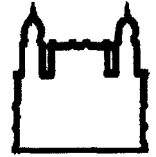




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

Dissertação de Mestrado

**Modulação da infecção leishmaniótica em
modelo murino por moléculas de amastigota de
*Leishmania***

Daniela Farias Larangeira

**Salvador - Bahia
2003**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

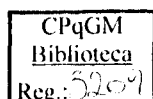
**Modulação da infecção leishmaniótica em
modelo murino por moléculas de amastigota de
*Leishmania***

Daniela Farias Larangeira

Orientador: Lain Carlos Pontes de Carvalho

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

**Salvador – Bahia -Brasil
2003**



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

L318m Larangeira, Daniela Farias
Modulação da infecção leishmaniótica em modelo murino por moléculas de amastigota de leishmania. [manuscrito] . / Daniela farias larangeira. - 2003.
62 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2003.

Orientador: Prof^o Dr.: Lain Carlos Pontes de Carvalho, Laboratório de

1. Leishmaniose Tegumentar. 2. Amastigota I. Título.

CDU 616.993.161

MODULAÇÃO DA INFECÇÃO LEISHMANIÓTICA EM MODELO MURINO POR
LISADOS E FRAÇÕES DE LISADOS DE AMASTIGOTA DE *Leishmania*.

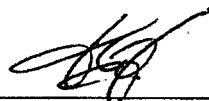
DANIELA FARIAS LARANGEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araújo
Professora adjunta
EBMSP



Dr. Johan Van Weyenbergh
Pesquisador Associado
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Aos doutores. Lain Pontes de Carvalho e Washington Conrado dos Santos pela excelente orientação, incentivo e entusiasmo.

A Márcia Aquino Teixeira por ter acompanhado e orientado meus primeiros passos no LIMC sempre com muito carinho.

As estudantes Romina Sampaio e Paula Suzart que iniciaram este trabalho.

Aos amigos do LIMC fundamentais em todos os momentos de trabalho.

Aos professores Stella Barrouin e Paulo Aguiar, meus eternos orientadores e amigos.

A Dra. Milena Soares pela orientação em todos os momentos que necessitei e a todos os amigos do LIF sempre prestativos e pacientes.

Aos meus queridos colegas do LPBC, LPBM, LIMI, LIP, LAPEX e Chagas.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela excelente estrutura disponibilizada para os alunos de pós-graduação. E a todas as pessoas responsáveis por sua organização.

A minha família que mesmo não concordando com minhas escolhas acabam as apoiando.

A Edvan e sua família por serem meu segundo lar.

Aos meus amigos que mesmo não entendendo nada sobre meu trabalho fizeram questão de decorar o título da dissertação.

E por fim aos animais que são meu porto seguro sempre que há tempestades.

Lista de figuras e tabelas

- Figura 1.** Esquema do desenho experimental básico 31
- Figura 2.** Tamanho da lesão cutânea em camundongos BALB/c tratados com salina, lisado de amastigota de *Leishmania braziliensis* (am lb) ou de amastigota *Leishmania amazonensis* (am la) e infectados com *Leishmania braziliensis*. 36
- Figura 3.** Tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c, tratados com frações hidrofílicas de *Leishmania braziliensis* (lb hidro) ou *Leishmania amazonensis* (la hidro) ou com salina tratada com Triton X-114 (salina TX114), infectados com *L. braziliensis*. 37
- Figura 4.** Tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c tratados com frações hidrofílicas com pesos moleculares maior e menor que 100 kDa de *Leishmania braziliensis* (lb maior 100 e lb menor 100) ou *Leishmania amazonensis* (la maior 100 e la menor 100) ou com salina tratada com Triton X-114 (salina TX 114) e infectados com *L. braziliensis*. 38
- Figura 5.** Tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c tratados com as frações anfílicas de *Leishmania braziliensis* (lb anf) ou *Leishmania amazonensis* (la anf), diluídas a 0,1 % no detergente BRIJ 35 ou com salina contendo BRIJ 35 (salina BRIJ) e infectados com *L. braziliensis*. 39
- Figura 6.** Atividade de IgG-2a em ELISA, do soro dos camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* tratados com: lisado de amastigota de *L. amazonensis* (la am ax) ou de *L. braziliensis* (lb am ax), fração hidrofílica *L. amazonensis* (la hidro) ou de *L. braziliensis* (lb hidro), fração hidrofílica maior ou menor que 100 kDa *L. amazonensis* (la maior ou menor 100) ou de *L. braziliensis* (lb maior ou menor 100), fração anfílica de *L. amazonensis* (la anf) ou de *L. braziliensis* (lb anf) e salina. 41
- Figura 7.** Atividade de anticorpo IgG1 em ELISA, do soro dos camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* tratados com: lisado de amastigota de *L. amazonensis* (la am ax) ou de *L. braziliensis* (lb am ax), fração hidrofílica *L. amazonensis* (la hidro) ou de *L. braziliensis* (lb hidro), fração hidrofílica maior ou menor que 100 kDa *L. amazonensis* (la maior ou menor 100) ou de *L. braziliensis* (lb maior ou menor 100), fração anfílica de *L. amazonensis* (la anf) ou de *L. braziliensis* (lb anf) e salina. Como controle negativo foi utilizado um grupo de animais não infectados (não infect). 42
- Figura 8:** Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongo BALB/c tratado com salina, lisado de amastigota de *Leishmania braziliensis*, fração anfílica de *Leishmania amazonensis* ou de *Leishmania braziliensis* e infectado com *Leishmania*

braziliensis (grupo controle). Coloração hematoxilina e eosina (HE).
43

Figura 9: Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongo BALB/c tratado com lisado de amastigota de *Leishmania braziliensis*, fração anfifílica de *Leishmania amazonensis* ou de *Leishmania braziliensis* e infectado com *Leishmania braziliensis* (grupo controle). Coloração hematoxilina e eosina (HE).
44

Figura 10: Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongo BALB/c tratado com lisado de amastigota de *Leishmania amazonensis*, fração hidrofílica de amastigota de *Leishmania braziliensis* ou fração hidrofílica de amastigota de *Leishmania amazonensis* e infectado com *Leishmania braziliensis*. A seta indica área com presença de cristais de colesterol. Coloração hematoxilina e eosina (HE). 45

Figura 11: Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongo BALB/c tratado com lisado de amastigota de *Leishmania amazonensis*, fração hidrofílica de amastigota de *Leishmania braziliensis* ou fração hidrofílica de amastigota de *Leishmania amazonensis* e infectado com *Leishmania braziliensis*. A seta indica a presença de macrófagos vacuolados contendo formas amastigotas de *Leishmania*. Coloração hematoxilina e eosina (HE). 46

Figura 12: Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongo BALB/c tratado com subfração hidrofílica de amastigota de *Leishmania braziliensis* ou subfração hidrofílica de amastigota de *Leishmania amazonensis* e infectado com *Leishmania braziliensis*. Coloração hematoxilina e eosina (HE).
47

Figura 13: Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongo BALB/c tratado com subfração hidrofílica de amastigota de *Leishmania braziliensis* ou subfração hidrofílica de amastigota de *Leishmania amazonensis* e infectado com *Leishmania braziliensis*. Coloração hematoxilina e eosina (HE).
48

Figura 14: Corte histológico da pata traseira direita de camundongo BALB/c tratado com lisado de amastigota de *Leishmania amazonensis*, fração hidrofílica de amastigota de *Leishmania amazonensis*, de *Leishmania braziliensis*, subfração hidrofílica *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* e infectado com *Leishmania braziliensis*. Coloração hematoxilina e eosina (HE). 49

Figura 15: Corte histológico da pata traseira direita de camundongo BALB/c tratado com lisado de amastigota de *Leishmania amazonensis*, fração hidrofílica de amastigota de *Leishmania amazonensis*, de *Leishmania braziliensis*, subfração hidrofílica *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* e infectado com *Leishmania braziliensis*. Coloração hematoxilina e eosina (HE). 50

Tabela 1. Natureza do material injetado em grupos de camundongos BALB/c 31

Tabela 2. Semi-quantificação de endotoxina em diferentes preparados antes e após precipitação com o detergente Triton X-114 35

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CD	Grupo de diferenciação
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBS-T	PBS com Tween 20
SBF	Soro fetal bovino
Th	Linfócitos T auxiliar
TMB	3,3',5,5'- tetrametilbenzidina

RESUMO

Embora algumas espécies de *Leishmania* possam determinar várias formas de doença, existe usualmente uma relação entre a espécie infectante, e a apresentação clínica da enfermidade e natureza da resposta imune ao parasito. A *Leishmania braziliensis*, por exemplo, costuma ocasionar uma forte resposta imune celular e poucas lesões restritas à pele ou/e à mucosa, enquanto que a *Leishmania amazonensis* pode causar uma forma muito grave da doença, conhecida como leishmaniose cutâneo-difusa (LCD), na qual ocorre uma resposta imunológica ao parasito deficiente e lesões disseminadas pelo corpo do hospedeiro. É possível que diferenças moleculares entre estas duas espécies de *Leishmania* sejam responsáveis pela associação da LCD apenas com a infecção por *L. amazonensis*. Neste trabalho, foi investigada a capacidade de moléculas de *L. amazonensis* em potenciar a infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c. A identificação e caracterização de moléculas parasitárias supressoras podem servir de base para o desenvolvimento de futuras estratégias de produção de vacinas e imunoterápicos.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea. Amastigota. BALB/c.

SUMMARY

Although some species of *Leishmania* can determine several forms of illness, exists usually a relation between the sort infectante, and the clinical presentation of the illness and nature of the immune answer to the parasito. To *Leishmania braziliensis*, by example, costuma cause a strong cellular immune answer and few restricted wounds to the skin or/and to the mucosa, while that to *Leishmania amazonensis* can cause a very grave form of the illness, known as leishmaniose cutaneous-diffuse (LCD), in the which occurs an answer imunológica to the parasito deficient and wounds disseminated by the body of the hospedeiro. It is possible that differences moleculares between these two species of *Leishmania* be responsible by the association of the LCD barely with the infection by *L. amazonensis*. In this work, was investigated the capacity of molecules of *L. amazonensis* in potenciar the infection by *L. braziliensis* in mice BALB/c. The identification and caracterização of molecules parasitárias supressoras can serve of base for the development of future vaccines output strategies and imunoterápicos.

Key-words: Cutaneous leishmaniasis. Amastigote. BALB/c

SUMÁRIO

Introdução.....	2
1.1 Alguns aspectos gerais das leishmanioses.....	2
1.2 O desenvolvimento da leishmaniose depende de fatores do hospedeiro e do parasito.....	2
1.3 A leishmaniose tegumentar humana – alguns aspectos gerais.....	3
1.4 Tratamento.....	7
1.5 Relação parasito, vetor e resposta do sistema imune do hospedeiro.....	9
1.6 Modelos experimentais murinos.....	13
1.7 Estudo da resposta imune a antígenos de <i>Leishmania</i>	16
1.8 Cultivo axênico de amastigotas.....	19
Objetivos.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
Relevância.....	23
Material e métodos.....	23
4.1 Animais e Parasitos.....	23
4.2 Cultivo axênico de amastigota.....	24
4.3 Preparo dos lisados de <i>Leishmania</i>	24
4.4 Dosagem de endotoxina bacteriana nos lisados de <i>leishmania</i> e nos diluentes.....	24
4.5 Precipitação de endotoxina e fração hidrofóbica com Triton-X 114.....	25
4.6 Separação por peso molecular da fração hidrofílica.....	26
4.7 Remoção do Triton-X 114.....	26
4.8 Injeção dos lisados e frações protéicas de <i>Leishmania</i> em camundongos BALB/c.....	27
4.9 Infecção experimental.....	28

4.10 Acompanhamento dos animais.....	28
4.11 Sacrifício e coleta de espécimes para análise.....	28
4.12 Dosagem de IgGg1 e IgG2a.....	28
4.13 Análise estatística.....	30
5. Resultados.....	30
5.1 Dosagem de endotoxina nos lisados.....	32
5.2. Avaliação da lesão cutânea através da medida de patas.....	34
5.3. Detecção de anticorpo anti- <i>leishmania</i> das subclasses IgG2a e IgG1.....	36
5.4. Histopatologia de linfonodo poplíteo e pata.....	39
6. Discussão.....	49
7. Conclusão.....	54
8. Referências bibliográficas.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alguns aspectos básicos da leishmaniose tegumentar americana

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose causada pelas espécies *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* do gênero *Leishmania*, sendo transmitida por insetos vetores do gênero *Lutzomyia* e tem como reservatórios mamíferos silvestres e animais domésticos (SHERLOCK 1996). A LTA é endêmica em muitos países tropicais, constituindo um grave problema de saúde pública (GRIMALDI e TESH 1993). A doença é registrada em quase todo o território brasileiro, porém as regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste concentram, atualmente, a maioria dos casos (FUNASA 2000).

1.2 Desenvolvimento da leishmaniose depende de fatores do hospedeiro e do parasito

Os parasitos do gênero *Leishmania* infectam células do sistema fagocítico-mononuclear, produzindo lesões tegumentares e viscerais (RITTIG e BOGDAN et al. 2000). Embora algumas espécies de *Leishmania* possam determinar várias formas da doença, há usualmente uma nítida relação entre a espécie infectante e a apresentação clínica da enfermidade (COUTINHO et al. 1996a). Algumas espécies de *Leishmania* possuem uma maior virulência, possivelmente devido à capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro através de moléculas capazes de inativar componentes do sistema complemento, inibir a

fusão do fagossomo ao endossomo ao serem fagocitadas por macrófagos e estimular a produção de IL-4, (BOGDAN e ROLLINGHOFF 1998; SCHILLING e GLAICHENHAUS 2000). Estas moléculas estão discutidas na seção 1.5.

Estudos realizados com a linhagem de camundongos BALB/c demonstraram que a susceptibilidade está associada ao padrão de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺. A produção de IL-4, no início da infecção por *Leishmania major*, permite que o parasito desenvolva-se no interior de macrófagos, propiciando a progressão da doença (REINER e LOCKSLEY 1995). Em linhagens resistentes, é detectada a produção de IFN- γ , capaz de ativar macrófagos, que eliminam o parasito, desencadeando o processo de cura (LOCKSLEY et al. 1999). O padrão de diferenciação das células T CD4⁺ que leva a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α responsáveis pela resistência a infecções por microorganismos intracelulares, é denominado Th-1. Por outro lado, o padrão de resposta Th-2, representado pela produção de IL-4 e IL-10, está relacionado à defesa do organismo contra microorganismos extracelulares (MOSSI e COFFMAN 1995). Muitos patógenos são capazes de interferir no perfil de resposta do hospedeiro, estimulando um padrão de resposta favorável ao seu desenvolvimento (MANGER e RELMAN 2000)

Um exemplo de polarização da resposta imune é o que ocorre na infecção de mamíferos por a *Leishmania amazonensis* e a *Leishmania braziliensis*. Uma minoria de pacientes infectados com *L. amazonensis* manifesta uma forma gravíssima da doença, a leishmaniose cutâneo-difusa (LCD), que está relacionada a uma resposta imunológica deficiente ao parasito (COUTINHO et

al. 1996a). Esta forma nunca foi descrita em pacientes infectados por *L. braziliensis*, que costuma ocasionar uma lesão restrita à pele e /ou à mucosa, com poucos parasitos e forte resposta imune celular (BARRAL et al. 1995b).

Após a cura de uma infecção por *Leishmania*, o indivíduo pode adquirir proteção contra reinfecção, e em alguns casos a proteção estende-se a outras espécies de *Leishmania* (LIMA et al. 1999). Esta observação indica a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina. Vários estudos estão sendo feitos, utilizando antígenos de *Leishmania* em imunizações, em experimentos para verificar a imunogenicidade e o tipo de resposta celular estimulada, com resultados promissores (VINHAS et al. 1994; SOONG et al. 1995; BEYRODT et al. 1997; HABERER et al. 1998; PINTO et al. 2000).

1.3 A leishmaniose tegumentar humana – alguns aspectos gerais

Em seres humanos, a LTA pode manifestar-se inicialmente por aumento dos linfonodos próximos ao local da picada do flebotomíneo (BARRAL et al; 1995a). As formas clínicas da LTA são classificadas, de acordo com a localização das lesões, em: cutânea, cutâneo-mucosa e difusa. Conforme discutido acima, estas formas clínicas ocorrem devido a fatores relacionados à espécie de *Leishmania* e à resposta imune do hospedeiro (BOGDAN et al. 1996).

Diversos estudos com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com leishmaniose cutânea têm demonstrado que o controle da leishmaniose está relacionado às células T, que ao serem ativadas podem

produzir citocinas capazes de induzir uma resposta eficiente na eliminação do parasito, propiciando a cura do indivíduo, enquanto que as manifestações clínicas graves envolvem a produção de citocinas do tipo Th-2 ou a exacerbação de uma resposta Th-1 (MAASHO et al. 1998; LOCKSLEY et al. 1999).

Forma cutânea

É a manifestação mais comum da LTA, sendo observada em cerca de 85% dos pacientes (FUNASA 2000) . Caracteriza-se como uma úlcera de contorno circular com bordas elevadas e recortadas, que quando não existem infecções secundárias, é pouco exsudativa, sem tendência a sangramentos nem dor (BARRAL-NETTO et al 1995b). Inicia-se no local da picada do inseto vetor após um período de incubação de três a oito semanas, com a formação de uma pápula que evolui formando a lesão, que costuma estabilizar-se devido às defesas do hospedeiro e curar-se espontaneamente (FALQUEIRO E SESSA 1998). Esta forma é usualmente relacionada a infecções por *Leishmania braziliensis* e a outras espécies do complexo mexicana, e está associada a uma resposta mediada por linfócitos T CD 4⁺ do subtipo Th-1, capaz de controlar a infecção (BARRAL-NETTO et al. 1995a; LOCKSLEY et al. 1999).

Experimentos realizados com PBMC de pacientes infectados, agrupados, de acordo com o tipo de lesão, em pacientes com úlceras ativas, lesões crônicas e presença de cicatriz, demonstraram, através de dosagem de citocinas do sobrenadante das culturas, que a forma cutânea benigna é dependente de uma resposta Th-1 produtora de IFN- γ , citocina capaz de ativar macrófagos, os

tornando aptos a destruir o parasito (AJDARY et al. 2000). Por outro lado, as culturas dos pacientes com lesões crônicas produziram IL-4, citocina capaz de inibir a resposta imune celular, permitindo a sobrevivência do parasito no interior de macrófagos (RIBEIRO DE JESUS et al. 1998).

Forma cutâneo-mucosa

A forma cutâneo-mucosa é causada principalmente por *Leishmania braziliensis*. Esta surge meses ou anos após o desaparecimento de uma lesão primária cutânea, constituindo-se em lesões secundárias destrutivas envolvendo mucosas e cartilagens. As lesões de mucosa instalam-se de preferência nas vias aéreas superiores, acometendo as estruturas mais resfriadas pela passagem do ar inspirado, especialmente do septo nasal. Os sintomas comuns são: desconforto nasal, ardência, obstrução nasal, aumento da secreção, formação de crostas escuras e sangramentos aos traumatismos (FALQUEIRO e SESSA 1998) .

Menos de 5% dos pacientes desenvolveram a forma, e os fatores de risco para o desenvolvimento dessa forma incluem história de múltiplas lesões cutâneas, úlceras cutâneas extensas abaixo da cintura e tratamento incompleto com antimoniais no início da lesão primária (BARRAL-NETTO et al. 1998).

A extensão das lesões não está relacionada com o tempo de evolução da doença, que pode adquirir um caráter agudo, com destruição de regiões da face (nariz, lábios) em poucos meses, ou crônico, com discretas perfurações no septo nasal, sem comprometimento da aparência externa. Em ambos os casos as lesões são progressivas, não ocorrendo cura espontânea (CARVALHO et al.

1994). As lesões ulcerativas mutilantes são desencadeadas devido à necrose tecidual e podem levar o paciente a óbito em decorrência a problemas respiratórios, alimentares e à ação secundária de patógenos, como bactérias e fungos (COUTINHO et al. 1996a).

As lesões apresentam poucos parasitos e a resposta celular a antígeno de *Leishmania* costuma estar aumentada: pacientes com esta forma de leishmaniose cutânea geralmente possuem uma forte resposta mediada por células T contra o antígeno do parasito caracterizada pelo resultado positivo no teste intradérmico de Montenegro, linfoproliferação elevada e alta produção de IFN- γ por leucócitos 'in vitro'. (GUTIERREZ et al. 1991; COUTINHO et al. 1996a).

Forma cutânea difusa

Denominada de hansenóide, a forma cutânea difusa é causada no nosso meio por parasitos da espécie *L. amazonensis* (BITTENCOURT et al. 1992). Caracteriza-se pela presença de nódulos isolados ou agrupados, máculas, pápulas e placas infiltradas, que se disseminam aos poucos pelo corpo. (CARVALHO et al. 1985).

As lesões possuem limites imprecisos, que lembram a hanseníase virchowiana (FALQUEIRO E SESSA 1998). Nos indivíduos com esta forma de leishmaniose existe a produção de citocinas supressoras que inibem a destruição do parasito (COUTINHO et al. 1996b).

A depressão do sistema imune é específica, havendo resposta ao teste de Montenegro, sendo possível através de análise histopatológica, a observação de macrófagos cheios de parasitos e pouco infiltrado linfocitário (COUTINHO et al. 1998). Estudos linfoproliferativos demonstram a falta de resposta a antígenos de *Leishmania* e produção de citocinas IL-4 e IL-10 (CARVALHO et al. 1994; VIEIRA et al. 1994).

1.4 Tratamento

O tratamento da LTA foi introduzido pelo médico brasileiro Gaspar Viana (1912), utilizando o antimonial tártaro emético. Atualmente os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados como medicação de escolha por serem menos tóxico. São comercializados com os nomes de Pentostan® e Glucantime®, sendo este último o único disponível no Brasil (FALQUEIRO e SESSA 1998).

A posologia do medicamento em seres humanos difere entre as formas clínicas da doença e entre os indivíduos infectados, porém sabe-se que doses baixas e irregulares contribuem para seleção de clones de parasitos resistentes (GRIMALD e TESH 1993). O medicamento causa muitos efeitos colaterais, como dores epigástricas, mialgias, arritmias, reações de hipersensibilidade, adinamia e anorexia (PEARSON et al. 2000).

Além disso, a droga não pode ser utilizada em mulheres grávidas, é contra indicada em pacientes com doenças renais e/ou cardíacas e existem casos refratários (BARRAL-NETTO et al. 1995b).

Os pacientes que não respondem ao antimonial são tratados com a anfotericina B, um medicamento mais tóxico, sendo necessário o monitoramento semanal da função renal do indivíduo. Os principais efeitos colaterais são: reações de hipersensibilidade, hipopotassemia e nefrotoxicidade. Seu uso exige administração parenteral, porém é efetiva na leishmaniose mucosa (BARRAL-NETTO et al. 1995b).

A pentamidina é também uma segunda opção terapêutica, porém causa efeitos colaterais severos, como hiperglicemia ou hipoglicemia, cefaléia, náuseas, hipotensão e formação de abscessos no local de aplicação das injeções (PEARSON et al. 2000).

As drogas utilizadas, atualmente, na terapêutica da LTA são caras, tóxicas e o parasito costuma tornar -se resistente (MAYRINK et al. 1992). Além disso, os tratamentos são longos, precisam ser efetuados com acompanhamento médico e não são eficazes para muitos dos indivíduos que desenvolvem a forma cutâneo-mucosa e a difusa (GRIMALD e TESH 1993; BARRAL-NETTO et al. 1995).

Estudos imunoterápicos e com estimuladores da resposta imune, como o BCG e citocinas, estão sendo realizados em seres humanos, com base nos resultados obtidos em modelos experimentais (PEARSON e SOUSA 1996). A associação de IFN-gama e glucantime forneceu bons resultados por via sistêmica em indivíduos com a forma cutânea e mucosa resistentes ao tratamento com antimonial (BADARÓ et al. 1990).

Outra forma de tratamento consiste na utilização de drogas capazes de inibir citocinas responsáveis pelo aumento das lesões como ocorre na leishmaniose mucosa associado-a com um quimioterápico. No Brasil, estudos com a pentoxifilina, droga capaz de inibir TNF-alfa, associada à terapia com antimonial, foi capaz de curar pacientes com leishmaniose mucosa refratários ao tratamento convencional (LESSA et al. 2001).

Os trabalhos científicos nesta área estão produzindo resultados promissores, o que estimula a busca por antígenos de *Leishmania* e adjuvantes moduladores da resposta imune em modelos experimentais (WALKER et al. 1999; AEBISCHER et al. 2000).

1.5 Relação parasito, vetor e resposta do sistema imune do hospedeiro.

Os protozoários desenvolveram estratégias complexas de evasão ao sistema imune do hospedeiro, provavelmente utilizadas durante todo o processo de infecção, promovendo a perpetuação no organismo. Em relação à *Leishmania*, evidências clínicas e experimentais indicam que, além de fatores presentes no parasito e no hospedeiro conforme descrito acima, a saliva do vetor influencia a evolução da doença (LIMA e TITUS 1996). As falhas dos hospedeiros vertebrados em controlarem a infecção podem estar relacionadas a dois fatores principais: a habilidade da *Leishmania* em resistir às ações microbidas dos macrófagos ativados e a inibição da resposta imune celular do hospedeiro (GRIMALDI e TESH 1993).

A forma promastigota metacíclica da *Leishmania*, encontrada na saliva do flebotomíneo, é resistente ao sistema do complemento (NORONHA et al. 1998). Isto ocorre, possivelmente, devido à presença de glicofosfoglicano (LPG) na membrana celular do parasito e da LPK-1 (proteína cinase de *Leishmania*) (BOGDAN e ROLLINGHOFF 1998). Estas moléculas não permitem a ligação adequada do complexo de ataque à membrana (MAC) ao parasito, impossibilitando sua lise pelo complemento (BOGDAN et al. 1996). Estudos com o LPG constataram que esta molécula também é responsável pela ligação do parasito à membrana dos macrófagos (PINTO et al. 2000).

Após a penetração, o LPG inibe a fusão do lisossomo ao fagossomo, protegendo a forma promastigota das enzimas proteolíticas e do pH ácido, permitindo a transformação em amastigota, forma resistente ao baixo pH (BOGDAN e ROLLINGHOFF 1998).

Neutrófilos e macrófagos dispõem de dois mecanismos importantes para a destruição da *Leishmania*, a formação de superóxidos pelo complexo NADPH oxidase e a síntese de óxido nítrico catalisada pela enzima sintetase de óxido nítrico-2 (NOS-2) (MOSSALAY et al. 1999). As espécies de *Leishmania* são capazes de interferir em ambas vias através do LPG, inibindo a proteína cinase C (PKC), enzima chave para a explosão oxidativa, impedindo sua translocação do citossol para a membrana plasmática (BOGDAN e ROLLINGHOFF 1998).

Outra molécula importante para a modulação da resposta imune do hospedeiro é a LACK (receptor de *Leishmania* homólogo à cinase C ativada), que é capaz de ligar-se aos receptores $V\alpha 8$ e $V\beta 4$ presentes nas células T CD 4⁺, estimulando a produção de IL-4 (SCHILLING e GLAICHENHAUS 2000).

Além disso, 40 proteíno-cinases expressas em grande quantidade na superfície do parasito na fase de penetração no mamífero hospedeiro são capazes de fosforilar componentes do sistema complemento, causando a inibição da via clássica e da alternativa (NORONHA et. al 1998). Um exemplo é a metaloproteinase gp63, que é capaz de acelerar a conversão do C3b para C3bi, o qual funciona como fator opsonizante da *Leishmania*, facilitando sua penetração no macrófago, sem que haja a ativação de substâncias microbidas, através do receptor de complemento do macrófago (CR3) (BRITTINGHAM et al. 1995).

A gp63 também atua protegendo o parasito da citólise intralisossomal e da degradação, através de sua atividade proteolítica (McCONVILLE et al. 1987; NORONHA et al. 1998).

Outra forma de escape é o estímulo por *Leishmania major* para a produção de citocinas inibidoras autócrinas por nas células de Langerhans, tornando estas células ambientes seguros durante seu transporte para os linfonodos (LIMA et al. 1999; MOSSALAY et al.1999).

As citocinas derivadas do macrófago que inibem a morte dos parasitos fagocitados são o fator de transformação de crescimento (TGF- β) e a IL-10, que suprimem células NK e as funções microbidas do macrófago. Foi demonstrada a indução da produção de TGF- β e IL-10 em cultura de macrófagos murinos derivados de medula óssea por infecção pela *Leishmania braziliensis* e

Leishmania major (BARRAL et al. 1995). Também ocorreu o aumento da expressão de TGF- β e IL-10 em cultivo de linfócitos periféricos de seres humanos com leishmaniose cutânea crônica, causada por *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* ou com *Leishmania major* (BOGDAN e ROLLINGHOFF 1998).

Aplicação intralesional de TGF- β em animais experimentais acarretou o crescimento da lesão, enquanto que a neutralização desta citocina limitou o crescimento, confirmando o efeito prejudicial desta citocina na infecção por este protozoário (BARRAL et al. 1995b; BOGDAN e ROLLINGHOFF 1998).

Estudos com cepas da mesma espécie de *Leishmania*, porém de pacientes com formas clínicas distintas, demonstraram um efeito oposto quando as cepas eram incubadas com células mononucleares do sangue periférico. A cepa isolada de paciente com leishmaniose cutânea difusa estimulou a produção de IL-10, enquanto uma outra isolada de um indivíduo com leishmaniose cutânea (benigna) estimulou as mesmas células a produzirem IFN-gama (REINER e LOCKSLEY 1995; BOGDAN e ROLLINGHOFF 1998).

A ativação de linfócitos T CD 4⁺, necessária para o desenvolvimento da resposta, requer a apresentação de antígenos pelo complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC classe II), presente nas células apresentadoras de antígenos, e a interação entre receptores co-estimulatórios (B7/CD-28, CD-40/CD-40L) (DeSOUZA et al. 1995). As espécies de *Leishmania* são capazes de diminuir a expressão de MHC-II causando sua destruição ou de clivar o CD 4 através de gp63. Além disso, alguns parasitos são capazes de

inibir a expressão de B7-1, molécula co-estimulatória presente na membrana do macrófago, sem a qual esta célula não responde ao estímulo do IFN-gama (BARRAL-NETTO et al. 1995a; BOGDAN e ROLLINGHOFF 1998).

Algumas espécies de *Leishmania* induzem a formação de uma resposta Th-2, que permite seu desenvolvimento no hospedeiro, através de interações com receptores das células que as fagocitam, causando o bloqueio da produção de citocinas e outros mecanismos de escape ainda não esclarecidos (PINTO et al. 2000).

1.6 Modelos experimentais murinos de leishmaniose.

Os estudos com modelos experimentais murinos permitiram avanços no entendimento da patogênese das leishmanioses. As linhagens existentes com perfis imunológicos distintos, a possibilidade de modificações genéticas e a similaridade com o homem (KAYLE et al. 1991), tornam estes animais ferramentas importantes para a elucidação dos mecanismos de relacionamento parasito hospedeiro em diversas doenças.

Os modelos experimentais murinos para o estudo da leishmaniose cutânea esclareceram a importância da regulação por linfócitos T CD4⁺ na relação parasito/hospedeiro, determinando a resistência ou susceptibilidade de uma linhagem (MOCCI e COFFMAN 1995). Estas descobertas estão sendo aplicadas no estudo da infecção humana e o padrão de resposta imune tem se

mostrado semelhante ao da resposta imune murina (MENON e BRETSCHER 1998).

A linhagem BALB/c é a mais utilizada para estudo do perfil de susceptibilidade à leishmaniose. Nos camundongos dessa linhagem, a depender da espécie de *Leishmania* utilizada para infecção, a doença pode tornar-se sistêmica causando a morte dos animais. As investigações da resposta imune desses camundongos durante a infecção por *Leishmania major* permitiu definir o padrão de produção de citocinas conhecido atualmente como Th-2 (MOSMANN e COFFMAN 1989; TORRENTERA et al. 2001).

Como mencionado na seção 1.2, a resposta Th-2 consiste, inicialmente, na produção de IL-4, citocina produzida por linfócitos T CD4⁺, capaz de inativar os mecanismos de destruição do parasito, gerando macrófagos altamente parasitados e aparentemente inativos (REINER e LOCKSLEY 1995).

Esta mesma espécie de *Leishmania*, quando inoculada em camundongos de linhagem CBA, permitiu o estudo do padrão de resposta Th-1, que cursa com produção de IFN-gama, o qual induz a lise do parasito e a cura da infecção (SOUZA et al. 2000).

Os estudos destas duas linhagens de camundongos, com perfil de resposta imune opostas ao serem infectadas com *Leishmania major*, permitiriam fossem pesquisados diversos protocolos de imunoproliferação e tratamento da infecção,

visando à modulação da resposta imune e o desenvolvimento de vacinas (SOMMER et al. 1998).

A espécie *Leishmania braziliensis*, em modelos experimentais murinos, não permite a demonstração do padrão Th-2, pois as linhagens de camundongos são resistentes, desenvolvendo uma forma benigna de doença que cura-se em poucas semanas (DeKREY et al. 1998).

Estudos estão sendo realizados com o objetivo de criar linhagens geneticamente modificadas capazes de mimetizar a forma cutâneo-mucosa e a disseminada da leishmaniose (TERABE et al. 2000). Estas formas de doença estão relacionadas à infecção por *L. braziliensis* em seres humanos e são um grave problema de saúde pública (LIMA e TITUS 1996; DeKREY et al. 1998).

A espécie *Leishmania amazonensis*, encontrada nas Américas, causa doença severa na maioria das linhagens de camundongos (ALMEIDA et. al. 1996). Os estudos têm demonstrado que o perfil de resposta imune não corresponde ao padrão Th-2 observado nas espécies suscetíveis à *Leishmania major* (SOONG et al. 1997; TERABE et al. 2000).

Camundongos geneticamente modificados para serem incapazes de ativar células T CD4⁺, quando infectados com *Leishmania amazonensis*, não apresentaram lesões, sugerindo que a formação de úlceras e destruição de tecido presentes no camundongo normal está relacionado à ativação de células T CD4⁺ (TERABE et al. 1999). Alguns autores acreditam que a *Leishmania*

amazonensis seja capaz de induzir a presença de linfócitos T CD 4⁺ produtores de linfocinas quimiotáticas para monócitos, os quais são células ideais para a replicação da *Leishmania* (SOONG et al. 1997).

Outras investigações estão sendo realizadas para a avaliação desta hipótese, utilizando camundongos da linhagem CB-7, com imunodeficiência severa combinada (SCID), infectados com *L. amazonensis*. Verificou-se que estes animais não desenvolveram úlceras. Entretanto, ao receberem por via intraperitoneal esplenócitos de C.B-7 normais também infectados, houve o surgimento de úlceras algumas semanas após a inoculação (TERABE et. al. 2000). Estes resultados demonstram o papel das células T CD4⁺ na formação de úlceras em camundongos suscetíveis e torna a linhagem SCID interessante para o estudo da leishmaniose cutâneo difusa humana (TERABE et al. 2000), a qual cursa com a formação de múltiplos nódulos cutâneos não ulcerados.

Outras espécies de *Leishmania* estão sendo pesquisadas em modelos experimentais murinos, contribuindo para o esclarecimento da imunidade a estes parasitos e favorecendo o desenvolvimento de terapias mais eficazes contra a doença e vacinas (CHANG e McGWIRE 2002).

1.7. Estudo da resposta imune a antígenos de *Leishmania*.

Uma importante questão nas leishmanioses é a caracterização de antígenos dos agentes etiológicos capazes de ativar seletivamente uma resposta Th-1, gerando proteção para o hospedeiro (BEYROLT et al. 1997).

Estudos em seres humanos e modelos animais têm indicado a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose. A linhagem de

camundongos BALB/c costuma ser utilizada nestes estudos, por estes serem susceptíveis a infecções por *Leishmania amazonensis* e por *Leishmania major* e resistentes à *Leishmania braziliensis* (SOUZA et al. 2001). A cura da doença pode ser induzida nesses animais por uma variedade de tratamentos, incluindo a injeção de parasitos mortos, atenuados, lisados ou antígenos purificados do parasito (KAYLE et al. 1991). Nestas condições, a produção de citocinas reflete uma expansão da resposta protetora Th-1 (SOONG et al. 1995; HABERER et al. 1998).

Alguns trabalhos têm descrito a indução de proteção em modelos experimentais de susceptibilidade à infecção através da inoculação de parasitos mortos (POMPEU et al. 1992). O protocolo consiste em duas ou três doses destes por via intraperitoneal ou intravenosa e posterior infecção com parasitos vivos da mesma espécie. Em experimentos desta natureza com *Leishmania amazonensis*, observou-se uma proteção parcial, em que camundongos BALB/c imunizados desenvolveram lesões pequenas no local da infecção e não houve disseminação da doença, ao contrário dos animais controle.

Outra forma de controle da infecção consiste na proteção cruzada. Este fenômeno evidencia-se pela capacidade de uma infecção por *Leishmania* resolvida (curada) conferir resistência a uma reinfecção não apenas por parasitos da mesma espécie, mas também por parasitos de outras espécies de *Leishmania*. Isto pode ser observado em camundongos BALB/c infectados por *Leishmania braziliensis*. Após a cura, estes camundongos não desenvolvem doença ao serem inoculados com *Leishmania major* (LIMA et al.1999).

Estes resultados confirmam a presença de antígenos, em algumas espécies do protozoário, aptos a estimular uma resposta protetora e a possibilidade de utilizá-los em vacinas e imunoterápicos, e justificam o estudo da imunogenicidade e da capacidade de proteção de antígenos purificados, a exemplo dos descritos nos parágrafos abaixo.

Em 1987, Mcconville e colaboradores utilizaram um protocolo de vacinação, através do qual camundongos BALB/c foram injetados com LPG purificado de promastigota de *Leishmania major* e incorporados em lipossomos, por via intraperitoneal, em duas aplicações. Os animais foram posteriormente desafiados com parasitos vivos da mesma espécie. Os animais vacinados, ao contrário do grupo de animais controle, não desenvolveram a doença, demonstrando o efeito protetor deste antígeno. Outros autores relataram a capacidade do LPG de promover a ativação de linfócitos de indivíduos com LTA, causada por *Leishmania braziliensis*, em ensaios de linfoproliferação *in vitro* (MENDONÇA et al. 1991). A análise por citometria de fluxo dos linfócitos que proliferaram evidenciou um predomínio de células CD4⁺ (RUSSO et al. 1992; VINHAS et al. 1994). O efeito protetor conferido pelo LPG está relacionado com a capacidade deste antígeno em estimular a produção de IFN-gama (VINHAS et al. 1994; RAFATI et al. 1997).

Protocolos semelhantes foram utilizados para o estudo da gp 63. Contudo, não ocorreu linfoproliferação em células de pacientes e de camundongos infectados, estimuladas com este antígeno. Os autores atribuem estes resultados à ação proteolítica desta glicoproteína, porém não descartam sua participação nos

estudos imunoproliféricos. Nos estudos de imunização, a gp-63 induziu uma proteção menor que a LPG (MENDONÇA et al. 1991; VINHAS et al. 1995).

A maioria dos trabalhos de imunização costuma utilizar antígenos de promastigotas, sendo poucos realizados com antígenos de amastigotas. No entanto, esta forma é responsável pela disseminação da infecção no organismo infectado, penetrando e sobrevivendo nos macrófagos (RAFATI et al. 1997; BEYROLT et al. 1997; PINTO et al. 2000).

Um estudo utilizando amastigotas de *Leishmania pifanoi* consistiu em três injeções de antígenos purificados desta forma evolutiva, em camundongos BALB/c, e posterior infecção com esta espécie e com *Leishmania amazonensis*. Um dos antígenos estudados, o antígeno P8, foi capaz de induzir proteção contra ambas infecções. Ensaio de linfoproliferação e dosagem de citocinas destes animais indicaram estimulação de células T CD 4⁺ e a produção de IL-2 e IFN-gama. O antígeno P8 também induziu proliferação de células mononucleares de seres humanos com LTA ativa e de indivíduos infectados por *Leishmania braziliensis* curados (COUTINHO et al. 1996b).

A comparação da resposta de células mononucleares de indivíduos infectados com *Leishmania major* ao estímulo com antígenos de amastigota e promastigota indicou uma resposta mais intensa aos antígenos da primeira (RAFATI et al. 1997). Os antígenos da fase amastigota proporcionaram uma melhor indução de resposta protetora (Th-1), justificando a continuidade de trabalhos utilizando - os (HABERER et al.1998; PINTO et al. 2000).

1.8 Cultivo axênico de amastigotas

A utilização de formas amastigotas de *Leishmania* em pesquisas é muito importante para elucidação de fatores relacionados à interação entre o parasito e hospedeiro, na imunidade ao parasito, e na caracterização molecular desta forma, visando o desenvolvimento de imunoterápicos (Al-BASHIR et al. 1992; BALANCO et al. 1997).

Antigamente, os estudos envolvendo amastigotas dependiam do isolamento e purificação dessas formas, oriundas de animais de laboratório, ou do cultivo *in vitro* em culturas de células murinas ou caninas de linhagem tumoral ou de células linhagem macrófaga. Essa purificação consome muito tempo e sempre envolve o risco de contaminação com material do hospedeiro (Al-BASHIR et al. 1992).

A utilização de culturas axênicas para obtenção de amastigotas tornou-se uma alternativa útil para facilitar as pesquisas dessa forma parasitária. Diversos protocolos para obtenção destas formas, visando rapidez na purificação e a produção em massa de amastigotas com morfologia e composição molecular semelhante aquelas encontradas nos mamíferos, vêm sendo estudados (Al-BASHIR et al. 1992; HODGKINSON et al. 1996).

Os primeiros estudos sobre a transformação de promastigotas em amastigotas em cultivo axênico foram realizados por Trager em 1953. Os estudos

baseavam-se no aumento da temperatura de cultivo, porém o tempo de transformação era muito longo, durando mais de 40 dias (AL-BASHIR et al. 1992).

Atualmente os protocolos para transformação utilizam menos tempo de cultivo, associando-se a diminuição do pH do meio ao aumento de temperatura (HODGKINSON et al. 1996; TEXEIRA et al. 2002). Além disso, verificou-se que existem diferenças de meio de cultivo ideal para as diferentes espécies de *Leishmania* (AL-BASHIR et al. 1992; BALANCO et al. 1997; SAAR et al. 1998).

A transformação morfológica de promastigotas em amastigotas e a capacidade destes últimos em infectar animais e macrófagos são evidências do sucesso da transformação (AL-BASHIR et al. 1992). Além disso, há compartilhamento de antígenos, pelo menos parcial, entre as formas amastigotas obtidos nos cultivos axênicos e as amastigotas provenientes de células, ocorrendo a expressão de proteínas específicas de amastigota, e ausência de expressão de moléculas específicas da forma promastigota, nos cultivos de amastigota axênica (HODGKINSON et al. 1996; SAAR et al. 1998).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a existência de moléculas de *Leishmania amazonensis* potenciadoras da infecção e caracterizá-las parcialmente.

2.2. Objetivos específicos

- a. Avaliação da capacidade do lisado de amastigotas de *L. amazonensis* em alterar o desenvolvimento da lesão induzida por *L. braziliensis* em camundongos da linhagem BALB/c.

- b. Caracterização parcial a nível molecular das frações do lisado de amastigota de *L. amazonensis* responsáveis pelo efeito potenciador da infecção por *L. braziliensis*.

3. RELEVÂNCIA

A identificação de moléculas moduladoras de origem parasitária e sua caracterização molecular podem servir de base para o desenvolvimento de futuras estratégias de produção de vacinas ou imunoterapia, tanto para a leishmaniose tegumentar quanto para a visceral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS E PARASITOS

Foram utilizados camundongos BALB/c com aproximadamente três meses de idade, oriundos do Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz - Fundação

Oswaldo Cruz. Todos foram mantidos em condições ambientais adequadas e receberam ração balanceada e água *ad libitum*. Os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética da FIOCRUZ.

As espécies de *Leishmania* utilizadas no experimento foram isoladas de pacientes e identificadas como *L. amazonensis* (MHOM/BR88/BA-125 Leila strain) e *L. braziliensis* (MHOM/BR/3456). Estas foram mantidas em golden hamsters ou camundongos BALB/c. Ao serem isoladas destes animais, elas foram cultivadas em meio Schneider's para *Drosophila* (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA), contendo 125µl/ml de gentamicina, pH 7.2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) para *L. amazonensis* ou 20% de SFB para *L. braziliensis*, a 22 °C.

4.2. CULTIVO AXÊNICO DE AMASTIGOTA

As formas axênicas foram obtidas segundo protocolos desenvolvidos em nosso laboratório (TEIXEIRA et. al. 2002). Resumidamente, formas promastigotas de cultura foram cultivadas por sete dias em meio Schneider com 10 % de SBF, a 32° C, pH 5,4, para a espécie *L. amazonensis* ou por três dias, em Schneider com pH 5.4, com 20% de SBF, a 34°C, para *L. braziliensis*.

Depois de finalizado o tempo de cultivo, 97 a 99% dos parasitos correspondiam a formas imóveis e aflageladas. Os parasitos foram lavados três vezes com salina estéril, através de centrifugação a 1500 g, ajustados para 5×10^7 por ml e conservados a -70° C.

A infectividade, a viabilidade e as características antigênicas dos amastigotas de cultivo axênico foram objetivo de outro estudo, que demonstrou similaridades desses amastigotas com a forma amastigota presente nos mamíferos hospedeiros (SAAR et al. 1998)

4.3. PREPARO DOS LISADOS DE *Leishmania*

Amastigotas de cultivo axênico foram quebrados por ultra-som (5 ciclos de 40 segundos, frequência de ondas 20 e intensidade 2), a 4° C, em condições estéreis, na concentração de 5×10^7 amastigotas por ml de solução salina. Após a sonicação, os lisados foram aliquotados e estocados a – 70° C até o momento do uso, quando foram homogeneizados através de nova sonicação.

4.4. DOSAGEM DE ENDOTOXINA BACTERIANA NOS LISADOS DE *Leishmania* E NOS DILUENTES

A dosagem de endotoxina foi realizada através do “kit” comercial QCL-100 (Biowittaker, MD, EUA) que se baseia na interação de endotoxina bacteriana com uma enzima do amebócito do *Limulus polyphemus*,. O resultado é consiste na alteração de cor de um substrato, caso haja endotoxina bacteriana na amostra, através de leitura em espectrofotômetro com filtro de 410 nm. As amostras das substâncias listadas na tabela II foram colocadas em tubos estéreis contendo 50 µl do lisado de amebócito de *Limulus* incubadas por 10 minutos a 37 °C, após a incubação foi adicionado 100 µl da solução de substrato “Kit”, e realizada nova incubação por 6 minutos a 37 °C. Este mesmo

procedimento foi utilizado para o controle negativo contendo salina estéril e para o controle positivo, que se constitui em endotoxina bacteriana de *E. coli* em quatro concentrações de modo a permitir a construção de uma curva padrão, utilizada com auxílio de uma equação de regressão linear para calcular as concentrações de endotoxina bacteriana presente nas amostras testadas.

4.5. PRECIPITAÇÃO DE ENDOTOXINA E FRAÇÃO HIDROFÓBICA COM TRITON X-114

Aos lisados de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* foram acrescentados 10% (concentração final) de octylphinoxypolyethoxethanol (Triton X-114, Sigma Bioscience™, MO, EUA) pré-lavado através de três centrifugações com salina. O Triton X-114 é um detergente, facilmente precipitável à temperatura de 4° C, promovendo assim a separação de substâncias hidrofóbicas e anfifílicas, precipitadas com este, do conteúdo hidrofílico do lisado de *Leishmania*. Resumidamente, as misturas foram incubadas por 10 minutos a 4° C e posteriormente por 5 minutos a 37° C, sendo então submetidas a microcentrifugação (12.000 g por 15 minutos) à temperatura ambiente. Em seguida foi retirado o sobrenadante (fração hidrofílica), que foi filtrado em filtro Millipore (poro de 0,22 µm) e submetido à dosagem de endotoxina, conforme descrito no item anterior.

4.6 SEPARAÇÃO POR PESO MOLECULAR DA FRAÇÃO HIDROFÍLICA

A fração hidrofílica foi centrifugada em microconcentrador (Centricon 100, Amicon™, MO, EUA) por 30 minutos a 4° C a 1000 g, para subfracioná-la em

moléculas com pesos moleculares maiores e menores que 100 kDa. O conteúdo que passou pela membrana, correspondendo a fração de peso molecular menor que 100 kDa, foi filtrado e estocado a -20°C . O material que não passou pela membrana foi lavado por diafiltração três vezes com salina estéril, e removido do microconcentrador por uma nova centrifugação com o microconcentrador invertido sobre um outro tubo, por 4 minutos a 700 g e a 4°C , em um volume total de salina igual ao volume inicial da solução submetida ao fracionamento, correspondendo à subfração de peso molecular maior que 100 kDa.

4.7 REMOÇÃO DO TRITON-X 114

A fração anfifílica foi dialisada contra salina contendo 0,1% do detergente BRIJ® 35 (BRIJ® 35 SOLUTION 30% w/v, Sigma Diagnostics™, MO, EUA) durante quatro dias. Este detergente pode ser utilizado “in vivo” nesta concentração. Como controle desta preparação foi utilizada salina contendo a mesma concentração do detergente.

4.8. INJEÇÃO DOS LISADOS E FRAÇÕES PROTÉICAS DE *Leishmania* EM CAMUNDONGOS BALB/c

Camundongos de linhagem Balb/c foram injetados por via intravenosa (no plexo retro-orbital) com 200 µl contendo material correspondente a 5×10^6 parasitos , dos preparados de *Leishmania* ou de salina descritos a seguir, formando-se grupos de seis camundongos (Tabela I).

Tabela I: Natureza do material injetado em grupos de camundongos BALB/c

Grupo A	Lisado de amastigota de <i>L. amazonensis</i>
Grupo B	Lisado de amastigota de <i>L. braziliensis</i>
Grupo C	Fração hidrofílica de amastigota de <i>L. amazonensis</i>
Grupo D	Fração hidrofílica de amastigota de <i>L. braziliensis</i>
Grupo E	Salina tratada com Triton x-114
Grupo F	Fração anfifílica de <i>L. amazonensis</i>
Grupo G	Fração hidrofílica menor que 100 kDa de <i>L. braziliensis</i>
Grupo H	Fração hidrofílica menor que 100 kDa de <i>L. amazonensis</i>
Grupo I	Fração hidrofílica maior que 100 kDa de <i>L. amazonensis</i>
Grupo J	Fração hidrofílica maior que 100 kDa de <i>L. braziliensis</i>
Grupo L	Fração anfifílica de <i>L. braziliensis</i>
Grupo M	Salina contendo 0,1% de BRIJ 35

As injeções foram repetidas a cada 15 dias, de acordo com o desenho experimental representado na figura 1, durante seis semanas.

Figura 1: Esquema do desenho experimental básico.

14

Tempo (semanas)

injeções de lisado ou salina



Infecção

4.9. INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Uma semana depois do início do tratamento com lisados de *Leishmania*, todos animais foram inoculados no coxim da pata traseira direita com 10^7 promastigotas de *L. braziliensis*, em fase estacionária de cultivo, em 50 μ l de salina estéril.

4.10. ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS

A evolução das lesões nos camundongos foi acompanhada através de medida semanal do tamanho da lesão, com o emprego de paquímetro de precisão. Foram medidas ambas as patas traseiras, sendo que o tamanho da lesão foi expresso como a diferença entre essas medidas.

4.11. SACRIFÍCIO E COLETA DE ESPÉCIMES PARA ANÁLISE

Após seis semanas de infecção os animais foram sacrificados para análise histopatológica dos linfonodos poplíteos e patas correspondentes ao local da infecção. Também foi coletado sangue para semiquantificação de anticorpos através de ELISA.

4.12. DOSAGEM DE IgG1 e IgG2a

A dosagem foi feita através de teste imunoenzimático (ELISA), utilizando anticorpos específicos para estas imunoglobulinas. Poços de placa de microtitulação de 96 poços foram sensibilizados com um lisado de antígeno de *Leishmania* na concentração de 20 µg de proteínas/ml em PBS com pH 8,0 (contendo 0,5 M de cloreto de sódio e 0,01% de azida), em um volume total de 50 µl por poço.

Após uma incubação de 16 horas a 4°C em câmara úmida, os poços foram esvaziados e os possíveis sítios de ligação remanescentes foram bloqueados com 100 µl por poço de PBS contendo 5% de leite em pó desnatado. Após duas horas, os poços foram lavados três vezes com PBS contendo Tween a 0,05 % (PBS-Tween) e uma vez com PBS puro. Em seguida, foram colocados 50 µl do

soro retirado dos camundongos, diluídos 100 vezes em PBS contendo 5% de leite em pó desnatado (PBS-leite) em duplicata.

A placa foi incubada a 4° C por 1 hora em câmara úmida, lavada quatro vezes de acordo com o mesmo protocolo descrito acima, sendo adicionados os anticorpos anti-IgG1 ou anti-IgG2a biotinizados (Pharmigen, EUA) diluídos a 1:500 em PBS-leite. Após incubação por 60 minutos a temperatura ambiente, os poços foram novamente lavados seis vezes da forma descrita acima. Foram então colocados 100 µl de uma solução de extravidina-peroxidase (Sigma ChemicalCo., St Louis, EUA) na concentração de 1µg/ml. A placa foi incubada por 60 minutos a temperatura ambiente, os poços foram lavados 8 vezes como anteriormente e foram adicionados a eles o substrato 5 µg de TMB(Tetramethylbenzidine Sigma ChemicalCo., St Louis, EUA) e 5 µl de H₂O₂ (Nuclear Ind., São Paulo, Brasil). Como controles do ensaio foram utilizados soros de camundongos não infectados (controle negativo) e soro de camundongos com anticorpo anti-*Leishmania* previamente determinado (controle positivo) Quando o conteúdo dos poços contendo o soro controle positivo apresentou coloração azulada, a reação foi interrompida com ácido fosfórico (1:20). A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A possível significância estatística das diferenças dos tamanhos de lesão nos diferentes grupos de animais, no decorrer do tempo, foi determinada pelo teste estatístico ANOVA. Como pós-teste, foi utilizado o teste de comparação múltipla

de Newman-Keuls. Estes métodos fornecem informações quanto a diferenças globais nas curvas de tamanho versus tempo de infecção.

A análise dos resultados da semiquantificação de IgG1 e IgG2a foi realizada no software Softmax 3.0 e utilizou-se o teste estatístico ANOVA e o pós-teste Newman-Keuls.

5. RESULTADOS

5.1. DOSAGEM DE ENDOTOXINA NOS LISADOS

Quantidades comparáveis de endotoxina foram detectadas em ambos lisados de amastigota de cultivo axênico de *Leishmania* (Tabela II). Lisados de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, depletados de endotoxina e de moléculas anfífilas e hidrofóbicas da *Leishmania* por precipitação com Triton X-114. Tiveram reduzidas as concentrações de endotoxina, a níveis indetectáveis no lisado de *L. braziliensis*. O mesmo ocorreu em vários outros preparados biológicos, a exemplo de um sobrenadante de cultivo de *T. cruzi*, disponíveis no laboratório (Tabela II). A maior parte da atividade endotoxina do lisado de *L. amazonensis* não foi afetada pela precipitação (Tabela II).

Tabela II - Semi-quantificação de endotoxina em diferentes preparados antes e após precipitação com o detergente Triton X-114.

Amostra	Tratamento		
	nenhum	Triton X-114 Primeira vez	Triton X-114 Segunda vez
Sobrenadante de T. cruzi- I	2,875 ^b	0,080	ND ^c
Sobrenadante de T. cruzi- II	2,968	0,180	ND
Tireoglobulina	2,960	0,055	ND
Albumina sérica bovina	> 3	0,068	ND
Albumina sérica bovina 1/10	> 3	0,072	ND
Lisado de <i>Leishmania braziliensis</i>	1,107	0,091	ND
LIT	2,983	0,104	ND
Lisado de <i>Leishmania amazonensis</i>	1,231	0,744	0,667
Salina	0,078	0,075	ND

- a. O sobrenadante da precipitação com Triton X-114 foi reprecipitado com o mesmo detergente.
b. Valores em densidade óptica (a 207 nm, 1 cm, média de duplicatas).
c. Não detectado.

5.2. AVALIAÇÃO DO TAMANHO DA LESÃO CUTÂNEA ATRAVÉS DA MEDIDA DE PATAS

Houve um aumento significativo ($p < 0.001$, Teste de ANOVA) do tamanho da lesão da pata dos camundongos injetados com lisado de amastigota de *L. amazonensis* e posteriormente infectados com *L. braziliensis*, em comparação com o grupo injetado com lisado de amastigota de *L. braziliensis* e com o grupo controle injetado com salina tratada com Triton X-114, ambos infectados com *L. braziliensis* (Figura 2). Esta diferença foi observada a partir da segunda semana pós-infecção, sendo, no entanto mais nítida da quinta semana de infecção em diante.

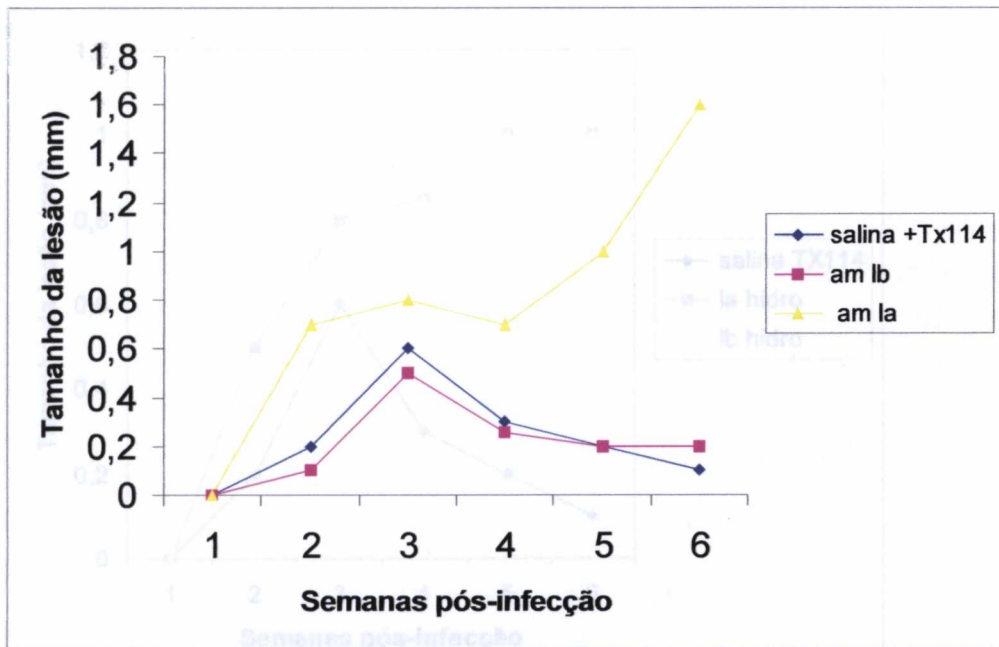


Figura 2: Tamanho da lesão cutânea em camundongos BALB/c tratados com salina, lisado de amastigota de *Leishmania braziliensis* (am lb) ou de amastigota *Leishmania amazonensis* (am la) e infectados com *Leishmania braziliensis* como descrito em Materiais e Métodos. As dimensões da lesão foram avaliadas semanalmente.

Houve também um aumento significativo ($p < 0.05$, Teste de ANOVA) do tamanho da lesão cutânea nos camundongos infectados com *L. braziliensis* e injetados tanto com o sobrenadante do lisado de *L. amazonensis* quanto com o de *L. braziliensis*, tratados com Triton X-114 (fração hidrofílica), em comparação com o grupo controle injetado com salina. Este aumento foi mais nítido da quarta semana em diante (Figura 3).

As subfrações dessas frações hidrofílicas, de diferentes pesos moleculares, também levaram a um aumento significativo da lesão cutânea ($p < 0,05$, Teste de ANOVA). Esta diferença, assim como no experimento anterior, tornou-se mais nítida da quarta semana em diante (Figura 4).

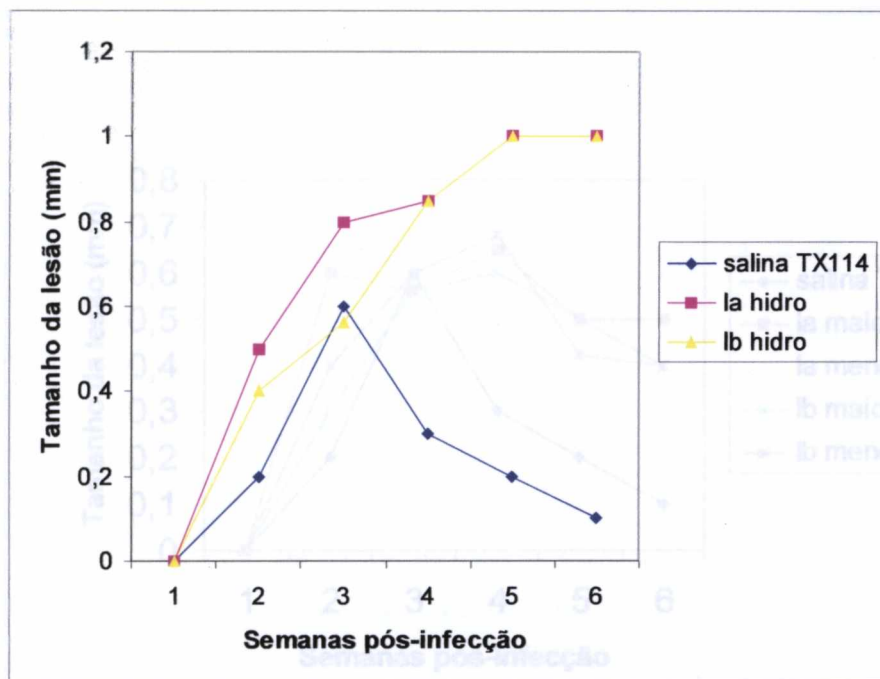


Figura 3: Tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c, tratados com frações hidrofílicas de *Leishmania braziliensis* (lb hidro) ou *Leishmania amazonensis* (la hidro) ou com salina tratada com Triton X-114 (salina TX114), infectados com *L. braziliensis*.

Por outro lado, não houve aumento do tamanho da lesão cutânea da pata dos camundongos injetados com as frações anfífilas de lisado de amastigota de *L. amazonensis* e de *L. braziliensis* e posteriormente infectados com *L. braziliensis*, em comparação com o grupo controle injetado com salina contendo a mesma quantidade do detergente BRIJ 35 (Figura 5).

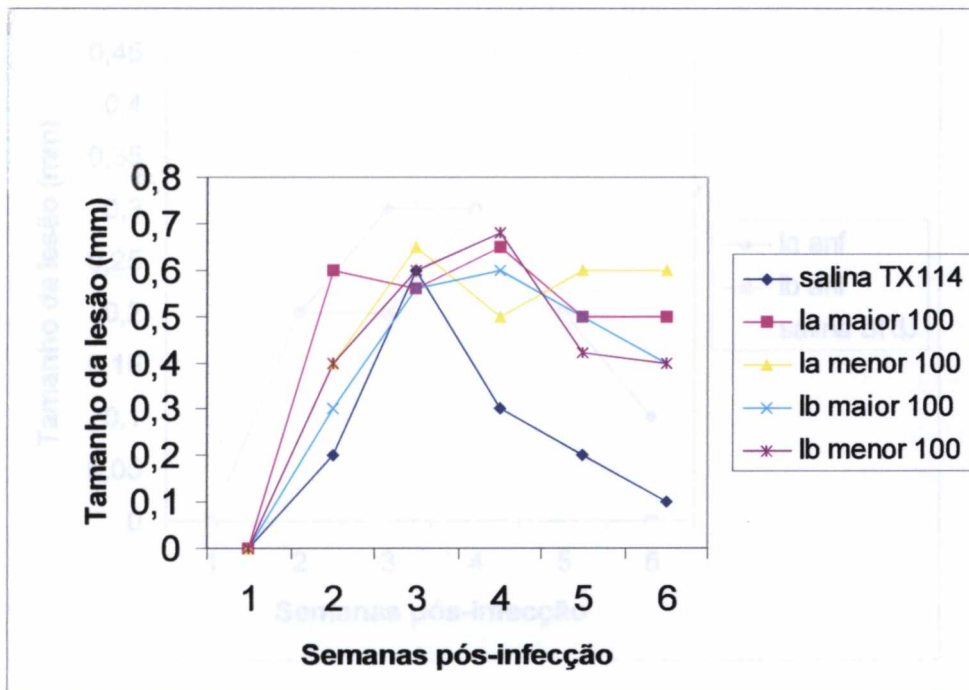


Figura 5: Tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c tratados com as frações anfífilas de *Leishmania braziliensis* (lb anf) ou *Leishmania*

Figura 4: Tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c tratados com frações hidrofílicas com pesos moleculares maior e menor que 100 kDa de *Leishmania braziliensis* (lb maior 100 e lb menor 100) ou *Leishmania amazonensis* (la maior 100 e la menor 100) ou com salina tratada com Triton X-114 (salina TX 114) e infectados com *L. braziliensis*. As frações hidrofílicas foram obtidas pelo tratamento do lisado das amastigotas com Triton X-114, conforme descrito no Material e Métodos.

IgG2a e IgG1

Foi observada uma maior produção de IgG2a anti-*Leishmania* nos animais dos grupos tratados com o lisado de amastigota de cultivo axênico de *L. amazonensis* em relação aos controles e aos animais dos outros grupos ($p < 0,001$, Teste de ANOVA) (Figura 6). Os resultados da dosagem de IgG1 demonstraram haver uma maior produção de IgG1 anti-*Leishmania* nos grupos tratados com lisado e fração hidrofílica de *L. amazonensis* em comparação com os outros grupos ($p < 0,001$, Teste de ANOVA) (Figura 7).

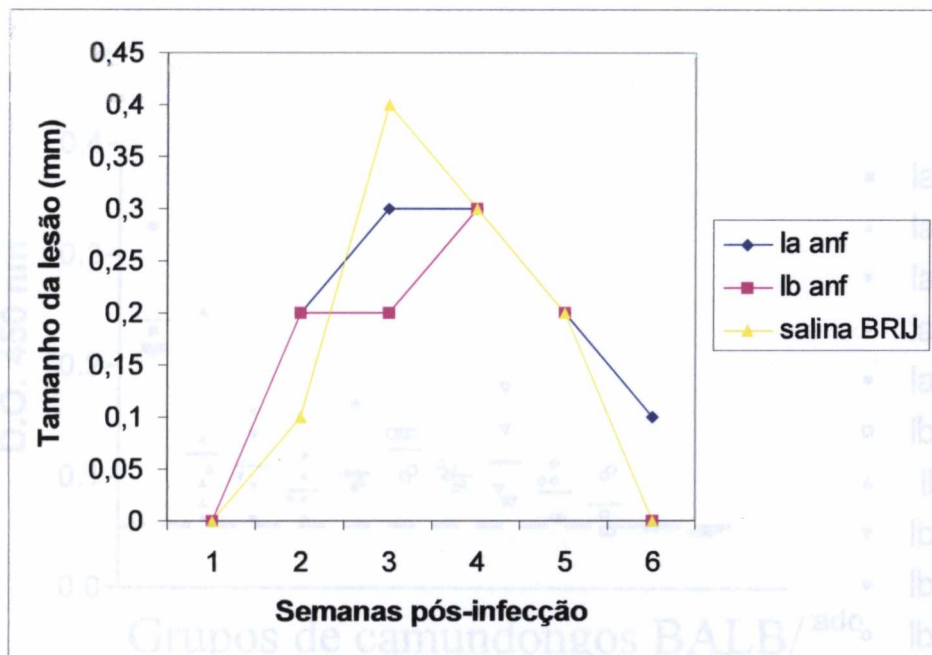


Figura 5: Tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c tratados com as frações anfílicas de *Leishmania braziliensis* (lb anf) ou *Leishmania amazonensis* (la anf), diluídas a 0,1 % no detergente BRIJ 35 ou com salina contendo BRIJ 35 (salina BRIJ) e infectados com *L. braziliensis*.

5.3. DETECÇÃO DE ANTICORPO ANTI-*Leishmania* DAS SUBCLASSES IgG2a e IgG1

Foi observada uma maior produção de IgG2a anti-*Leishmania* nos animais dos grupos tratados com o lisado de amastigota de cultivo axênico de *L. amazonensis* em relação aos controles e aos animais dos outros grupos ($p < 0.001$, Teste de ANOVA) (Figura 6). Os resultados da dosagem de IgG1 demonstraram haver uma maior produção de IgG1 anti-*Leishmania* nos grupos tratados com lisado e fração hidrofílica de *L. amazonensis* em comparação com os outros grupos ($p < 0.001$, Teste de ANOVA) (Figura 7).

Dosagem de IgG1

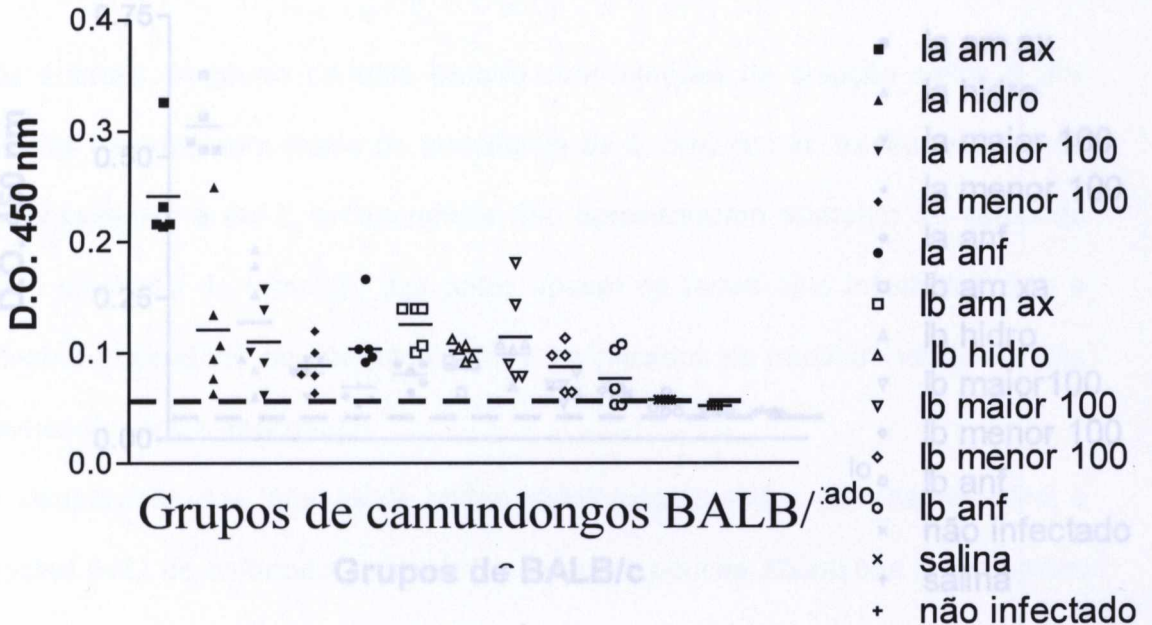


Figura 7: Atividade de anticorpo IgG1 em ELISA, do soro dos camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* tratados com lisado de amastigota de *L. amazonensis* (la am ax) ou de *L. braziliensis* (lb am ax), fração hidrofílica *L. amazonensis* (la hidro) ou de *L. braziliensis* (lb hidro), fração hidrofílica maior ou menor que 100 kDa *L. amazonensis* (la maior ou menor 100) ou de *L. braziliensis* (lb maior ou menor 100), fração anfílica de *L. amazonensis* (la anf) ou de *L. braziliensis* (lb anf) e salina. Como controle negativo foi utilizado um grupo de animais não infectados (não infect). Densidade óptica 450 nm. Cada símbolo corresponde aos resultados obtidos a partir do soro de um animal. A linha horizontal tracejada indica a média mais o desvio padrão multiplicado por dois dos resultados obtidos no grupo de animais controles não infectados. Os traços horizontais indicam os valores das médias dos resultados dos animais de cada grupo.

Figura 6: Atividade de IgG-2a em ELISA, do soro dos camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* tratados com: lisado de amastigota de *L. amazonensis* (la am ax) ou de *L. braziliensis* (lb am ax), fração hidrofílica *L. amazonensis* (la hidro) ou de *L. braziliensis* (lb hidro), fração hidrofílica maior ou menor que 100 kDa *L. amazonensis* (la maior ou menor 100) ou de *L. braziliensis* (lb maior ou menor 100), fração anfílica de *L. amazonensis* (la anf) ou de *L. braziliensis* (lb anf) e salina. Como controle negativo foi utilizado um grupo de animais não infectados (não infect). Densidade óptica 450 nm. Cada símbolo corresponde aos resultados obtidos a partir do soro de um animal. A linha horizontal tracejada indica a média mais o desvio padrão multiplicado por dois dos resultados obtidos no grupo de animais controles não infectados. Os traços horizontais indicam os valores das médias dos resultados dos animais de cada grupo.

Dosagem de IgG1

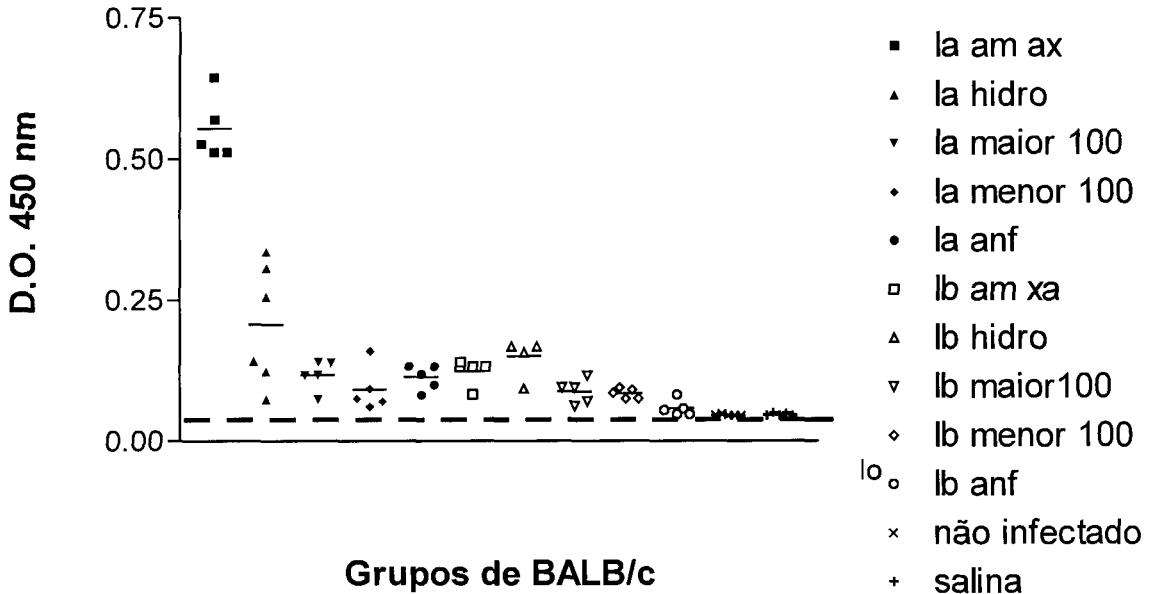


Figura 7: Atividade de anticorpo IgG1 em ELISA, do soro dos camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis* tratados com: lisado de amastigota de *L. amazonensis* (la am ax) ou de *L. braziliensis* (lb am ax), fração hidrofílica *L. amazonensis* (la hidro) ou de *L. braziliensis* (lb hidro), fração hidrofílica maior ou menor que 100 kDa *L. amazonensis* (la maior ou menor 100) ou de *L. braziliensis* (lb maior ou menor 100), fração anfílica de *L. amazonensis* (la anf) ou de *L. braziliensis* (lb anf) e salina. Como controle negativo foi utilizado um grupo de animais não infectados (não infect). Densidade óptica (D.O.) a 450 nm. Cada símbolo corresponde aos resultados obtidos a partir do soro de um animal. A linha horizontal tracejada indica a média mais o desvio padrão multiplicado por dois dos resultados obtidos no grupo de animais controles não infectados. Os traços horizontais indicam os valores das médias dos resultados dos animais de cada grupo.

5.4. HISTOPATOLOGIA DE LINFONODO POPLÍTEO E PATA

Os animais do grupo controle tratado com injeções de solução salina e dos grupos tratados com lisado de amastigota de *L. braziliensis*, fração anfifílica de *L. brasiliensis* e de *L. amazonensis* não apresentaram aumento de linfonodo nem alteração do tamanho das patas apesar de terem sido infectados com a mesma quantidade de parasitos (10^7) e sacrificados no mesmo momento (sete semanas após a infecção).

A visualização das lâminas de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE) de linfonodos apresentou -se com poucas alterações morfológicas sendo possível visualizar seus compartimentos morfológicos íntegros. Como pode ser observada nas figuras 8 e 9 representativas dos quatro grupos citados acima, cada grupo contendo cinco animais. As lâminas de cortes histológicos das patas destes animais apresentaram tecido com poucas alterações.

Os animais tratados com injeções de lisado de amastigota de *L. amazonensis* e frações hidrofílicas de *L. brasiliensis* e *L. amazonensis* apresentaram aumento de linfonodo. As lâminas dos cortes histológicos de linfonodo destes animais apresentaram parasitos, granulomas, macrófagos coalescentes e cristais de colesterol substituindo o tecido original (Figura 10 e 11). As análises dos cortes histológicos das patas também apresentaram nódulos de macrófagos, cristais de colesterol, parasitos em vacúolos de macrófagos e inflamação (Figura 14 e 15).

Os animais tratados com frações hidrofílicas subdivididas em maior e menor que 100 kDa de ambas espécies estudadas apresentaram padrão histológico semelhante porém com intensidade menor de inflamação não havendo presença de cristais de colesterol e menor quantidade de macrófagos vacuolados e parasitos (figuras 12 e 13).

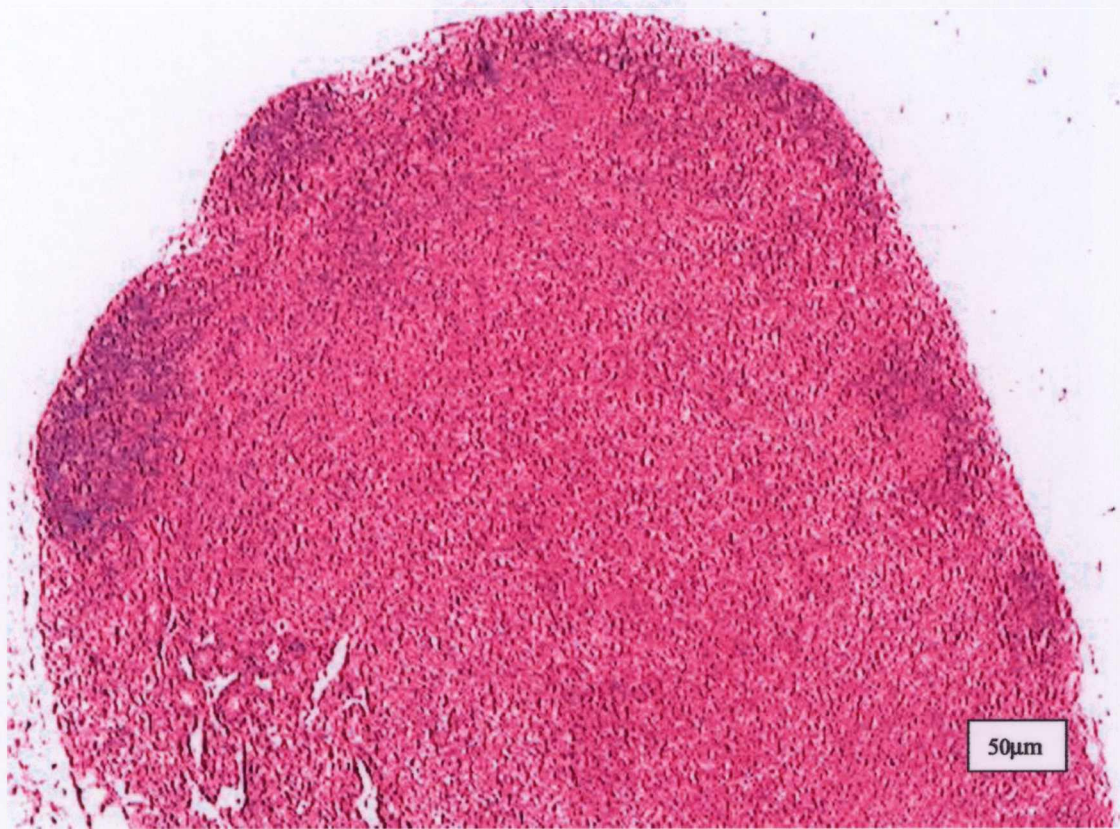


Figura 8: Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongo BALB/c tratado com salina, lisado de amastigota de *Leishmania braziliensis*, fração anfífilica de *Leishmania amazonensis* ou de *Leishmania braziliensis* e infectado com *Leishmania braziliensis* (grupo controle). Coloração hematoxilina e eosina (HE).

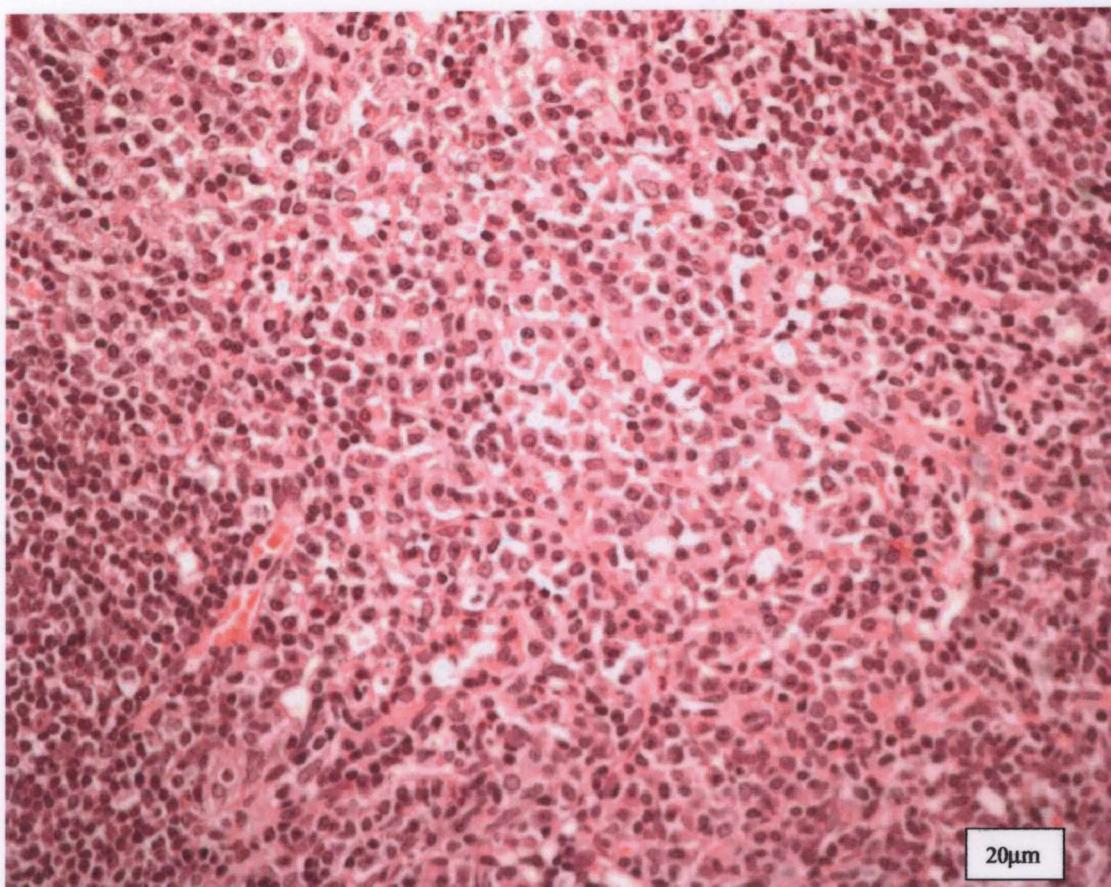


Figura 9: Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongo BALB/c tratado com salina, lisado de amastigota de *Leishmania braziliensis*, fração anfifílica de *Leishmania amazonensis* ou de *Leishmania braziliensis* e infectado com *Leishmania braziliensis* (grupo controle). Coloração hematoxilina e eosina (HE).



Figura 10: Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongo BALB/c tratado com lisado de amastigota de *Leishmania amazonensis*, fração hidrofílica de amastigota de *Leishmania braziliensis* ou fração hidrofílica de amastigota de *Leishmania amazonensis* e infectado com *Leishmania braziliensis*. A seta indica área com presença de cristais de colesterol. Coloração hematoxilina e eosina (HE).

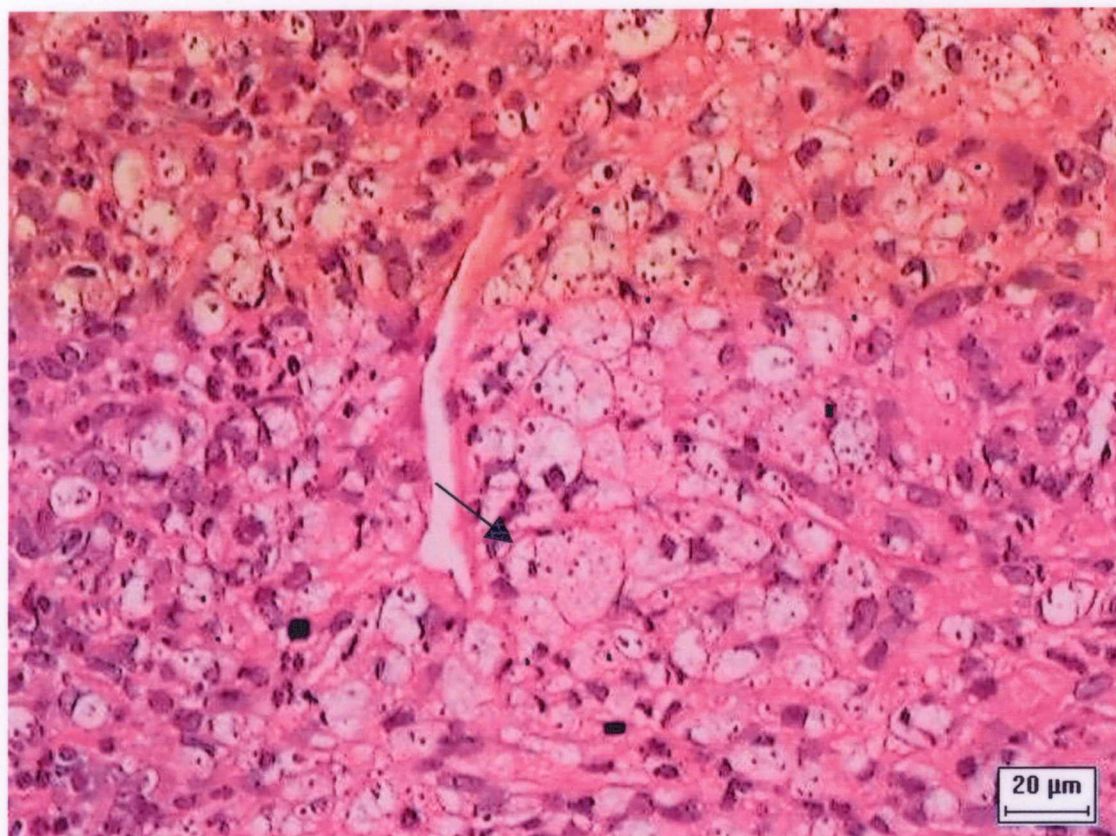


Figura 11: Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongo BALB/c tratado com lisado de amastigota de *Leishmania amazonensis*, fração hidrofílica de amastigota de *Leishmania braziliensis* ou fração hidrofílica de amastigota de *Leishmania amazonensis* e infectado com *Leishmania braziliensis*. A seta indica a presença de macrófagos vacuolados contendo formas amastigotas de *Leishmania*. Coloração hematoxilina e eosina (HE).

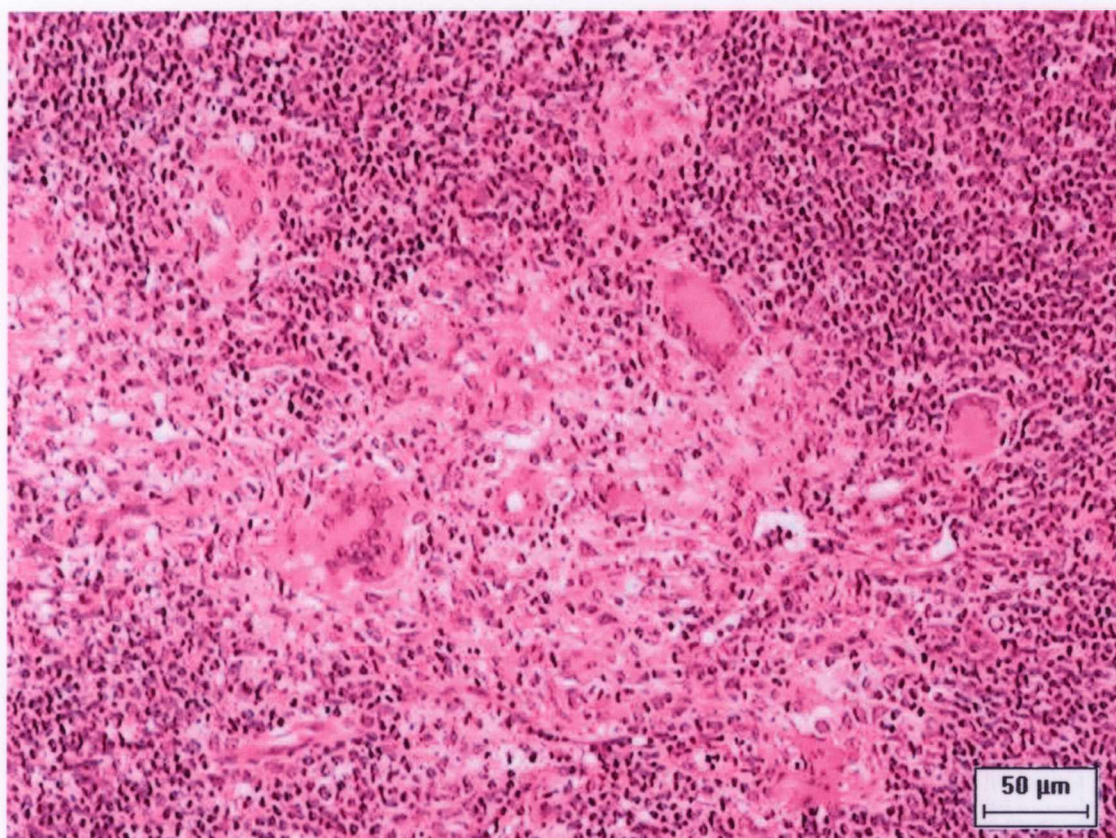


Figura 12: Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongo BALB/c tratado com subfração hidrofílica de amastigota de *Leishmania braziliensis* ou subfração hidrofílica de amastigota de *Leishmania amazonensis* e infectado com *Leishmania braziliensis*. Coloração hematoxilina e eosina (HE).

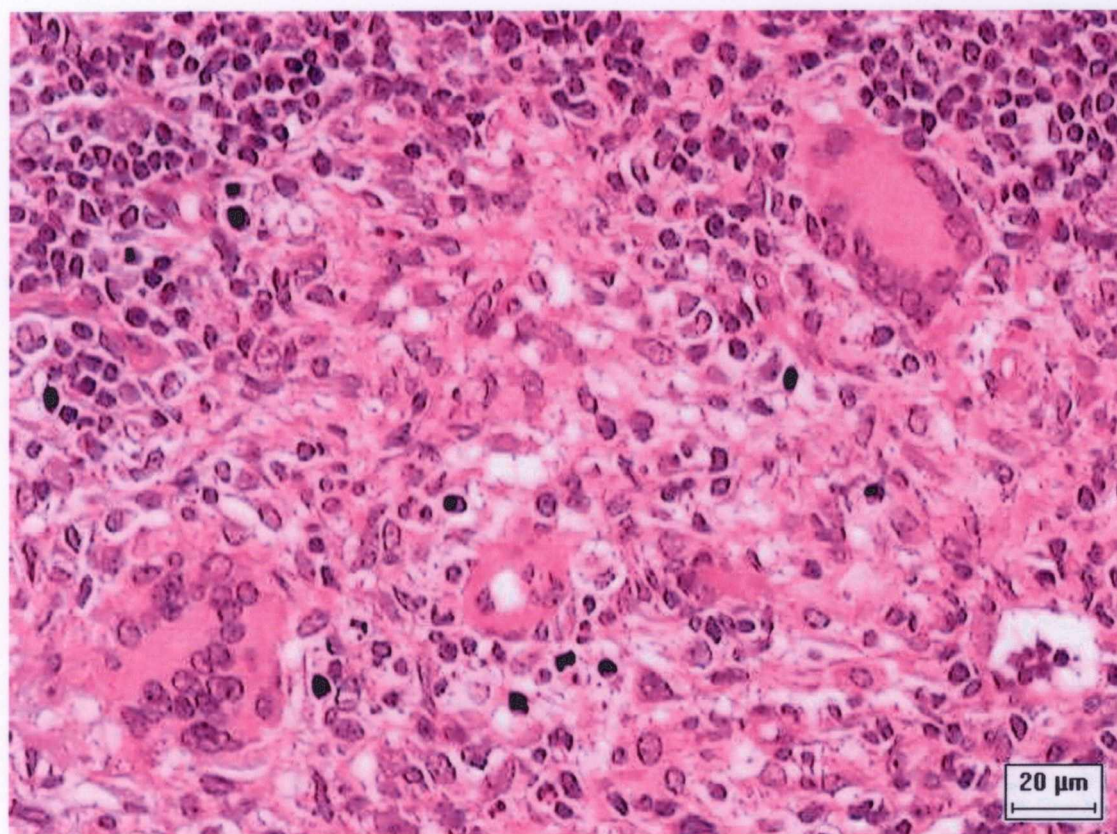


Figura 13: Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongo BALB/c tratado com subfração hidrofílica de amastigota de *Leishmania braziliensis* ou subfração hidrofílica de amastigota de *Leishmania amazonensis* e infectado com *Leishmania braziliensis*. Coloração hematoxilina e eosina (HE).

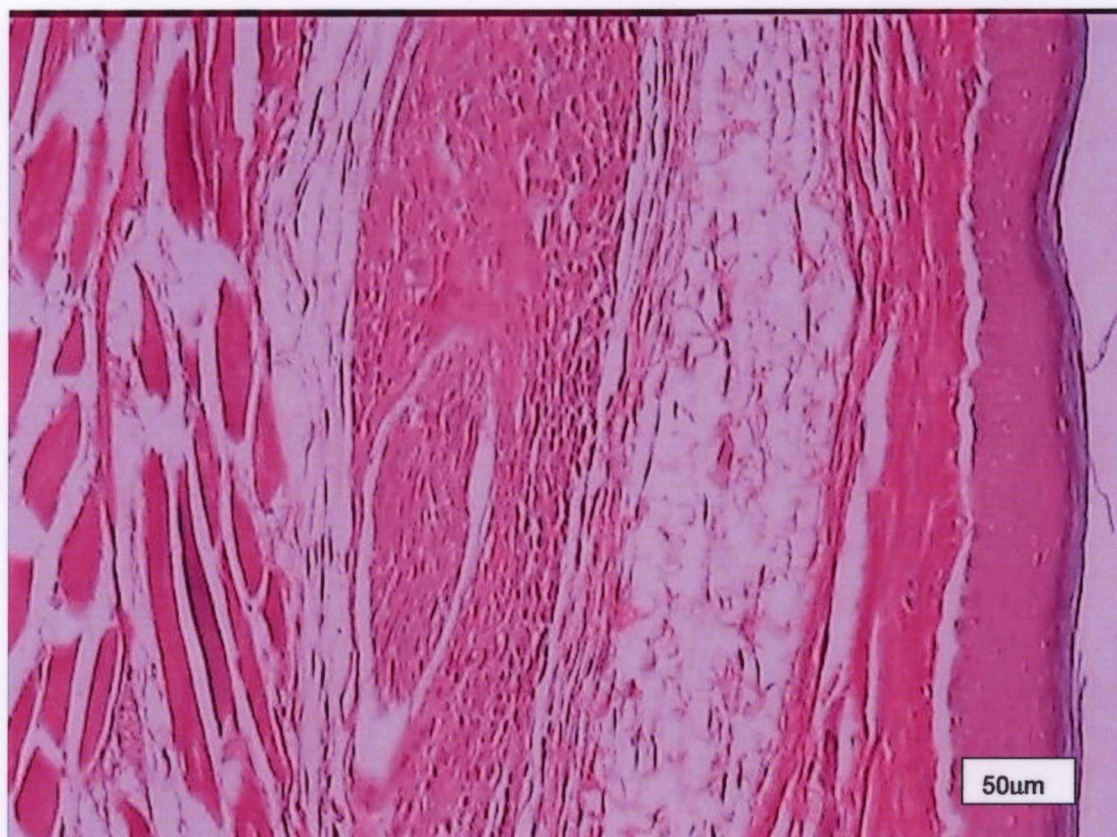


Figura 14: Corte histológico da pata traseira direita de camundongo BALB/c tratado com lisado de amastigota de *Leishmania amazonensis*, fração hidrofílica de amastigota de *Leishmania amazonensis*, de *Leishmania braziliensis*, subfração hidrofílica *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* e infectado com *Leishmania braziliensis*. Coloração hematoxilina e eosina (HE).

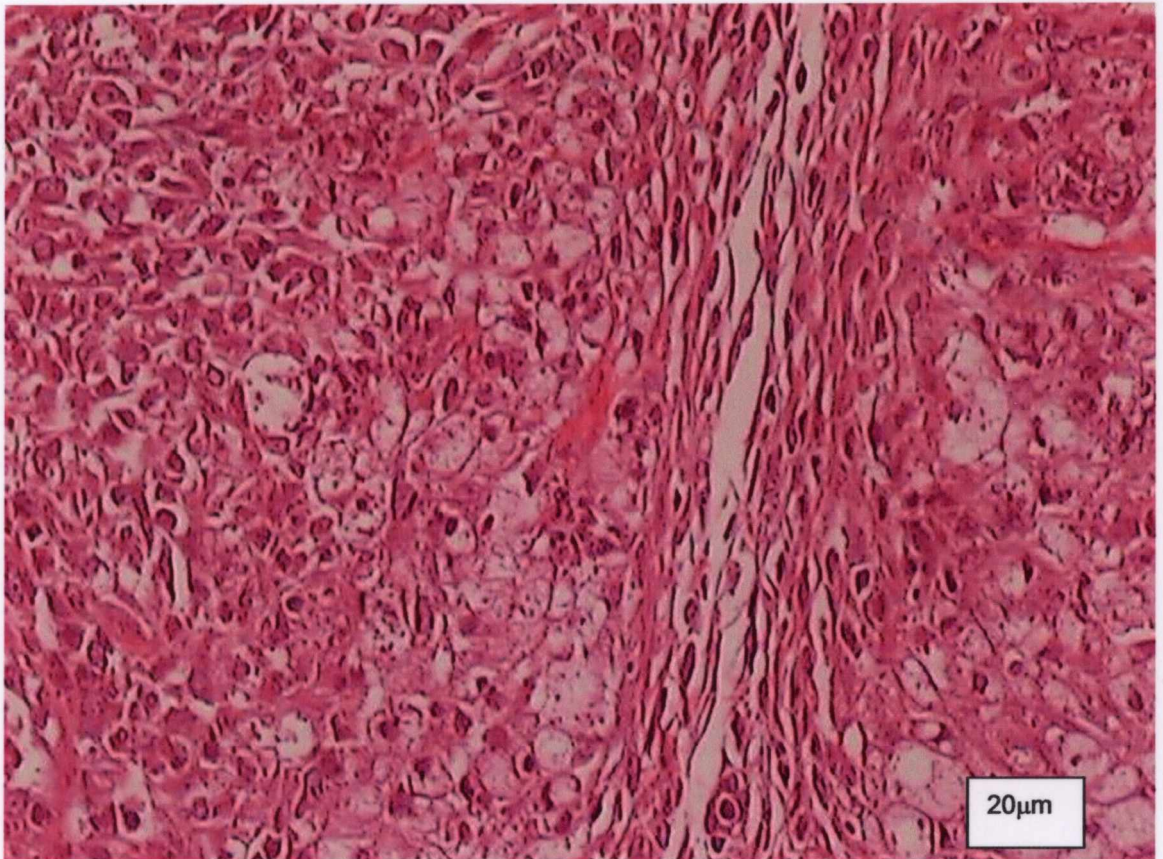


Figura 15: Corte histológico da pata traseira direita de camundongo BALB/c tratado com lisado de amastigota de *Leishmania amazonensis*, fração hidrofílica de amastigota de *Leishmania amazonensis*, de *Leishmania braziliensis*, subfração hidrofílica *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* e infectado com *Leishmania braziliensis*. Coloração hematoxilina e eosina (HE).

6. DISCUSSÃO

A investigação inicial deste estudo resultou na observação da capacidade do lisado de amastigota de *Leishmania amazonensis* em causar, em camundongos BALB/c, o aumento do tamanho da lesão resultante da infecção por *Leishmania braziliensis*, em relação a animais controle injetados com lisado de amastigota de *L. braziliensis* ou salina (figura 2). A caracterização molecular do fator ou fatores responsáveis por este aumento da lesão iniciou-se com o fracionamento dos lisados em frações hidrofílica e anfifílica. Os resultados, inesperadamente, demonstraram aumento da lesão nos grupos tratados com frações hidrofílicas de ambas espécies de *Leishmania*, e não apenas na fração hidrofílica de *Leishmania amazonensis*.

Como o lisado total (contendo, portanto ambas frações, a fração hidrofílica e a anfifílica da *Leishmania braziliensis*) não potenciou o desenvolvimento da lesão, os resultados indicam a presença de alguma molécula com efeito protetor na fração anfifílica de *L. braziliensis* contrabalanceando o efeito potenciador da fração anfifílica. Experimentos envolvendo a mistura de frações homólogas (mesma espécie de *Leishmania*) e heterólogas (fração anfifílica de *Leishmania braziliensis* e hidrofílica de *Leishmania amazonensis*, por exemplo) poderiam esclarecer esse ponto.

Atualmente, trabalhos científicos estão focalizando o estudo da imunogenicidade de moléculas de *Leishmania* e seus efeitos em protocolos de vacinação (SOONG et al. 1995; BEYRODT et al. 1997; HABERER et al. 1998; PINTO et al. 2000).

Os dados citados acima encorajam a realização de estudos visando identificar a natureza das moléculas anfífilas no lisado de *Leishmania braziliensis* aparentemente capazes de contrapor-se ao efeito potenciador da infecção presente na fração hidrofílica. Estas moléculas seriam candidatas promissoras para componentes de uma vacina.

Após os resultados positivos com as frações hidrofílicas de ambas espécies de *Leishmania*, estas foram subfracionadas em frações com peso molecular maior e menor que 100 kDa. Ocorreu um menor aumento da pata em camundongos tratados com estas subfrações quando comparado aos resultados obtidos com as frações hidrofílicas totais. Porém, em relação ao grupo controle, injetado apenas com salina e infectado, ainda foi possível verificar um aumento de tamanho da pata estatisticamente significativo. Estes achados indicam, portanto, que a potenciação da lesão pode resultar da ação cumulativa de moléculas com peso molecular acima e abaixo de 100 kDa.

As frações anfífilas foram utilizadas segundo o mesmo protocolo utilizado para as frações hidrofílicas, não se observando, entretanto diferenças entre o tamanho das patas dos camundongos tratados e dos animais controle, confirmando que as moléculas que potenciam o desenvolvimento da lesão são hidrofílicas e afastando

a possibilidade do efeito potenciador ser devido ao LPG, pois esta molécula é anfifílica (McCONVILLE et al; 1987).

Uma possibilidade seria a de que o efeito potenciador do desenvolvimento da lesão fosse devido à atividade imunomoduladora da proteína LACK (TURCO; 1999). Para explicar os dados aqui descritos, portanto, essa molécula estaria presente tanto na fração hidrofílica de *L. braziliensis* quanto na de *L. amazonensis*, porém sua ação potenciadora da infecção seria impedida, direta ou indiretamente, por uma molécula anfifílica de *L. braziliensis*.

Como a endotoxina bacteriana exerce um efeito importante sobre o sistema imune, investigou-se a presença desta substância contaminando diferencialmente os lisados de *Leishmania*. Quantidades comparáveis desta substância foram encontradas no lisado de *L. braziliensis* e no de *L. amazonensis*, indicando que a diferença observada entre eles, em termos de induzir um aumento da lesão cutânea causada pela *Leishmania braziliensis* não ser explicada pela presença de endotoxina em apenas um deles. Além disso, frações hidrofílicas dos lisados que não continham endotoxina, devido à precipitação da mesma com o detergente Triton X-114, também potenciaram o desenvolvimento da lesão. Um achado inesperado da dosagem de endotoxina foi à detecção, no lisado de *L. amazonensis*, de alguma substância com atividade semelhante à da endotoxina, em termos de agir sobre o lisado de amebócito de *Limulus*. Esta atividade não é

precipitável por Triton X-114, afastando a possibilidade de ser lipopolissacarídeo bacteriano.

Devido à associação entre susceptibilidade e a produção de anticorpos IgG1 na infecção leishmaniótica (MOCCI & COFFMAN 1995), foi realizada a dosagem por ELISA de anticorpos dessa subclasse em todos os grupos de camundongos. Os animais tratados com lisado de amastigota e com fração hidrofílica de *L. amazonensis* realmente apresentaram uma maior produção de IgG1 de que os controles infectados e injetados apenas com salina, e também do que os outros grupos de camundongos.. Entretanto a produção de IgG2a anti-*Leishmania*, associada com uma resposta Th-1, também foi maior nos animais tratados com lisado de amastigota de *L. amazonensis*. Além disso, a injeção de qualquer lisado de *Leishmania* ou suas frações levou a um aumento da produção de anticorpos em relação ao grupo infectado e injetado com salina. Esses dados sugerem que injeções dos lisados ou frações, apesar de potenciar a resposta humoral, não acarretariam um desvio da resposta Th-1 para Th-2 que se expressasse na produção preferencial de subclasses de imunoglobulina.

O padrão histológico observado nos linfonodos de drenagem (poplíteo) e na pata traseira direita, onde foram inoculados os parasitos, revelou um maior número de parasitos e a presença de um infiltrado inflamatório contendo macrófagos com citoplasma de aspecto espumoso nos animais que apresentaram maior tamanho de lesão, corroborando a hipótese de não ter ocorrido o desenvolvimento de uma

resposta protetora Th-1, e sim a indução de uma resposta imune Th-2 nos animais tratados com lisado e fração hidrofílica de *Leishmania amazonensis*, já que o padrão histológico com macrófagos espumosos está relacionado com uma resposta Th-2 de susceptibilidade à *Leishmania*. A quantificação dos parasitos nos diferentes grupos, por diluição limitante ou imunohistoquímica, seria importante para confirmar estes dados.

Injeções intravenosas do lisado de *Leishmania amazonensis*, e as frações e subfrações das duas espécies interferem, portanto na capacidade do camundongo BALB/c em controlar a infecção por *Leishmania braziliensis*. O presente trabalho não foi desenvolvido com o intuito de investigar quais são os mecanismos envolvidos neste fenômeno. Para elucidar estes mecanismos seria importante, por exemplo, a condução de estudos sobre a produção de citocinas nos linfonodos drenantes da pata infectada e análises "in vitro" da ação do lisado de *L. amazonensis* ou de moléculas dele purificadas sobre a resposta imune.

7. CONCLUSÕES

1. O lisado de *Leishmania amazonensis* e não o de *Leishmania braziliensis*, potenciou lesão por *Leishmania braziliensis*, de maneira estatisticamente significativa, indicando uma diferença na composição molecular das duas espécies de *Leishmania*.
2. A fração hidrofílica de *Leishmania braziliensis* teve a mesma ação potenciadora da lesão que a fração hidrofílica de *Leishmania amazonensis*. Como o lisado total de *Leishmania braziliensis* não potenciou a lesão, é possível que alguma molécula protetora neste lisado interfira com a ação potenciadora associada à fração hidrofílica.
3. O lisado de *Leishmania amazonensis*, e não o de *Leishmania braziliensis*, apresentou uma atividade semelhante a da endotoxina em termos de agir sobre o lisado de amebócito do *Limulus*. Esta atividade não é precipitável por Triton X-114, afastando portanto, a possibilidade dela ser devida a endotoxina bacteriana.

4. Frações hidrofílicas com pesos moleculares maiores e menores que 100 kDa de lisados de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* potenciaram a lesão por *Leishmania braziliensis*, de maneira estatisticamente significativa, quando comparadas aos controles, porém em intensidade menor que as outras frações hidrofílicas totais de ambas espécies de *Leishmania*, sugerindo que a potenciação pode ser mediada por dois fatores diferentes.

5. As frações anfífilas não tiveram ação potenciadora da infecção, produzindo resultados semelhantes aos obtidos nos grupos controles injetados com salina e infectados, indicando que essas frações ou antígenos dessas frações poderiam ser candidatos a imunoprolifáticos.

6. O padrão histológico, observado nos grupos de camundongos que apresentaram aumento da lesão pela injeção dos lisados e suas frações, corrobora a hipótese de que tenha se desenvolvido uma resposta Th-2., já que esse padrão com presença de macrófagos vacuolados contendo parasitos está associado com susceptibilidade à *Leishmania* e com uma resposta celular do tipo Th-2.

7. O padrão do isotipo dos anticorpos anti-*Leishmania* observado nos diversos grupos não foi característico nem de uma resposta Th-1 nem de uma resposta Th-2, indicando que a natureza isotípica da resposta humoral anti-*Leishmania* não se correlaciona com o desenvolvimento da lesão no modelo aqui estudado, e que um

padrão histológico do tipo Th-2 (ver conclusão anterior) pode ocorrer na presença de uma resposta humoral mista (Th-1 e Th-2).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBISCHER T, WOLFRAM M, PATZER SI, ILG T, WIESE M, OVERATH P.
Subunit vaccination of mice against new world cutaneous leishmaniasis: comparison of three proteins expressed in amastigotes and six adjuvants. **Infect. Immun.** 68;1328-1336, 2000.
- AJDARY, S., ALIMOHAMMADIAN, M., ESLAMI, M.B., KEMP, K., KHARAZMI, A.
Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. **Infect. Immun.** 68; 1760 -1764, 2000.
- AI-BASHIR, N.T., RASSAN M. B. AI-RAWI, B.M. Axenic cultivation of amastigote of *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and their infectivity. **Ann. Trop. Medicine Parasitology.** 86; 487-502, 1992.
- ALMEIDA, R., BARRAL-NETTO, M., DE JESUS, A., FREITAS, L. A., CARVALHO, E., 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;178-184, 1996.
- ASHFORD, R.W., DESJEUX, P., RAADT, P. Estimation of Risk of Infection and Number of cases of Leishmaniasis. **Parasitol Today**,5; 104-105, 1992.
- BADARO, R., BADARO, F.S., CARVALHO, E.M., PEDRAL-SAMPAIO,D., BARRAL,A., BRANDELY,M. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon-gama. **N. Engl. J. Med.**,322;55-57, 1990.
- BALANCO, J.M.F., PRAL, E.M.F., SILVA, S., BIJOVSKY, A.T., MORTARA R.A., ALFIERI, S.C. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. **Parasitology**, 116;103-113, 1998.
- BARRAL, A., GUERREIRO, J., BOMFIM,G., CORREIA, D., BARRAL-NETTO, M., CARVALHO. E. M., Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 53;256-259, 1995.

- BARRAL A., COSTA M. D., BITTENCOURT A. L., BARRAL-NETTO M., CARVALHO E. M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **Int. J. Dermatol** 34; 474 – 478, 1995b.
- BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A., BRODSKYN, C., CARVALHO, E.M., REED, S.G. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. **Par. Immunol**, 17; 21-28, 1995 a.
- BARRAL-NETTO M., MACHADO, P., BARRAL, A. Human cutaneous leishmaniasis: recent advances in physiopathology and treatment. **Eur. J. Dermatol.** 5;104-113, 1995 b.
- BARRAL-NETTO, M., BRODSKYN, C., CARVALHO, E.M., BARRAL, A. Human_ leishmaniasis@cytokines.bahia.br. **Braz. J. Med. Biol. Reseach**, 1;149-155, 1998.
- BITTENCOURT, A., BARRAL, A., COSTA, J., M., L., SALDANHA A., C., BADARÓ, F., BARRAL-NETTO, M., FREITAS, L.A.R. Difuse cutaneous leishmaniasis with atypical aspects. **Inter. J. Dermat.** 31;568-570, 1992.
- BEYRODT,C PRESTES, G., PINTO,A., R., FREYMULLER, E.; BARNIÉRI,C. L. Characterization of an Antigen from *Leishmania Amazonensis* Amastigotes Able to Elicit Protective Response in Murine Model. **Infect.Immun.** 63;2052-2059, 1997.
- BOGDAN, C., RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Int. J. Parasitol.** 28;121-134, 1998.
- BOGDAN, C., GRESSNER, A., SOLBACH, W., RÖLLINGHOFF, M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites **Curr. Opin. Immunol.**8;517-525, 1996.
- BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface gp63 in complement fixation, cell adhesion, resistance to complement-mediated lysis. **J. Immunol.** 155;3102-3111, 1995.
- CARVALHO, E. M., JOHNSON, W. D., BARRETO, E., MARSDEN P., COSTA, J. M. L., STEVEN, R., ROCHA, H. Cell mediated immunity in american cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J. Immunol.** 135; 4144-4148, 1985.
- CARVALHO, E. M.,BARRAL, A, COSTA, J. M. L., BITTENCOURT, A. ,MARSDEN P. Clinical and immunological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica** 56;315-325, 1994.

- CARVALHO, E.M., CORREIA-FILHO, D., BACELLAR, O., ALMEIDA, R. P., LESSA, H., ROCHA, H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**3;273-277, 1995.
- CHANG, K. P., McGWIRE, B. S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biol.Dis.** 1;1-7, 2002.
- COUTINHO, S. G. et al. CD4⁺ and CD8⁺ T cell immune responses of immunocompetent and immunocompromised (AIDS) patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz** 91;381-384, 1996a.
- COUTINHO, S. G. et al. T-cell responsiveness of American Cutaneous Leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. **Exper. Paras.** 84;144-155, 1996b.
- COUTINHO, S. G., DA-CRUZ, ^aM., BERTHO, ^aL., SANTIAGO, M.A., DE-LUCA, P., Immunologic patterns associated with cure in human american cutaneous leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**31;139-142, 1998.
- DeKREY, G. K., LIMA, H. C., TITUS R. G. Análisis of the immune response of mice infection with *L. braziliensis*. **Infec. Immun.** 66;827-829, 1998.
- FALQUETO, A., SESSA, P.A. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan, p. 1212-1233, 1998.
- _____, Manual de controle da Leishmaniose tegumentar americana no Brasil. 5 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2000. (Série técnica)
- GUTIERREZ, Y., SALINAS, G.H., PALMA, G., VALDERRAMA, I. B., SANTRICH, C. V., SARAIVA, N.G. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **Am. j. Trop. Med. Hyg.** 45;281-289, 1991.
- GRIMALDI, G. Jr., TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clin. Microb. Rev.** 6;230-250, 1993.
- JULIA, V., RASSOULZADEGAN, M., GLAICHENHAUS, N. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. **Science** 274;421-423, 1996.
- JULIA, V., GLAICHENHAUS, N. CD4 T cells which react to the *Leishmania major* LACK antigen rapidly secrete interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice. **Infect. Immun.** 67;3641-3644, 1999.

- HABERER, J. E. et al. *Leishmania pifanoi* amastigote antigen P-4: epitopes involved in T-cell responsiveness in Human cutaneous Leishmaniasis. **Inf. Immun.**, 66;3100-3105, 1998.
- HODGKINSON, V. H., SOONG, L., DUBOISE, S. M., McMAHON-PRATT, D. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms **Exp. Parasitol.**83;94-105, 1996.
- KAYE, P. M., CURRY, A. J., BLACKWELL, J. M. Differential production of Th-1 and Th-2 derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. **J.Immunol.** 146; 2763-2770, 1991.
- LEÃO, S. S., LANG, T., PRINA, E., HELLIO,R., ANTOINE, J.C. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **J.Cell Sci.**108;3219-3231,1995.
- LESSA, H. A., MACHADO, P., LIMA, F., CRUZ, A.A., BACELLAR, O., GUERREIRO, J; CARVALHO, E.M. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with petoxifylline. **Am. J. Trp. Med. Hyg.**65;87-89, 2001.
- LIMA, H. C., TIUS, 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;5442-5445, 1996.
- LIMA, H. C., DeKREY, G. K., TIUS, R. G. Resolution of an infection with *L. braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *L. major* in BALB/c mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94;71-76, 1999.
- LOCKSLEY RM, PINGEL S, LACY D, WAKIL AE, BIX M, FOWELL DJ. Susceptibility to infectious diseases: Leishmania as a paradigm. **J Infect Dis.** 2;305-308, 1999.
- MAASHO, K., SANCHEZ, F., SCHURR, E., HAILU, A., AKURO, H. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in area of endemicity. **Infec.Immun.**66;2698-2704, 1998.
- MANGER, I. D., RELMAN, D. A. How the host 'sees' pathogens: global gene expression responses to infection. **Cur. Opin. Imm.**12;215-218, 2000.
- MAYRINK, W., MAGALHÃES, M.S., MICHALICK, M.S.M., DA-COSTA, C.A., LIMA, A. O., MELO, M.N., TOLEDO, V.P., WILLIAMS, P. Immunotherapy as a treatment of American cutaneous leishmaniasis;: preliminary studies in Brazil. **Parassitologia.**34;159-165, 1992.

- McCONVILLE, M. J., BACIC, A., MITCHELL, G. F., HANDMAN, E. Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contain an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**84;8941-8945, 1987.
- MENDONÇA, S. C. F., RUSSEL, D. G., COUTINHO, S. G. Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp63). **Clin. Exp. Immunol.**83;472-478, 1991.
- MENON, J. N., BRETSCHER, P. A. Parasite dose determines the Th-1/Th-2 nature of the response to *Leishmania major* independently of infection route and strain of host or parasite. **Eur. J. Immunol.**28;4020-4028, 1998.
- MOSMANN, T. R., COFFMAN, R. L. Th-1 and Th-2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol.**7;145-173, 1989.
- MOSSALAYI, M.D., AROK, M., MAZIER, D., VINCENDEAU, P., VOULDOUKIS, I. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. **Parasit Today** 15;342-345, 1999.
- MOSSI, S., COFFMAN, R. Induction of a Th-2 population from a polarized *Leishmania*-specific Th-1 population by in vitro culture with IL-4. **J. Immun.** 154;3779-3787, 1995.
- NORONHA, F., NUNES, A., C., SOUZA, K., MELO, M. N., PINTO, J.R. Differential sensitivity of New world *Leishmania* spp. Promastigotes to complement-mediated lysis: correlation with the expression of three parasite polypeptides. **Acta Tropica** 69;17-29, 1998.
- PEARSON, R. D., SOUSA, A. Q., JERONIMO, S. M.B. **Cutaneous Leishmaniasis** in: Principles and practice of infectious diseases. 5ed. Pennsylvania: Churchill Livingstone, p. 2831-2845, 2000.
- PEARSON, R. D., SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin. Infect. Diseas.**22;1-13, 1996.
- PINTO, A. R. BEYRODT, C.G., LOPES, R.A., BARBIERI, C.E. Identification of a 30 kDa antigen from *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes implicated in protective cellular responses in a murine model. **Intern. J. Paras.**30;599-607, 2000.
- POMPEU, M. L. et al. *Leishmania amazonensis* infection: A comparison of *in vivo* leishmanicidal mechanisms between immunized and naive infected BALB/c mice. **Exp. Parasitol.**74;169-176, 1992.

- RAFATI S, COUTY-JOUVE S, ALIMOHAMMADIAN MH, LOUIS JA. Biochemical analysis and immunogenicity of *Leishmania major* amastigote fractions in cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Immunol.** 110;203-211, 1997.
- REINER, S. L., LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Ann. Rev. Immunol.** 13;151-177, 1995.
- RIBEIRO DE JESUS, A., ALMEIDA, R.P., LESSA, H., BACELLAR, O., CARVALHO, E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz. J. Biol. Res.** 31;143-148, 1998.
- RITTIG, M. G., BOGDAN, C. Leishmania – Host-cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasit. Today.** 16;292 – 297, 2000.
- RUSSO, D. M., TURCO, S. J., BURNS, J. M., REED, S. G. Stimulation of human T lymphocytes by *Leishmania* lipophosphoglycan-associated proteins. **J Immunol.** 1;202-7, 1992.
- SAAR, Y., RANSFORD, A., WALDMAN, E., MAZAREB, S., AMIN-SPECTOR, S., PLUMBLEE, J., TURCO, S. J., ZILBERSTEIN, D. Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 95;9-20, 1998.
- SCHILLING, S., GLAICHENHAUS, N. T cell that react to the immunodominant *Leishmania major* LACK antigen prevent early dissemination of the parasite in susceptible BALB/c mice. **Infect. Immun.** 69;1212-1214, 2001.
- SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of Visceral leishmaniasis in the State of Bahia. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz.** 91;671-683, 1996.
- SOMMER, F., MEIXER, M., MANNHERZ, M., OGILVIE, A. L. J., ROLLINGHOFF, M., LOHOFF, M. Analysis of cytokines patterns produced by individual CD4⁺ lymph node cells during experimental murine leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **Intern. Immun.** 10;1853-1861, 1998.
- SOONG, L., DUBOISE, M., KIMA, P., McMAHON-PRATT, D. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against Cutaneous Leishmaniasis. **Inf. Immun.** 63;3559-3566, 1995.
- SOONG, L., CHANG, C. H., SUN, J., LONGLEY, B. J., McMAHON-PRATT, D. Role of CD4 T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.** 158;5374-5383, 1997.
- SOUZA, V. L., SOUZA J.A., SILVA, T.C., VERAS, P. T., FREITAS, L.A. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological response in CBA mice. **Microbes Infect.** 2;1807-1815, 2000.

- TERABE, M., KURAMOCHI, T., ITO, M., HATABU, T., SANJOBA, C., CHANG, K.P., MATSUMOTO, Y. Non-ulcerative cutaneous lesion in immunodeficient mice with *L. amazonensis* infection. **Par. Int.**48;47-53, 1999.
- TERABE, M., KURAMOCHI, T., ITO, M., HATABU, T., SANJOBA, C., CHANG, K.P., MATSUMOTO, Y. CD4 cells are indispensable for ulcer development in murine cutaneous leishmaniasis. **Infect.Immun.** 68;4574-4577, 2000.
- TEIXEIRA, M.C.,DE-JESUS,S.R., SAMPAIO, R.B.,PONTES-D-CARVALHO,L.C.,DOS-SANTOS , A sample and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitol. Res.**88;963-968, 2002.
- TORRENTERA, F. A., GLAICHENHAUS, N., LAMAN, J., CARLIER, Y T-cell responses to immunodominant LACK antigen do not play a critical role in determining susceptibility of BALB/c mice to *Leishmania mexicana*. **Infect. Immun.**69;6177-6621, 2001.
- TURCO, S.T. Adversal relationship between the *Leishmania* lipophosphoglycan and protein Kinase C of host macrophages. **Parasit. Immunol.** 21;597-600, 1999.
- VIEIRA LQ, HONDOWICZ BD, AFONSO LC, WYSOCKA M, TRINCHIERI G, SCOTT P. Infection with *Leishmania major* induces interleukin-12 production in vivo. **Immunol.Lett.**40;157-161, 1994.
- VINHAS, V. VINHAS V, FREIRE M, BACELLAR O, CUNHA S, ROCHA H, CARVALHO EM.t al. Characterization of T cell responses to purified *Leishmania* antigens in subjects infected with *Leishmania chagasi*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**27;1199-1205, 1994.
- WALKER, P.S., KERSTEN, T.S., KRIEG, A.M., HOMAN, L., ROWTON, E.D., UDEY, M.C., VOGEL, J.C. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12 and IFN-gama dependent mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96;6970-6975, 1999.