannia) lainson</i> (NM)	Úlcera única
		<i>L. (Viannia) peruviana</i> (NM)	Úlcera única que cura espontaneamente
Leishmania	Leishmania Mexicana	<i>L. (Leishmania) amazonensis</i> (NM)	Lesão única ou de número limitado, menos freqüentemente causa LCM, LCD e LV
		<i>L. (Leishmania) mexicana</i> (NM) ou <i>pifanoi</i> ^a	LC, nódulos ou lesões crônicas destrutivas. Tendência a cura espontânea, mas pode causar LCD
		<i>L. (Leishmania) venezuelensis</i> (NM)	Lesão única ou múltiplos, algumas vezes nodulares disseminadas
	Complexo Leishmania Donovani^a	<i>L. (Leishmania) donovani</i> (VM)	LV
		<i>L. (Leishmania) infantum</i> (VM)	LV, ocasionalmente LC
		<i>L. (Leishmania) chagasi</i> (NM)	LV
		<i>L. (Leishmania) tropica</i> (VM)	LC
		<i>L. (Leishmania) major</i> (VM)	LC
		<i>L. (Leishmania) aethiopica</i> (VM)	LC e LCD, ocasionalmente LCM

LC, leishmaniose cutânea; LCM, leishmaniose cutânea mucosa; LCD, leishmaniose cutânea difusa; LV, leishmaniose visceral

^asegundo Grimaldi et al., (1989 e 1993).

1.3 AS FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE E SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS

Observam-se duas formas clínicas básicas da doença: a forma tegumentar e a forma visceral, sendo que a forma tegumentar apresenta um espectro amplo de manifestações clínico-imuno-patológicas (BRYCESON, 1969). O polo responsivo ou alérgico, representado pela leishmaniose cutânea localizada (LCL) e pela leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM). Os pacientes fazem uma forte reação de hipersensibilidade do tipo tardia aos antígenos de leishmânia na pele devido a uma potente imunidade mediada por células (IMC) e produção de níveis elevados de IFN- γ em resposta aos antígenos parasitários, quando testados *in vitro*. Por outro lado, a imunidade humoral específica é menos exarcebada, com baixa produção de anticorpos (CARVALHO et al., 1985; CASTES et al., 1983). Quanto aos aspectos histológicos das lesões, são observados reação granulomatosa, necrose fibrinóide devido a alteração da parede vascular ou do tecido conjuntivo, acarretando extensos danos teciduais. O número de parasitos é pequeno ou ausente, a depender do tempo de infecção (BITTENCOURT & ANDRADE, 1967; RIDLEY & RIDLEY, 1983).

No outro polo do espectro, encontra-se a leishmaniose cutânea difusa (LCD), representando o polo não responsivo ou anérgico. Os pacientes apresentam imunidade humoral exarcebada na ausência de uma resposta imune mediada por células (CONVIT et al., 1972). A resposta linfoproliferativa é deficiente e além disso esses linfócitos, não secretam interferon γ (IFN- γ) quando estimulados com antígenos de leishmânia, mas produzem esta citocina quando desafiados com mitógenos ou antígenos não-relacionados (MURRAY

et al., 1984). Outra característica importante é a produção de anticorpos específicos e a presença de lesões difusas, constituídas por infiltrado monótono de macrófagos vacuolados intensamente parasitados. A intensidade do infiltrado linfocitário e da fibrose é inversamente proporcional a intensidade do parasitismo (BITTENCOURT et al., 1990; BITTENCOURT & FREITAS, 1983; BRYCESON, 1969).

Entre estas formas polares, foram descritas formas intermediárias da doença, mais raras, que misturam aspectos clínicos das duas formas polares. O número de parasitos é menor e o infiltrado inflamatório é constituído de células epitelióides associadas com intenso infiltrado linfoplasmocitário (CONVIT et al., 1972; MORIEARTY et al., 1978).

A forma visceral está representada pela leishmaniose visceral (LV), que apresenta as formas: aguda, subaguda e crônica, no entanto a maioria dos pacientes permanecem assintomáticos (BADARÓ et al., 1986). Nos indivíduos sintomáticos, é caracterizada por uma resposta imune humoral marcante enquanto que a resposta imune celular específica está suprimida (CARVALHO et al., 1985). Além da produção aumentada dos anticorpos anti-leishmânia, são observados níveis elevados de imunoglobulina IgG e IgM, fatores reumatóides e complexos imunes circulantes sugerindo ativação policlonal das células B (GALVÃO-CASTRO et al., 1984). O aspecto histológico característico é a proliferação macrofágica marcante com parasitismo intenso nos órgãos hematopoiéticos (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

1.3.1 A Leishmaniose Cutânea (LC)

As lesões cutâneas apresentam-se no local da picada do flebótomo como uma pequena pápula que se desenvolve em um nódulo ulcerado no centro. Podem ocorrer lesões cutâneas únicas ou múltiplas, geralmente localizadas e ulceradas, sendo que a forma mais freqüente é uma úlcera de bordas elevadas e fundo plano (aspecto de crateras), que cicatrizam espontaneamente ou têm curso indolente. Menos freqüentemente as lesões podem aumentar de tamanho tornando-se nodulares ou verrucosas. Estas formas podem sofrer ulcerações ou não (GRIMALDI, 1982).

Em geral, a *L. major* (agente etiológico Velho Mundo) induz doença menos grave e auto-limitada quando comparada com os agentes do Novo Mundo e confere proteção contra reinfecções (DEANNE & GRIMALDI, 1985; MAYRING et al., 1979). No Novo Mundo o agente que causa a forma clínica mais grave é a *L. braziliensis*. As lesões cutâneas são ulceradas e freqüentemente apresentam aspecto de crateras. Cerca de 1% dos casos de LC por *L. amazonensis* podem disseminar apresentando múltiplas lesões, com aspecto de pápulas e úlceras pequenas (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO 1995).

1.3.2 A Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM)

A doença pode manifestar-se com aparecimento de lesões em poucas semanas ou pode levar anos para ocorrer, após o início da infecção primária. A LCM é caracterizada por um quadro de disseminação do parasito, para sítios da mucosa nasal, palato, úvula, faringe e o lábio superior, causando destruição dessas mucosas, ocorrendo inclusive perfuração septal, devido provavelmente,

à disseminação hematogênica dos parasitos a partir das lesões primárias (MAUEL & BEHIN, 1981).

A LCM é considerada como polo hiperérgico da doença devido a potente resposta IMC aos antígenos de leishmânia. A reação de hipersensibilidade do tipo tardia positiva nestes pacientes pode existir simultaneamente com algumas formas clínicas graves da doença, mas a cura desses pacientes não ocorre na sua ausência (CASTÉS et al., 1983).

No Velho Mundo a LCM está associada com a infecção causada por *L. aethiopica*. No Novo Mundo aproximadamente 3% dos pacientes infectados com *L. braziliensis* são acometidos pela LCM, menos freqüentemente está associada à infecção causada por *L. amazonensis* (MARSDEN, 1986 apud BARRAL-NETTO et al., 1995).

1.3.3 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)

As lesões podem evoluir estendendo-se pelo corpo, com aspecto eritromatoso ou com aparência de nódulos, ocorrendo geralmente na face, podendo disseminar-se por todo o corpo. Diferente da LC, as lesões geralmente não ulceram e a cicatrização espontânea de algumas lesões é acompanhada pelo aparecimento de outras. Os parasitos disseminam-se de um sítio para o outro através do sistema linfático, permanecendo na derme, não há visceralização. (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995; MAUEL & BEHIN, 1981).

Esses pacientes parecem ter uma imuno-deficiência específica aos antígenos de leishmânia, sendo incapazes de montar uma resposta imune celular efetiva (CONVIT et al., 1972). Após tratamento com drogas específicas

a resposta celular pode ser restaurada e uma mudança nos padrões de citocinas é observado nas células mononucleares do sangue periférico; predomínio de mRNA IFN- γ sobre mRNA IL-10 (BARRAL-NETTO et al., 1996). O uso de IFN- γ como um agente co-terapêutico com antimônio pentavalente, mostra-se benéfico, sendo capaz de promover a redução ou o desaparecimento do parasitismo e a cura das lesões, durante e após o tratamento (BITTENCOURT et al., 1996).

Os agentes etiológicos associados à LCD são *L. aethiopica* no Velho Mundo e *L. amazonensis*, *L. mexicana* no Novo Mundo. Entretanto, existem relatos de casos de LCD causados por *L. major* (MAUEL & BEHIN, 1981).

1.3.4 Leishmaniose Visceral

No local da picada do flebótomo parasitado surgiu algumas vezes uma pápula, com ou sem linfadenopatia, que após poucas semanas pode desaparecer espontaneamente ou após o tratamento, induzindo o desenvolvimento de imunidade protetora. A capacidade de controlar a infecção está relacionada com o desenvolvimento de uma resposta imune específica, predominantemente, mediada por células (BADARÓ et al., 1986).

No entanto, alguns indivíduos desenvolvem a forma grave da doença. Os macrófagos parasitados disseminam-se através do sistema reticuloendotelial, geralmente para os órgãos hematopoiéticos baço, fígado, medula óssea e para tecidos linfóides (MAUEL & BEHIN, 1981; LIEW & O'DONNELL, 1993). As manifestações clínicas principais nos pacientes que desenvolvem a doença, são febre intermitente, perda de peso e de apetite, anemia, diarreia, hepatoesplenomegalia. Com o avanço da doença ocorrem

caquexia e infecções secundárias e manifestações hemorrágicas graves, podendo ser fatal se não tratados (BITTENCOURT & BARRAL-NETO, 1995).

Os agentes etiológicos que causam a LV são *L. infantum* e *L. donovani*, no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo. Ocasionalmente, a *L. amazonensis* tem sido isolada de paciente com doença visceral ou com leishmaniose dérmica pós-kala-azar (LAINSON & SHAW, 1987).

1.4 MODELO MURINO

1.4.1 A importância do modelo murino

O modelo murino tem sido muito útil no estudo das infecções com leishmânia. Várias linhagens de camundongos isogênicos reproduzem experimentalmente algumas características das manifestações clínicas observadas na doença humana. As linhagens de camundongos são classificadas como resistentes ou susceptíveis à infecção por *Leishmania sp*, a depender do “background” do camundongo e da espécie do parasito (BEHIN et al., 1979; GRIMALDI, 1982; HOWARD et al., 1980).

As linhagens de camundongos consideradas resistentes desenvolvem um padrão que se assemelha a LC. No curso da infecção, desenvolvem lesões pequenas locais, são capazes de destruir os parasitos e de montar uma resposta imune protetora evoluindo para a cura espontânea da infecção. Os estudos histológicos mostram a presença de reação granulomatosa na lesão, associada a um número pequeno de parasitos. Já as linhagens consideradas como modelos de susceptibilidade desenvolvem lesões progressivas, ulceradas, podendo evoluir com visceralização, metástase, e morte. Há intenso

parasitismo no local de inoculação e necrose lítica. Algumas linhagens de camundongos fazem resposta intermediária, as lesões pequenas persistentes, apresentam parasitismo relativamente elevado, mas a infecção não é fatal (ANDRADE et al., 1984; BEHIN et al., 1979; BRADLEY & KIRKLEY, 1977; PÉREZ et al., 1978). Não há nenhum modelo que, satisfatoriamente, reproduza a LCM. Esses estudos contribuíram para caracterizar o espectro de manifestações clínicas em linhagens de camundongos isogênicas, mostrando que fatores genéticos são parâmetros importantes na determinação do padrão de resistência ou de susceptibilidade.

Os fatores relacionados à espécie de parasito foram destacados por ALEXANDER & BLACKWELL, (1986) demonstrando que a depender da espécie de leishmânia utilizada na infecção, cursos diferentes da doença podem ser determinados. Eles compararam o desenvolvimento da lesão em oito espécies de camundongos isogênicos infectados com formas amastigotas de duas espécies de leishmânias diferentes (*L. major* e *L. mexicana*). Eles verificaram que as linhagens C3H/He, C57Bl/6, C57Bl/10, CBA/Ca, ATL, A, normalmente resistentes à infecção por *L. major*, eram susceptíveis à infecção por *L. mexicana* e desenvolveram lesões que não curavam. Ao contrário, a linhagem de camundongos DBA/2 foi resistente à infecção com *L. mexicana* e susceptível à *L. major*. Apenas a linhagem de camundongos BALB/c foi susceptível às duas espécies de leishmânias.

Outros trabalhos sugerem que existem diferenças fenotípicas entre parasitos da mesma espécie, determinando inclusive diferentes cursos da infecção. ALMEIDA, et al. (1996) avaliou o curso da infecção em camundongos

BALB/c, infectados com cinco isolados de *L. amazonensis* de casos humanos com LC, LCM e LV. Foi observado diferentes padrões de resposta à infecção. Os camundongos BALB/c infectados com isolados de LC/LMC desenvolveram susceptibilidade à doença. Enquanto que esta mesma linhagem de camundongo infectada com isolados de LV, cursaram com sinais de resistência e de controle à infecção.

Algumas espécie de leishmânia como a *L. braziliensis* que induzem infecção grave no homem, nem sempre causam doença em camundongos isogênicos. CHILDS, et al. (1984) estudaram a infecção causada por *L. braziliensis* nas linhagens de camundongos isogênicos C3H/HeJ, C57L/J, C57BL/6J, CBA/J, DBA, A/HeJ, AKR/J, BALB/c, DBA/2j, SWR/j CBA/Caj e A/J. Oito dessas doze linhagens, desenvolveram lesões na fase inicial da infecção, mas estas lesões foram controladas e não mostraram sinais de evolução crônica. Somente a linhagem de camundongos BALB/c apresentou parasitos isolados em cultura.

A infecção causada por *L. major* é o modelo mais bem estudado na leishmaniose tegumentar murina, tanto nos experimentos *in vivo* como *in vitro*. Tem sido demonstrado que a maioria das linhagens como CBA, C57Bl/6, C57Bl/10, C3H/He são resistentes à infecção. Desenvolvem lesões cutâneas localizadas, que evoluem para a cura espontânea, tornando o animal imune à reinfecção. Enquanto que as linhagens de camundongos susceptíveis como BALB/c, DBA e A/Jax, desenvolvem lesões cutâneas ulceradas no local de inoculação do parasito, evoluindo com visceralização, metástase e morte do animal. (BEHIN et al., 1979; LAUNOIS et al., 1996; MÜLLER et al., 1992). Nos

estudos realizados BEHIN et al., (1979), os camundongos C57Bl/6 foram considerados uma como linhagem de resposta intermediária à infecção por *L. tropica major* (atualmente designada *L. major*). O tamanho da lesão e a proporção de camundongos recuperados variou na dependência da quantidade de parasitos inoculados (5, 10 e 20 x 10⁶ promastigotas). Enquanto, que as linhagens dos camundongos CBA/ca e C3H/He conseguiram curar suas lesões, mesmo quando infectados com alta carga do parasito.

Na infecção causada por *L. amazonensis* verifica-se uma variação maior no espectro de susceptibilidade, a depender da linhagem de camundongo utilizada. A maioria das linhagens de camundongos investigadas desenvolvem lesões e mostram poucas evidências de resolução (CALABRESE & COSTA, 1992; SOONG et al., 1997).

O nível extremo de susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis* é representado pela linhagem de camundongos BALB/c, que desenvolvem lesões progressivas, visceralização dos parasitos e metástase (ANDRADE et al., 1984; BARRAL-NETTO et al., 1987a; BARRAL-NETTO et al., 1987b; ALMEIDA et al., 1996). A mesma tendência para desenvolver necrose na pata e lesões metastáticas, foram verificadas em linhagem de camundongos C57Bl/10, porém menos grave do que nos camundongos BALB/c (CALABRESSE & COSTA, 1992), ou mesmo para desenvolverem lesões persistentes com elevado parasitismo no sítio de inoculação (AFONSO & SCOTT, 1993).

A infecção por *L. amazonensis* em camundongos CBA foi pouco estudada. CHAMPSI & PRATT, (1988) relatam que a infecção induz lesões de

crescimento progressivo. Em experimentos de esquemas de imunização, os camundongos CBA foram considerados por CHAMPSI & PRATT, (1988) e SOONG, et al. (1995), como susceptível à infecção por *L. amazonensis* mas relativamente resistente a esta infecção, quando comparada com a linhagem de camundongos BALB/c. Esses são os únicos relatos da literatura demonstrando a susceptibilidade dos camundongos CBA à infecção por *L. amazonensis*.

Nas linhagens de camundongos C3H/HeN e DBA/2 infectadas por *L. amazonensis*, as lesões desenvolvem-se mais lentamente, não ulceram mas também não curam (ALEXANDER & BLACKWELL, 1986; CALABRESSE & COSTA, 1992; REED et al., 1986).

A linhagem de camundongos C57Bl/6 mostra um padrão variado de lesões primárias que cicatrizam espontaneamente (CHILDS et al., 1984), ou de lesões progressivas, ulceradas e/ou metastáticas (BARRAL et al., 1983; SOONG et al., 1997) à infecção por *L. amazonensis*.

Estudando o curso da infecção por *L. amazonensis* em camundongos C57Bl/6, por períodos prolongados (superior a um ano), foi observado que após a cura clínica aparente da infecção, ocorreu desenvolvimento do tamanho das lesões primárias com ulceração, inclusive na base da cauda e na pata traseira contra lateral, a qual continuava a abrigar formas viáveis do parasito, e desenvolveram lesões metastáticas na região nasal. Foi detectado presença de parasitos do baço. (BARRAL et al., 1983; BARRAL-NETTO et al., 1987).

O desenvolvimento de lesões metastáticas após resolução da lesão com 4 a 6 meses de infecção, foi também relatado por ANDRADE, et al. (1984) em

camundongos A/J infectados com *L. mexicana amazonensis*. Estes dados da literatura são muito interessantes e apontam para a importância do binômio parasito-hospedeiro na determinação do curso da infecção.

As bases genéticas que determinam as funções efetoras associadas ao fenótipo de resistência e de susceptibilidade à patógenos intracelulares, ainda não foram bem definidas (McLEOD et al., 1995). Sabe-se que a infecção causada por diferentes espécies de leishmânias é controlada por diferentes genes do hospedeiro (ALEXANDER & BLACKWELL, 1986). Além disso, parece que vários genes estão envolvidos em diferentes mecanismos, em camundongo de diferentes background genético (LOUNOIS et al., 1998).

No estudo da infecção por *L. donovani*, que causa a leishmaniose visceral, foram identificados dois estágios de regulação genética envolvendo diferentes genes. No estágio inicial da infecção, a susceptibilidade e a resistência inata são controladas pelo gene Lsh, mapeado no cromossomo 1. O gene Lsh está envolvido no processo de maturação dos macrófagos teciduais do hospedeiro restringindo a proliferação dos parasitos (McLEOD et al., 1995). No estágio tardio da infecção, a imunidade adquirida é controlada por no mínimo três genes adicionais: Rld, H-11 e Ir-2 (LIEW & O'DONNELL, 1993; McSORLEY et al., 1996).

Na leishmaniose cutânea não é evidente a distinção de estágios durante o curso da infecção, como observado na infecção por *L. donovani*. A susceptibilidade à infecção causada por *L. major* é controlada pelos genes Scl-1 (cromossomo 11) e Scl-2 e pelos genes ligados a H-11 (LIEW & O'DONNELL, 1993). O gene H-11 afeta portanto, a susceptibilidade tanto nas infecções por

L. donovani como por *L. major*. A expressão do gene Scl-1 está associado com o fenótipo de controle ou aumento do tamanho das lesões por *L. major* e *L. mexicana*. A expressão de gene Scl-2, está associado com o fenótipo de controle do desenvolvimento das lesões, nos camundongos DBA/2 infectados com *L. mexicana* (McSORLE et al., 1996).

A clonagem do gene Lsh, identificou um produto que tem semelhança estrutural com o transportador de nitrato (nitrate transporter) codificado pelo gene CrnA de *Aspergillus nidulans*, denominado “natural resistance-associated macrophage protein 1” (NRAMP1). Na infecção por *Leishmania sp*, a atividade microbicida é dependente da habilidade dos macrófagos em elaborar produtos intermediários do nitrogênio, como o óxido nítrico (LIEW & COX, 1991). Baseado nesta homologia do hospedeiro, a função de NRAMP1 pode estar associada com o mecanismo efetor microbicida; no transporte e/ou no metabolismo dos radicais de nitratos para o interior dos fagolisossomas onde são convertidos para óxido nítrico. (McLEOD et al., 1995; McSORLEY et al., 1996; NATHAN, 1995).

Recentemente, analisando os dados genotípicos e fenotípicos de 470 animais da geração F2 do cruzamento entre as linhagens de camundongos C57Bl/6 e BALB/c, foram mapeados dois *loci* que estão associados com controle do curso da infecção com *L. major*. Um na região que inclui o locus H-2 no cromossomo 17, identificado como *Imr 1* e o outro no cromossomo 9, identificado como *Imr 2* (ROBERTS et al., 1997).

Os diferentes cursos da doença não podem ser atribuídos somente às diferenças no “background”, uma vez que a susceptibilidade pode ser revertida

por manipulações imunológicas. Camundongos BALB/c infectados modificam os perfis da resposta imune, tornando-se mais resistentes através de imunizações com antígenos parasitários solubilizados (BARRAL-NETTO et al., 1987; POMPEU et al., 1992), antígenos purificados (CHAMPSI & McMAHON, 1988; SOONG et al., 1995), ou mesmo induzindo proteção cruzada entre espécies de leishmânias taxonomicamente distintas, através de parasitos vivos ou atenuados (ALEXANDER & KAYE, 1985; ALEXANDER et al., 1982).

O modelo murino tem contribuído para compreensão das interações entre parasito e hospedeiro, identificando partes de um mecanismo complexo que envolvem os fenômenos de resistência e de susceptibilidade à infecção por *Leishmania sp* (MAUEL & BEHIN, 1981, LAUNOIS et al., 1996, McLEOD et al., 1995).

1.4.2 A resposta imune dos camundongos

O desenvolvimento da imunidade protetora está associada a indução de uma reação imune mediada por célula (IMC) em camundongos resistentes e em camundongos susceptíveis imunizados (BARRAL et al., 1996) ou manipulados por intervenções imunológicas (McSORLEY et al., 1996).

Em relação a imunidade humoral, as evidências da falta de um papel protetor dos anticorpos, foi verificada nos estudos em que a transferência passiva do soro ou das frações de anticorpos por um período prolongado de camundongos imunes, não alterou o curso da infecção nos camundongos BALB/c. Outros experimentos utilizando camundongos Biozzi AB/L, que fazem uma resposta humoral deficiente quando infectados com *L. major*, mostram-se

resistentes a doença (HALE & HOWARD, 1981 apud LIEW & O'DONNELL, 1993; McSORLEY et al., 1996).

Apesar da falta de um papel importante na recuperação das infecções estabelecidas, há evidências de que os anticorpos anti-leishmânia participam da lise mediada pelo complemento das formas promastigotas de *L. donovani in vitro* (LIEW & O'DONNELL, 1993). A vacinação com a glicoproteína de superfície gp46 de promastigotas de *L. amazonensis*, mostrou correlação entre proteção e níveis de anticorpos produzidos contra estas proteínas, sugerindo um possível papel dos anticorpos na geração de imunidade (CHAMPSI & McMAHON, 1988).

Enquanto os anticorpos não parecem influenciar de forma definitiva na resolução da doença, a produção da imunidade mediada por célula, em especial as células T CD4⁺ antígeno-específicas, são elementos chaves na determinação dos perfis de resistência ou de susceptibilidade na leishmaniose.

Os parâmetros celulares responsáveis por estes perfis, estão bem demonstrado nos experimentos em que é possível manipular a resposta imune, tornando camundongos geneticamente susceptíveis, resistentes a infecção e vice-versa. A depleção das células T CD4⁺ através da administração repetida de anticorpo monoclonal anti-CD4, induz desenvolvimento de lesões em camundongos resistentes ou promove controle da infecção em camundongos susceptíveis (MÜLLER et al., 1992; TITUS et al., 1987). A reconstituição com células T singênicas em camundongos atímicos nude, os quais são deficientes de células T, capaz de restaurar a resposta protetora

desses animais, indicando assim, o comprometimento das células T, para influenciar o curso da infecção por *Leishmania sp* (MITCHELL et al., 1980).

Os experimentos de transferência adotiva de células T CD4⁺ derivadas de camundongos resistentes, que foram curados da infecção primária ou de camundongos susceptíveis, que tornaram-se resistentes pela vacinação contra antígenos parasitários podem induzir a imunidade protetora. A transferência dessas células para receptores “naive” singênicos ou camundongos de “background” susceptível, torna-os capazes de controlar a doença após desafio (LIEW, 1986).

Entretanto, a susceptibilidade à infecção pode ser mediada pelas células T CD4⁺ de camundongos geneticamente susceptíveis (BALB/c) e resistentes (CBA). A transferência intra-venosa dessas células T CD4⁺ antígeno-específicas (*L. major*), para receptores singênicos normais, exacerbou a infecção. O desenvolvimento da doença foi caracterizado pelo aumento do tamanho das lesões, aumento do número de parasitos no sítio de inoculação pela capacidade montar reação de DTH específica e de produzir níveis altos IFN- γ em resposta à estimulação com antígenos parasitários de *L. major* (TITUS et al., 1984; 1985).

Estes resultados indicam que existe uma heterogeneidade dentro do compartimento de células T CD4⁺; de subpopulações celulares que podem estar envolvidas com fenótipo de cura e de outras com o fenótipo de exarcebação da doença.

A identificação dessas subpopulações foi baseada no perfil de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺ antígeno-específico. Foi demonstrado que na

infecção por *L. major*, após reestimulação *in vitro*, a depender do estímulo antigênico ou da linhagem de camundongos utilizada, dois perfis distintos de resposta das células T CD4⁺ foram identificados. O perfil de resposta do tipo Th 1, nos quais os clones celulares secretam as citocinas IL-2, INF- γ , está associado ao fenótipo de resistência e o perfil de resposta do tipo Th2, caracterizado por clones celulares que secretam as citocinas IL-4, IL-10, está associado ao fenótipo de susceptibilidade (CHERWINSKI et al., 1988; HEINZEL et al., 1989).

Desta forma a habilidade dos camundongos resistentes para inibir a multiplicação dos parasitos e controlar as lesões correlaciona-se com o desenvolvimento de subpopulações celulares que produzem predominantemente células do tipo Th1, induzindo reação de hipersensibilidade tardia e ativação dos macrófagos. Enquanto que a inabilidade para controlar a multiplicação dos parasitos e o desenvolvimento das lesões, estão associadas com a expansão de subpopulações celulares do tipo Th2, os quais provêm um eficiente auxílio para a produção de anticorpos e inativação dos macrófagos (CHER & MOSMANN, 1987; COFFMAN et al., 1988). No entanto, as subpopulações do tipo Th1 também podem prover auxílio às células B para produzir anticorpos, estimulando diferentes isotipos de imunoglobulinas. As subpopulações do tipo Th1 induzem mais substancialmente a produção de IgG2a, enquanto que os subpopulações Th2 induzem a produção de IgG1 e IgE (COFFMAN et al., 1988).

A demonstração do envolvimento de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 (produzindo INF- γ) e do tipo Th2 (produzindo IL-4),

determinando preferencialmente a resposta de cura ou de exacerbação da doença, foi avaliada nos experimentos de transferência de subpopulações celulares T CD4⁺ que secretam citocinas IL-2 e IFN- γ ou de IL-4. A transferência de cada uma dessas subpopulações para camundongos BALB/c e BALB/c mutante (SCID – “severe combined immunodeficiency”), resultou em controle da infecção ou exacerbação da doença, respectivamente (HOLADAY et al., 1991; SCOTT et al., 1988). Outro experimento utilizando populações de células T que reconhecem antígenos solúveis de *L. major* e secretam IL-2 e IFN- γ mas não secretam IL-4 ou IL-5 foram capazes de transferir proteção à camundongos susceptíveis BALB/c (SCOTT et al., 1990).

A importância de IFN- γ como mediador principal da resistência à infecção por *L. major*, tem sido verificada nos experimentos de neutralização usando anticorpos monoclonais (BELOSEVIC et al., 1989) e em camundongos “knockout” para o gene de IFN- γ (WANG et al., 1994). A administração de anticorpos monoclonais neutralizantes anti-IFN- γ em camundongos resistentes, durante o curso da infecção ou quando é oferecido em dose única no início da infecção, é suficiente para tornar esses animais susceptíveis à infecção (BELOSEVIC et al., 1989), sugerindo que a presença de IFN- γ nas fases iniciais da infecção é necessária para dirigir o desenvolvimento de uma resposta benéfica. O IFN- γ em sinergia com o TNF- α e/ou LPS, induz a síntese de óxido nítrico sintetase (iNOS) pelos macrófagos ativados. A ativação dos macrófagos resulta na produção de radicais reativos de nitrogênio que são tóxicos para os parasitos (LIEW & COX, 1991; NATHAN, 1995). No entanto, o tratamento com IFN- γ recombinante (r-IFN- γ) em camundongos BALB/c, não é

suficiente para induzir imunidade (BELOSEVIC et al., 1989). Tem sido sugerindo que o efeito de IFN- γ no desenvolvimento das células Th1 pode ser direto, atuando como um co-fator com IL-12 ou indiretamente através da inibição da produção de IL-4 (SCHARTON-KERSTEN, 1995; SCHMITT et al., 1994).

A IL-4 é produzida por células T, células NK1.1 e por mastócitos. O tratamento de camundongos BALB/c com anticorpo monoclonal anti-IL-4 (mAb anti-IL-4) na fase inicial da infecção por *L. major*, reverte completamente o fenótipo de susceptibilidade. A cura foi correlacionado com a produção de citocinas do tipo Th1 nas células de linfonodo de drenagem (SADICK et al., 1990). A IL-4 tem sido demonstrado ser essencial e suficientemente capaz de induzir resposta não protetora na leishmaniose experimental. MORRIS, et al. (1993) verificaram em diferentes linhagens de camundongos que a expressão de mRNA de IL-4 correlaciona-se bem com a gravidade da infecção por *L. major*, enquanto que a expressão de mRNA de IFN- γ não teve uma boa correlação com resistência entre as linhagens estudadas, sugerindo que a produção de IFN- γ para o desenvolvimento da resposta Th1 pode variar em relação ao “background” genético do camundongo.

Os experimentos de neutralização de IL-12 com mAb anti-IL-12, demonstram a importância desta citocina no desenvolvimento da resposta do tipo Th1. A IL-12 é produzida principalmente por monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. A IL-12 induz proliferação de células T e células “natural killer” (NK), as quais são fontes importantes de IFN- γ (SCHARTON & SCOTT, 1993). Os camundongos BALB/c tratados com IL-12

recombinante (rIL-12) na primeira semana após a infecção por *L. major*, controlam as lesões, há aumento dos níveis de IFN- γ e desenvolvimento da resposta protetora tipo Th1 (SYPEK et al., 1993).

O tratamento com “transforming growth factor β ” (TGF- β) recombinante (rTGF- β) em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, exerceu as lesões e foi associado com aumento da produção de mRNA de IL-10 nas células do linfonodo de drenagem. O papel de TGF- β tem sido relatado nos eventos iniciais da infecção regulando os mecanismos que promovem a inativação das funções dos macrófagos (BARRAL et al., 1993). O TGF- β inibe a produção de iNOS nas lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com *L. major*, favorecendo portanto a manutenção dos parasitos intracelulares e o desenvolvimento de resposta susceptível à infecção (STENGER et al., 1994).

Além das células T CD4⁺, vários estudos têm demonstrado a contribuição das células T CD8⁺ na imunidade protetora à infecção por *L. major*, especificamente na resistência à infecção secundária. A depleção das células T CD8⁺ com anticorpos monoclonais, exacerba as lesões de camundongos resistentes e susceptíveis (TITUS et al., 1987). Na infecção por *L. amazonensis*, foi demonstrado que na ausência das células T CD4⁺ as células T CD8⁺ podem modular o curso da infecção em camundongos C57Bl/6 (SOONG et al., 1997).

SHANKAR & TITUS (1995) mostram que além do compartimento das células T, o compartimento das células não-T (macrófagos e células B) podem determinar independentemente a resistência à doença. O trabalho indica que a

despeito da correlação significativa entre resposta Th1, associada a cura, e resposta Th2, associada ao desenvolvimento da doença, pode haver uma sobreposição das funções celulares Th1/ Th2 na leishmaniose experimental murina por *L. major*.

A interação das células dendríticas, macrófagos e células B (células apresentadoras de antígeno) no sítio de inoculação ou em experimentos *in vitro*, induzem seletivamente diferenciação de células T CD4⁺ (MOSMANN & SAD, 1996; ROSSI-BERGMANN et al., 1993). Foi demonstrado no sistema de PIV “priming in vitro” (estimulação primária *in vitro*) que as células dendríticas foram as mais potentes células apresentadoras de antígeno, seguida pelas células B e macrófagos. As células B sozinhas ou em conjunto com células dendríticas favorecem a diferenciação de células tipo Th2 e a produção de IL-4. No entanto, os macrófagos induzem preferencialmente níveis mais elevados de IFN- γ e são mais eficientes células apresentadoras de antígeno para estimular as células do tipo Th1 (SHANKAR & TITUS, 1997).

A influência de sinais co-estimulatórios em células apresentadoras de antígeno como B7.1 ou B7.2 durante a apresentação do antígeno podem induzir seletivamente o desenvolvimento da resposta do tipo Th1 ou Th2, respectivamente. No entanto, sua função pode ser afetada pela concentração do antígeno (McSORLEY et al., 1996; MOSMANN & SAD, 1996).

Outros fatores relacionados com o desencadeamento e a modulação das respostas inflamatórias e imunes são essenciais para a defesa do hospedeiro e portanto podem influenciar o curso da doença. A seqüência de eventos que são desencadeados com a liberação dos leucócitos desde o

lúmem vascular até o sítio da lesão, são regulados por uma rede complexa de interações específicas, a qual fazem parte as quimiocinas, as moléculas de cito-adesão e mediadores inflamatórios dentre, os quais os produtos do metabolismo do ácido araquidônico (COTRAN et al., 1994).

A adesão e transmigração dos leucócitos são determinados em grande parte, pelas moléculas de cito-adesão através de ligações complementares entre os receptores de adesão e seus respectivos ligantes. Envolvendo a ação combinada de múltiplas famílias de moléculas de adesão: as selectinas (E-selectinas, P-selectinas e E-selectinas), as imunoglobulinas (ICAM-1,2, "integrins intercellular adhesion molecule" 1, 2; VCAM-1, "vascular adhesion molecule" 1; MAdCAM-1, "mucosal addressin cell adhesion molecule" 1; PECAM-1- "platelet/endothelial cell adhesion molecule" 1) e as integrinas (COLLINS, 1995; COTRAN et al., 1994).

As quimiocinas tem um papel fundamental nestes eventos, devido sua habilidade para: A) otimizar a função das integrinas (proteína de transmembrana), promovendo uma firme adesão entre os leucócitos e seus ligantes endoteliais. B) atrair subpopulações específicas de células. C) estimular as funções efetoras dos leucócitos (COLLINS, 1995; FURIE & RANDOLPH, 1995). Na leishmaniose murina foi mostrado recentemente, que promastigotas em fase estacionária de *L. major* induz expressão de transcritos das quimiocinas KC e JE (membro da família das quimiocinas α e β respectivamente) em macrófagos murinos. Essa indução é rápida, ocorre entre 1 a 2 horas e desaparece dentro de 3 a 4 horas. As quimiocinas JE (homólogo murino de "MCAF/MCP-1, monocyte chemotactic and activating factor /

monocyte chemoattractant protein” -1 no homem) e KC (homólogo murino de GRO no homem) foram descritas como capazes de recrutar macrófagos e neutrófilos. Portanto, podem atrair subpopulações de células específicas na leishmaniose (RACOOSIN & BEVERLEY, 1997).

Nas lesões dos pacientes com LCL e LCD infectados por *L. mexicana* foi verificado níveis de expressão distintos das quimiocinas MCP-1 e MIP-1 α “macrophage inflammatory protein” 1). Nas lesões dos pacientes com LCL, que curam espontaneamente suas lesões foram expressos níveis predominantes de MCP-1 e níveis moderados de MIP-1 α . Enquanto que nas lesões dos pacientes com LCD, foi associado com a expressão de níveis baixos de MCP-1 e níveis altos de MIP-1 α (RITTER et al., 1996). Nos modelos murinos de leishmaniose estes fatores foram pouco ou nada explorados.

Na inflamação aguda, os produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (leucotrienos e prostaglandinas) mediam todas as etapas desde a vasoconstricção até quimiotaxia. Dentre os tipos de prostaglandinas (PG) produzidos, a série PGE₁ e PGE₂, secretadas por macrófagos, fibroblastos e células foliculares dendríticas, podem inibir a síntese de IFN- γ pelas células do tipo Th1, mas não podem inibir a síntese de IL-4 pelas células do tipo Th2 (PHIPPS et al., 1991). A infecção em camundongos BALB/c por *L. major*, têm sugerido que PGE₂ favorece a exarcebação das lesões cutâneas. O tratamento com indometacina (inibidor da síntese de PG) foi associado com uma diminuição significativamente no tamanho das lesões e com aumento na produção de IFN- γ e de óxido nítrico (FARRELL & KIRKPATRICK, 1987; FREITAS et al., 1995).

Os experimentos *in vitro*, utilizando o sistema PIV, mostram que os camundongos susceptíveis BALB/c produzem mais PGE₂ do que os camundongos resistentes CBA. E a adição de prostaglandina nas culturas de células de camundongos CBA, inibiu a produção de IFN- γ e de óxido nítrico (SOARES, 1997a)._Esses resultados sugerem que PGE₂ contribui para o desenvolvimento da resposta Th2 nos camundongos BALB/c infectados por *L. major*.

Além dos fatores relacionados com a indução das subpopulações de células T CD4⁺ (Th1/Th2), os fatores relacionados com o sítio de inoculação do parasito (NABORS et al., 1995; KIRKPATRICK et al., 1987), a dose (DOHERTY & COFFMANN, 1996), o sexo do hospedeiro (SATOSKAR & ALEXANDER, 1995), a gravidez (KRISHNAN et al., 1996), imunossupressão induzida por co-infecção (BARRAL-NETTO et al., 1995) também são relatados como capazes de influenciar o curso da infecção.

O sítio de inoculação onde o sistema imune entra em contacto com o parasito, pode ser um determinante crítico no curso da infecção. KIRKPATRICK, et al. (1987) verificaram que quando a infecção por *L. major* ou *L. amazonensis* é feita nas regiões anteriores do tronco dos camundongos, junção cérvico-torácica e torácica-lombar, as linhagens susceptíveis BALB/c e CB6F1 (descendência F1 de C57Bl/6 x BALB/c), que são incapazes de montar uma resposta imunológica protetora, tornaram-se capazes de controlar e de curar as pequenas lesões formadas. Em comparação, nas regiões posteriores do tronco, da metade do dorso até a cauda, as lesões desenvolvem-se mais rapidamente, resultando inclusive em metástase nos camundongos BALB/c. As

lesões nos camundongos CB6F1 não curaram, sendo que estas, foram maiores no grupo infectado com *L. amazonensis* do que no grupo infectado com *L. major*.

Recentemente NABORS, et al. (1995) investigaram a resposta imune nos camundongos CB6F1, em diferentes sítios cutâneos. Os resultados indicaram que os camundongos CB6F1 desenvolvem lesões progressivas, apresentando resposta imune celular do tipo Th2, quando inoculados com *L. major* na região dorsal. Quando inoculados na pata, curaram suas lesões e apresentaram resposta imune celular tipo Th1. No entanto, durante as 2 primeiras semanas de infecção os perfis de expressão do mRNA IL-4 e IFN- γ foram similares em ambos os sítios de inoculação (NABORS et al., 1995).

A rota de imunização via intravenosa e intraperitoneal em camundongos BALB/c resulta em cura da infecção. Enquanto que a rota de imunização via subcutânea da mesma preparação, exacerba a infecção (McSORLEY et al., 1996). Esses dados indicam que determinados sítios de inoculação, nos quais os antígenos parasitários são apresentados, o tropismo e a rota percorrida pelo parasito, são fatores importantes que devem ser considerados no estudo da infecção experimental (SOLBACH & LASKAY, 1995).

Outro fator importante, capaz de influenciar o curso da infecção é a dose infectante. Camundongos BALB/c infectados com 10^2 formas metacíclicas de *L. major*, tornam-se aptos à controlar suas lesões e desenvolver imunidade prolongada. O controle das lesões está associada com produção predominante de altos níveis de IFN- γ e níveis não detectáveis de IL-4, apesar da persistência de parasitos no sítio das lesões primárias (DOHERTY &

COFFMAN, 1996). Esses dados indicam que a contenção do parasito no sítio de inoculação, correlaciona-se com resistência e que foi dependente da baixa dose infectante. Quando camundongos BALB/c são infectados com 10^3 ao invés de 10^6 , nas primeiras 24 horas observa-se, disseminação dos parasitos somente para a pata e para o linfonodo popliteo. Enquanto que, nos camundongos BALB/c infectados com 10^6 , os parasitos disseminam para o baço, pulmão e medula óssea. Em linhagens resistentes à infecção por *L. major* como CBA/J, C3H/HeJ e C57Bl/6, ocorreu o mesmo padrão de disseminação verificado em camundongos BALB/c, que receberam a dose baixa (10^3) de parasito (HEINZEL et al., 1988; LASKAY et al., 1995).

Deve ser ressaltado, que toda a base de conhecimento sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na diferenciação das células T CD4⁺ mediando os perfis de susceptibilidade (Th1) e de resistência (Th2), foram estabelecidos na infecção por *L. major*, utilizando linhagens de camundongos geneticamente resistentes como C3H, CBA, C57Bl/6 contrapondo com linhagens altamente susceptível como BALB/c (MÜLLER et al., 1992; McSORLEY et al., 1996).

A falta de modelo experimental apropriado tem sido uma limitação no estudo da infecção causada por *L. braziliensis*. Recentemente, foi demonstrado que a baixa infectividade da *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, pode ser devido, à inabilidade deste parasito para induzir uma forte e sustentada produção de IL-4 nestes animais. Os níveis de IFN- γ produzidos, foram equivalentes quando comparados em animais (BALB/c) infectados com *L. major* (DeKREY et al., 1998). A exarcebação da infecção por *L. braziliensis*

em camundongos BALB/c, é possível de ser obtida através da administração de TGF- β recombinante (rTGF- β) exógeno (BARRAL et al.,1993; BARRAL-NETTO, 1992). A infecção foi associada com aumento de produção de IL-10 e diminuição de IFN- γ .

Os mecanismos imunológicos que promovem a susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis* no modelo murino, diferente da infecção causada por *L. major* é pouco explorado. Trabalhos recentes têm demonstrado que a susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis* não é exclusivamente mediada pelas células Th2 e pode haver a participação de outros mecanismos. Em linhagem de camundongos C57Bl/10, resistentes à infecção por *L. major*, o perfil de susceptibilidade foi caracterizado como crônico e não-fatal. A produção de IL-4 foi verificada somente nas fases iniciais da infecção. Nas fases tardias, quando a lesão se desenvolve, não foi detectado produção de IL-4 (AFONSO & SCOTT, 1993). Esses resultados mostram que a susceptibilidade verificada na infecção causada por *L. amazonensis*, pode ser induzida na ausência ou em níveis baixos de produção de IL-4 (AFONSO & SCOTT, 1993; MAUEL & BEHIN, 1981; SOONG et al., 1997).

O perfil imunológico mediado pelas células T CD4⁺ em camundongos CBA está bem caracterizado na infecção por *L. major*. Esses animais são resistentes e produzem níveis elevados de IFN- γ e níveis baixos ou não detectáveis de IL-4 e IL-5 (SOARES et al., 1997b). Entretanto, não há relato do padrão de resposta celular desenvolvida pelos camundongos CBA infectados por *L. amazonensis*.

1.4.3 O estudo morfológico das lesões em modelos murinos de leishmaniose tegumentar

As características histológicas das lesões são indicadores importantes de resistência e de susceptibilidade que podem ser estudadas experimentalmente, correlacionando as principais alterações histológicas com a manifestação clínica e associando-as com o prognóstico da doença (ANDRADE et al., 1984; BARRAL et al., 1996; BARRAL et al., 1987; COTRAN et al., 1994).

No homem, os perfis histológicos que caracterizam as formas polares alérgicas, (LC e LCM), variam de um infiltrado inflamatório dérmico de moderado a intenso, constituído por macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Presença de reação granulomatosa, necrose fibrinóide e os parasitos são geralmente escassos. Nas formas polares graves anérgicas da infecção (LCD), caracteriza-se basicamente pelo intenso infiltrado macrofágico repleto de parasitos, poucos linfócitos e plasmócitos (BARRAL et al., 1996; BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995; DEANNE & GRIMALDI, 1985).

As linhagens de camundongos isogênicos apresentam resistência ou susceptibilidade relativas à infecção por leishmânia, comparáveis as formas polares alérgicas e anérgicas do espectro na doença humana (ANDRADE et al., 1984; BARRAL-NETTO et al., 1987). ANDRADE, et al. (1984) demonstraram padrões diferenciais da resposta tissular em camundongos BALB/c e A/J infectados com *L. amazonensis*. As lesões cutâneas nos animais resistentes (A/J) foram caracterizadas por um nódulo localizado, com infiltrado celular misto focal, constituídos por muitos linfócitos, plasmócitos, e outras células mononucleares. Os macrófagos e neutrófilos são numerosos nas

primeiras semanas e tendem a diminuir consideravelmente no curso da infecção. Áreas focais de necrose fibrinóide, presença de pequenos granulomas e fibrose intersticial e periférica (ANDRADE et al., 1984; BARRAL et al., 1987) foram outros achados importantes. Já nos animais susceptíveis, as lesões foram caracterizadas por áreas extensas de necrose tipo coagulativa e com infiltrado de aspecto monomórfico macrofágico, intensamente parasitados (ANDRADE et al., 1984). Os macrófagos tinham aspecto semelhante aos descritos na hanseníase “virchowiana”, exibindo citoplasma amplo, claro e vacuolado, repleto de amastigotas.

Desta forma, os padrões histológicos distintos de resistência e susceptibilidade à infecção por leishmânia se correlacionam, tanto no homem quanto no modelo murino, com diferentes perfis de resposta tissular (RIDLEY et al., 1983; ANDRADE et al., 1984). O perfil histológico associado a resistência à infecção, demonstram um infiltrado inflamatório do tipo mononuclear misto, com macrófagos contendo poucos parasitos, reação granulomatosa, necrose fibrinóide, deposição de colágeno e fibrose, os quais correlacionam-se com as formas benignas da doença humana. Enquanto que o perfil histológico associado com a susceptibilidade à infecção tendem a apresentar um infiltrado monomórfico macrofágico altamente parasitado, o qual caracteriza a forma difusa da leishmaniose humana (ANDRADE et al., 1984; BARRAL et al., 1987; FALCOFF et al., 1991). Nesta forma, a presença de linfócitos e plasmócitos limita-se à periferia das lesões (BITTENCOURT et al., 1983).

A mudança no perfil da resposta imune através de imunização intravenosa com antígenos solúveis de promastigotas, é acompanhando por modificação do perfil de resposta histológica. Os camundongos BALB/c altamente susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*, tornam-se parcialmente resistentes e apresentam características histológicas semelhantes às características das linhagens resistentes (BARRAL-NETTO et al., 1987b; POMPEU et al., 1992).

O perfil fenotípico do infiltrado inflamatório, nas fases iniciais da infecção, apresentam características similares nas linhagens de camundongos que desenvolvem padrão de resistência e de susceptibilidade. O predomínio é de polimorfonucleares neutrófilos, seguido por macrófagos e eosinófilos até 24 horas após a infecção por *L. major* ou *L. amazonensis* (ANDRADE et al., 1984; BARRAL et al., 1987; HEINZEL et al., 1988; McELRATH et al., 1987; SUNDERKÖTTER et al., 1993). Por volta do 4º dia, nas lesões de linhagens que desenvolvem padrão de susceptibilidade, o infiltrado granulocítico é substituído por infiltrado macrofágico (macrófagos vacuolados com numerosos parasitos). Nas linhagens que desenvolvem padrão de resistência, o infiltrado é substituído pelo tipo celular misto constituído por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, alguns desses contendo poucos parasitos, além de fibroblastos (ANDRADE et al., 1984; BARRAL-NETTO et al., 1987b).

Os neutrófilos e macrófagos contém grânulos lissossomais que são liberados durante os eventos de quimiotaxia e fagocitose. A análise ultra-estrutural das áreas de necrose, revela sinais de que a maioria dos parasitos foram mortos e fagocitados por neutrófilos e eosinófilos (BARRAL-NETTO et

al., 1987). Sugere-se que os eosinófilos são menos eficiente para fagocitar e para matar o parasito intracelular que outras células inflamatórias (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

A cinética da população de macrófagos infectados com *L. major* em camundongos C57Bl/6 e BALB/c são fenotipicamente distintos (HEINZEL et al., 1988; SUNDERKÖTTER et al., 1993). Comparando com os camundongos BALB/c, a partir do 7º dia após a infecção, os camundongos C57Bl/6 apresentam um percentual alto de macrófagos imaturos, (MRP14⁺), os quais exibem uma elevada atividade leishmanicida. O aparecimento desta população não é dependente de células T e a migração corresponde ao processo de maturação rápida dos macrófagos da medula óssea. A população de macrófagos maduros (F4/80⁺) aumenta a partir do 2º dia e é maior, nos camundongos resistentes do que nos camundongos susceptíveis. A cura da infecção, foi associado com a presença do marcador F4/80⁺, sucedido pela propagação dos clones de células T protetores. Foi verificado que os camundongos C57Bl/6 (nu/nu) que não dispõem de células T funcionais, mostraram também um rápido infiltração de macrófagos F4/80⁺, inclusive em maiores quantidades do que os camundongos BALB/c nu/nu (SUNDERKÖTTLER et al., 1993), evidenciando que o recrutamento desses macrófagos independe da resposta imune celular.

Na fase tardia da infecção, o infiltrado linfocitário torna-se predominante nas lesões cutâneas de camundongos que desenvolvem padrão de resistência à infecção por *L. major* ou *L. amazonensis* (ANDRADE et al., 1984; BARRAL et al., 1987; POMPEU et al., 1992; SUNDERKÖTTER et al., 1993). Na infecção

por *L. amazonensis*, o perfil de resistência desenvolvido pelos camundongos C57Bl/6 à infecção, está associado com a migração de linfócitos T CD4⁺ (anteriormente designado L3T4⁺) e CD8⁺ (anteriormente designado Lyt-2⁺) para o local das lesões na derme, após a 12^o semana. E o perfil de susceptibilidade está associado com uma deficiência migratória de linfócitos T CD4⁺ em camundongos BALB/c (McELRATH et al., 1987).

Na infecção por *L. major*, a análise fenotípica dos linfócitos T CD4⁺ no linfonodo de drenagem e nas lesões cutâneas de camundongos resistentes C57Bl/6 e susceptíveis BALB/c, indica que a ativação de células CD4⁺ expressando receptores IL-2 (IL2R⁺) ocorre nas 2 linhagens de camundongos. Após a primeira semana de infecção, os linfonodos dos camundongos BALB/c apresentaram 4 vezes mais células do que os linfonodos dos camundongos C57Bl/6. Esta diferença persiste até a terceira semana. A partir da sétima semana, o número de células nos linfonodos dos camundongos C57Bl/6 é maior que nos linfonodos dos camundongos BALB/c. Esses dados sugerem que a inabilidade dos camundongos BALB/c para controlar a infecção, não é devido a deficiência de ativação das células T, pois um número significativamente grande de células CD4⁺ (IL2R⁺) estiveram presentes precocemente nos linfonodos de drenagem desses camundongos (HEINZEL et al., 1988).

Apesar de descritos os perfis de respostas relacionados com resistência e susceptibilidade, não há estudos detalhados sobre os mecanismos *in situ* envolvidos na patogênese da leishmaniose. São escassos os conhecimentos sobre a cinética do infiltrado inflamatório no sítio de inoculação, como as

citocinas atuam *in vivo*, quando e como as moléculas de citoadesão são expressas nas fases precoces da infecção com leishmânia antes da ativação de linfócitos T específicos, e como esta resposta inicial pode influenciar o subsequente desenvolvimento das células efetoras.

O camundongo CBA exhibe padrões bem distintos de reatividade histopatológica e imunológica quando infectado pela *L. amazonensis*, em contraposição ao que acontece com a *L. major*. O presente trabalho consiste num estudo comparativo, para avaliar se os tipos de reações polares causados por duas espécies de leishmânia num mesmo hospedeiro, tem ou não as mesmas características, que têm sido descritas em diferentes linhagens de camundongos isogênicos infectados por uma mesma espécie de leishmânia.

2 OBJETIVO GERAL

ESTUDAR, DE MODO COMPARATIVO, A INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS DA LINHAGEM CBA POR *L. amazonensis* ou *L. major*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o curso da infecção pela mensuração do tamanho da lesão e pela pesquisa de parasitos no sítio de inoculação e no linfonodo popliteo.
- Avaliar o padrão morfológico da resposta inflamatória no local da infecção e no linfonodo de drenagem através de estudos histopatológicos
- Avaliar o perfil da resposta imune através da produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes de cultura das células dos linfonodos de drenagem.
- Avaliar a produção de óxido nítrico no sobrenadante das células dos linfonodos de drenagem.

3 JUSTIFICATIVAS

Os parâmetros de resistência e susceptibilidade à infecção por leishmânia têm sido explorados nas duas últimas décadas, comparando-se linhagens de camundongos com “background” genéticos diferentes, que apresentam respostas polarizadas quando infectados com determinadas espécies de leishmânia. Outra estratégia utilizada tem sido a de manipular a resposta imune, tornando camundongos susceptíveis, resistentes a uma determinada espécie de leishmânia, ou tornando camundongos resistentes, susceptíveis à infecção (BARRAL-NETTO et al., 1984; POMPEU et al., 1992; LAUNOIS et al., 1996). Tais estudos foram importantes para definir os fatores que contribuem para o desenvolvimento das subpopulações das células T $CD4^+$ *L. major*-específicas, Th1/Th2 (LAUNOIS et al., 1996; SCHARTON-KERSTTEN et al., 1995). Sendo que, a maior parte dos estudos provém de experimentos feitos com as linhagens de camundongos resistentes C57Bl/6 ou susceptíveis BALB/c à infecção por *L. major*. Entretanto, há evidências de que uma determinada linhagem de camundongo pode demonstrar resistência à infecção com determinadas espécies de leishmânia e susceptibilidade a outras.

Pouco tem sido explorado sobre os mecanismos relacionados com resistência ou susceptibilidade às espécies de leishmânias do Novo Mundo, (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*), as quais causam a doença tegumentar (AFONSO et al., 1993; SOONG et al., 1997; BARRAL et al., 1993; BARRAL-NETTO et al., 1992; DeCREY et al., 1998). A infecção causada por *L. amazonensis*, ao contrário da infecção causada por *L. major*, está associada

com diferentes formas clínicas observadas na doença humana (BARRAL et al., 1991). Na modelo murino a maioria das linhagens de camundongos desenvolvem susceptibilidade à infecção com variados padrões de lesões primárias (AFONSO et al., 1993; CALABRESE & COSTA 1992; SOONG et al., 1997).

A linhagem de camundongos CBA é utilizada na maioria dos estudos experimentais, como modelo de resistência à infecção por *L. major* (BEHIN et al., 1979; TITUS et al., 1984; SOARES et al., 1997). Raríssimos são os trabalhos que investigaram a susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis* (CHAMPSI & McMAHON, 1988, NEAL & HALE, 1983; SOONG et al., 1995). Nenhum destes estudos, entretanto, descreveram os aspectos imunológicos e histológicos envolvidos no curso da infecção por *L. amazonensis*. CHAMPSI & McMAHON, 1988 e SOONG et al., 1995, verificaram que após esquema de imunização, estes animais obtiveram proteção completa contra o desafio de formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Outros trabalhos mostram que a linhagem de camundongo CBA é susceptível à infecção por *L. mexicana* (ALEXANDER, 1982; ALEXANDER & BLACKWELL, 1986; CHILDS et al., 1984). Um aspecto interessante investigado na infecção dos camundongos CBA com a *L. mexicana* foi de que a vacinação com leishmânia heteróloga (atenuada) protege esses animais contra à infecção por *L. mexicana* (ALEXANDER & KAYE, 1985).

O modelo de infecção do camundongo CBA demonstra que uma mesma linhagem de camundongo pode apresentar padrões distintos de respostas, quando infectado com diferentes espécies de leishmânia. Um modelo que

module de modo diverso a resposta do hospedeiro em função de diferentes patógenos abre perspectivas para se investigar por exemplo: a) em relação ao hospedeiro, quais os mecanismos imunológicos e genéticos envolvidos com os fenótipos de resistência e susceptibilidade à infecção; b) avaliar fatores dos parasitos (antígenos parasitários) relacionados com a resposta protetora e não-protetora do hospedeiro; c) modelo para avaliação da resposta de resistência e de susceptibilidade, sobretudo no que se refere a proteção cruzada.

As estratégias para o desenvolvimento de vacinas e na validação de eventuais candidatos, deve levar em consideração os fatores relacionados ao parasito, ou seja, a resposta protetora a uma determinada espécie de leishmânia não significa necessariamente proteção à outra espécie.

A nossa proposta é explorar de modo mais aprofundado este modelo, utilizando como sistema de referência a infecção por *L. major*. Pretende-se estender a abordagem descrevendo-se o perfil de resposta celular e investigando-se o perfil da resposta imune. Estes conhecimentos iniciais serão de fundamental importância para a investigação de mecanismos de resistência e de susceptibilidade no modelo e na utilização de manipulações no sentido de modificar os perfis de resposta, tanto na perspectiva do hospedeiro quanto dos parasitos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas as linhagens de camundongos isogênicos, CBA e BALB/c, fêmeas ou machos, com 6 a 10 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central/ FIOCRUZ/ RJ e mantidos no Biotério de experimentação do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (FIOCRUZ/Ba). Os animais foram alimentados com ração comercial balanceada e água acidificada, oferecidas livremente. Os camundongos BALB/c, susceptíveis à infecção por *L. major* e *L. amazonensis* foram utilizados como controles positivos da infecção.

4.2 PARASITO

As cepas dos parasitos utilizadas neste trabalho; *L. major*-MHOM/IR/-173 e *L. amazonensis*-MHOM/Br88/Ba-125, foram doadas pela Dra. Aldina Barral do Laboratório de Imunologia do Hospital Universitário Edgar Santos (HUPES)/ UFBA/SSA. Os parasitos foram mantidos em cultura axênica em meio LIT total (SADIGURSKY & BRODSKYN, 1986) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Hyclone laboratories). Para a manutenção da infectividade foram feitas passagens sucessivas em camundongos e reisolamentos periódicos de parasitos das lesões ou linfonodos de camundongos infectados.

4.3 INFECÇÃO

Para a inoculação dos animais com as leishmânias foram utilizadas as formas promastigotas em fase estacionária de cultura axênica. As culturas

eram monitoradas diariamente através de contagens do número de parasitos em câmara de Neubauer. Somente as culturas entre a 3^ª e a 5^ª passagem foram utilizadas para preparo do inóculo. As culturas de leishmânia em fase estacionária eram lavadas com PBS estéril, centrifugando-as a 2000 rpm por 10 minutos, para remover o meio de cultivo.

Foram infectados dois grupos de camundongos CBA e dois grupos de camundongos BALB/c, com uma das duas espécies de leishmânias (*L. major* ou *L. amazonensis*). Os animais foram inoculados por via subcutânea com 5.0×10^6 parasitos, em 25 μ l de salina, na pata esquerda traseira.

4.4 ACOMPANHAMENTO DO TAMANHO DAS LESÕES

O curso da infecção foi monitorado durante 10 semanas consecutivas em 10 camundongos CBA e em 5 camundongos BALB/c de cada grupo infectado, medindo-se a pata infectada e a não infectada com auxílio de paquímetro (MITUTOYO). O tamanho da lesão foi determinado pela diferença entre a espessura da pata infectada (esquerda) e a não infectada (direita), expresso em milímetros (mm).

4.5 ESTUDOS MORFOLÓGICOS

4.5.1 Histologia

Foram analisados comparativamente os aspectos qualitativo das lesões (a natureza do processo inflamatório) e semi-quantitativo dos tipos celulares. As respostas tissulares foram estudadas em 3 animais de cada grupo, em cortes histológicos da pata infectada e linfonodo popliteo, sacrificados no 3^º, 7^º, 21^º,

42° e 70° dia após a infecção. Os fragmentos dos tecidos foram retirados e fixados em formalina tamponado 10%, durante 12 a 20 horas. As patas foram descalcificadas em solução de ácido nítrico a 7% durante 48 horas e cortadas posteriormente em 3-4 porções. A etapa seguinte foi a desidratação gradual de todo o material em álcool e banhos em xilol para posterior inclusão em parafina. Após a inclusão cada fragmento foi seccionado em 3-5µm de espessura. As seções foram coradas pela hematoxilina-eosina (H-E) para verificar o padrão do infiltrado inflamatório e grau de extensão das alterações histológicas, pelo Picrosírius vermelho contra-corado pelo Fast Green (PIFG) para avaliação de fibrose.

4.5.2 Imunohistoquímica

Para a demonstração dos parasitos no sítio da infecção e no linfonodo de drenagem foi realizada a técnica de imunohistoquímica, em 3 animais de cada grupo, no 3°, 7°, 21°, 42° e 70° dia após a infecção. As secções das patas e dos linfonodos incluídas em parafina conforme descrito acima (item 5.1.), foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol por 10 minutos e hidratadas gradativamente em banhos de álcool por 5 minutos, água destilada e PBS. Empregou-se a técnica da imunoperoxidase indireta com o sistema Avidina-Biotina.

Inicialmente, fez-se o bloqueio das ligações inespecíficas com soro de cabra normal (VECTOR laboratories) diluído a 10% em PBS. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário anti-leishmânia policlonal produzido por inoculação de parasitos em coelhos (SOARES et al., 1993), gentilmente cedido

pelo Dr. Lain Pontes de Carvalho (CPqGM/ FIOCRUZ/SSA), diluído 1:1500 em PBS contendo 10% de soro normal de camundongo. Utilizamos como controle negativo da reação, imunoglobulina não imune de coelho (diluído 1: 2000). Incubamos durante 12-18 horas, em câmara úmida a 4°C e em seguida, as secções foram lavadas (duas vezes) com PBS por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se o anticorpo secundário conjugado com biotina contra imunoglobulina de coelho produzido em cabra (Pharmingen), diluído 1:200 em PBS contendo 10% de soro normal de camundongo e incubou-se por 45 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. As secções foram lavadas com PBS e removido o excesso de líquido. Bloqueou-se a atividade da peroxidase endógena com metanol, contendo 0,1% de azida sódica e 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante 30 minutos. Para aumentar a sensibilidade do método utilizou-se o complexo Avidina-Biotina (ABC) que se liga covalentemente ao anticorpo secundário marcado com biotina, incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. A reação foi revelada com a solução substrato Three,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB), preparado previamente, dissolvendo 6mg do DAB em 10 ml de tampão Tris 0,05M pH 7.6, a qual produz coloração castanho ao adicionar-se 0,1ml de peróxido de hidrogênio a 3% (H₂O₂). O desenvolvimento da cor foi verificado no microscópio óptico, sendo interrompida a reação com banho em água destilada. Utilizou-se a hematoxilina de Harris para contracorar e finalmente foi feita a montagem entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá.

4.6 CULTURA DE CÉLULAS DO LINFONODO

Para obtenção das células, os linfonodos popliteos das patas infectadas retirados de 5 animais de cada grupo, foram dissociados sob condições estéreis em meio Dulbecco's modified Eagle's medium completo (DMEM) contendo 2,5% de HEPES pH7.4 - (N-2hidroxitillpiperazina-N'-2-etano ácido sulfônico), 200mM de glutamina, penicilina/streptomicina 10,000U/10.000mg, 3,7 g/l de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino, solução de aminoácidos à 25x (25.4mM de piruvato de sódio, 1.6mM de L-arginina e 0.7mM de L-asparagina), 0,1% de mercapto-etanol). Em seguida, as células foram transferidas para um tubo de centrifugação e lavadas por três vezes em meio DMEM, centrifugando-as a 1600 rpm por 5 minutos (4°C). Em seguida as células foram ressuspensa em 1 ou 2 ml de meio DMEM completo, contadas em hemocitômetro em meio DMEM completo. Nesta etapa foi verificado a viabilidade das células para cultivo, misturando-se proporções iguais (1:1) de células ressuspensa em meio DMEM completo e corante Tripán blue com azida sódica a 20mM. As células não-viáveis podem ser diferenciadas das células viáveis porque tornam-se azuladas pela impregnação do corante. Um número baixo de células não-viáveis foi mantido constante entre os dois grupos em diferentes períodos dos experimentos. Após a contagem ajustou-se a concentração para 3×10^6 células/ml. As células foram então distribuídas em placas de 24 poços e incubadas durante 72 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C sob estimulação com: ConA 10 µg/ml (controle positivo) ou 5.0×10^5 formas promastigotas de *L. amazonensis* ou de *L. major* por ml. Os

sobrenadantes foram coletados e estocados a -20°C até sua utilização para a dosagem de citocinas e do óxido nítrico.

4.7 DOSAGENS DOS NÍVEIS DE CITOCINAS NOS SOBRENADANTES DE CULTURA DE LINFÓCITOS

Nos sobrenadantes de cultura de células dos linfonodos popliteos de drenagem foram dosados as citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10, no 7^o, 49^o e 70^o dia após a infecção, pelo método ELISA de captura conforme recomendação do fabricante (Pharmlingen).

Utilizamos os anticorpos de captura purificado nas seguintes concentrações:

- anti-IFN- γ (clone RA-642 Pharmlingen # 18181D): 2 $\mu\text{g/ml}$
- anti-IL-4 (clone 11B11 Pharmlingen # 18191D): 1 $\mu\text{g/ml}$
- anti-IL-10 (clone J2S5 642 Pharmlingen # 18141D): 2 $\mu\text{g/ml}$

Os anticorpos mencionados acima foram diluídos em tampão de carbonato 1M pH 9.6, plaqueados em placas de 96 poços (50 $\mu\text{l/poço}$) e incubados 12-18 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida, os anticorpos de captura em excesso foram removidos através de lavagens com PBS contendo 0,05% de detergente Tween 20. Os sítios de ligações inespecíficas foram bloqueados com PBS contendo 10% de SFB por 2 horas, a temperatura ambiente.

A curva padrão foi construída realizando diluições seriadas (1:2) das citocinas recombinantes em PBS contendo 10% de SFB, a partir de:

- 100 ng/ml para IFN- γ
- 5 ng/ml para IL-4
- 50ng/ml para IL-10

Foram adicionados à placa 100µl/poço do padrão diluído e das amostras (sobrenadantes das culturas) em triplicata, incubados por 12-18 horas a 4°C. Após as lavagens, foram adicionados 100µl/poço dos anticorpos de detecção marcado com biotina, descrito abaixo, na concentração de 2µg/ml, incubados durante 45 minutos, à temperatura ambiente.

- IFN- γ (Clone XMG1.2/ Pharmingen #18112D)
- IL-10 (Clone SXC /Pharmingen #18152D)
- IL-4 (Clone BVD6-24G2 /Pharmingen #18042D)

Em seguida, após a lavagem (6 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20), adicionou-se o conjugado avidina-peroxidase (Sigma 2.5µg/ml) por 30 minutos. Para revelação, as placas foram lavadas 8 vezes e posteriormente incubadas com o substrato 3,3', 5,5-Tetramethyl-benzidine (TMB - Sigma). A reação foi interrompida pela adição de ácido fosfórico diluído 1:20 em água destilada. A leitura foi realizada a 450nm e analisamos os resultados pelo programa Softmax.

4.8 DOSAGEM DE ÓXIDO NITRICO

O teor de nitrito foi dosado no sobrenadante das culturas de linfonodo no 7º, 49º e 70º dia após a infecção, pelo método de Griess segundo DING et al. (1988).

A curva padrão foi construída a partir de 100µM, realizando diluições seriadas (1:2) do nitrito de sódio 10mM em meio DMEM. Foram plaqueados 50 µl por poço dos padrões diluídos e das amostras (sobrenadantes) em placas de 96 poços, em triplicata. Em seguida, foram adicionados 50µl/poço do

reagente de cor, preparado com as soluções sulfanilamida 1% e N-1 Naphylethylenediamina (NEED) 0,1%, na proporção 1:2. A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm. Os resultados obtidos foram processados e colocados em gráfico utilizando-se o programa Softmax.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos da medida do tamanho da lesão nos grupos de camundongos CBA e BALB/c infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foram submetidos a análise estatística para determinar se as diferenças observadas entre os quatro grupos de animais estudados eram significativas quando comparados. Nós utilizamos um teste paramétrico ANOVA, pois os grupos estudados apresentaram distribuição normal na curva Gaus e o pós-teste foi o de Newman-Keuls, para identificar em cada ponto do estudo sítios das diferenças entre os grupos. As diferenças só foram consideradas significativas se $p < 0.05$.

O teste estatístico utilizado para comparar a produção das citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-10) e do teor de nitrito, entre os grupos de camundongos CBA infectados com *L. major* e *L. amazonensis*, foi o teste *t* de Student. Obtivemos uma variação nos níveis de produção de citocinas entre os três experimentos realizados, apesar de sido mantido um mesmo padrão de resposta. As diferenças só foram consideradas significativas se $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES: O TAMANHO DAS LESÕES FOI ACOMPANHADO EM CAMUNDONGOS CBA e BALB/c INFECTADOS COM DIFERENTES ESPÉCIES DE LEISHMÂNIA.

O curso da infecção em camundongos CBA e BALB/c inoculados com 5×10^6 formas promastigotas de fase estacionária de *L. major* ou *L. amazonensis* foi avaliado de modo comparativo, através do monitoramento do tamanho da lesão durante 10 semanas consecutivas (tabela 2 - apêndice).

Em camundongos da linhagem BALB/c, susceptíveis à infecção por *L. major* ou *L. amazonensis*, as infecções determinaram o aparecimento de lesões que crescem progressivamente, conforme pode ser verificado na figura 1. Após a segunda semana, as lesões foram progressivamente maiores em ambos os grupos e tornaram-se ulceradas. No entanto, as lesões causadas por *L. amazonensis* foram significativamente maiores do que as causadas por *L. major*. Esta linhagem de camundongo foi utilizada, afim de avaliarmos a virulência e a patogenicidade das cepas de parasitos utilizados nos experimentos e de compararmos o curso das infecções em camundongos CBA.

Em camundongos da linhagem CBA as infecções por *L. major* ou *L. amazonensis* tem cursos distintos. Na figura 2 pode-se observar que até a 3ª semana as infecções causaram lesões de tamanhos semelhantes. A partir daí, os cursos foram distintos. Nos animais infectados por *L. major* as lesões cresceram pouco até a sétima semana e diminuíram progressivamente, até voltar ao tamanho normal na décima semana após a infecção. Nos animais infectados por *L. amazonensis*, o curso foi progressivo até a décima semana

quando os animais foram sacrificados. Por volta da nona semana ocorreram necrose, amolecimento e ulceração das lesões. Os resultados apresentados são representativos de três experimentos, nos quais o comportamento das lesões mostraram curvas com padrões semelhantes. Nas fases iniciais da infecção, ocorreram pequenas variações em relação ao tamanho das lesões entre os experimentos. Em um dos três experimentos a infecção dos camundongos CBA por *L. major* foi ligeiramente maior do que no grupo infectado por *L. amazonensis*. No entanto, após a quarta semana, na infecção por *L. amazonensis*, as lesões cresceram rapidamente e não houve sinais de recuperação. Os animais infectados por *L. major* mostraram regressão das lesões. Alguns animais do grupo infectado por *L. amazonensis* foram mantidos vivos por mais seis meses e apresentaram disseminação das lesões da pata para focinho, orelhas e órgãos internos.

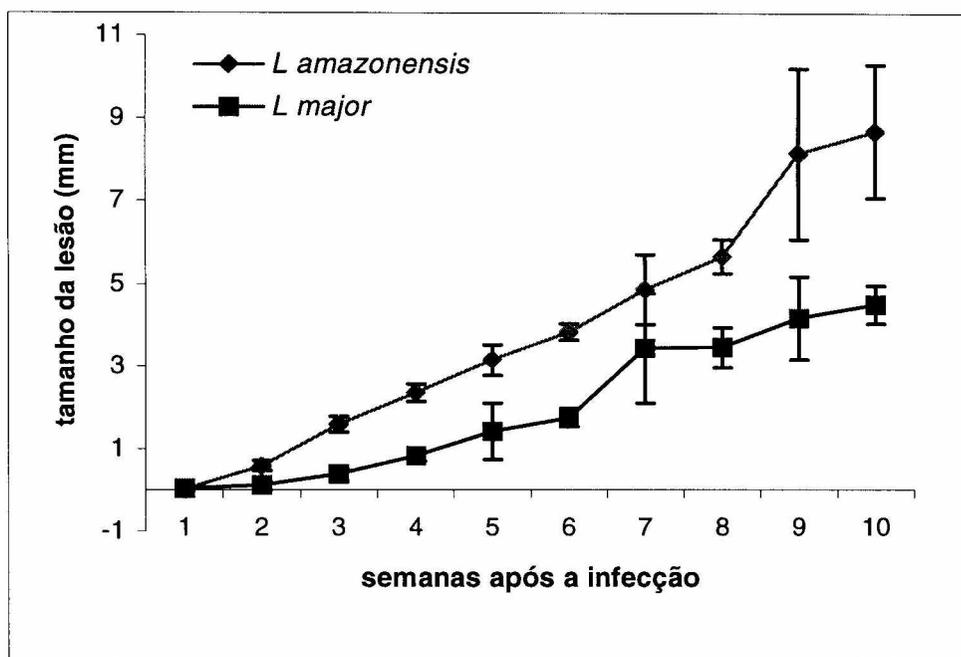


Figura 1: A progressão da infecção em camundongos BALB/c inoculados com *L. major* ou *L. amazonensis*. Grupos de 5 animais foram infectados com 5×10^6 formas promastigotas em fase estacionária *L. major* (■) ou *L. amazonensis* (▲). Cada ponto da semana representa a média da diferença da lesão e as barras os valores médios do desvio padrão. Na 7ª semana, não houve diferença estatisticamente significativa $p > 0.05$. Enquanto que na 10ª semana, foi significativa $p < 0.001$. Os resultados são representativos de 3 experimentos.

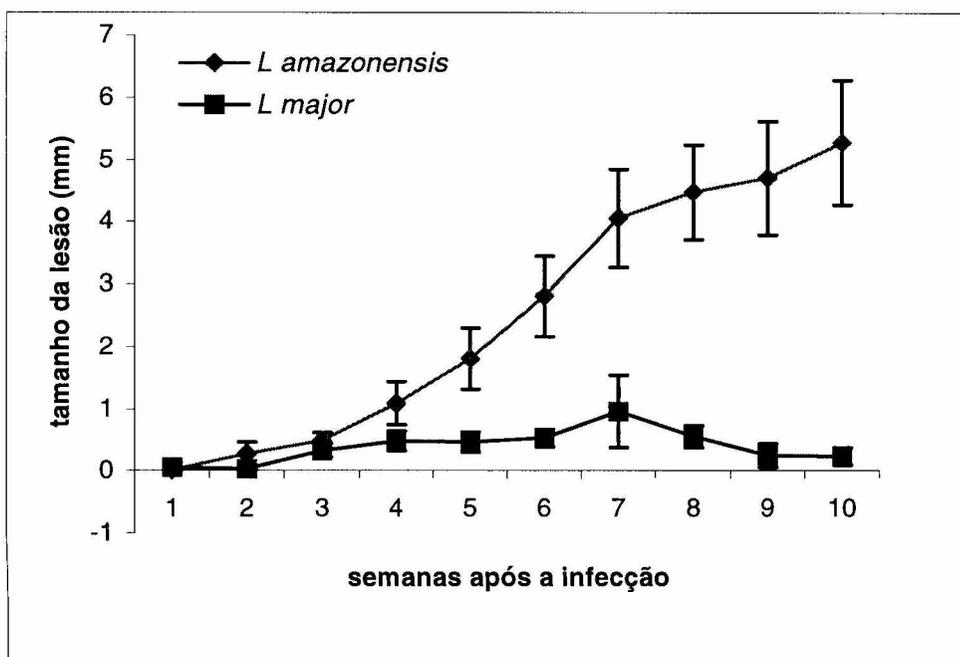


Figura 2: A progressão da infecção em camundongos CBA inoculados com *L. major* ou *L. amazonensis*. Grupos de 10 animais foram infectados com 5×10^6 formas promastigotas em fase estacionária *L. major* (■) ou *L. amazonensis* (▲). O tamanho das lesões e a determinação dos valores em cada ponto do infecção foi realizado conforme descrito na figura 1. Valores estatísticos: Até a 2ª semana não houve diferença significativa $p > 0.05$, a partir da 4ª semana $p < 0.05$. Na 7ª semana e na 10ª semana $p < 0.001$. Os resultados são representativos de 3 experimentos.

A figura 3 mostra comparativamente o desenvolvimento das lesões causadas por *L. major* em linhagens de camundongos BALB/c e CBA. Os camundongos BALB/c desenvolvem lesões com crescimento progressivo, enquanto os camundongos CBA curam.

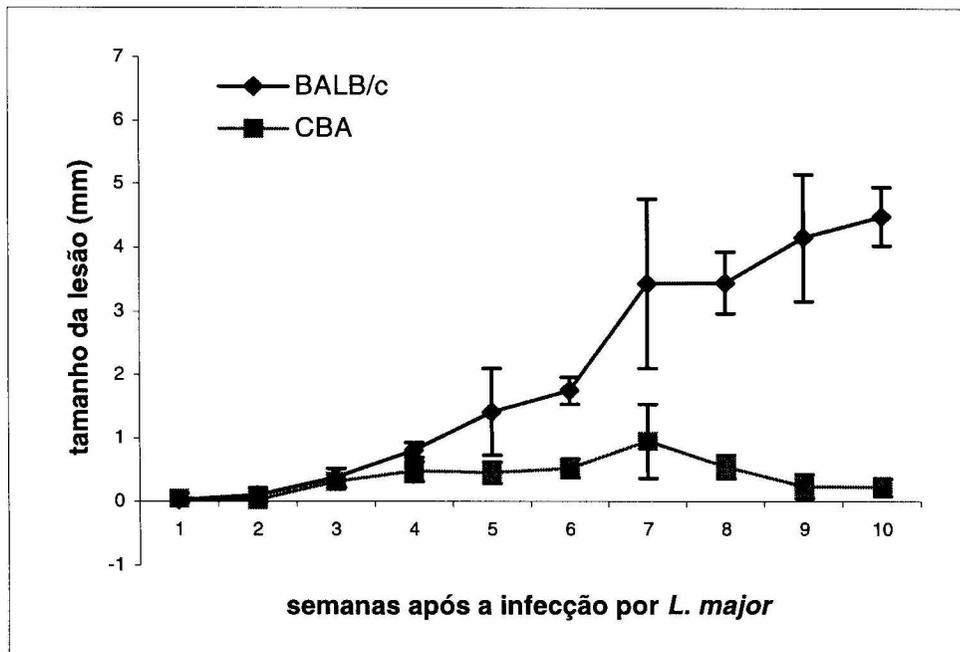


Figura 3: A progressão da infecção por *L. major* em camundongos CBA ou BALB/c. Camundongos CBA (■) ou BALB/c (▲) infectados com 5×10^6 formas promastigotas em fase estacionária *L. major*. O tamanho das lesões e a determinação dos valores em cada ponto do infecção foi realizado conforme descrito na figura 1. Quando comparado a infecção entre os grupos de animais a diferença foi estatisticamente significativa na 7ª semana e na 10ª semana após a infecção $p < 0.001$. Os resultados são representativos de 3 experimentos.

Na figura 4 demonstra-se que ambas as linhagens de camundongos BALB/c e CBA são susceptíveis à infecção por *L. amazonensis* e desenvolvem lesões que aumentam rapidamente sem sinais de cura e tornaram-se ulceradas. Na sétima semana não houve diferença estatisticamente significativa entre os tamanhos das lesões nos dois grupos de animais, mas a partir daí as lesões nos BALB/c foram significativamente maiores.

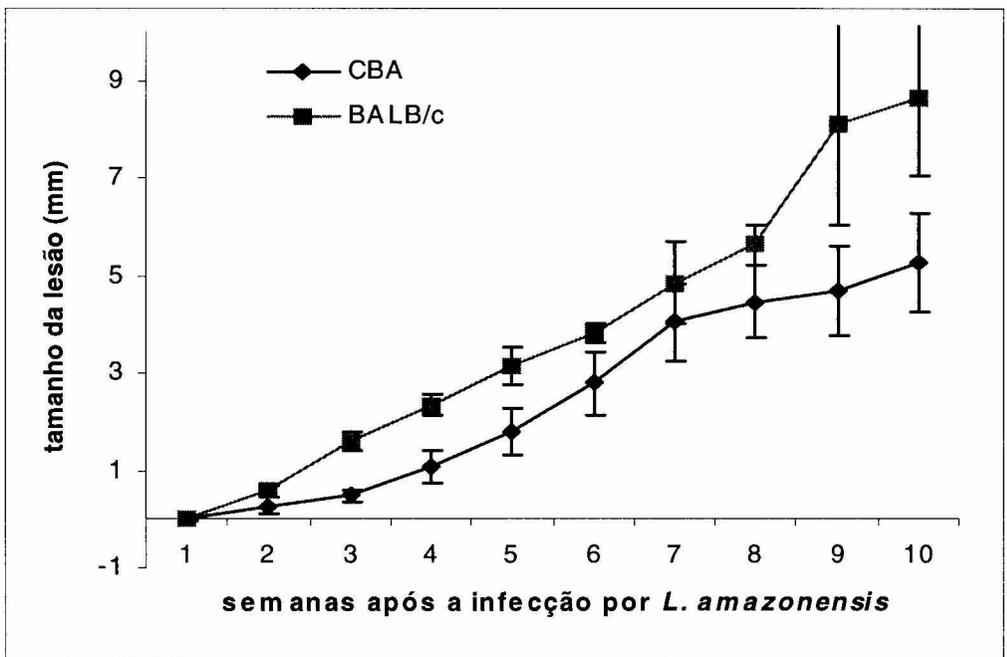


Figura 4: A progressão da infecção por *L. amazonensis* em camundongos CBA ou BALB/c. Camundongos CBA (■) ou BALB/c (▲) infectados com 5×10^6 formas promastigotas em fase estacionária *L. amazonensis*. O monitoramento do desenvolvimento da lesão e a determinação dos valores em cada ponto de infecção foi realizado conforme descrito na figura 1. Não houve diferença estatisticamente significativa na 7ª semana $p > 0.05$, enquanto que na 10ª semana foi significativa $p < 0.001$. Os resultados são representativos de 3 experimentos.

5.2 PESQUISA DE PARASITOS ATRAVÉS DO MÉTODO IMUNOHISTOQUÍMICO

O método da imunohistoquímica foi utilizado para se avaliar a intensidade e a distribuição do parasitismo no local da infecção e no linfonodo poplíteo de drenagem, comparando-se os dois grupos de animais infectados com diferentes espécies de leishmânia.

As secções de tecido incluídos em parafina foram submetidos a processamento através da técnica de imunoperoxidase indireta para a pesquisa de parasitos.

5.2.1 Na pele: local da infecção

No 3º dia após a infecção, não foram observadas diferenças em relação a quantidade e a freqüência de parasitos nas lesões cutâneas, entre os dois grupos de animais infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*. Nas áreas do infiltrado inflamatório a quantidade de parasitas foi pequena a moderado, em ambos os grupos de animais. Foram observadas formas amastigotas íntegras do parasito no interior dos macrófagos. A partir do 7º dia, a intensidade do parasitismo tornou-se distinto entre os dois grupos de animais infectados por diferentes espécies de parasito (figura 5 A e B).

Na infecção causada por *L. major* houve marcante redução na quantidade de macrófagos infectados e no número de parasitos por macrófagos no curso da infecção. Até o 28º dia após a infecção notou-se aumento no número de parasitos, mas nas semanas subseqüentes houve redução progressiva. Com a progressão da infecção, os macrófagos parasitados localizados em áreas focais do infiltrado inflamatório, passaram a

se dispor nas áreas de reação granulomatosa (fig. 6A). No 70º dia após a infecção, só raros macrófagos infectados foram observados no sítio de inoculação.

Na infecção causada por *L. amazonensis* observou-se aumento progressivo do número de macrófagos infectados e da quantidade de formas amastigotas no interior dos vacúolos parasitóforos em macrófagos (fig.6B). Os vacúolos parasitóforos eram grandes e mostravam os parasitos dispostos em sua periferia. Apenas macrófagos foram vistos parasitados, exceto nas fases mais precoces, onde granulócitos também foram vistos parasitados.

Em ambos os grupos de animais os parasitos apareciam como formas amastigotas íntegras.

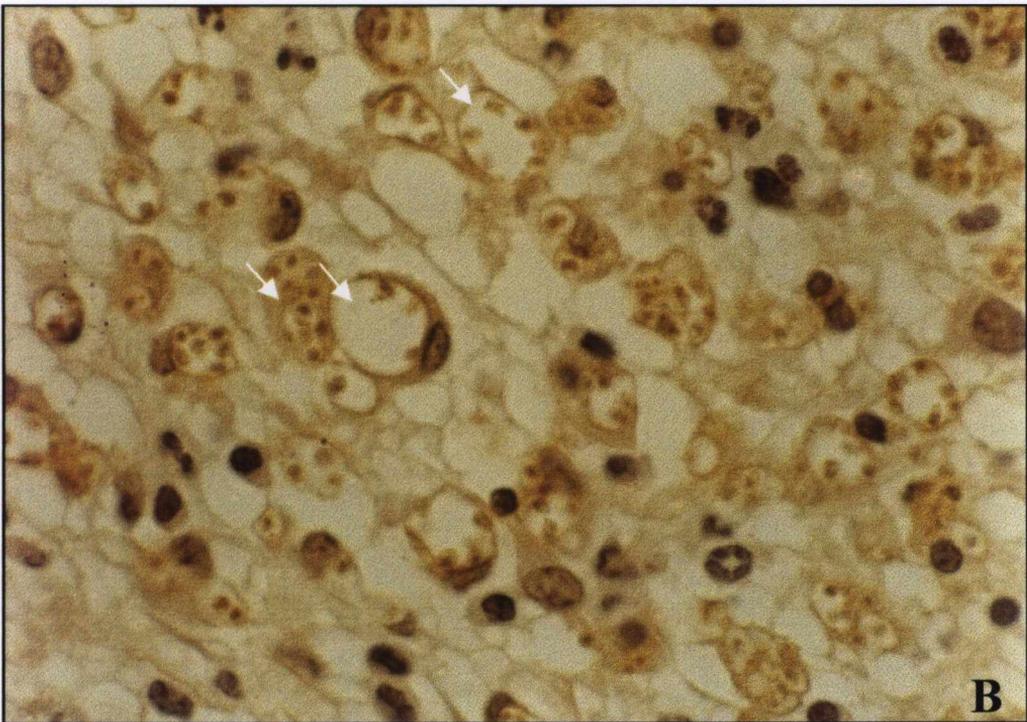
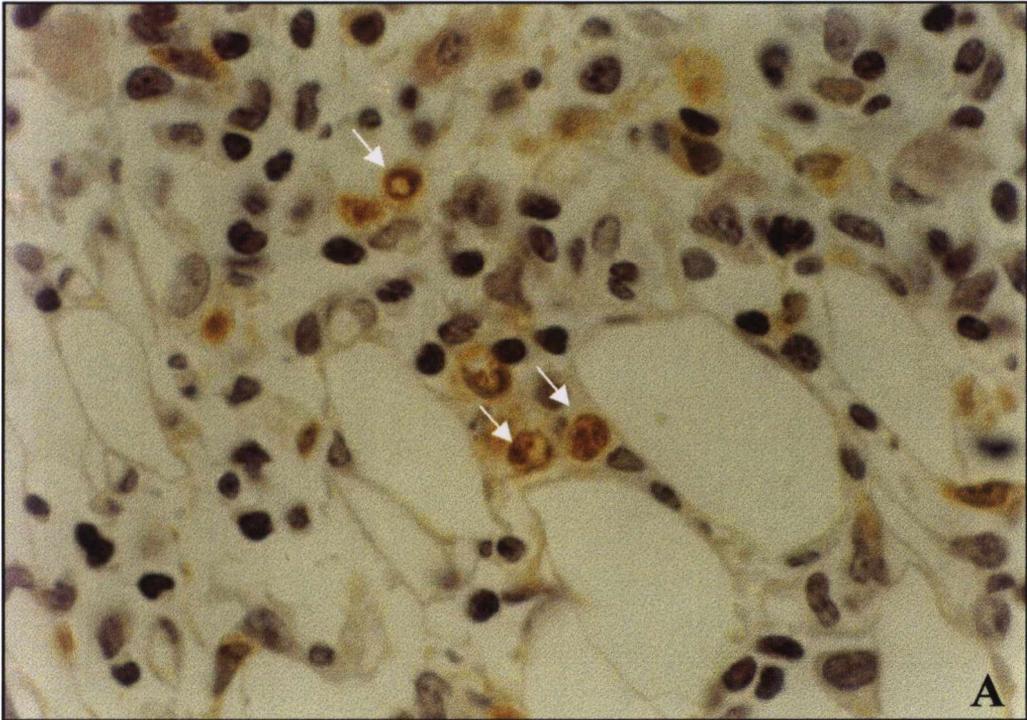


Figura 5: Identificação de formas amastigotas na pata de camundongos CBA com 7 dias após a infecção: A- Camundongos CBA infectados por *L. major*. Há poucos parasitos no interior dos macrófagos, de permeio são vistos linfócitos. B- Camundongos infectados por *L. amazonensis*. Vêem-se vacúolos parasitóforos grandes contendo várias formas amastigotas. Presença de alguns neutrófilos, linfócitos e plasmócitos (Imunoperoxidase/ anticorpo anti-leishmânia x 1000).

os raros linfócitos (Imunoperoxidase/ anticorpo anti-leishmânia x 1000).

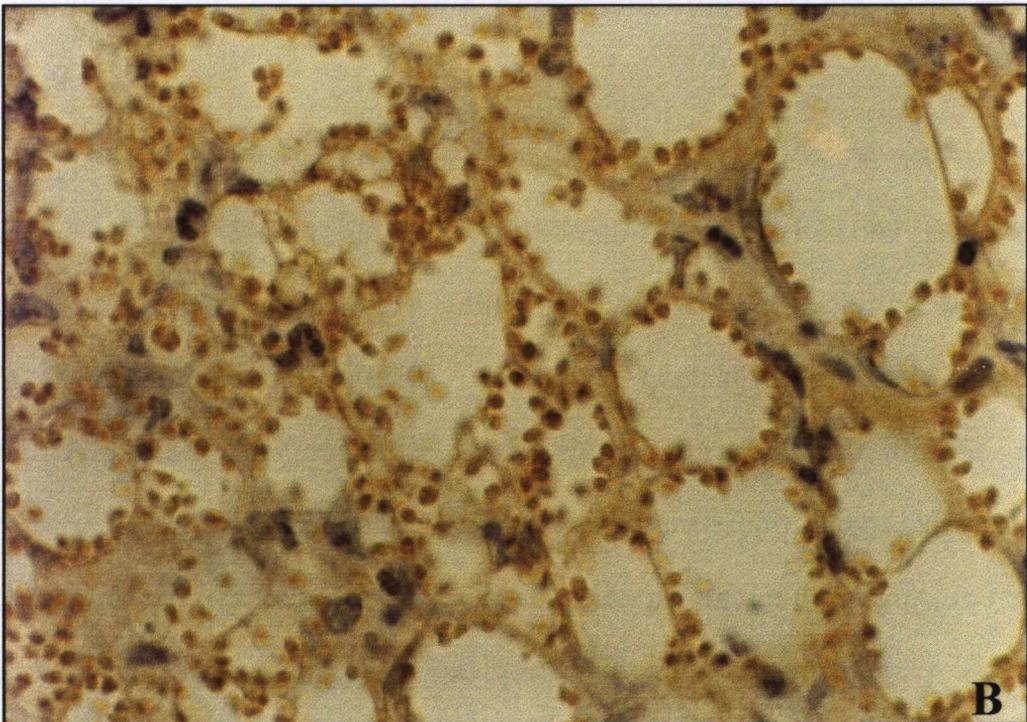
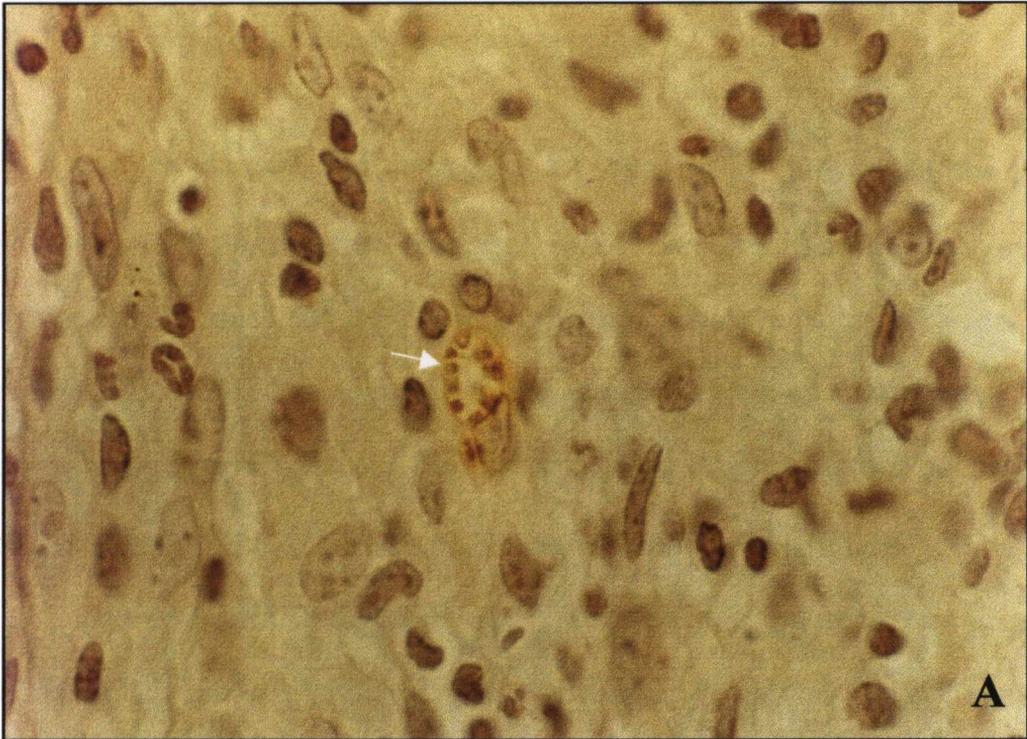


Figura 6: Identificação de formas amastigotas na pata de camundongos CBA com 42 dias após a infecção: A- Camundongos infectados por *L. major*. Observa-se macrófago isolado contendo várias formas amastigotas localizado em área de reação granulomatosa. **B-** Camundongos infectados por *L. amazonensis*. Observa-se macrófagos com vacúolos parasitóforos amplos e claros com denso parasitismo, macrófagos de aspecto "virchowiano". De permeio alguns neutrófilos e raros linfócitos (Imunoperoxidase/ anticorpo anti-leishmânia x 1000).

5.2.2 Nos linfonodos poplíteos de drenagem

No 3º dia após a infecção, foi observado que a distribuição dos parasitos nos linfonodos de drenagem eram semelhantes nos dois grupos de animais infectados. Os seios subcapsulares estavam repletos de células mononucleares, muitas delas contendo algumas formas amastigotas íntegras dos parasitos no citoplasma (fig. 7). As diferenças no padrão de distribuição dos parasitos surgiram a partir do 7º dia após a infecção (fig.8A e B).

Nos animais infectados por *L. major*, os macrófagos apareceram dispostos formando estruturas granulomatosas dispersos no parênquima e o padrão imunohistoquímico apresentava-se como estruturas parasitárias-amastigotas- íntegras (9A e 10A). Este padrão persistiu até o 70º dia após a infecção.

Nos animais infectados com *L. amazonensis* observou-se distribuição dos parasitos e seus antígenos em áreas subcapsular, folicular, parafolicular e medular. Foram observados parasitos íntegros no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos, além de grande quantidade de células mononucleares de aspecto macrofágico contendo abundante material antigênico de diferentes estágios de degradação disposto nos seios subcapsulares (fig. 9B). Progressivamente estas células foram vistas no interior dos linfonodos, circunscrevendo porções mais ou menos nodulares do parênquima e também nos centros germinativos dos folículos linfóides (fig. 10B). Não havia formação de granulomas e as células macrofágicas contendo antígeno parasitário distorcia a arquitetura dos linfonodos.

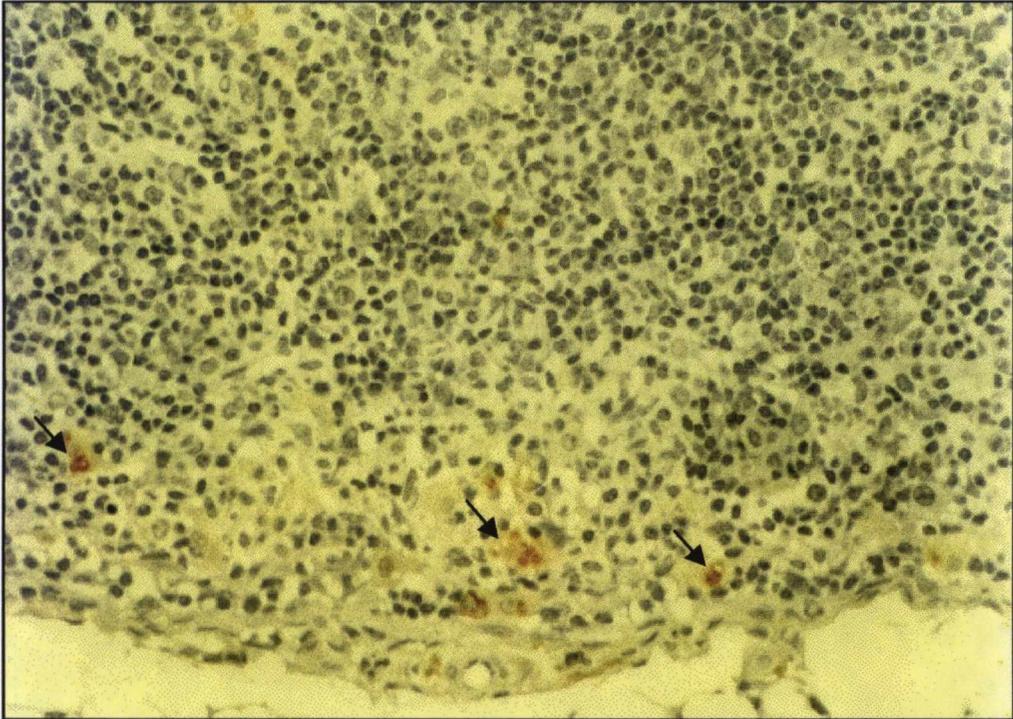


Figura 7: Identificação de formas amastigotas no linfonodo poplíteo de camundongos CBA infectados por *L. major* com 3 dias após a infecção: Verifica-se no seio sub-capsular parasitos no interior de células mononucleares (Imunoperoxidase/ anticorpo anti-leishmânia x 400).

Figura 8: Identificação de formas amastigotas no linfonodo poplíteo de camundongos CBA com 7 dias após a infecção: A- Camundongos infectados por *L. major*. Há poucos parasitos em macrófagos isolados na região paracortical expandida. B- Camundongos infectados por *L. amazonensis*. Observa-se numerosos macrófagos contendo ou não formas degradadas do parasito que ocorre a reatividade paracortical (Imunoperoxidase/anticorpo anti-leishmânia x 400).

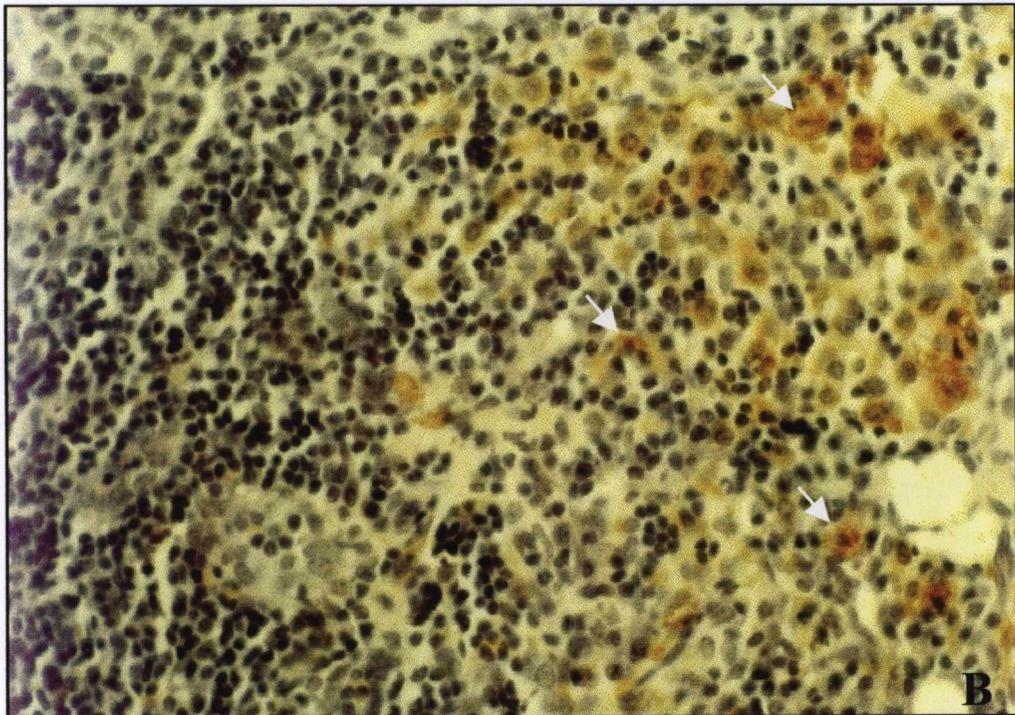
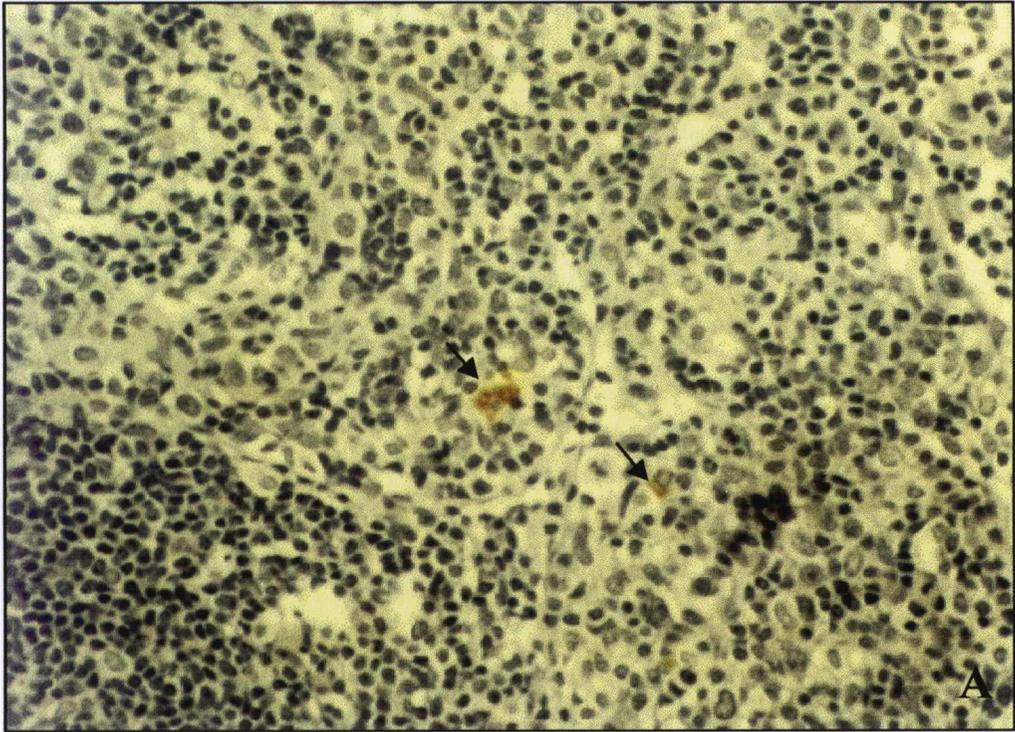


Figura 8: Identificação de formas amastigotas no linfonodo popliteo de camundongos CBA com 7 dias após a infecção: A- Camundongos infectados por *L. major*. Há poucos parasitos em macrófagos isolados na região paracortical expandida. **B-** Camundongos infectados por *L. amazonensis*. Observa-se numerosos macrófagos contendo ou não formas degradadas do parasito que avança e reduz parcialmente área paracortical (Imunoperoxidase/anticorpo anti-leishmânia x 400).

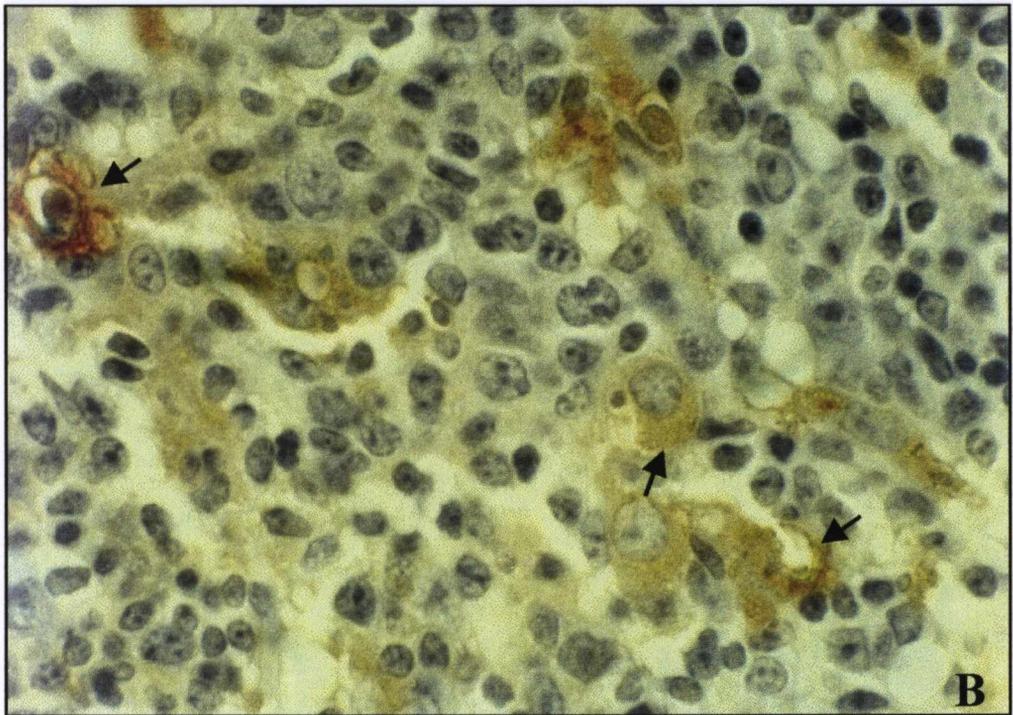
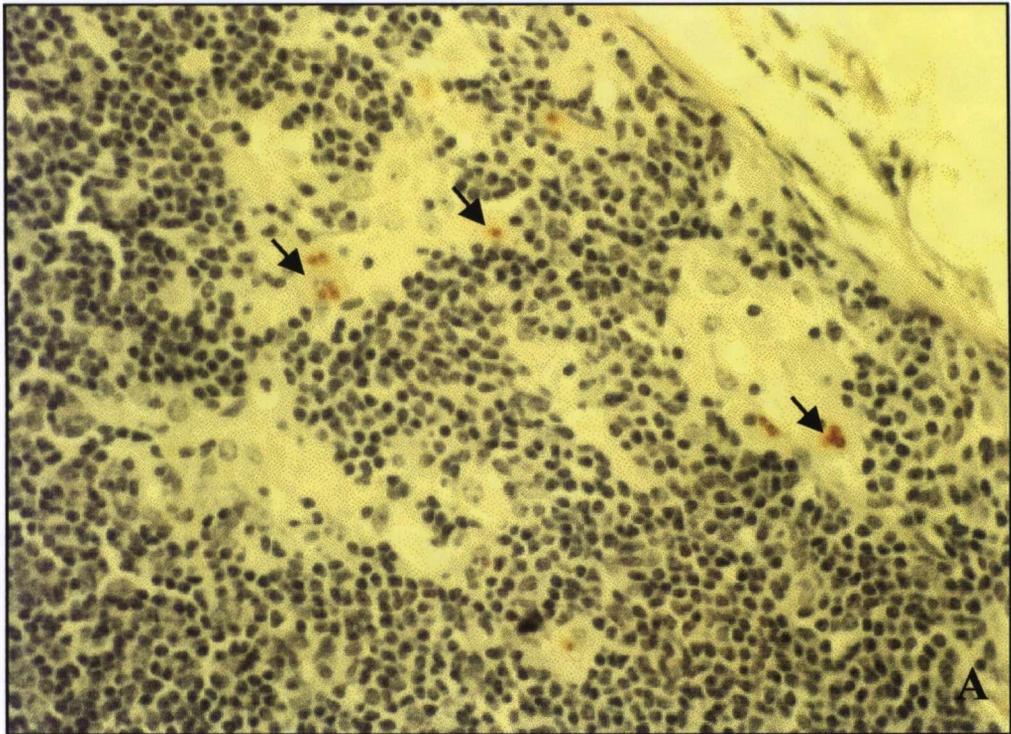


Figura 9: Identificação de formas amastigotas no linfonodo popliteo de camundongos CBA com 42 dias após a infecção: A- Camundongos infectados por *L. major*. Amastigotas de aspecto íntegro em áreas de reação granulomatosa (x 400). B- Camundongos infectados por *L. amazonensis*. Macrófagos contendo material antigênico em diferentes estágios de degradação. (Imunoperoxidase/anticorpo anti-leishmânia x 1000).

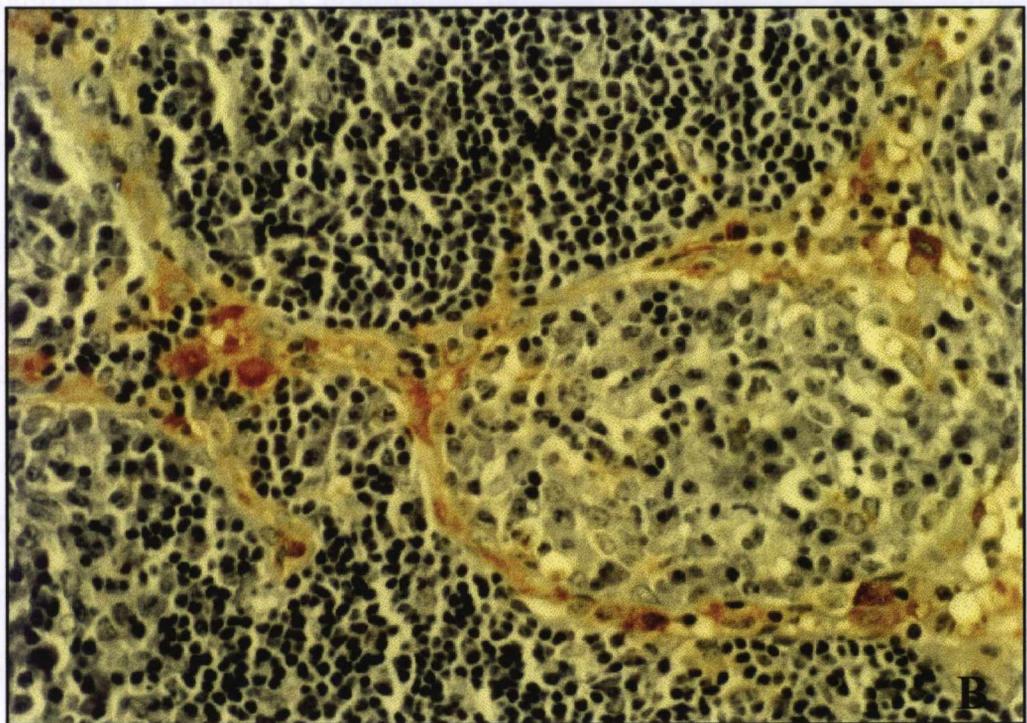
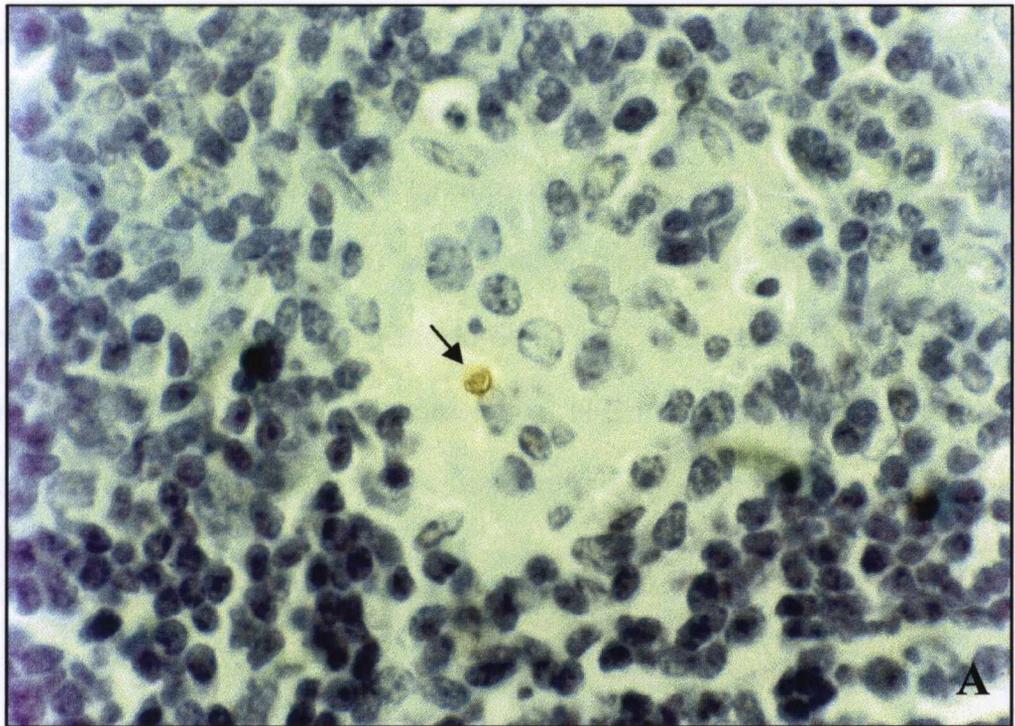


Figura 10: Identificação de formas amastigotas no linfonodo popliteo de camundongos CBA com 42 dias após a infecção: A- Camundongos infectados por *L. major*. Vêem-se macrófagos formando estruturas granulomatosas contendo no seu interior uma única forma amastigota de leishmânia. **B-** Camundongos infectados por *L. amazonensis*. Verifica-se células de aspecto macrofágico contendo material antigênico degradado, circundando porções nodulares do parênquima. (Imunoperoxidase/anticorpo anti-leishmânia x 400).

5.3 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Para avaliarmos os aspectos celulares de natureza inflamatória envolvidos na infecção por *L.major* ou *L.amazonensis*, nós comparamos o padrão de resposta tissular em secções histológicas da pata e do linfonodo popliteo de drenagem, no período de 3°, 21°, 42° e 70° dias após a infecção em cortes histológicos corados pelo H-E. A análise histológica mostrou padrões distintos de resposta tissular entre os grupos estudados.

5.3.1 Na pele: local da infecção

No 3° dia após a infecção, o perfil tissular no sítio de inoculação dos parasitos foi do tipo inflamatório agudo com mistura de granulócitos e macrófagos, edema e congestão vascular. Os aspectos foram semelhantes nos dois grupos de animais. O infiltrado inflamatório foi de moderada intensidade.

A partir do 7° dia após a infecção esses perfis tissulares tornaram-se progressivamente distintos tanto sob o ponto de vista qualitativo da composição celular quanto quantitativo.

O infiltrado inflamatório no grupo de animais infectados por *L. major* foi do tipo misto. Entre o 7° e 21° dias após a infecção, houve predomínio de um infiltrado inflamatório difuso, constituído predominantemente por células mononucleares macrófágicas tendo de permeio neutrófilos, eosinófilos, raros linfócitos, mastócitos e plasmócitos. Vários macrófagos estavam parasitados (Fig. 11A). A partir do 42° dia notou-se aumento progressivo da quantidade de linfócitos na lesão e redução da quantidade de macrófagos parasitados. Neste

período, foram observados macrófagos de aspecto epitelióide que se organizavam em estruturas granulomatosas, entremeadas por linfócitos e neutrófilos. Alguns macrófagos epitelióides contendo parasitas em pequenos vacúolos parasitóforos foram observados (Fig 12 A - ver detalhe no canto da foto). No 70º dia, o infiltrado inflamatório tornou-se escasso, constituído de linfócitos e os macrófagos parasitados eram raros ou ausentes (Fig. 14 A).

No grupo de animais infectados por *L. amazonensis*, o infiltrado inflamatório foi do tipo monomórfico macrofágico. A partir da 7º dia após a infecção, áreas extensas da derme foram ocupadas por macrófagos com grandes vacúolos parasitóforos intensamente parasitado (Fig. 11B). Com a progressão da infecção foi mantido o infiltrado inflamatório do tipo macrofágico difuso, monomórfico, e com raros linfócitos vistos na periferia da lesão. Os macrófagos parasitados tinham aspecto “virchowiano” exibindo amplos vacúolos parasitóforos claros contendo grande quantidade de amastigotas de parasitos íntegros (Fig. 12B, 13B). Neste grupo de animais, em nenhum ponto do experimento foram observadas formações de granulomas.

Outra diferença observada nos dois grupos se refere à extensão e tipo de necrose no sítio da inoculação dos parasitas. Nos animais infectados com *L. major*, na terceira semana, eram observados focos pequenos de necrose eosinófila do tipo fibrinóide, esparsas na derme (fig. 13A). Já nos animais infectados com *L. amazonensis*, a partir de 21 dias após infecção, as áreas de necrose foram progressivamente mais extensas, do tipo necrose lítica, com infiltração de granulócitos e formação de múltiplos micro-abscessos e ulceração de pele, sobretudo 70 dias após a infecção (fig.14B). A destruição

celular intensa levou a liberação de aglomerados de parasitas livres na derme.

Os animais infectados com *L. major* mostraram um processo associado com o controle da infecção, proliferação de fibroblastos e deposição de matriz conjuntiva colagênica, configurando, nas fases finais de observação, a presença de fibrose (fig. 14A). Nos animais infectados com *L. amazonensis*, não houve fibrose.

A tabela 3 mostra de modo simplificado as principais alterações histológicas observadas no curso da infecção.

Tabela 2: Principais aspectos histopatológicos da pele observados no curso da infecção por *L.major* ou *L.amazonensis* nos camundongos CBA.

	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. major</i>
INFILTRADO	Macrofágico difuso, momórfico (aspecto “virchowiano”)	Mononuclear misto (linfocitário, macrofágico granulomatóide)
PARASITISMO	Intenso	Escasso
PERFIL DAS LESÕES	Necrose lítica, microabcessos e úlcera	Necrose fibrinóide, formação de granulomas, fibrose

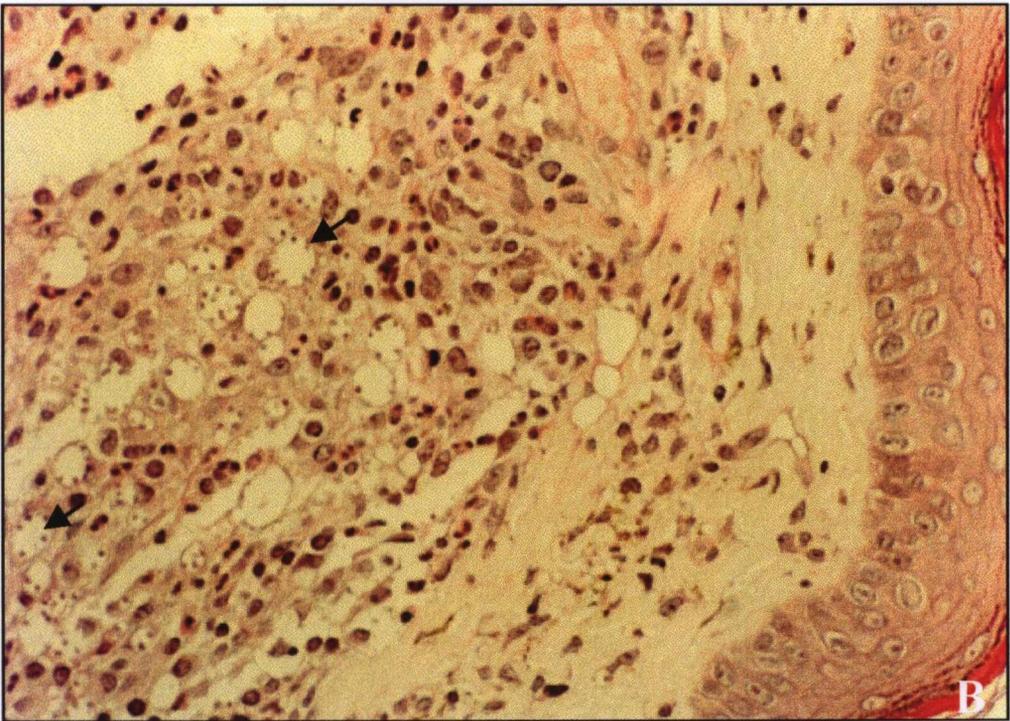
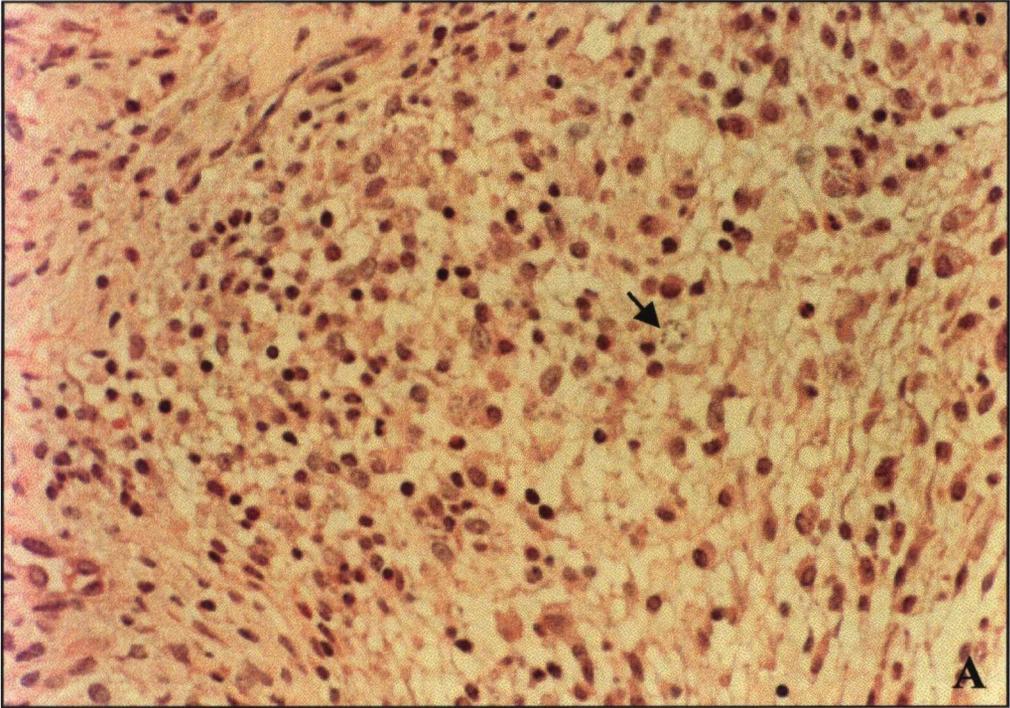


Figura 11: Comparação do padrão tissular no sítio de inoculação nos camundongos CBA com 14 dias após a infecção: A- Camundongos infectados por *L. major*. Verifica-se no infiltrado inflamatório o predomínio de mononucleares e polimorfonucleares com poucos macrófagos parasitados. **B-** Camundongos infectados por *L. amazonensis*. O infiltrado inflamatório apresenta predomínio de macrófagos vacuolados contendo numerosos parasitos e presença de polimorfonucleares e raros linfócitos (H-E x 400).

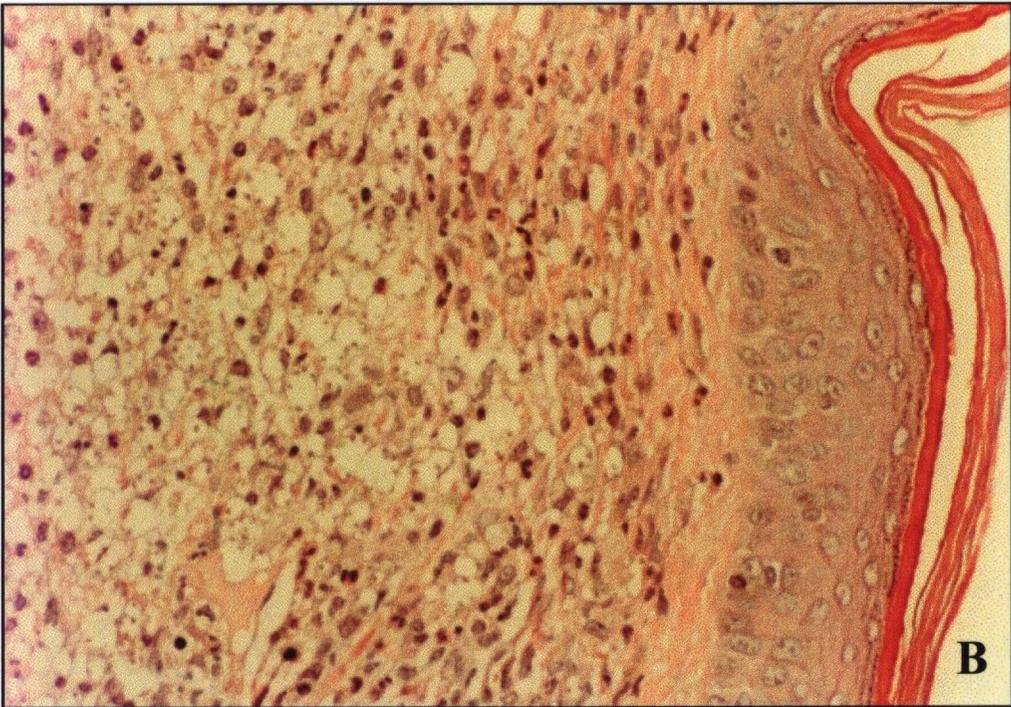
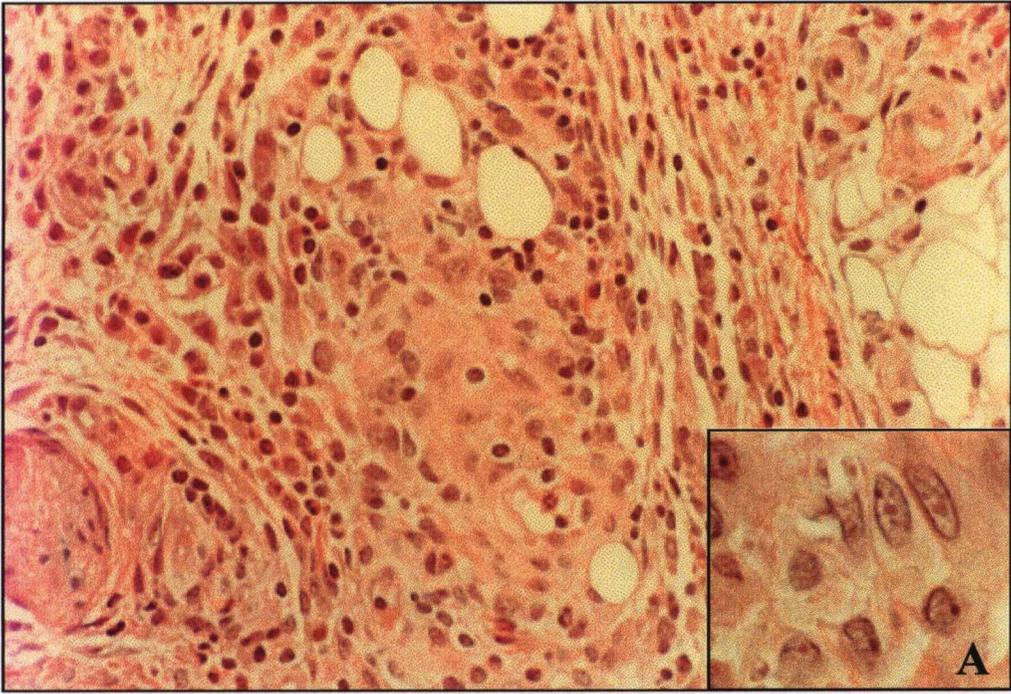


Figura 12: Comparação do padrão tissular no sítio de inoculação nos camundongos CBA com 21 dias após a infecção: A- Camundongos infectados por *L. major*. Observa-se áreas de reação granulomatosa e no detalhe macrófagos de aspectos epitelioides que constituem o infiltrado, alguns contendo parasitos (aumento x 1000). B- Camundongos infectados por *L. amazonensis*. Verifica-se infiltrado inflamatório do tipo monomórfico macrófágico intensamente parasitado de aspecto "virchowiano" (H-E x 400).

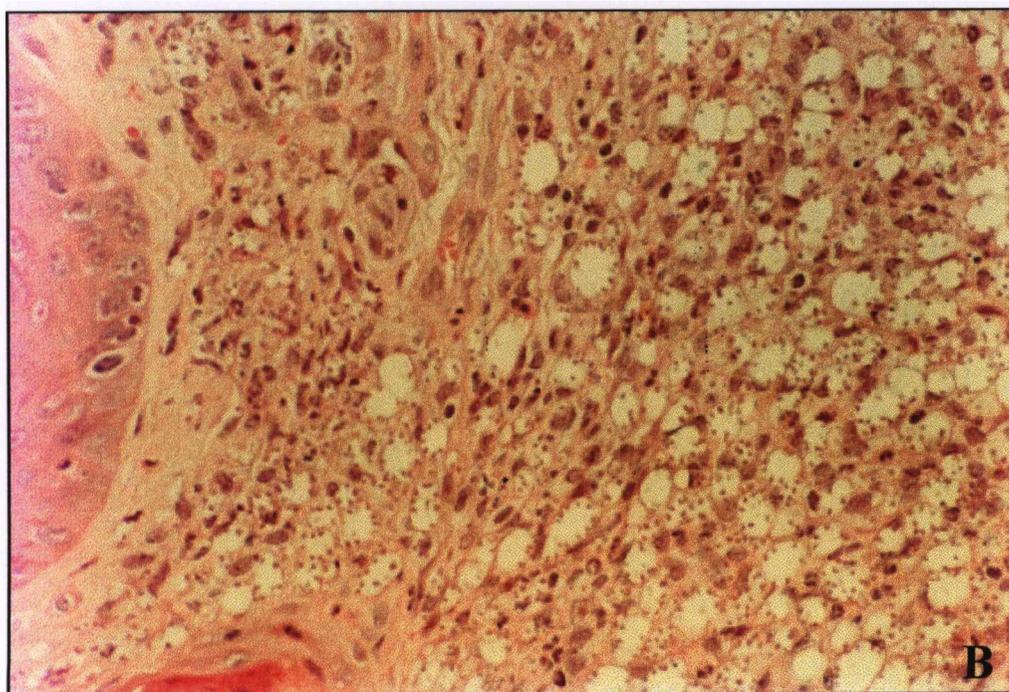
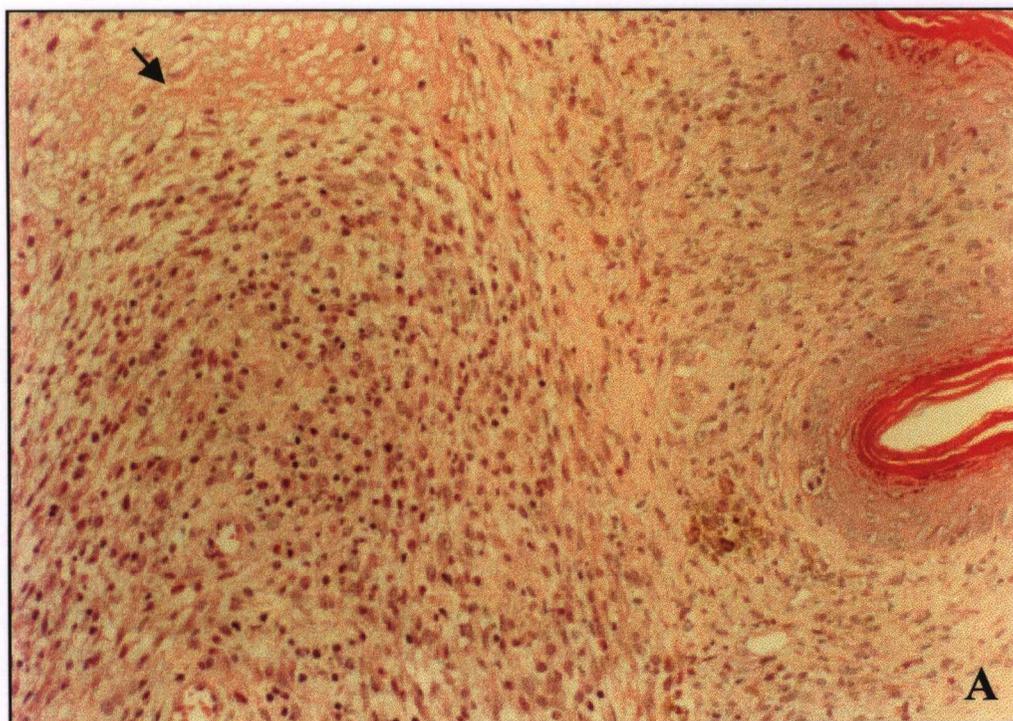


Figura 13: Comparação do padrão tissular no sítio de inoculação nos camundongos CBA com 42 dias após a infecção: A- Camundongos infectados por *L. major*. Observa-se necrose do tipo fibrinóide e áreas de reação granulomatosa circundando o infiltrado inflamatório. B- Camundongos infectados por *L. amazonensis*. O padrão monomórfico macrófágico de aspecto "virchowiano" é mantido com intenso parasitismo (H-E x 400).

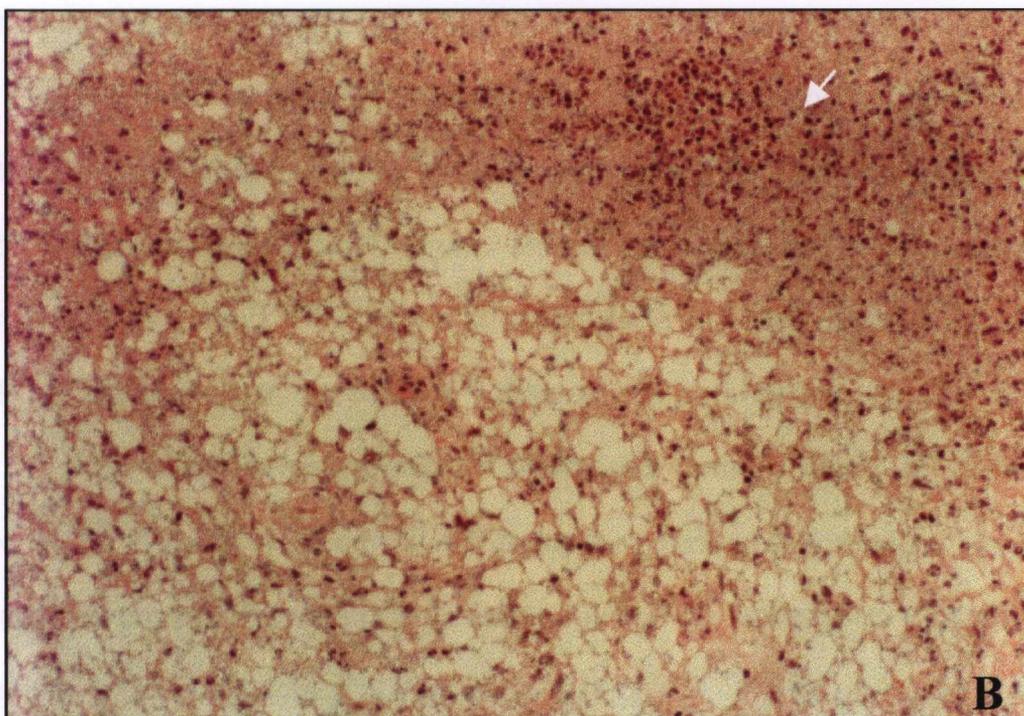
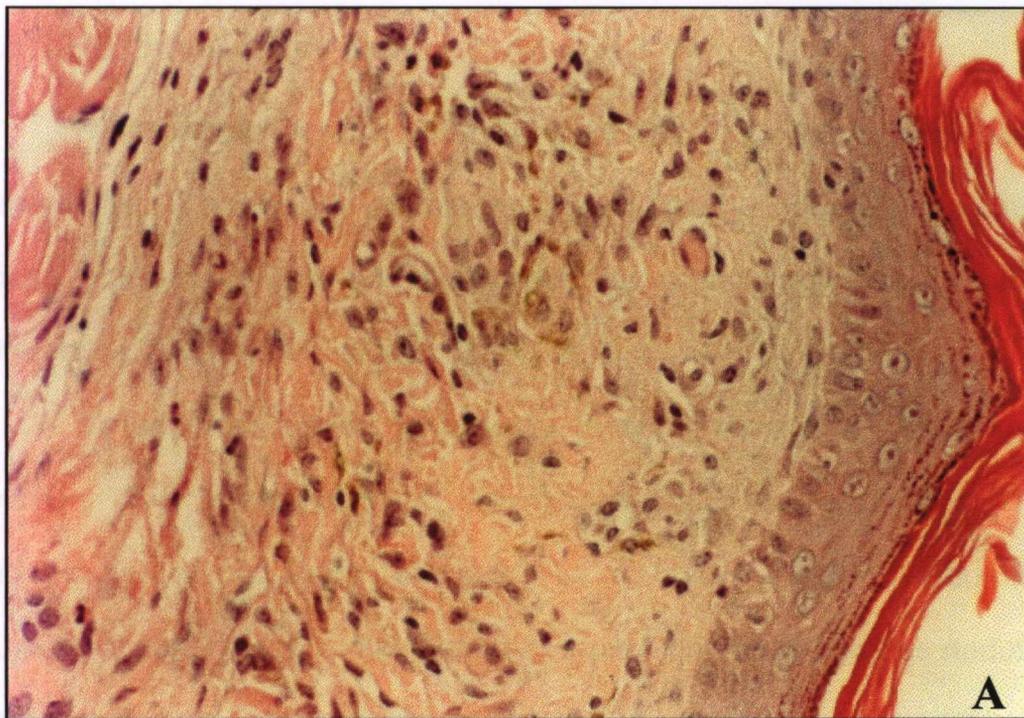


Figura 14: Comparação do padrão tissular no sítio de inoculação nos camundongos CBA com 70 dias após a infecção: A- Camundongos infectados por *L. major*. Verifica-se escasso infiltrado inflamatório, deposição de matriz colagênica e fibrose. B- Camundongos infectados por *L. amazonensis*. Áreas extensas de necrose lítica e a manutenção do padrão monomórfico macrófágico intensamente parasitado (H-E x200).

5.3.2 No linfonodo popliteo

No terceiro dia após a infecção os linfonodos mostravam seios subcapsulares infiltrados por células mononucleares macrófágicas de citoplasma róseo e amplo, várias delas contendo parasitas. Neste ponto não houve diferenças entre os dois grupos.

No sétimo dia após a infecção já eram observadas diferenças. Nos animais infectados com *L. amazonensis* a quantidade de células mononucleares nos seios subcapsulares era maior e estas células invadiam superficialmente a cortical do linfonodo circunscrevendo porções nodulares de linfócitos. Os centros germinativos dos folículos linfóides eram amplos e claros, exibindo células com citoplasma abundante que continuam antígeno parasitário quando submetidas ao processamento imunohistoquímico (Fig. 8B).

Progressivamente os linfonodos foram sendo ocupados por macrófagos de citoplasma amplo, muitos deles parasitados. Estas células se estenderam aos seios medulares. Os folículos linfóides mostravam centros germinativos proeminentes. Após 70 dias de infecção, todo o linfonodo foi substituído por células de aspecto plasmocitóide e macrófagos parasitados (fig. 16).

Nos linfonodos dos animais infectados com *L. major* as lesões eram focais. Viam-se acúmulos de macrófagos formando estruturas granulomatóides dispersas no parênquima. Ocasionalmente formas amastigotas isoladas eram vistas nestas estruturas granulomatóides (Fig. 10A). Neste grupo de animais os folículos linfóides mostravam centros germinativos amplos e as áreas parafoliculares estavam expandidas (Fig. 15A) e mostravam linfócitos com aspectos blásticos.

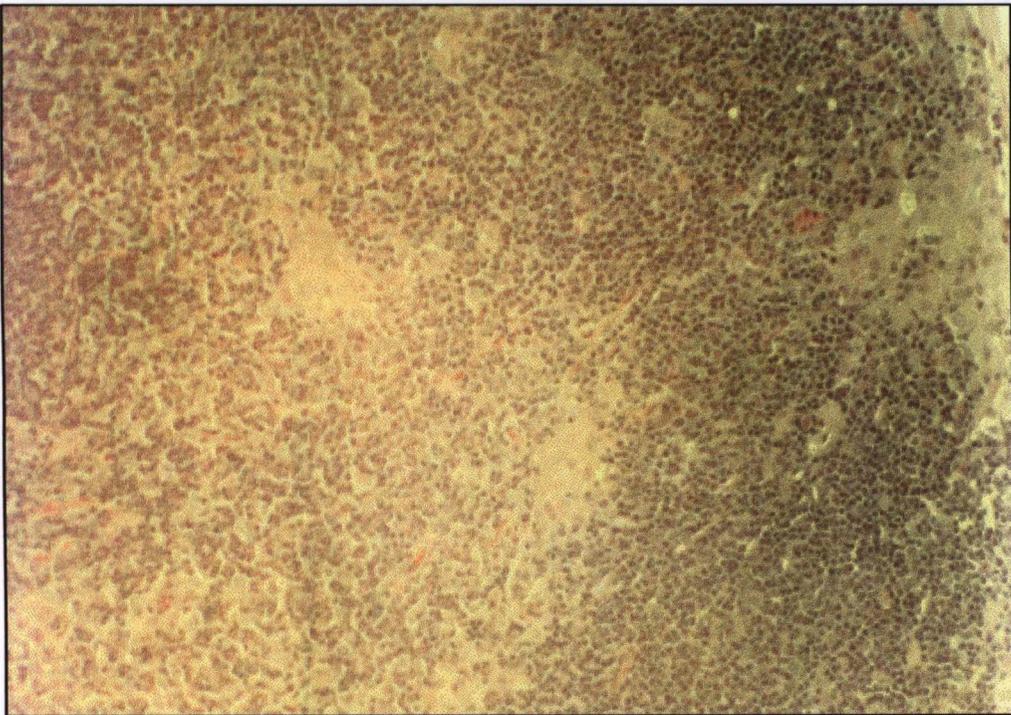
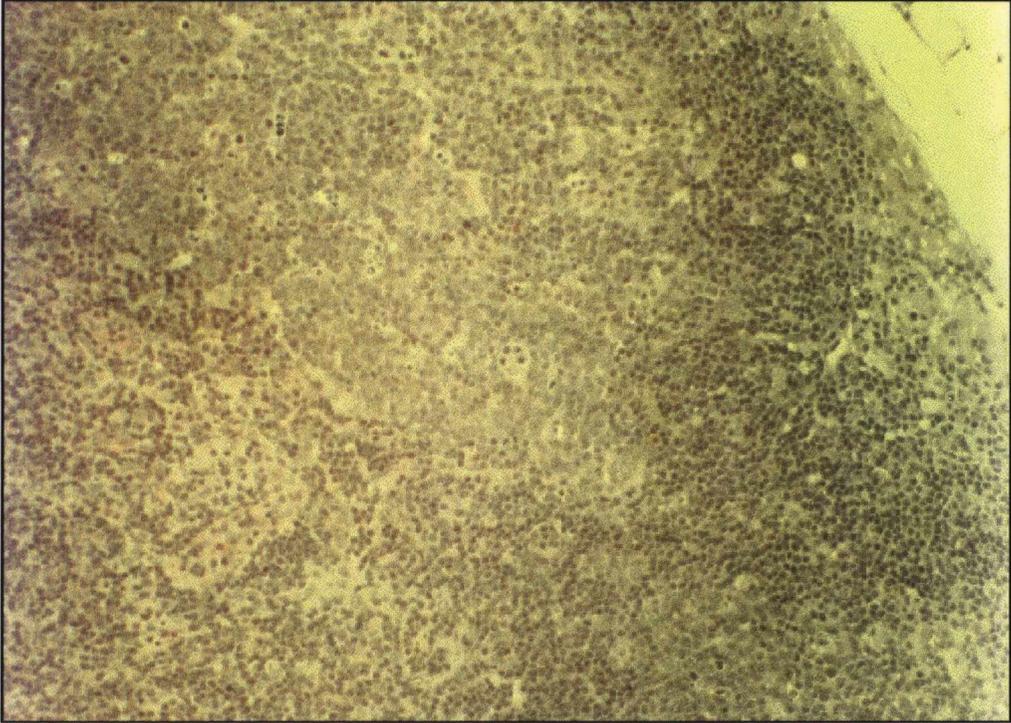


Figura 15: Comparação do padrão tissular no linfonodo popliteo de camundongos CBA com 42 dias após infecção: A- Camundongos infectados por *L. major*. Observa-se macrófagos formando estruturas granulomatosas na área subcapsular e na área paracortical expandida. **B-** Camundongos infectados por *L. amazonensis*. Evidencia-se macrófagos no espaço subcapsular e na área cortical observa-se folículo linfóide com centro germinativo ativo. (H-E x 200).

Para investigar os efeitos da infecção e a capacidade de resposta do sistema imune, os camundongos CBA foram infectados por *L. major* por via intracutânea.

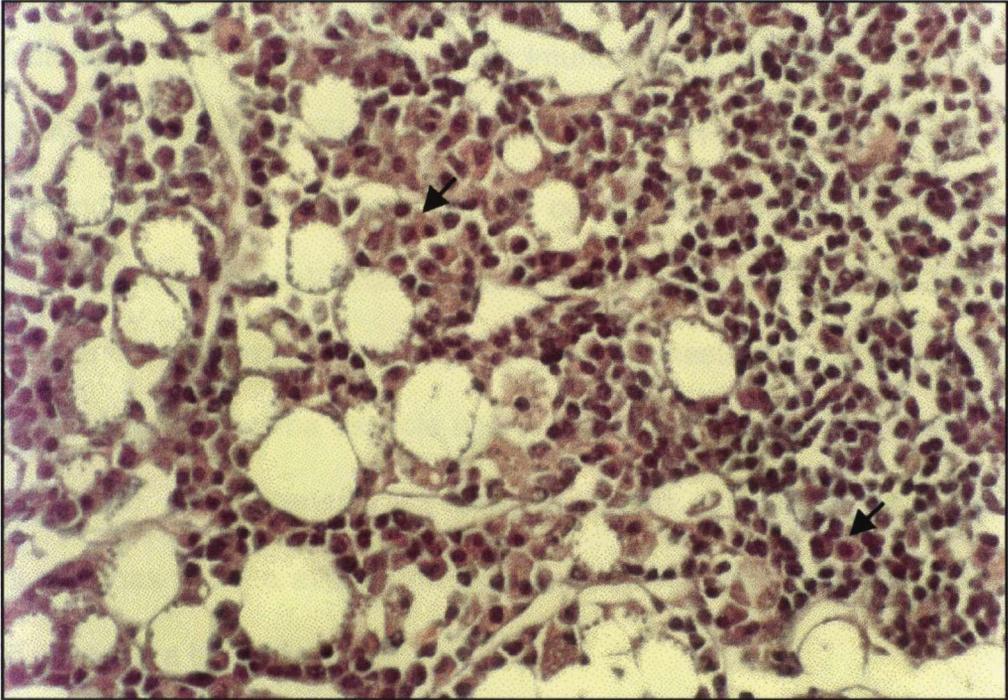


Figura 16: Padrão tissular no linfonodo popliteo de camundongos CBA infectado por *L. amazonensis* após 70 dias de infecção: Observa-se predominância do padrão macrofágico-plasmocitário. (H-E x 1000).

IFN- γ , IL-4 e IL-10. Nas células não estimuladas (controle negativo), os níveis de citocinas permaneceram próximos ou abaixo do limiar de detecção do teste (tabela 4, 5, e 6).

3.4.1 Produção de IFN- γ

A figura 17 mostra que as células do linfonodo popliteo dos camundongos CBA infectados por *L. major* produziram níveis mais altos de IFN- γ do que os camundongos CBA infectados por *L. amazonensis*. No 7^o dia após a infecção os animais infectados por *L. major* produziram 23,4 vezes mais IFN- γ do que os animais infectados por *L. amazonensis*. Essa diferença se

5.4 O PERFIL DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA INFECÇÃO POR *L. major* OU *L. amazonensis*

Para investigarmos se a resistência ou a susceptibilidade de camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis* estava relacionada com a indução de perfis imunológicos diferentes, comparou-se a produção de citocinas IFN- γ , como indicador da resposta Th1, e IL-4 e IL-10; como indicadores da resposta Th2. As células dos linfonodos poplíteos (cinco animais de cada grupo) foram cultivadas na concentração de 3×10^6 células/ml, na ausência ou na presença de 10^5 formas promastigotas do parasito em fase estacionária, da mesma espécie usada para a infecção e na presença de Con A ($10 \mu\text{g/ml}$). Os sobrenadantes foram coletados após 72 horas e a dosagem das citocinas foi feita através da técnica de ELISA, nos intervalos do 7°, 49° e 70° dia após a infecção.

Na presença do mitógeno ConA, as culturas de células do linfonodo poplíteo dos dois grupos de animais infectados, produziram níveis elevados de IFN- γ , IL-4 e IL-10. Nas células não estimuladas (controle negativo), os níveis de citocinas mantiveram-se próximos ou abaixo do limiar de detecção do teste (tabelas 4, 5, e 6).

5.4.1 Produção de IFN- γ

A figura 17 mostra que as células do linfonodo poplíteo dos camundongos CBA infectados por *L. major* produziram níveis mais altos de IFN- γ , do que os camundongos CBA infectados por *L. amazonensis*. No 7° dia após a infecção a os animais infectados por *L. major* produzem 23,4 vezes mais IFN- γ do que os animais infectado por *L. amazonensis*. Essa diferença se

mantém no 49º dia após a infecção e no 70º dia após a infecção, ocorreu uma redução dos níveis de IFN- γ , que continuou a ser produzido pelas células do grupo de animais infectados com *L. major*, mas não foi detectado no grupo de animais infectados com *L. amazonensis*. A análise estatística destes resultados mostrou diferenças significativas de produção entre os dois grupos de animais, em todos os pontos do estudo $p < 0.001$.

5.4.2 Produção de IL-4

A figura 18 mostra que no 7º dia após a infecção, ambos os grupos de células dos camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis* produziram IL-4. Entretanto, as células do grupo de animais infectados por *L. major* produziram 2.9 vezes mais IL-4 do que as células do grupo de animais infectados por *L. amazonensis*.

A partir do 49º dia após a infecção, os níveis de IL-4 produzidos foram mantidos apenas pelas células do grupo infectado por *L. amazonensis*. Nos grupos infectados por *L. major*, no entanto, ocorreu redução da quantidade de IL-4 produzida. A análise estatística dos resultados mostrou diferenças significativas de produção de IL-4 entre os dois grupos de camundongos infectados, em todos os pontos analisados; 7º dia $p = 0.0002$, 49º dia $p = 0.0020$ e no 70º dia $p < 0.005$.

5.4.3 Produção de IL-10

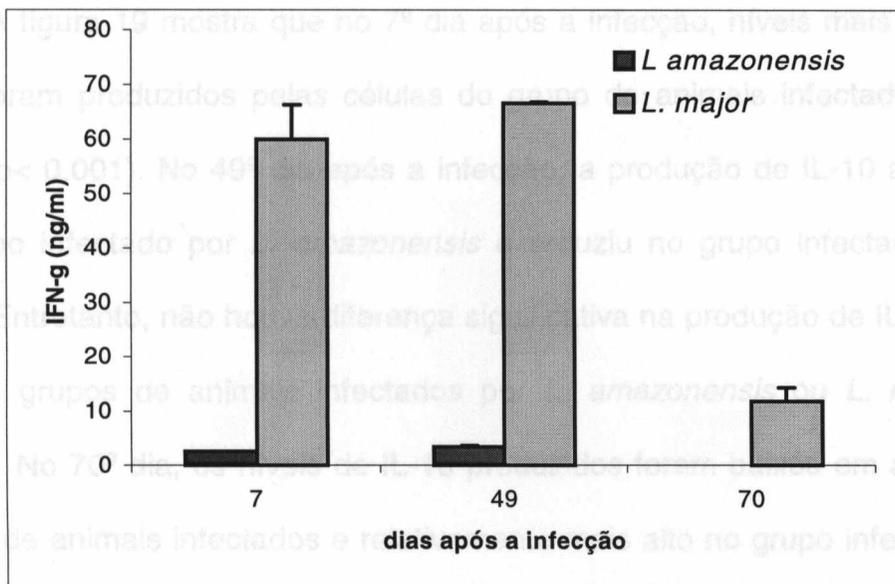


Figura 17: Produção de IFN- γ nas células do linfonodo popliteo de camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*. Os resultados apresentados são representativos de três experimentos. As barras representam os valores do desvio padrão.

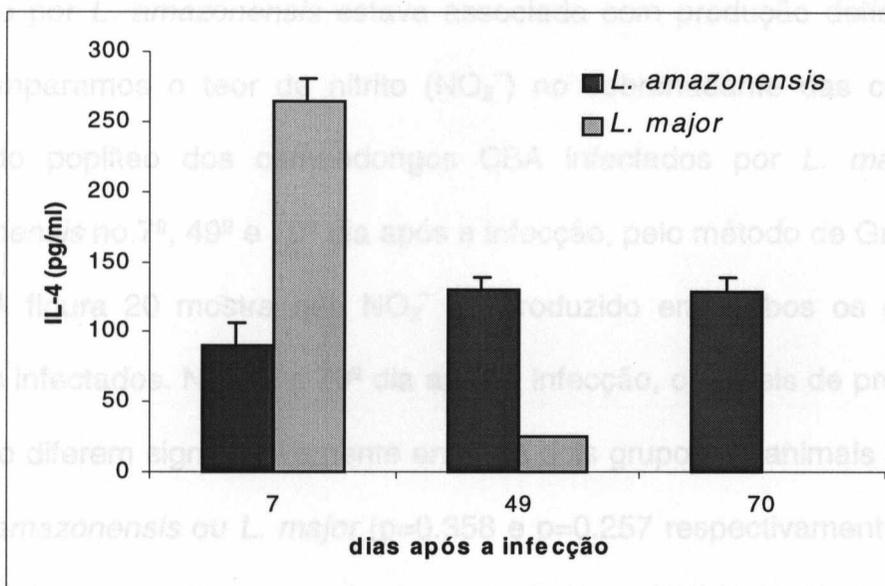


Figura 18: Produção de IL-4 nas células do linfonodo popliteo de camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*. Os resultados apresentados são representativos de três experimentos. As barras representam os valores do desvio padrão.

5.4.3 Produção de IL-10

A figura 19 mostra que no 7º dia após a infecção, níveis mais elevados IL-10 foram produzidos pelas células do grupo de animais infectados por *L. major* ($p < 0.001$). No 49º dia após a infecção, a produção de IL-10 aumentou no grupo infectado por *L. amazonensis* e reduziu no grupo infectado por *L. major*. Entretanto, não houve diferença significativa na produção de IL-10 entre os dois grupos de animais infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* ($p = 0.093$). No 70º dia, os níveis de IL-10 produzidos foram baixos em ambos os grupos de animais infectados e relativamente mais alto no grupo infectado por *L. amazonensis*, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0.007$).

5.5 A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA INFECÇÃO POR *L. major* OU *L. amazonensis*

Para avaliarmos se a susceptibilidade dos camundongos CBA à infecção por *L. amazonensis* estava associada com produção deficiente NO, nós comparamos o teor de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante das culturas de linfonodo popliteo dos camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis* no 7º, 49º e 70º dia após a infecção, pelo método de Griess.

A figura 20 mostra que NO_2^- foi produzido em ambos os grupos de animais infectados. Nos 7º e 70º dia após a infecção, os níveis de produção de NO_2^- não diferem significativamente entre os dois grupos de animais infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* ($p = 0.358$ e $p = 0.257$ respectivamente). No 49º dia, células de linfonodo dos camundongos CBA infectados por *L. amazonensis* produziram 4.7 vezes mais NO_2^- do que as células do *L. major* ($p = 0.0001$).

DISCUSSÃO

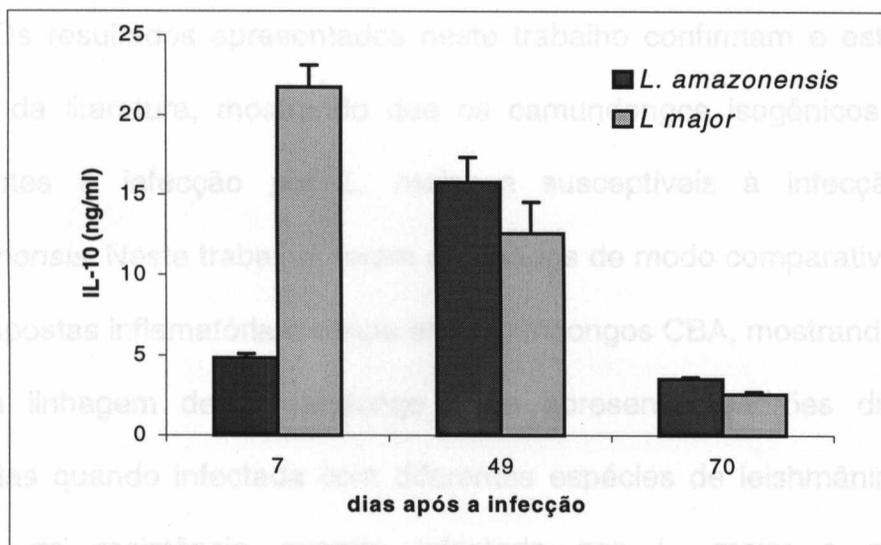


Figura 19: Produção de IL-10 nas células do linfonodo popliteo de camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*. Os resultados apresentados são representativos de três experimentos. As barras representam os valores do desvio padrão.

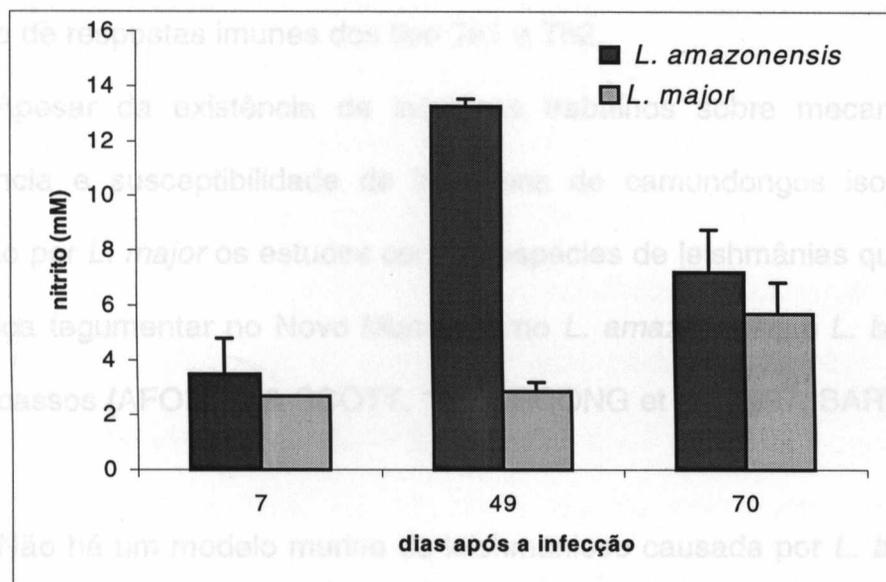


Figura 20: Produção de óxido nítrico nas células do linfonodo popliteo de camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*. Os resultados apresentados são representativos de dois experimentos. As barras representam os valores do desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho confirmam e estendem os relatos da literatura, mostrando que os camundongos isogênicos CBA são resistentes à infecção por *L. major* e susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*. Neste trabalho, foram analisados de modo comparativo os perfis das respostas inflamatória e imune de camundongos CBA, mostrando que uma mesma linhagem de camundongo pode apresentar padrões distintos de respostas quando infectada com diferentes espécies de leishmânia, ou seja, padrão de resistência quando infectada por *L. major* e padrão de susceptibilidade quando infectada por *L. amazonensis*. Esses resultados demonstram que fatores relacionados com os parasitos são importantes na determinação do tipo de resposta do hospedeiro e estão relacionados com a indução de respostas imunes dos tipo Th1 e Th2.

Apesar da existência de inúmeros trabalhos sobre mecanismos de resistência e susceptibilidade de linhagens de camundongos isogênicos à infecção por *L. major* os estudos com as espécies de leishmânias que causam a doença tegumentar no Novo Mundo como *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, são escassos (AFONSO & SCOTT, 1993; SOONG et al., 1997; BARRAL et al., 1993).

Não há um modelo murino de leishmaniose causada por *L. braziliensis*, a espécie responsável pela maioria dos casos de leishmaniose tegumentar no Brasil. A maioria das linhagens estudadas demonstram um perfil de resistência à infecção (BARRAL-NETTO, 1992; DeKREY et al., 1998). O desenvolvimento de lesões ocorre quando são feitas manipulações prévias da resposta imune

como a administração de TGF- β recombinante (rTGF- β) exógeno (BARRAL-NETTO et al., 1992; BARRAL et al., 1993), ou quando se inoculam os parasitos juntamente com produtos da saliva de flebotomíneos (LIMA & TITUS, 1996).

A maioria das linhagens de camundongos é susceptível à infecção pela *L. amazonensis*. Mesmo os camundongos da linhagem C57Bl/6, que conseguem controlar inicialmente a infecção, terminam desenvolvendo uma doença disseminada e fatal quando acompanhado por longo tempo (BARRAL et al., 1983; BARRAL-NETTO, 1987a). Na infecção causada por *L. amazonensis* de origens variadas, observam-se padrões de resistência e de susceptibilidade diferentes (AFONSO & SCOTT, 1993; BARRAL et al., 1983; BARRAL-NETTO et al., 1987a; CALABRESE & COSTA, 1992; FALCOFF et al., 1991; SOONG et al., 1997).

ALMEIDA, et al. (1996) verificaram que isolados de *L. amazonensis* de casos humanos com diferentes formas da doença, LC, LCM ou LV, relacionavam-se com diferentes padrões de resposta à infecção, quando inoculados em camundongos BALB/c. Estes resultados indicam que diferenças fenotípicas entre parasitos da mesma espécie podem determinar diferentes perfis de resposta em modelos murinos.

No presente estudo, os resultados do monitoramento do curso da infecção mostraram diferenças significativas entre os dois grupos de animais infectados. Nos camundongos CBA infectados por *L. amazonensis* as lesões cresceram progressivamente, ocorrendo necrose e ulceração. Alguns animais deste grupo foram mantidos por mais de cinco meses após a infecção, e

mostraram disseminação das lesões para várias áreas da pele e para vísceras, morrendo em consequência da infecção, como ocorre em camundongos BALB/c, altamente susceptíveis à *L. amazonensis* (BARRAL et al., 1983, MAUEL & BEHIN, 1981, CALABRESSE & COSTA, 1992). Essa mesma linhagem de camundongos quando infectada por *L. major*, desenvolveu lesões pequenas e mostrou capacidade de controlá-las espontaneamente, como já descrito na literatura (BEHIN et al., 1979; ALEXANDER & BLACKWELL, 1986).

Há dados na literatura indicando que nem sempre uma redução no tamanho da lesão está relacionada com diferenças significativas no número de parasitos (TITUS et al., 1985). Nós avaliamos a intensidade do parasitismo nos dois grupos de animais através da reação da imunoperoxidase indireta usando anticorpo anti-leishmânia e observamos que na infecção causada por *L. amazonensis*, a quantidade de parasitos aumentou progressivamente nas lesões, observando-se macrófagos de aspecto “virchowiano”, com citoplasma amplo, repleto de formas amastigotas. Em contraste, a infecção por *L. major* foi marcada por redução do número de macrófagos infectados e pela menor quantidade de parasitas por macrófagos. Esses dados indicam que lesões maiores estavam relacionadas com aumento da carga parasitária nos animais infectados por *L. amazonensis* e que a redução do tamanho da lesão nos animais infectados com *L. major* estava relacionada com controle da carga parasitária.

Tem sido descrito que os padrões de resistência e susceptibilidade na leishmaniose se correlacionam, tanto no homem quanto no modelo murino,

com perfis distintos de resposta tissular (RIDLEY et al., 1983; ANDRADE et al., 1984).

No homem, os aspectos histológicos das lesões nas formas polares benignas da LC e LCM, consideradas formas responsivas ou hiperérgica caracterizam-se pelo desenvolvimento de infiltrado inflamatório mononuclear misto constituído por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, formação de granulomas e escassez de parasitos. A presença de granulomas, vasculite, e necrose fibrinóide sugerem uma resposta imune de hipersensibilidade do tipo IV, mediada por linfócitos. Na forma polar grave, considerada a forma anérgica da infecção (LCD), as lesões caracterizam-se basicamente por intenso infiltrado quase monomórfico macrófágico, com escassos linfócitos e plasmócitos na periferia. Os macrófagos têm aspecto “virchowiano”, semelhante ao descrito na hanseníase virchowiana, por apresentarem-se intensamente parasitados, contendo vacuolos claros (BARRAL-NETTO et al., 1996; BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995; DEANNE & GRIMALDI, 1985). Recentemente, foi purificado um glicoconjugado secretado por amastigotas de *L. mexicana*, um proteofosfoglicana (PPG), que é responsável pela formação dos vacúolos parasitóforos amplos. É provável que a PPG contribua para o desenvolvimento das lesões em camundongos CBA (PETERS et al., 1997).

No modelo murino, os estudos morfológicos comparando perfis diferentes de resistência à infecção são escassos. Os poucos estudos realizados mostram que nos animais resistentes, a resposta tissular parece com a observada na LCL e LCM humana. O infiltrado é mononuclear do tipo

misto, ocorre necrose do tipo fibrinóide e formam-se granulomas. Como na LCD humana, o perfil de susceptibilidade murina na leishmaniose está associado a um infiltrado monomórfico macrofágico com denso parasitismo (ANDRADE et al., 1984; FALCOFF et al., 1991). Confirmando as evidências de que os perfis morfológicos correspondem a diferentes graus de resistência à parasitose, camundongos susceptíveis manipulados através de imunização com antígenos parasitários solubilizados tornam-se mais resistentes e modificam o perfil de resposta tissular (BARRAL-NETTO et al., 1987b; POMPEU et al., 1992).

Os achados histológicos neste trabalho confirmam que a resposta tissular guarda estreita relação com os comportamentos biológicos e as respostas imunes dos camundongos quando infectados com as duas espécies leishmânicas. Camundongos CBA desenvolveram perfis distintos de resposta tissular, tanto no sítio de inoculação como no linfonodo popliteo, a partir do 7º dia após a infecção. O perfil tissular de resistência no sítio de inoculação, foi evidenciado no grupo de animais infectados com *L. major*. Observamos um infiltrado inflamatório misto mononuclear, com escasso parasitismo. O número de linfócitos na lesão aumentou progressivamente e observou-se acúmulo de macrófagos epitelióides. A infecção evolui com áreas de reação granulomatosa, necrose fibrinóide, fibrose e deposição de colágeno. No perfil de susceptibilidade dos camundongos CBA à *L. amazonensis*, a resposta tissular semelhante a observada em camundongos BALB/c (ANDRADE et al., 1984), mostra infiltrado do tipo monomórfico difuso de macrófagos com imensos vacúolos parasitóforos densamente parasitado, e poucos linfócitos na

periferia da lesão. A infecção evoluiu com áreas extensas de necrose do tipo coagulativo, micro-abscessos e úlceras.

Nossos achados estendem estes aspectos aos linfonodos de drenagem. Há uma nítida diferença no padrão tissular de resposta e na distribuição dos antígenos parasitários nos linfonodos e que estão relacionados com resistência e susceptibilidade. Nos camundongos CBA infectados com *L. major* (resistentes), o padrão tissular é macrofágico granulomatoso, com acúmulo de macrófagos formando estruturas granulomatóides dispersas no gânglio. Por outro lado, nos camundongos CBA infectados com *L. amazonensis*, a susceptibilidade correlacionou-se com o padrão macrofágico-plasmocitário difuso, associado a dissociação da estrutura dos linfonodos.

A disseminação dos parasitos das lesões das patas para os linfonodos popliteos de drenagem, foi detectada no 3º dia após a infecção (primeiro ponto de análise no experimento), persistindo até o 70º dia, nos dois grupos de animais infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*. A reação da imunoperoxidase indireta utilizando anticorpo anti-leishmânia, revelou aspectos interessantes no padrão de distribuição e da forma de apresentação dos antígenos parasitários. Nos camundongos CBA infectados por *L. major*, além da quantidade menor de parasitos, a estrutura da forma amastigota está sempre bem preservada (fig.9A e 10A). Esta forma de apresentação do parasito persistiu no linfonodo até o final do estudo, mesmo quando o parasitismo era escasso ou ausente no local da inoculação. Talvez a presença de parasitos em pequena quantidade no linfonodo, seja importante para uma resposta protetora eficaz. AEBISCHER, et al. (1993) referem-se ao encontro

de parasitos viáveis no linfonodo de drenagem vários meses após a cura espontânea da lesão no local da inoculação, em linhagens de camundongos altamente resistentes à infecção por *L. major* (CBA e C57Bl/6). Além disso, esses parasitos quando isolados das linhagens de camundongos resistentes não perdem virulência e são capazes de induzir doença quando inoculados em camundongos susceptíveis BALB/c. Esses dados sugerem que a persistência do parasito pode ser importante na manutenção da memória imunológica, mas pode também representar uma fonte para reativação de infecções em hospedeiros quando, por algum motivo, tornam-se imunodeprimidos.

Por outro lado, nos animais infectados por *L. amazonensis* observou-se além de parasitos íntegros no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos, grande quantidade de células mononucleares de aspecto macrofágico contendo abundante material antigênico degradado (Fig.9B e 10B). Progressivamente, estas células foram vistas nas áreas subcapsular, e nos centros germinativos dos folículos linfóides. As células macrofágicas parasitadas ou contendo antígeno parasitário terminam ocupando grandes áreas do linfonodo, distorcendo sua arquitetura. Progressivamente ocorre intensa plasmocitose com desaparecimento de linfócitos. É provável que a intensa carga antigênica seja responsável pela indução de apoptose de linfócitos, observada através da técnica do apopteg (dados não mostrados), favorecendo a disseminação parasitária.

A resistência e a susceptibilidade de linhagens de camundongos infectadas com *L. major* correlaciona-se com a indução de sub-populações celulares Th1 ou Th2 de células T CD4⁺, respectivamente (HEINZEL et al.,

1991). Os mecanismos imunes envolvidos na infecção dos camundongos CBA por *L. major* ou *L. amazonensis*, induziram produção de citocinas com perfis distintos de respostas. Nós verificamos que IFN- γ foi predominante produzido pelas células do linfonodo dos animais infectados por *L. major*, desenvolvendo resposta do tipo Th1, enquanto que os níveis de IL-4 foram mantidos mais alto no grupo de animais infectados por *L. amazonensis*, indicando um comprometimento da resposta do tipo Th2, após o 7^o dia de infecção.

Na fase inicial da infecção (7^o dia), a resposta imune celular nos camundongos CBA infectados por *L. major* foi associada a resposta do tipo misto Th1/Th2. Níveis elevados de IFN- γ , IL-4 e IL-10 foram produzidos. Apesar dos níveis elevados de IL-4 detectados neste grupo, em comparação com os níveis detectados no grupo infectado por *L. amazonensis*, a presença desta citocina associada a níveis também elevados de IFN- γ , não foi capaz de determinar um curso desfavorável da infecção. Resultados similares foram obtidos no estudo de REINER, et al. (1994) que demonstraram que quantidades similares de transcritos de IFN- γ e IL-4 foram expressas por diferentes linhagens de camundongos resistentes e susceptível, no 4^o dia após a infecção. No entanto, vários trabalhos demonstram que as citocinas produzidas na primeira semana, são fatores decisivos para a diferenciação das células T CD4⁺ (BELOSEVIC et al., 1990; SADICK et al., 1990; SCHARTON-KERSTEN et al., 1995). O perfil misto Th1/Th2 observado nos camundongos CBA se assemelha com o perfil da resposta de pacientes que desenvolvem a forma cutâneo-mucosa e forma cutânea localizada infectados com espécies

parasitárias do complexo *braziliensis* e mexicana (CÁCERES-DITTMAR et al., 1993; PIRMEZ et al., 1993).

Após a 1^o semana verificamos, nos camundongos infectados por *L. major*, uma redução dos níveis de IL-4 e uma redução gradativa dos níveis de IL-10. Por outro lado, níveis elevados de IFN- γ permanecem elevados até 49^o dia após a infecção quando observamos o declínio e o controle do tamanho da lesão. Essa mudança no padrão de citocinas foi relacionada com a indução de resposta protetora neste grupo de animais e foi associada com padrão de diferenciação celular do tipo Th1.

O padrão de resistência dos camundongos CBA infectados por *L. major*, está bem demonstrado na leishmaniose tegumentar murina (BEHIN et al., 1979; SOARES et al., 1997a). TITUS, et al. (1987) demonstraram que os camundongos CBA apresentam na 3^o semana após a infecção, três vezes mais células T CD8⁺ nos linfonodos de drenagem do que os camundongos BALB/c. As células T CD8⁺ também produzem IFN- γ bem como TNF- α . O IFN- γ em sinergia com TNF- α induz ativação de macrófagos resultando em produção de radicais reativos de nitrogênio que são tóxicos para os parasitos (LIEW & O'DONNELL, 1993). Estes dados sugerem que as células T CD8⁺ podem estar contribuindo, junto com as células T CD4⁺, para promover níveis elevados de IFN- γ nas fases iniciais da infecção.. Seria interessante verificar em nosso modelo se há diferenças na quantidade de células T CD8⁺ em animais infectados por *L. amazonensis* ou por *L. major*.

A produção de IL-10 no grupo infectado por *L. major* foi elevada no 7^o dia após a infecção e diminui progressivamente no decorrer da infecção,

quando comparamos com o grupo infectado por *L. amazonensis*. Resultados similares foram obtidos por SOARES et al. (1997b). As células de camundongos resistentes (CBA) produzem níveis mais altos de IL-10 do que os camundongos susceptíveis (BALB/c), tanto *in vivo* como *in vitro*. Apesar desta citocina estar associada ao perfil de resposta imune celular do tipo Th2, contribuindo para o desenvolvimento da susceptibilidade em camundongos BALB/c infectados com *L. major*, existem relatos de que em camundongos CBA pode estar associado com papel protetor. CORRADIN, et al. (1993) mostrou que IL-10 aumenta a produção de NO em macrófagos ativados por IFN- γ e TNF- α na infecção por *L. major*. Talvez a IL-10 funcione com uma citocina moduladora da resposta Th1.

A infecção causada por *L. amazonensis* nos camundongos CBA foi caracterizada por uma baixa produção de IFN- γ detectada desde o início da infecção. Nossos resultados indicam que na ausência de IFN- γ , mesmo quantidades menores de IL-4, produzidos no início da infecção pelas células do grupo de animais infectados com *L. amazonensis* quando comparados com as células do grupo de animais infectados por *L. major*, foram suficientes para induzir uma resposta não protetora, do tipo Th2.

A partir da 1^o semana, a produção de IL-4 foi mantida até o fim do estudo pelas células do grupos de camundongos CBA infectadas por *L. amazonensis*. Os resultados indicam que a capacidade dos camundongos CBA infectados com *L. major* de suprimir a produção de IL-4 se correlaciona com a resistência à infecção, enquanto que a manutenção dos níveis de IL-4,

detectada no grupo infectado por *L. amazonensis* se correlaciona com susceptibilidade à infecção.

A presença de IL-10 e de IL-4 na ausência de IFN- γ , em camundongos infectados com *L. amazonensis*, sugere que talvez neste contexto a IL-10 esteja contribuindo no sentido de favorecer uma resposta Th2. A IL-10, assim como IL-4 e TGF- β tem sido caracterizada como um potente inibidor da produção de IFN- γ dependente de IL-12 (SCHARTON & SCOTT, 1995). Este papel regulatório foi demonstrado tanto em linhagem de camundongos resistentes (CBA) como susceptíveis (BALB/c). Quando se neutraliza IL-10, com anticorpo anti-IL-10 em cultura de células de camundongos CBA e BALB/c, é induzido aumento da produção de IFN- γ e de NO (SOARES et al., 1997b). No entanto, a neutralização de IL-10, não é suficiente para promover o controle da infecção em camundongos BALB/c (McSORLEY et al., 1996). O conjunto dos dados sugere que esta citocina por si só não é capaz de polarizar a resposta imune no sentido Th1 ou Th2, porém reforçam seu caracter inibitório da resposta Th1.

O mecanismo que promove a susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis* não é bem conhecido. Trabalhos recentes realizados com a linhagem C57Bl/10 e C57Bl/6, os quais desenvolvem lesões persistentes sem sinais de cura, indicam que na infecção por *L. amazonensis*, a susceptibilidade não está sempre associada à indução de células do tipo Th2. Células do linfonodo popliteo de camundongos C57Bl/10 produzem IL-4 apenas no início da infecção, enquanto na fase mais tardia quando as lesões se desenvolvem não foi detectado a produção desta citocina (AFONSO et al., 1993). Em

sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos C57Bl/6, removidas 8 semanas após a infecção, não foi detectado produção de IL-4 (SOONG et al., 1997).

Nossos resultados mostram que os camundongos CBA quando infectados com *L. amazonensis* desenvolvem padrão de resposta do tipo Th2, ou seja, IL-4 é produzido pelas células do linfonodo popliteo e esses níveis foram mantidos altos durante o curso da infecção. Diferente dos resultados demonstrados por AFONSO, et al. (1993) e SOONG, et al. (1997) em linhagem de camundongos das C57Bl/10 e C57Bl/6. A infecção causada pela *L. major* induziu resposta do tipo Th1, como já demonstrado por outros estudos.

Os dados da literatura indicam que uma mesma espécie de leishmânia pode induzir susceptibilidade, em diferentes linhagens de camundongos, através de mecanismos distintos. O modelo do camundongo CBA, mostra que há indução de uma resposta Th2 típica quando esses animais são infectados com *L. amazonensis*.

As diferenças entre os experimentos podem ser devido as diferenças nas cepas de leishmânias ou devido ao "background" genético das linhagens de camundongos utilizadas. MORRIS, et al. (1993) relatam que na infecção por *L. major* a produção de IFN- γ necessária para induzir o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1, pode variar na dependência do "background" genético do camundongo. A infecção causada por *L. amazonensis* apresenta um variado grau de susceptibilidade à infecção, sendo assim padrões diferenciais da resposta imune do tipo Th2 podem ser induzidos.

Em relação à produção de NO_2^- no curso da infecção, nós observamos que o grupo infectado com *L. amazonensis* mostrou uma tendência para produzir níveis ligeiramente mais elevados de NO_2^- do que o grupo de animais infectados por *L. major*. No entanto, não houve diferença significativa na produção de NO_2^- no 7° e no 70° dia após a infecção, apenas no 49° dia após a infecção, entre os dois grupos de animais infectados. A produção de NO_2^- aumentou gradativamente nas células dos animais infectados por *L. major*, quando verificamos o controle do tamanho da lesão. E foi inversamente relacionada com os níveis de IL-10 produzidos, no decorrer da infecção, indicando o papel inibitório de IL-10.

Tem sido demonstrado na infecção por *L. major*, que a habilidade dos macrófagos de linhagens resistentes para produzir NO está diretamente relacionada com a capacidade dessas células para destruir os parasitos (LIEW et al., 1991). Em geral esses trabalhos avaliaram a produção de NO *in vitro* em macrófagos estimulados com LPS e/ou IFN- γ (LIEW et al., 1991b; DING et al., 1994) ou em células do linfonodo de drenagem, nas fases iniciais até o 7° dia após a infecção (SOARES et al., 1997b).

Outros estudos têm demonstrado uma estreita correlação entre atividade leishmanicida de macrófagos murinos e a produção de nitrato derivado de arginina (NO_2^-). NO_2^- é um produto final estável da via metabólica que se combina com arginina para forma NO lábil. CORRADIN, et al. (1991), demonstraram que com a intensificação da fagocitose, aumenta a atividade leishmanicida e conseqüentemente a produção NO_2^- pelos macrófagos. Esses dados indicam que a produção de NO_2^- está associado diretamente com a

indução de atividade microbicida. No entanto, sugere que a atividade leishmanicida nem sempre está relacionado com o controle da infecção.

Poucos são os relatos sobre a produção de NO no curso da infecção por *L. amazonensis*. Trabalhos recentes demonstram que no sítio de inoculação, a produção de NO é um importante mecanismo de eliminação do parasito, caso ocorra antes da carga parasitária tornar-se alta. Nos estágios tardios da infecção, a produção de NO eleva-se e os derivados oxidantes agravam o processo inflamatório em camundongos BALB/c, quando comparado com camundongos relativamente resistentes, C57Bl/6, durante o curso da infecção por *L. amazonensis* (GIORGIO et al., 1998). Esses resultados sugerem que NO pode estar envolvido nos mecanismos que regulam proteção bem como o desenvolvimento das lesões.

Outra possibilidade é que NO sozinho não seja capaz de eliminar os parasitos. Talvez outros fatores como metabólitos do O₂ sejam necessários. Outro aspecto a ser investigado é se as diferentes espécies de leishmânia são igualmente sensíveis ao NO. Talvez a *L. amazonensis* seja capaz de neutralizar o efeito leishmanicida de NO, ou seja mesmo mais resistente ao NO.

Os resultados apresentados neste estudo reforçam que fatores relacionados com parasito determinam padrões diferentes de resposta imune-inflamatória nos camundongos CBA. A abordagem utilizada exclui a possibilidade de que o "background" genético do hospedeiro determine, exclusivamente, o perfil de resposta ao patógeno. Ou que a resposta Th1/ Th2 seja um epifenômeno. Fatores relacionados com a *L. amazonensis*

determinam uma resposta do tipo Th2 em camundongos CBA, que são capazes de manter uma resposta do tipo Th1 quando infectados com *L. major*. Antígenos ou outros fatores da *L. amazonensis* podem estar envolvidos na indução da resposta Th2 ou na indução da tolerância das células Th1, e precisam ser investigadas.

O modelo de infecção do camundongo CBA, induzindo perfis fenotípicos distintos em função das diferentes espécies de leishmânia, abre perspectivas para se investigar mecanismos na relação parasito x hospedeiro envolvidos na resposta protetora e não-protetora à leishmaniose tegumentar murina.

A determinação de que fator(es) na *L. amazonensis* induz(em) resposta Th2, abre perspectivas no sentido de se desenvolver vacinas capazes de promover a produção de anticorpos neutralizantes deste(s) fator(es), ou indução de tolerância a este(s) fator(es).

O modelo, além de útil na compreensão de mecanismos básicos, da proteção e susceptibilidade, pode ser utilizado na indução de proteção cruzada de eventuais candidatos a vacina.

Por último, o estudo aqui apresentado chama a atenção para a particularidade das relações parasito-hospedeiro, que devem ser levados em consideração no desenvolvimento e avaliação de vacinas.

7 RESUMO DOS RESULTADOS

- Camundongos isogênicos CBA são resistentes à infecção por *L. major*, desenvolvendo lesões pequenas que curam espontaneamente e mostram capacidade de controlar a carga parasitária. Por outro lado, são susceptíveis à infecção por *L. amazonensis* desenvolvendo, lesões e carga parasitária que aumentam progressivamente, ocorrendo necrose e ulceração e disseminação dos parasitos.
- Os perfis distintos de susceptibilidade e resistência correspondem a padrões distintos de resposta tissular. O perfil tissular de resistência à infecção por *L. major* está relacionado com um padrão granulomatoso de resposta inflamatória e necrose do tipo fibrinóide. Enquanto que o perfil tissular de susceptibilidade à *L. amazonensis*, foi associado com infiltrado do tipo monomórfico difuso de macrófagos com imensos vacúolos parasitóforos densamente parasitado e áreas de necrose do tipo coagulativo.
- Há uma nítida diferença no padrão tissular de resposta e na distribuição dos antígenos parasitários nos linfonodos e que estão relacionados com resistência e susceptibilidade. Nos camundongos CBA infectados com *L. major*, resistentes, o padrão é macrofágico granulomatoso. Por outro lado, nos camundongos CBA infectados com *L. amazonensis*, a susceptibilidade correlacionou-se com o padrão macrofágico-plasmocitário difuso.

- padrão morfológico de resposta tecidual comporta-se como correlato da resposta imune, ou seja, estão relacionados com a produção aumentada de IFN- γ ou IL-4. Camundongos CBA quando infectados por *L. major* produziram níveis elevados de IFN- γ . No entanto, quando infectados por *L. amazonensis* produziram níveis elevados de IL-4.

8 CONCLUSÕES

- A infecção por *L. amazonensis* induz resposta imune celular do tipo Th2, enquanto a infecção por *L. major* induz resposta celular do tipo Th1 em camundongos CBA .
- Os dados apresentados indicam que, no contexto do camundongo CBA, fatores relacionados com o parasito são determinantes do tipo da resposta imune-inflamatória

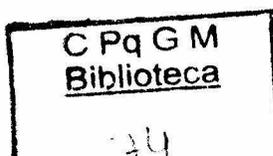
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBISCHER, T.; MOODY, S.F.; HANDMAN, E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. **Infect. Immun.**, **61**: 220-26,1993.
- AFONSO, L.C. & SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, **61**: 2952-59, 1993.
- ALEXANDER, J. A radio attenuated *Leishmania major* vaccine markedly increases the resistance of CBA mice to subsequent infection with *Leishmania mexicana mexicana*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **76**: 646-49, 1982.
- ALEXANDER, J. & BLACKWELL, J.M. The immunological significance of genetically determinant cross reactivity between taxonomically distinct *Leishmania species*. IMEEE, Montpellier, 1986, p.185-91.
- ALEXANDER, J. & KAYE, P.M. Immunoregulatory pathways in murine leishmaniasis: different regulatory control during *Leishmania mexicana mexicana* and *Leishmania major* infections. **Clin. Exp. Immunol.**, **61**: 674-82, 1985.
- ALMEIDA, R.P.; BARRAL-NETTO, M.; JESUS, A.M.R.; FREITAS, L.A.R.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **54**: 178-84, 1996.

- ANDRADE, Z.A.; REED, S. G.; ROTERS, S. B.; SADIGURSKY, M.
Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, **114**: 137-48, 1984.
- BADARÓ R.; JONES T.C.; LORENÇO R.; CERF B.J.; SAMPAIO D.;
CARVALHO E.M.; ROCHA H.; TEIXEIRA R.; JOHNSON JUNIOR, W.D. A
prospective study of visceral leishmaniasis in a endemic area of Brazil. **J. Infect.Dis.**, **154**: 639-49, 1986.
- BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E. C.; BROWNELL,C.E.;
TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor β as a
virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**,
90: 3442-46, 1993.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, R. G.; MOMEN, H.;
McMAHON-PRATT, D.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.;
BARRAL NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON JUNIOR, W.D.
Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis*
produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**,
44: 536-46, 1991.
- BARRAL, A.; PETERSEN, E.A.; SACKS, D.L.; NEVA, F.A. Late metastatic
leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32**: 277-85, 1983.
- BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C.E.; SKEIKY, Y.A.W.;
ELLINGSWORTH, L.R.; TWARDZIZ, D.R.; REED, S.G. Transforming
growth factor- β in leishmanial infection: A parasite escape mechanism.
Science, **24**: 545-48, 1992.

- BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; BONFIM, G.; BARRAL, A. Cytokine regulation in human american cutaneous leishmaniasis. In: TAPIA, F.J.; CÁCERES-DITTMAR, G.; SÁNCHEZ, M.A., *Molecular and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis*. New York: Springer-Verlag, 1996. Cap. 9, p.153-71.
- BARRAL-NETTO, M.; CARDOSO, S.A.; BARRAL, A. Different patterns of disease in two inbred mouse strains infected with a clone of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Acta Trop.**, **44**: 5-11, 1987a.
- BARRAL-NETTO, M.; FREITAS, L.A.R; ANDRADE, Z.A. Histopathologic changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of BALB/c mice. **Am. J. Pathol.**, **127**: 271-78, 1987b.
- BARRAL-NETTO, M.; MACHADO, P.; BARRAL, A. Human cutaneous leishmaniasis recent advances in physiopathology and treatment. **Eur. J. Dermatol.**, **5**: 104-13, 1995.
- BARRAL-NETTO, M.; SILVA, J.S.; BARRAL, A.; REED, S. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *leishmania amazonensis*. **Am. J. Pathol.**, **146**: 635-42, 1995.
- BEHIN, R.; MAUEL, J.; SORDAT, B. *Leishmania tropica*: pathogenicity and *in vitro* macrophage function in strains of inbred mice. **Exp. Parasitol.**, **48**: 81-91, 1979.
- BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D.S.; MEIDE, P.H. van der; SLAYTER, M.V.; NACY, C. A. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies *in vivo* abrogates resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, **143**: 266-74, 1989.

- BEVERLEY, S. M. & TURCO, S.J. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. **Trends Microbiol.**, **6**: 35-40, 1998.
- BITTENCOURT A. L & ANDRADE, Z. Aspectos imunopatológicos da leishmaniose cutâneo-mucosa. **O Hospital**, **71**: 976-84, 1967.
- BIITTENCOURT, A.L.; BADARÓ, R.; COSTA, J.; BARRAL, A.; BADARÓ, F.; CARVALHO, E.M. Effect of pentavalent antimonial treatment on the histopathological and ultrastructural aspects of diffuse cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania amazonensis*. **Eur. J. Dermatol.**, **6**: 264-67, 1996.
- BITTENCOURT, A.L. & BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: DOERR, W. & SEIFERT, G. (eds.) *Tropical Pathology*. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.597-651.
- BITTENCOURT, A.L. & FREITAS, L.A.R. Leishmaniose tegumentar difusa. Aspectos anátomo-patológicos. **Med. Cut. Ibero Lat.-Am.**, **11**: 265-70, 1983.
- BITTENCOURT, A.L.; FREITAS, L.A.R.; POMPEU, M.M.L.; VIEIRA, M.L.; BARRAL, A. Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **85**: 53-9, 1990.
- BRADLEY, D.J. & KIRKLEY, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. **Clin. Immunol.**, **30**: 119-29, 1977.



- BRASIL. *Controle, Diagnóstico e Tratamento de Leishmaniose Visceral (Calazar). Normas Técnicas*. Brasília: Ministério da Saúde/Fundação Nacional da Saúde, 1996. 86 p.
- BRYCESON A.D.M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The clinical and histological features of the disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **63**: 708 -37, 1969.
- CALABRESE, K.S. & COSTA, S.C.G. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **87**: 49-56, 1992. Suppl.I.
- CÁCERES-DITTMAR, G.; TAPIA, F.J.; SÁNCHEZ, M.A.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; MODLIN, R.L.; BLOOM, B.R.; CONVIT, J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. **Clin. Exp. Immunol.**, **91**: 500-5, 1993.
- CARVALHO E.M.; JOHNSON, W.D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P.D.; COSTA J.L.M.; REED, S.G.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J. Immunol.**, **135**: 4144-48, 1985.
- CASTES, M. Th1 and Th2 responses in human cutaneous leishmaniasis: Relation to the Outcome of infection and implications for immunotherapy and vaccine development. In: TAPIA, F.J.; CÁCERES-DITTMAR, G.; SÁNCHEZ, M.A.; *Molecular and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis* New York: Springer-Verlag, 1996. Cap.12, p.203-21.
- CASTES, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O.; RONDÓN J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **27**: 176-86, 1983.

- CHAMPSI, J.& McMAHON, P.D. Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. **Infect. Immunol.**, **52**: 3272-79, 1988.
- CHER, D.J. & MOSMANN, T.R. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **J. Immunol.** , **138**: 3688-94, 1987.
- CHERWINSKI, H.M.; SCHUMACHER, J.H.; BROWN, K.D.; MOSMANN, T.R. Two types of murine helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **J. Exp. Med.**, **166**: 1229-44, 1988.
- CHILDS, G.E.; LIGHTNER, L.K.; McKINNEY, L.; GROVES, M.G.; PRICE, E.E.; HENDRICKS, L.D. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana* and *L. aethiopica*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **78**: 25-34, 1984.
- COFFMAN, R.L.; SEYMOUR, B.W.; LEBMAN, D.A.; HIRAKI, D.D.; CHRISTIANSEN, J.A.; SHRADER, B.; CHERWINSKI, H.M.; SAVELKOUL, H.F.; FINKELMAN, F.D.; BOND, M.W. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunol. Rev.**, **102**: 5-28, 1988.
- COLLINS T. Adhesion molecules in leukocyte emigration. **Sci. & Med.**, 28-37, 1995.
- CONVIT, J., PINARDI, M.E., RONDÓN A.J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **66**: 603-10, 1972.

- CORRADIN, S. B.; FASEL, N.; BUCHMULLER-ROUILLER, Y.; RANSIJN, A.; SMITH, J.; MAUEL, J. Induction of macrophage nitric oxide production by interferon- γ and tumor necrosis factor- α is enhanced IL-10. **Eur. J. Immunol.**, **23**: 2045-48, 1993.
- CORRADIN, S.B. & MAUEL, J. Phagocytosis of *Leishmania* enhances macrophage activation by IFN- γ and lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, **146**: 279-85, 1991.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Inflammation and repair. In: _____ *Pathologic Basis of Disease*. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. Cap. 3, p.51-92.
- COURA, J. R.; GALVÃO-CASTRO, B.; GRIMALDI JUNIOR, G. Disseminated American Cutaneous Leishmaniasis in a patient with AIDS. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82**: 581-82, 1987.
- DEANE, L.M. & GRIMALDI JUNIOR, G. Leishmaniasis in Brazil In: CHANG, K.-P & BRAY, R.S. (Eds.) *Leishmaniasis*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1985. p.247-81.
- DeKREY, G.K.; LIMA, H.C.; TITUS, R.G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.**, **66**: 827-29, 1998.
- DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUERHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, **141**: 2407-12, 1988.
- DOHERTY, T.M. & COFFMAN, R.L. *Leishmania major*. Effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c mice. **Exp. Parasitol.**, **184**: 124-35, 1996.

- FALCOFF, R.; BARRAL-NETTO, M.; STIFFEL, C.; BOUTHILLIER, Y.; BARRAL, A.; FREITAS, L. A.R.; MEVEL, J.C.; MOUTON, D. Variations in susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection in lines of mice selected for high or low immunoresponsiveness. **Parasite Immunol.**,**13**: 639-47, 1991.
- FARRELL, J.P.& KIRKPATRICK, C.E. Experimental cutaneous leishmaniasis II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. **J. Immunol.**,**138**: 902-07, 1987.
- FREITAS, L.A.R.; STAY, M.; BLEYENBER, J.A.; TITUS, R.G. Indometacin treatment slows disease progression and enhances a Th1 response in susceptible mice infected with *Leishmania major*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNOLOGIA E INTERNATIONAL MEETING ON CYTOKINES, 21., Angra dos Reis, RJ, 1997. p. 01.72.
- FURIE, M.B.& RANDOLPH, G.J. Chemokines and tissue injury. Review. **Am. J. Pathol.**, **146**: 1287-301, 1995.
- GALVÃO-CASTRO B.; SÁ-FERREIRA, J.A.; MARZOCHI, K. F.; MARZOCHI,M.C.; COUTINHO, S.G.; LAMBERT, P.H. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, **56**: 58-66, 1984.
- GIORGIO, S.; LINARES, E.; ISCHIROPOULOS, H.; ZUBEN, F.J.von; YAMADA, A.; AUGUSTO, O. In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine Leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **66**: 807-14, 1998.
- GRIMALDI JUNIOR, G. Leishmanioses Tegumentares: Aspectos clínicos e imunopatológicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **77**: 195-215, 1982.

- GRIMALDI JUNIOR, G.; MORIEARTY, P.L.; HOFF, R. *Leishmania mexicana*: Immunology and Histopathology in C3H mice. **Exp. Parasitol.**, **50**: 45-56, 1980.
- GRIMALDI JUNIOR, G. & TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, **6**: 230-50, 1993.
- HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; LOCKSLEY, R.M. *Leishmania major*. Analysis of lymphocyte and macrophage cellular phenotypes during infection of susceptible and resistant mice. **Exp. Parasitol.**, **65**: 258-68, 1988.
- HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; MUTHA, S.S.; LOCKSLEY, R.M. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, **88**: 7011-15, 1991.
- HOLADAY, B.J.; SADICK, M.D.; WANG, Z-E.; REINER, S.L.; HEINZEL, F.P.; PARSLow, T.G.; LOCKSLEY, R.M. Reconstitution of *Leishmania* immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1 and Th2-like cell lines. **J. Immunol.**, **147**: 1653-58, 1991.
- HOWARD, J. G.; HALE, C.; LIEW, F.Y. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. IV. prophylactic effect of specific suppression of cell-mediated immunity. **J. Exp. Med.**, **152**: 594-607, 1980.
- KELSO, A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? **Immunol., Today**, **16**: 374-79 1995.
- KIRKPATRICK, C.E.; NOLAN, T.J.; FARRELL, J.P. Rate of *Leishmania*-induced skin-lesion development in rodents depends on the site of inoculation. **Parasitology**, **94**: 451-65, 1987.

KRISHNAN, L.; GUILBERT, L.J.; RUSSEL, A.S.; WEGMANN, T.G.; MOSMANN, T.R.; BELOSEVIC, M. Pregnancy impairs resistance of C57Bl/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN- γ responses and increased production of T helper 2 cytokines. **J. Exp. Med.**, **156**: 644-52, 1996.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. *Evolution, classification and geographical distribution. The Leishmaniases*. London: Academic Press Inc., 1987. v.1 119p.

LASKAY, T.; DIEFENBACH A.; RÖLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. **Eur. J. Immunol.**, **125**: 2220-27, 1995.

LAUNOIS, P.; SWIHART, K.; SILVA, F. C.; MILON, G.; LOUIS, J.A. T cell responses elicited by *Leishmania major* in mice. In: TAPIA, F.J., CÁCERES-DITTMAR, G.; SÁNCHEZ M. A. *Molecular and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis*. New York: Springer-Verlag, 1996. Cap. 7, p.129-37.

LIEW, F.Y. Cell-mediated immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitol. Tod**, **2**: 264-70, 1986.

LIEW, F.Y. & COX, F.E. Nonspecific defence mechanism: The role of nitric oxide. **Immunol. Tod.**, **12**: A17-21, 1991ab.

LIEW, F.Y.; MOSS, D.; PARKINSON, C.; ROGERS, M.V.; MONCADA, S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Eur. J. Immunol.**, **21**: 3009-14, 1991b.

LIEW, F.Y. & O'DONNELL, C.A. Immunology of Leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, **32**: 161-59, 1993.

- LIMA, H.C. & TITUS, R.G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, **64**: 5442-45, 1996.
- MAUEL, J. & BEHIN, R. Immunology of Leishmaniasis. (eds.). In: LEVANDOWSKY, M. & HUTNER, S.H. *Biochemistry and physiology of protozoa*. 2.ed. New York: Academic Press, 1981. vol.4. p. 385-429.
- MAYRINK, W.; COSTA, C.A.; MAGALHÃES, P.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; OLIVEIRA LIMA, A.; MICHALICK, M.S.; WILLIAMS, P. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **73**: 385-87, 1979.
- McELRATH, M.J.; KAPLAN, G.; NUSRAT, A.; COHN, Z. A. Cutaneous Leishmaniasis. The defect in T cell influx in BALB/c mice **J. Exp. Med.**, **165**: 546-59, 1987.
- McLEOD, R.; BUSCHMAN, E.; ARBUCKLE, L.D.; SKAMENE, E. Immunogenetics in the analysis of resistance to intracellular pathogens. **Curr. Op. Immunol.**, **7**: 539-52, 1995.
- McSORLEY, S.; PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, C.A.; LIEW, F.-Y. Immunology of Murine Leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, **14**: 451-64, 1996.
- MELBY, P.C. Molecular and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis In: TAPIA, F.J.; CÁCERES-DITTMAR, G.; SÁNCHEZ, M. A. *Determinants of immunity in human cutaneous leishmaniasis: the role of IL-10 and IL-12*. New York: Springer-Verlag, 1996. Cap.10, p173-87.

- MERCHÁN-HAMANN, E. Diagnóstico macroregional das situações das endemias das regiões Norte e Nordeste. **Inf. Epidemiol. SUS**, **6**: 43-114, 1997.
- MITCHELL, G.F.; CURTES, J.M.; HADMAN, E. Cutaneous leishmaniasis in mice: Disease patterns in reconstituted nude mice of several genotypes infected with *Leishmania tropica*. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, **58**: 521-32, 1980.
- MORIEARTY, P.L.; BITTENCOURT, A.L.; PEREIRA C.M; TEIXEIRA, R.; BARRETO, E.; GUIMARÃES, N.A. Bordeline cutaneous leishmaniasis. Clinical, immunological and histological differences from mucocutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **20**: 15-21, 1978.
- MORRIS, L.; TROUTT, A.B.; McLEOD, K.; KELSO, A.; HANDMAN, E.; AEBISCHER, T. Interleukin-4 but not gamma interferon production correlates with the severity of murine cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **61**: 3459-65, 1993.
- MOSMANN, T.R.; CHERWINSK, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A.; COFFMANN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition patterns of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, **136**: 2348-57, 1986.
- MOSMANN, T.R. & SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, **17**: 138-46, 1996.
- MOSSER, D.M. & ROSSENTHAL, L.A. Divergent strategies used by the promastigote and amastigote forms of *Leishmania* to invade mammalian cells. 1994 Baillière's. **Clin. Infect. Dis.**, **1**: 191-212, 1994.
- MÜLLER, I.; FREITH, U.; LOUIS, J.A. Immunobiology of experimental leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, **181**: 1-12 1992.

- MURRAY, H.W.; RUBIN, B.Y.; CARRIERO, S.; ACOSTA, A.M. Reversible defect in antigen-induced lymphokine and γ -interferon generation in cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, **133**: 2250-54, 1984.
- NABORS G.S.; NOLAN,T.; CROOP,W.; LI, J.; FARRELL, J.P. The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c x C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. **Parasite Immunol.**, **17**: 569-79, 1995.
- NASCIMENTO, E.G.; RIBEIRO, A.R.S.; PARANHOS-SILVA, M.; SANTOS, O.A.J., MELRO, M.C.; SANTOS, W.L.C. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Humana em Jequié, Bahia, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 15., Salvador, 1997. p.TL-063.
- NATHAN, C. Natural resistance and nitric oxide. **Cell**, **82**:873-76, 1995.
- NEAL, R.A. & HALE, C. A comparative study of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniases. **Parasitology**, **87**: 7-13, 1983.
- OLIVEIRA, S.S. Estudo epidemiológico da Leishmaniose visceral em Feira de Santana-Ba, 1995. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 15, Salvador, 1997. p.TL-065.
- PEREZ, H.; ARREDONDO, B.; GONZALEZ, M. Comparative study of American cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis in two strains of inbred mice. **Infect. Immun.** **22**:301-07, 1978.
- PETERS, C.; KAWAKAMI, M.; KAUL, M.; ILG, T.; OVERATH, P.; AEBISCHER, T. Secreted proteophosphoglycan of *Leishmania mexicana* amastigotas activates complement by triggering the nannan binding pathway. **Eur. J. Immunol.**, **27**: 2666-72, 1997.

- PHIPPS, R.P.; STEIN, S.H.; ROPER, R.L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunol. Tod.**,**12**: 349-52, 1991.
- POMPEU,M.; FREITAS, A.L.; REIS, G.A.; BARRAL NETTO, M. T-lymphocytes in experimental *Leishmania amazonensis* infection: comparison between immunized and naive BALB/c mice. **Parasitol. Res.**, **78**: 16-22, 1992.
- PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F., MODLIN, R. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, **91**: 1390-95, 1993.
- RACOOSIN, E. & BEVERLEY, S.M. *Leishmania major*. Promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. **Exp. Parasitol.**, **85**: 283-95, 1997.
- REED, S.G.; ANDRADE, Z.A.; ROTERS, S.B.; INVERSO, J.A.; SADIGURSKY, M. *Leishmania mexicana amazonensis* infections in "resistant" inbred mice following removal of the draining lymph node. **Clin. Exp. Immunol.**, **64**: 8-13, 1986.
- REINER, S.L.; ZHENG, S.; WANG, Z.-E.; STOWRING, L.; LOCKSLEY, R.M. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. **J. Exp. Med.**,**179**: 447-56, 1994.
- REY, L. Leishmânia e Leishmanioses: Os parasitos. In: _____ Parasitologia. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.,1991. p. 182-92.
- RIDLEY D.S. & RIDLEY, M.J. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. **J. Pathol.**, **141**: 83-96, 1983.

- RITTER U.; MOLL, H.; LASKAY, T.; BRÖCKER, E.B.; VELAZCO, O.; BECKER, I.; GILLITZER, R. Differential expression of chemokines in patients localized and diffuse cutaneous american leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **173**: 699-09, 1996.
- ROBERTS, L.J.; BALDWIN, T.M.; CURTIS, J.M.; HANDMAN, E.; FOOTE, S.J. Resistance to *Leishmania major* is linked to the region on chromosome 17 and to chromosome 9. **J. Exp. Med.**, **185**: 1705-10, 1997.
- ROSSI-BERGMANN, B.; MÜLLER, I.; GODINHO, E.B. Th1 and Th2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cells in murine leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **61**: 2266-69, 1993.
- SACKS, D.L. & PERKINS, P.V. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **34**: 456 -59, 1984.
- SADICK, M.D.; HEINZEL, F.; HOLADAY, B.J.; PU, R.T.; DAWKINS, R.S.; LOCKSLEY, R.M. Cure of murine leishmaniasis with a anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. **J. Exp. Med.**, **171**: 115-27, 1990.
- SADIGURSKY, M. & BRODSKYN, C.F. A new liquid medium without blood and serum for culture of hemaflagellates. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **35(5)**: 942-44, 1986.
- SAMUELSON, J. & LICHTENBERG, F. von. Infectious Diseases. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. *Pathologic basis of disease*. 5.ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1994. Cap.8, p.305-77.

- SATOSKAR, A. & ALEXANDER, J. Sex-determined susceptibility and differential IFN- γ and TNF- α mRNA expression in DBA/2 mice infected with *Leishmania mexicana*. **Immunology**, 84: 1-4, 1995.
- SCHARTON-KERSTEN, T.& SCOTT, P. The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. **J. Leukoc. Biol.**, 57: 515-22, 1995.
- SCHARTON, Y.M. & SCOTT P. Natural killer cells are a source of gamma interferon that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J. Exp. Med.**, 178: 567-77, 1993.
- SCHMITT E.; HOEHN P.; GERMANN T.;RUDE E. Differential effects of interleukin-12 on the development of naive mouse CD4⁺ T cells. **Eur. J. Immunol.**, 24: 343-47, 1994.
- SCOTT, P.; CASPAR, P.; SHER, A. Protection against *Leishmania major* in BALB/c mice by adoptive transfer of a T cell clone recognizing a low molecular weight antigen released by promastigotes. **J. Immunol.**,144: 1075-79, 1990.
- SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMANN, R.L., PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond distinct parasite antigens. **J. Exp. Med.**, 168: 1675-84, 1988.
- SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; SHER, A. B lymphocytes are required for the generation of T cells that mediate healing of cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, 137: 1017-21, 1986.

SHANKAR, A, H. & TITUS, R.G. T Cell and Non-T Cell compartments can independently determine resistance to *leishmania major*. **J. Exp. Med.**,**181**: 845-55, 1995.

SHANKAR, A.H.& TITUS, R.G. The influence of antigen-presenting cell type and interferon-g on priming and cytokine secretion of *Leishmania major*-specif T cells. **J. Infect. Dis.**,**175**: 151-57, 1997.

SILVA, O.A.; SOUSA, M.E.C.; SANTOS, F.A.B.; MEIRELLES, A.C.F.; SILVA, J.I. Leishmaniose tegumentar americana na zona da mata de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 15., Salvador, 1997. p.TL-040 .

SOARES, M. B. P. **Papel de substâncias imunomodulatórias produzidas pelos hospedeiros de *Leishmania spp* na resposta imune experimental à *Leishmania major***. Rio de Janeiro: 1997. 122p. Tese (Doutorado em Ciências)- Centro de Ciências, Instituto de Biofísica Carlos Chagas, UFRJ. Rio de Janeiro, 1997a.

SOARES, M.B.P.; DAVID, J.R.; TITUS, R.G. An in vitro for infeccion with *Leishmania major* mimics the immune response in mice. **Infect. Immun.**, **65**: 2837-45, 1997b.

SOARES, N.M., Carvalho E.M., Pinho R.T., Pontes L.C. Induction of complement-sensitivty in *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes by protease treatment but not by specific antibodies. **Parasitol. Res.**, **79**: 390-42, 1993.

SOLBACH, W.& LASKAY, T. *Leishmania major* infection: The overture. **Parasitol. Tod.**, **11**: 394-97, 1995.

- SOONG, L.; CHANG, C-H.; SUN, J.; LONGLEY, JUNIOR, B.; RUDDLE, N.H.; FLAVELL, R.A.; McMAHON-PRATT, D. Role of CD4⁺ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, **158**: 5374-83, 1997.
- SOONG, L.; DUBOISE, M.; KIMA, P.; McMAHON-PRATT, D. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **63**: 3559-66, 1995.
- STENGER, S.; THÜRING, H.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **180**: 783-93, 1994.
- SUNDERKÖTTER, C.; KUNZ, M.; STEINBRINK, K.; MEINARDUS-HAGER, G.; GOEBELER, M.; BILDAU, H.; SORG, C. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. **J. Immunol.**, **151**: 4891-901, 1993.
- SYPEK, J.P.; CHUNG, C.L.; MAYOR, S.E.H.; SUBRAMANYAN, J.M.; GOLDMAN, S.J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S.F.; SCHAUB, R.G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **J. Exp. Med.**, **177**: 1797-802, 1993.
- TITUS, R.G.; LIMA, G.C.; ENGERS, H.D.; LOUIS, J.A. Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite-specific helper T cell populations capable of mediating *Leishmania major*-specific delayed type hypersensitivity. **J. Immunol.**, **133**: 1594-600, 1984.
- TITUS, R.G.; MARCHAND, M.; BOON, T.; LOUIS, J.A. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol.**, **7**: 545-55, 1985.

- TITUS, R.G.; MILON, G.; MARCHAL, G.; VASSALLI, P.; CEROTTINI, J-C.; LOUIS, J.A. Involvement of specific Lyt-2⁺ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, **17**: 1429-33, 1987.
- TITUS, R.G.; MÜLLER, I.; KIMSEY, P.; CERNY, A.; BEHIN, R.; ZINKERNAGEL, R.; LOUIS, J. A Exacerbation of experimental murine leishmaniasis cutaneous with CD4⁺ *Leishmania major*-specific T cell lines or clones which secrete interferon gamma and mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity. **Eur. J. Immunol.**, **21**: 559-67, 1991.
- WANG, Z.-E.; REINER, S.T.; ZHENG, S.; DALTON, D.K.; LOCKSLEY, R.M. CD4⁺T effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **174**: 1367-71, 1994.

10 APÊNDICE

Tabela 2: Valores obtidos no monitoramento do tamanho da lesão dos camundongos CBA e BALB/c infectados com *L. amazonensis* ou *L. major*.

semanas	CBA		BALB/c	
	<i>L.a.</i> (\pm SD) ^a	<i>L.m.</i> (\pm SD)	<i>L.a.</i> (\pm SD)	<i>L.m.</i> (\pm SD)
1	0,021 (\pm 0,014)	0,057 (\pm 0,069)	0,006 (\pm 0,018)	0,026 (\pm 0,024)
2	0,273 (\pm 0,181)	0,026 (\pm 0,025)	0,574 (\pm 0,123)	0,102 (\pm 0,112)
3	0,485 (\pm 0,131)	0,324 (\pm 0,110)	1,592 (\pm 0,190)	0,376 (\pm 0,143)
4	1,088 (\pm 0,344)	0,477 (\pm 0,157)	2,348 (\pm 0,215)	0,812 (\pm 0,122)
5	1,804 (\pm 0,493)	0,458 (\pm 0,166)	3,144 (\pm 0,372)	1,412 (\pm 0,685)
6	2,804 (\pm 0,646)	0,525 (\pm 0,141)	3,828 (\pm 0,685)	1,746 (\pm 0,213)
7	4,055 (\pm 0,790)	0,953 (\pm 0,585)	4,854 (\pm 0,843)	3,438 (\pm 1,331)
8	4,473 (\pm 0,760)	0,55 (\pm 0,183)	5,646 (\pm 0,411)	3,452 (\pm 0,486)
9	4,705 (\pm 0,917)	0,246 (\pm 0,189)	8,122 (\pm 2,066)	4,16 (\pm 0,998)
10	5,275 (\pm 1,003)	0,231 (\pm 0,144)	8,67 (\pm 1,622)	4,494 (\pm 0,461)

Tabela 4: Produção in vitro de IFN- γ (ng/ml) nas células do linfonodo popliteo dos camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*.

Dias após a infecção	CBA x <i>L. major</i> (\pm SD) ^a		CBAx <i>L. amazonensis</i> (\pm SD)	
	s/ est.	c/ est.	s/ est.	c/ est.
7°	3,27 (\pm 0,36)	60 (\pm 6,2)	1,9 (\pm 0,22)	2,6 (\pm 0,5)
49°	10,47 (\pm 0,58)	66,5 (\pm 0,6)	1,6 (\pm 0,18)	3,4 (\pm 0,2)
70°	0	11,8 (\pm 2,5)	0	0

^a os dados representam o desvio padrão (SD) de um dos três experimentos realizados.

s/ est.- sem estímulo c/ est. - com estímulo
faixa de linearidade do teste: 1,5 a 100 ng/ml.

Tabela 5: Produção de IL-4 (pg/ml) nas células do linfonodo popliteo dos camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*.

Dias após a infecção	CBA x <i>L. major</i> (\pm SD) ^a		CBAx <i>L. amazonensis</i> (\pm SD)	
	s/ est.	c/ est.	s/ est.	c/ est.
7°	0	263,9 (\pm 17,3)	0	90,5 (\pm 16,5)
49°	0	24,68 (\pm 2,1)	0	130,3 (\pm 9,8)
70°	0	0	0	128,5 (\pm 10,4)

^a os dados representam o desvio padrão (SD) de um dos três experimentos realizados.

s/ est.- sem estímulo; c/ est. - com estímulo
faixa de linearidade do teste: 19,55 a 2500 pg/ml.

Tabela 6: Produção de IL-10 (ng/ml) nas células do linfonodo popliteo dos camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*.

Dias após a infecção	CBA x <i>L. major</i> (\pm SD) ^a		CBAx <i>L. amazonensis</i> (\pm SD)	
	s/ est.	c/ est.	s/ est.	c/ est.
7°	0,82 (\pm 0,2)	21,7 (\pm 1,3)	0	4,8 (\pm 0,2)
49°	5,53 (\pm 0,6)	12,6 (\pm 1,9)	3,5 (\pm 1,1)	15,8 (\pm 1,5)
70°	1,1 (\pm 0,1)	2,6 (\pm 0,1)	0,8 (\pm 0,1)	3,5 (\pm 0,1)

^a os dados representam o desvio padrão (SD) de um dos três experimentos realizados.

s/ est.- sem estímulo ; c/ est. - com estímulo
faixa de linearidade do teste:19,55 a 25 ng/ml.

Tabela 7: Produção de óxido nítrico (μ M/ml) nas células do linfonodo popliteo dos camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*.

Dias após a infecção	CBA x <i>L. major</i> (\pm SD) ^a		CBAx <i>L. amazonensis</i> (\pm SD)	
	s/ est.	c/ est.	s/ est.	c/ est.
7°	1,1 (\pm 0,5)	2,7 (\pm 0,6)	1,2 (\pm 0,2)	3,5 (\pm 1,3)
49°	1.1(\pm 0,4)	2,8 (\pm 0,3)	5,3 (\pm 1,0)	13,3 (\pm 0,3)
70°	2,8 (\pm 0,9)	5,8 (\pm 1,1)	3,1 (\pm 1,6)	7.2 (\pm 1,5)

^a os dados representam o desvio padrão (SD) de um dos dois experimentos realizados.

s/ est.- sem estímulo; c/ est. - com estímulo
faixa de linearidade do teste: 200 a 0,781 μ M/ml.