



UFBA

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



FIOCRUZ

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA HUMANA**

**A PARTICIPAÇÃO DE p40 NA INFECÇÃO DE  
CAMUNDONGOS C57BL/6 POR *Leishmania braziliensis***

**SÍRIO GABRIEL GOMES DE MELO FIGUEIREDO**

Salvador – Bahia - Brasil

2009

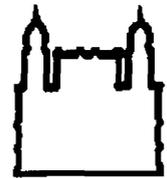


004470



**UFBA**

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



**FIOCRUZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**A PARTICIPAÇÃO DE p40 NA INFECÇÃO DE  
CAMUNDONGOS C57BL/6 POR *Leishmania braziliensis***

**SÍRIO GABRIEL GOMES DE MELO FIGUEIREDO**

**ORIENTADOR: LUIZ ANTÔNIO RODRIGUES DE FREITAS**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre  
em Patologia, área de concentração em Patologia  
Experimental

Salvador – Bahia – Brasil

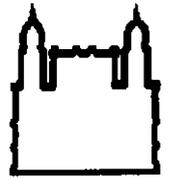
2009





**UFBA**

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



**FIOCRUZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**A PARTICIPAÇÃO DE p40 NA INFECÇÃO DE  
CAMUNDONGOS C57BL/6 POR *Leishmania braziliensis***

**SÍRIO GABRIEL GOMES DE MELO FIGUEIREDO**

**ORIENTADOR: LUIZ ANTÔNIO RODRIGUES DE FREITAS**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre  
em Patologia, área de concentração em Patologia  
Experimental

Salvador – Bahia – Brasil

2009



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

F475p Figueiredo, Sírio Gabriel Gomes de Melo  
A participação de p40 na infecção de camundongos C57BL/6 por *Leishmania braziliensis* [manuscrito] / Sírio Gabriel Gomes de Melo Figueiredo. - 2009.  
135 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação  
Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2009.**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, Laboratório de Patologia  
e Biointervenção.

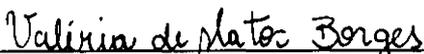
1. *Leishmania braziliensis*. 2. p40. 3. C57BL/6. 4. Infecção Intradérmica. I.Título.

CDU 616.928.5:599.323

SIRIO GABRIEL GOMES DE MELO FIGUEIREDO

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Valéria de Matos Borges

Tecnologista Nível III

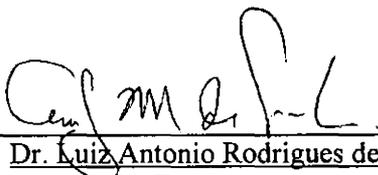
CPqGM / FIOCRUZ



Dra. Fabiola Cardillo

Pesquisadora Associada

CPqGM/FIOCRUZ



Dr. Luiz Antonio Rodrigues de

Freitas

Pesquisador Titular

CPqGM/FIOCRUZ

Fontes de Financiamento:

CAPES – Bolsa de Mestrado  
CPqGM/LPBI

*Às mulheres de minha vida:  
minha mãe Dinahva, minha madrinha Mari, e minha avó Edna, por todo  
amor, paciência, dedicação e estímulo.*

*À meu pai, Luís Alberto, pelo apoio e incentivo.*

*Aos meus irmãos Jorge Allan, Laís e Lucas pelo sentido da  
responsabilidade de ser exemplo, o que orienta meus passos.*

*À minha família, pelas referências e certeza da presença.*

*À minha casa, lugar acolhedor e inspirador, porto seguro.*

*Aos meus amigos, pela companhia e momentos de fraternidade.*

*À "essência da vida", pela força, coragem e esperança no caminhar.*

## AGRADECIMENTOS

---

O meu agradecimento a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas pelo incentivo e orientação.

À Cláudia Dias de Santana pela amizade, cuidado e estímulo incansáveis.

À Gilberto Bomfim pela convivência amigável e auxílio na execução deste trabalho.

À Marcus Welby Borges pelo estímulo durante a iniciação científica.

Aos pesquisadores do Laboratório de Patologia e Biointervenção pela disponibilidade e pelos equipamentos compartilhados. Em especial, à Dra. Patrícia Veras pela disponibilização de materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do LPBI: Valderes Lemos de Souza, Cleusa Rodrigues, Lúcia Moreno, Roberto Santos, Luana Palma, Antônio Petersen, Virgínia Góes, José Geraldo, Rodrigo Silva, Juliana Perrone, Taís de Almeida, Carlos Guedes e Niara Almeida pela agradável convivência diária.

Aos professores do Curso de Mestrado em Patologia pelos ensinamentos.

Aos amigos do curso do curso de Patologia: Lucilene Amorim, Sanara Sousa, Graciomar Costa, Théo Santos, Manuela Noia, Glória Sweet, Juliana Freitas, Cleire Santos, Marcos Guerreiro, Ana Carvalho, Elenilda Oliveira, Liliane Cunha, Lidiane Gaban, Magda Seixas e André Fernandes pela agradável convivência. Em especial, aos amigos Luís Fábio Batista e Jaqueline França pela indispensável companhia.

À toda equipe do Biotério, Plataforma de Histotecnologia, Biblioteca, Segurança, Manutenção e Administração do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz pelo suporte indispensáveis para a execução deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	07
LISTA DE FIGURAS .....	08
LISTA DE TABELAS.....	11
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO:</b> .....	<b>15</b>
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE .....	15
1.2 OS PARASITOS, VETORES E CICLO DE TRANSMISSÃO.....	16
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE .....	19
1.3.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CAUSADA POR <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i> .....	22
1.3.1.1 ASPECTOS CLÍNICOS.....	22
1.3.1.2 ASPECTOS HISTOLÓGICOS.....	23
1.3.1.3 IMUNOPATOGÊNESE.....	24
1.4 O MODELO MURINO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR .....	26
1.4.1 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DAS LESÕES NO MODELO MURINO DA LEISHMANIOSE .....	36
1.4.1.1 LESÃO .....	36
1.4.1.2 LINFONODO.....	37
1.4.1.3 BAÇO E FÍGADO .....	39
1.5 MODELOS DE INFECÇÃO COM <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i> .....	41
1.5.1 RESPOSTA HITOLÓGICA NO MODELO MURINO DE INFECÇÃO COM <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i> .....	42
1.6 IMUNORREGULAÇÃO POR CITOCINAS NA LEISHMANIOSE MURINA .....	44
1.7 P40 .....	47
1.7.1 P40 MONÔMERO E HOMODÍMERO .....	49
1.7.2 INTERLEUCINA-12 .....	51
1.7.3 INTERLEUCINA-23 .....	55
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	59
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
<b>3. DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>60</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>61</b>
4.1 ANIMAIS .....	61
4.2 PARASITOS .....	61
4.3 INFECÇÃO INTRADÉRMICA.....	62
4.4 TAMANHO DAS LESÕES .....	63
4.5 CARGA PARASITÁRIA .....	63
4.6 DISSEMINAÇÃO.....	64
4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	64
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	65
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>66</b>
5.1 DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES .....	66
5.2 CARGA PARASITÁRIA NA ORELHA E NO LINFONODO.....	69
5.3 VISCERALISAÇÃO DA INFECÇÃO.....	74
5.4 RESPOSTA IMFLAMATÓRIA.....	78
5.4.1 ORELHA.....	78
5.4.2 LINFONODO .....	89
5.4.3 BAÇO.....	95
5.4.4 FÍGADO.....	97
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>99</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>112</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>113</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

<b>CD</b>	Conjuntos de diferenciação
<b>CCL</b>	Quimiocina CC ligante
<b>CMSP</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>CXCL</b>	CXC quimiocina ligante
<b>DCs</b>	Células dendríticas
<b>G6PD</b>	Glucose6-fosfato-desidrogenase
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>IFN</b>	Interferon gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintetase induzível
<b>JAK</b>	Tirosina quinases que são ativadas pela agregação dos receptores de citocinas
<b>JE</b>	Homólogo murino para a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)
<b>LCD</b>	Leishmaniose cutânea difusa
<b>LCL</b>	Leishmaniose cutânea localizada
<b>LCM</b>	Leishmaniose cutâneo mucosa
<b>LD</b>	Leishmaniose difusa
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LTA</b>	Leishmaniose tegumentar americana

<b>LV</b>	Leishmaniose visceral
<b>MIP-2</b>	Proteína inflamatória de macrófagos
<b>NK</b>	“Natural killers”
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>O<sup>2-</sup></b>	Radical superóxido
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PCR</b>	Reação da polimerase em cadeia
<b>RAC</b>	Recombination-activating gene
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>SBF</b>	Soro fetal bovino
<b>SLA</b>	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
<b>STAT</b>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
<b>TCR</b>	Receptores de células T
<b>TGF</b>	Fator transformador de crescimento beta
<b>TLR</b>	Receptor semelhante a Toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>FIGURA 01.</b> O ciclo de transmissão da <i>Leishmania</i> .....	17
<b>FIGURA 02.</b> Diferentes formas de apresentação da p40.....	48
<b>FIGURA 03.</b> Tamanho das lesões nos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40 <sup>-/-</sup> , ambos infectados com 10 <sup>5</sup> promastigotas de <i>L. braziliensis</i> .....	67
<b>FIGURA 04.</b> Aspecto das lesões nos camundongos C57BL/6p40 <sup>-/-</sup> .....	68
<b>FIGURA 05.</b> Carga parasitária nas orelhas dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40 <sup>-/-</sup> .....	70
<b>FIGURA 06</b> Carga parasitária nos linfonodos retro-auriculares dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40 <sup>-/-</sup> .....	71
<b>FIGURA 07.</b> Aspecto do linfonodo retro-auricular dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40 <sup>-/-</sup> .....	72
<b>FIGURA 08.</b> Linfadenomegalia nos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40 <sup>-/-</sup> .....	73
<b>FIGURA 09.</b> Aspecto do fígado e do baço dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40.....	76
<b>FIGURA 10.</b> Hepatomegalia e esplenomegalia nos camundongos C57BL/6p40 <sup>-/-</sup> .....	77
<b>FIGURA 11.</b> Padrão tecidual na lesão cutânea 6 horas após infecção.....	79
<b>FIGURA 12.</b> Padrão tecidual na lesão cutânea 12 horas após infecção.....	80
<b>FIGURA 13.</b> Padrão tecidual na lesão cutânea 24 horas após infecção.....	81
<b>FIGURA 14.</b> Padrão tecidual na lesão cutânea 1 semana após infecção.....	83
<b>FIGURA 15.</b> Padrão tecidual na lesão cutânea 5 semanas após infecção.....	85

<b>FIGURA 16.</b> Padrão tecidual na lesão cutânea 10 semanas após infecção.....	87
<b>FIGURA 17.</b> Padrão tecidual no linfonodo retro-auricular 1 semana após infecção.....	89
<b>FIGURA 18.</b> Padrão tecidual no linfonodo retro-auricular 5 semanas após infecção.....	91
<b>FIGURA 19.</b> Padrão tecidual no linfonodo retro-auricular 10 semanas após infecção.....	93
<b>FIGURA 20.</b> Padrão tecidual no baço dos camundongos C57BL/6p40 <sup>-/-</sup> 5 e 10 semanas após infecção.....	96
<b>FIGURA 21.</b> Padrão tecidual no fígado dos camundongos C57BL/6 p40 <sup>-/-</sup> 5 e 10 semanas após infecção.....	98

## LISTA DE TABELAS

---

<b>TABELA 01.</b> Disseminação de <i>L. braziliensis</i> na infecção de camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40 <sup>-/-</sup> .....	74
<b>TABELA 02.</b> Principais aspectos histopatológicos observados nas lesões cutâneas dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40 <sup>-/-</sup> no curso da infecção por <i>L. braziliensis</i> . .....	88
<b>TABELA 03:</b> Principais aspectos histopatológicos observados nos linfonodos retro-auriculares dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40 <sup>-/-</sup> no curso da infecção por <i>L. braziliensis</i> .....	94

## RESUMO

---

MELO, S. A participação de p40 na infecção de camundongos C57BL/6 por *Leishmania braziliensis*. 2009. 135 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia/Fundação Oswaldo Cruz/Salvador, 2009.

*Leishmania braziliensis* é o principal agente etiológico da leishmaniose cutânea no Brasil. Fatores e mecanismos envolvidos com resistência ou susceptibilidade à infecção por esta espécie de *Leishmania* foram pouco estudados. Neste trabalho, avaliou-se a participação de p40 no curso da infecção de camundongos C57BL/6, utilizando-se camundongos *knocked out* para esta molécula, C57BL/6p40<sup>-/-</sup>, deficientes, portanto, na produção de IL-12 e IL-23. Partiu-se da hipótese de que a ausência de p40 torna camundongos C57BL/6 susceptíveis à infecção. Procedeu-se a injeção de *L. braziliensis* (10<sup>5</sup> parasitos) nas orelhas de camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup>, e o acompanhamento do curso da infecção a partir de 6 horas até 10 semanas pós-infecção. Monitorou-se o desenvolvimento das lesões, a carga parasitária e a ocorrência de disseminação de parasitos para baço e fígado. Caracterizou-se a resposta inflamatória por meio da análise histopatológica em cortes de orelhas, linfonodos, baços e fígados, corados com H&E. Após dez semanas de infecção, camundongos C57BL/6 controlaram a carga parasitária nas lesões, mas os parasitos persistiram nos linfonodos, sem disseminação para baço ou fígado. Por outro lado, camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> foram incapazes de conter a infecção, e desenvolveram lesões progressivas e doença visceral. Nas fases iniciais da infecção, a resposta inflamatória na pele foi distinta nos dois grupos, sendo menos intensa com menor recrutamento de neutrófilos nos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup>. Com uma semana de infecção, camundongos C57BL/6 apresentaram um infiltrado inflamatório misto, composto por macrófagos, linfócitos e neutrófilos, enquanto que nos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> o infiltrado foi predominantemente macrofágico. Cinco semanas após a infecção, ambos os grupos apresentaram um infiltrado inflamatório difuso do tipo misto, com parasitismo mais intenso nos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup>. Dez semanas após infecção, não foram detectados parasitos nas lesões, mas o infiltrado inflamatório persistiu. Nos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup>, a inflamação foi intensa com infiltrado do tipo misto com macrófagos intensamente parasitados. No linfonodo de drenagem, camundongos C57BL/6 desenvolveram resposta inflamatória granulomatosa associada à persistência dos parasitos. Nos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> a carga parasitária aumentou progressivamente, acompanhada pela alteração da arquitetura do linfonodo e ausência de granulomas. Nestes animais, cinco semanas após infecção foi observado no baço e no fígado infiltrado inflamatório com macrófagos parasitados. Estes resultados confirmam a participação de p40 no controle da infecção por *L. braziliensis* e sugerem que sua ausência determina alterações na dinâmica e composição da resposta inflamatória, determinantes no curso da infecção em camundongos C57BL/6.

**Palavras-chave:** *Leishmania braziliensis*, p40, C57BL/6.

## ABSTRACT

---

MELO, S. The participation of p40 in *Leishmania braziliensis* infection in C57BL/6 mice. 2009. 135 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia/Fundação Oswaldo Cruz/Salvador, 2009.

*Leishmania braziliensis* is the main agent of coetaneous leishmaniasis in Brazil. Factors and mechanisms involved in resistance and susceptibility to the infection with this species of *Leishmania* have not been well studied. In this work we evaluated the role of p40 in the course of the infection of C57BL/6 mice with *L. braziliensis*. Knock-out (KO) mice for p40 (C57BL/6p40<sup>-/-</sup>), which do not produce IL-12 or IL-23 were used. The absence of p40 causes C57BL/6 mice susceptible to *L. braziliensis* infection. Mice were infected in the dermis of the ear with *L. braziliensis* (10<sup>5</sup> parasites). Course of the infection was monitored regarding development of lesions, parasitic load and dissemination of the parasites to the spleen and liver at different time points after infection. Histological analysis of inflammatory response in the skin lesions, draining lymph nodes, spleen and liver was performed at 1, 5 and 10 weeks after infection. Moreover, early skin inflammatory response was evaluated 6, 12 and 24 hours after infection. Both groups of mice developed skin lesions and parasites were found in the draining lymph nodes. After 10 weeks of infection wild mice were able to control parasites in the site of inoculation but not in the draining lymph node. They did not have dissemination of infection to the spleen or liver. On the other hand, KO mice were unable to control infection and had progressive lesions with dissemination of parasites to internal organs. The inflammatory response in the skin was distinct in wild as compared to KO mice. In the early phase of the infection, KO mice had milder inflammatory response with fewer neutrophils than wild mice. At 1 week after infection, KO mice showed milder infiltrate, predominantly macrophagic, whereas wild mice showed a mixed infiltrate constituted by macrophages, lymphocytes and neutrophils. At 5 weeks after infection, both group of mice had a dense, diffuse, and mixed inflammatory infiltrate with parasitized macrophages. Parasitism was more intense in KO mice. At the 10<sup>th</sup> week after infection, inflammation persisted in wild mice but parasites were not present. At this same time point, KO mice showed dense mixed inflammatory infiltrate with huge amounts of parasites in the cytoplasm of macrophages. Interestingly, draining lymph nodes in wild mice showed persistent parasitism associated with the development of granulomatous inflammatory response. Increasing amounts of parasites were also present in lymph nodes of KO mice associated with progressive alteration of lymph node architecture and no granulomas were seen. After the 5<sup>th</sup> week of infection, parasites were found in the spleen and liver of KO mice, associated with inflammatory infiltrate of macrophages. The results presented herein, clearly confirm the importance of p40 in the control of *L. braziliensis* infection and suggest that its absence determine alterations in the dynamics and composition of the inflammatory infiltrate that are important to the containment of the parasites in C57BL/6 mice.

**Key words:** *Leishmania braziliensis*, p40, C57BL/6.

## 1 - INTRODUÇÃO

---

### 1.1 – ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE

A leishmaniose está amplamente distribuída, ocorrendo em grande parte do continente africano, europeu, asiático e americano. Estima-se que sua incidência anual esteja em torno de 1,5 a 2 milhões de casos e sua prevalência equivalente a 12 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2002). Entre as muitas doenças negligenciadas, a LTA merece atenção pela ampla distribuição e capacidade de causar deformações (BRASIL, 2007).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) está amplamente distribuída e encontra-se em expansão. A partir da década de 80 verificou-se aumento no número de casos registrados, com picos de transmissão a cada cinco anos. Num período de vinte anos (1985 e 2005) foram registrados, em média, 28.568 casos por ano. Em 2003 foi confirmada autoctonia em todos os estados e identificados 24 circuitos de produção da doença, representando 75% do total de casos registrados. Dentre estes, destacam-se os circuitos situados nas regiões Norte e Nordeste do país, que em 2004 concentraram 47% do total de casos registrados. Entre 2001 e 2003 o estado da Bahia representou o 24º circuito, com taxa de detecção de 64,77casos/100.000 habitantes, com 5,52% dos casos representados por doença mucosa (BRASIL, 2007).

Antes considerada zoonose de animais silvestres que acometia ocasionalmente pessoas em contato com a floresta, a doença passou a ocorrer em áreas rurais já desmatadas e também em regiões peri-urbanas de colonização recente, caracterizadas pela ocupação descontrolada e sem nenhuma estrutura de saneamento ou urbanização. Esta alteração do padrão de transmissão pode estar relacionada com alto índice de destruição do ambiente natural e com acelerado crescimento demográfico em áreas urbanas, criando um cenário favorável para a

transmissão de doenças, como a leishmaniose. Além de fatores demográficos, outros fatores têm contribuído para o aumento do número de casos registrados, como a adaptação dos vetores aos ambientes peri e intra-domiciliar em áreas de colonização antiga sem remanescentes de florestas (WHO, 2002) e a ocorrência de co-infecções, observadas em indivíduos portadores do vírus HIV (SILVA et al., 2002; RABELLO *et al.*, 2003).

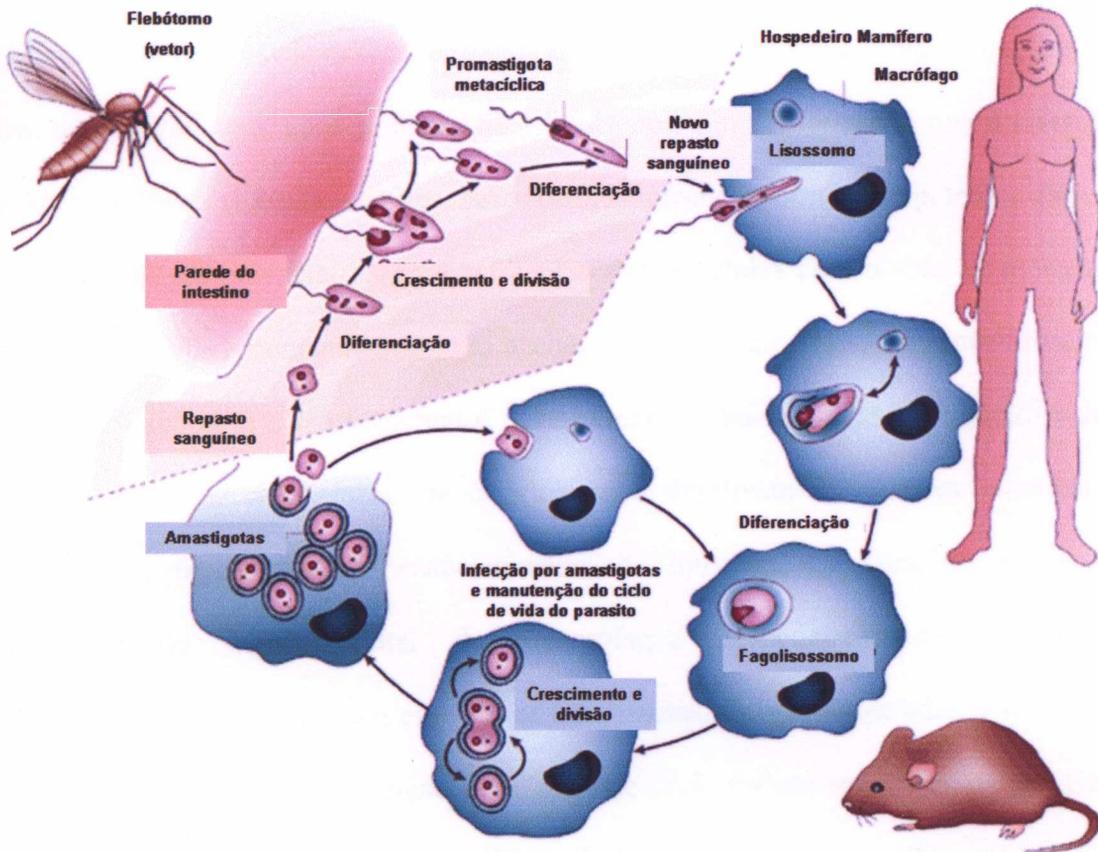
As medidas de controle epidemiológico da leishmaniose atualmente consistem no tratamento dos indivíduos infectados, combate ao vetor e controle das populações de reservatórios hospedeiros (BRASIL, 2007).

## 1.2 – OS PARASITOS, VETORES E CICLO DE TRANSMISSÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários parasitos intracelulares do gênero *Leishmania*, da Ordem Kinetoplastida e da Família Trypanosomatidae. Estes parasitos são digenéticos (heteróxeos) encontrados em sua forma promastigota extracelular no trato digestivo dos vetores, e em sua forma amastigota (com flagelo contido na bolsa flagelar) no interior de células hospedeiras. Os vetores naturais destes parasitos pertencem a Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae e aos Gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (KILLICK-KENDRICK, 1990; BANULS *et al.*, 2007).

O ciclo de transmissão do parasito (Figura 01) é iniciado quando o flebótomo fêmea (hematófago) realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro reservatório, e ingere sangue contendo células infectadas com formas amastigotas. No trato digestivo do flebótomo, as amastigotas são liberadas e transformam-se em promastigotas. Enquanto o sangue é digerido, as promastigotas metacíclicas que são formas infectantes para os hospedeiros vertebrados, se deslocam para a região anterior do trato digestivo do vetor e se instalam em seu aparelho

bucal. O flebótomo ao realizar um novo repasto injeta, junto com sua saliva, os parasitos na derme do hospedeiro vertebrado (LAINSON *et al.*, 1987; SACKS & KAMHAWI *et al.*, 2001; NIEVES & PIMENTA, 2002).



**Figura 01. O ciclo de transmissão da *Leishmania*.** O flebótomo ao realizar um repasto sanguíneo num hospedeiro de *Leishmania* ingere células sanguíneas parasitadas por amastigotas intracelulares. No interior de seu trato digestivo do flebótomo, estas células se rompem e os parasitos liberados se multiplicam e diferenciam em formas promastigotas. Ao realizar um novo repasto, o flebótomo injeta junto com sua saliva, formas virulentas do parasito na derme de um novo hospedeiro. Neste sítio, fagócitos residentes e recrutados reconhecem e internalizam as promastigotas que se estabelecem em fagolisossomos, e se multiplicam e diferenciam em formas amastigotas. Células parasitadas podem romper e as amastigotas extracelulares podem infectar outras células. O ciclo se mantém quando células parasitadas circulantes no sangue periférico são ingeridas por um flebótomo durante o repasto.

Modificado de Sacks & Noben-Trauth (2002).

No lago sanguíneo formado na derme do hospedeiro após o repasto do vetor, os parasitos inoculados são internalizados pelas células residentes e por neutrófilos recém-migrados. O recrutamento destas células é induzido por proteínas da saliva, por antígenos dos parasitos e por moléculas do hospedeiro, como a interleucina-8. Posteriormente, células inflamatórias mononucleares, macrófagos e células dendríticas, interagem com os parasitos não internalizados ou com os neutrófilos infectados. Foi demonstrado que a infecção induz retardo da apoptose em neutrófilos. Estas células infectadas produzem potentes quimiotáticos para macrófagos potencializando a infiltração destas células para o sítio de inoculação. Em fases mais tardias, concomitante com a chegada dos macrófagos, os neutrófilos infectados entram em apoptose e são fagocitados pelas células recém-migradas. A fagocitose de células apoptóticas induz a produção de citocinas que desativam as funções microbidas dos macrófagos, favorecendo o estabelecimento da infecção. Os parasitos se instalam no compartimento fagolisossomal dos macrófagos hospedeiros, denominado vacúolo parasitóforo, e se diferenciam em formas amastigotas. Células infectadas podem disseminar tornando-se circulantes no sangue periférico, de onde podem ser ingeridas por flebótomos durante um novo repasto sanguíneo (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2003; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2007; AFONSO *et al.*, 2008; PETERS *et al.*, 2008).

Durante o seu ciclo de vida, os parasitos utilizam diferentes mecanismos adaptativos que lhes permitem sobreviver no trato digestivo dos vetores e no interior das células dos hospedeiros mamíferos. No vetor, fatores como a qualidade do sangue ingerido, o nível de atividade das enzimas digestivas e o pH podem influenciar a sobrevivência destes parasitos. Já no hospedeiro mamífero, a capacidade de resistir e interferir com os mecanismos efetores da resposta imune do hospedeiro é essencial para o estabelecimento da infecção (MOSSER & ROSENTHAL, 1993; SACKS & KAMHAWI, 2001; NIEVES & PIMENTA, 2002;

DENKERS & BUTCHER, 2005).

Nas Américas são reconhecidas onze espécies de parasitos que causam a doença cutânea. No Brasil, já foram identificadas sete espécies como os principais agentes, sendo uma do subgênero *Leishmania* e seis do subgênero *Viannia*. *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* são os principais agente da LTA em nosso país. Dentre estas, *L. braziliensis* se destaca por ser a espécie que está presente em todas as regiões do país e por ser a espécie responsável pela quase totalidade dos casos registrados (BRASIL, 2007).

No Brasil, os principais vetores da LTA são *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. umbratilis*, *L. wellcome*, *L. migonei*, *L. intermedia* e *L. whitmani*. Destes, *L. whitmani* é um importante vetor de *L. braziliensis* nos Estados Mato Grosso do Sul, Paraná, Ceará e Bahia, enquanto que nos Estados de São Paulo e Minas Gerais *L. intermedia* é o principal, e tem sido encontrado tanto em regiões de florestas quanto em plantações, domicílios e peri-domicílios (BRASIL, 2007).

### 1.3 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE

As manifestações clínicas na leishmaniose dependem de características das espécies de *Leishmania* e o estado imunológico do hospedeiro. De modo geral, são observadas duas apresentações clínicas da doença: leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar. A leishmaniose cutânea localizada, cutâneo-mucosa, difusa ou disseminada são aspectos de manifestações clínicas da LTA.

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é caracterizada pelo desenvolvimento no local da picada do flebótomo de uma pequena pápula que evolui numa úlcera, com aspecto de cratera, possuindo borda elevada e fundo plano granuloso (GRIMALDI, 1982; LLANOS CUENTAS *et al.*, 1984). Em alguns casos esta lesão pode regredir espontaneamente (COSTA

*et al.*, 1990).

A leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) é uma das formas mais agressivas de LTA e é caracterizada por um quadro de disseminação dos parasitos para a mucosa nasal e/ou oral. A lesão inicial é caracterizada por uma reação inflamatória, formando um nódulo. Posteriormente, aparece uma lesão ulcerada superficialmente, que aumenta de tamanho e que apresenta aspecto granuloso, sangrando com facilidade. À medida que a resposta inflamatória se intensifica, as lesões tornam-se mais profundas e ulceradas, com envolvimento de cartilagem e necrose. Ocorre perfuração do septo nasal e destruição total da columela, com queda da ponta do nariz. Com a continuação do processo inflamatório, ocorre o comprometimento de outros sítios como palato, úvula, faringe e lábio superior (MARSDEN *et al.*, 1994).

A leishmaniose disseminada (LD) é caracterizada pelo desenvolvimento em várias partes do corpo de diversas lesões, 75 a 800, que podem ser papulosas, acneiformes, nodulares ou ulceradas, surgindo poucos dias após o aparecimento da lesão inicial (COSTA *et al.*, 1986; GALVÃO *et al.*, 1993; CARVALHO *et al.*, 1994; TURETZ *et al.*, 2002).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma forma rara de apresentação da LTA. A doença é caracterizada pelo desenvolvimento de múltiplas lesões nodulares, habitualmente não ulceradas, com aspecto eritematoso, que podem estender-se por várias partes do corpo. Lesões ulceradas e comprometimento de mucosa são pouco freqüentes (BITTENCOURT & FREITAS *et al.*, 1983). No entanto, na forma subpolar da LCD, ocorre ulceração de algumas lesões (BARRAL *et al.*, 1995). As lesões na LCD são compostas por infiltrado predominantemente macrofágico, poucos linfócitos estão presentes na periferia e o parasitismo é intenso (BITTENCOURT & FREITAS *et al.*, 1983). Pacientes com LCD apresentam pouca ou nenhuma resposta linfoproliferativa ao SLA e são negativos para o teste cutâneo (Reação de Montenegro) com o antígeno do parasito. Além disso, expressam baixos

níveis de RNAm de IFN- $\gamma$ , bem como produzem pequenas quantidades desta citocina, e expressam elevados níveis de RNAm de IL-10 (BOMFIM *et al.*, 1996). Os pacientes não curam a doença com o tratamento, tendo alternância de melhora e agravamento do quadro. Em alguns casos, a cicatrização espontânea de algumas lesões é acompanhada pelo aparecimento de outras.

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença que na ausência de tratamento pode ser fatal. Em pacientes sintomáticos, febre intermitente, perda de peso e apetite, diarreia e hepatoesplenomegalia são as principais manifestações clínicas. Com o avanço da doença, podem ser observadas anemia, infecções secundárias e hemorragia. Contudo, infecções assintomáticas e formas subclínicas da doença também ocorrem (BADARO *et al.*, 1986; D'OLIVEIRA *et al.*, 1997; PASTORINO *et al.*, 2002; GAMA *et al.*, 2004). Na fase ativa da doença pode ser observada alta carga parasitária no baço e no fígado. Parasitos também são encontrados na medula óssea. Pacientes com LV sintomática são incapazes de montar resposta imune celular eficiente, não apresentam resposta linfoproliferativa ao SLA e são negativos para o teste cutâneo com o antígeno do parasito. A produção de baixos níveis de IFN- $\gamma$  e altos níveis de IL-10 se correlacionam com a progressão da doença, e o balanço na produção destas citocinas é importante para a determinação do curso da infecção. Após o tratamento, o estado de imunossupressão observado durante a doença ativa pode ser revertido (CARVALHO *et al.*, 1985, 1992, 1994).

No Nordeste brasileiro, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* são os principais agentes da doença cutânea localizada. As formas cutâneo-mucosa e disseminada estão mais associadas com a infecção por *L. braziliensis* e a forma difusa com *L. amazonensis*. No entanto, a infecção por *L. amazonensis* também pode causar doença disseminada ou visceral, mas a leishmaniose visceral é mais frequentemente causada pela infecção por *L. infantum chagasi* (JONES *et al.*, 1987; BARRAL *et al.*, 1991; TURETZ *et al.*, 2002).

### 1.3.1 – LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CAUSADA POR

#### *Leishmania braziliensis*

##### 1.3.1.1 – ASPECTOS CLÍNICOS:

Em humanos, a infecção por *L. braziliensis* pode resultar num amplo aspecto de manifestações clínicas. A LCL corresponde a 97,3% dos casos de LTA observados na área endêmica de Três Braços na Bahia, área de transmissão de *L. braziliensis* (JONES *et al.*, 1987). Nestes casos, as lesões são geralmente únicas, úmidas, possuindo bordas elevadas e fundo plano granuloso (LLANOS CUENTAS *et al.*, 1984), podendo evoluir para a cura espontânea num período variável de seis meses a um ano (COSTA *et al.*, 1990), ou mostrar-se como infecção subclínica (FOLLADOR, 2002).

Na área endêmica de Corte de Pedra na Bahia, foi estimado que 2,7% dos pacientes infectados com *L. braziliensis* evoluíram para LCM concomitantemente ou meses ou até anos após a cura da doença cutânea (JONES *et al.*, 1987; BOAVENTURA *et al.*, 2006). A LCM é uma manifestação clínica grave, capaz de gerar lesões desfigurantes (MARSDEN *et al.*, 1994). Outra manifestação clínica observada na infecção por *L. braziliensis* é a LD, na qual ocorre o desenvolvimento de múltiplas lesões ulceradas (COSTA *et al.*, 1986; GALVÃO *et al.*, 1993; CARVALHO *et al.*, 1994; TURETZ *et al.*, 2002). Em nossa região, 28,6% dos pacientes com LD desenvolveram LCM. O tratamento pode resultar em redução da maioria das lesões, mas somente em alguns casos a cura é atingida e freqüentemente algumas lesões persistem por longo período (TURETZ *et al.*, 2002).

O comprometimento do linfonodo que drena a área da lesão cutânea é comum na infecção por *L. braziliensis*, ocorrendo em 66,7% dos casos (BARRAL *et al.*, 1992). Contudo, em alguns, pode ser o único sinal clínico em resposta à infecção (BARRAL *et al.*, 1995).

Estudos realizados em áreas endêmicas para LTA na Bahia e no Ceará onde *L. braziliensis* é o principal agente etiológico, mostraram que 67-77% dos pacientes apresentaram linfadenopatia. Na Bahia, a linfadenopatia teve duração média de três semanas, desaparecendo espontaneamente após este período e os linfonodos atingiram diâmetro entre 3-8 cm (BARRAL *et al.*, 1992). No Ceará, a linfadenopatia persistiu por vários meses mesmo depois do desenvolvimento das lesões cutâneas. Neste caso, os linfonodos foram maiores e atingiram até 10,5 cm (SOUSA *et al.*, 1995).

### 1.3.1.2 – ASPECTOS HISTOLÓGICOS:

Na LCL e LCM as alterações histológicas são variáveis e diversos padrões podem ocorrer concomitantemente, não sendo possível distinção histopatológica entre estas duas formas e nem a definição de uma classificação para fins de prognóstico ou resposta a terapia (BITTENCOURT & BARRAL, 1991).

Nos estágios iniciais da infecção o infiltrado inflamatório nas lesões é do tipo agudo, caracterizado pelo predomínio de neutrófilos com poucos macrófagos de permeio. Com a cronificação da infecção, o infiltrado inflamatório torna-se gradualmente misto, predominantemente mononuclear, sendo composto por macrófagos, linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos. Alterações vasculares são observadas, ocorrendo depósitos de fibrinóides e hialinos na parede e infiltração neutrofílica, caracterizando vasculites. Reação granulomatosa ocorre em 50 a 80% dos casos e se apresenta na forma de granulomas organizados ou conjunto de células epitelióides ou gigantes circundando áreas de necrose ou depósitos fibrinóides. Nestas lesões o parasitismo é freqüentemente escasso, mas pode variar dependendo da apresentação clínica. Em casos de cura, pode-se observar a redução do infiltrado inflamatório com ocorrência de fibrose e re-epitelização (RIDLEY *et al.*, 1980;

MAGALHÃES *et al.*, 1986; BITTENCOURT & BARRAL, 1991). O infiltrado inflamatório das lesões na LD é predominantemente mononuclear com presença de linfócitos, macrófagos e poucos parasitos (CARVALHO *et al.*, 1994).

A classificação proposta por Bittencourt e Barral (1991) considera os seguintes padrões:

A – Infiltrado inflamatório de células plasmáticas, linfócitos e macrófagos na ausência de células epitelióides ou gigantes

B – Presença de células gigantes e/ou epitelióides não organizadas

C – Presença de granulomas circunscritos associados ou não com os padrões A e/ou B

### 1.3.1.3 – IMUNOPATOGÊNESE

Na infecção por *L. braziliensis*, os pacientes podem desenvolver hipersensibilidade ao parasito. A intensidade desta resposta parece ser importante na definição do curso da infecção e o tipo de manifestação clínica. Os trabalhos sobre a imunopatogênese da leishmaniose causada por *L. braziliensis* têm mostrado que uma resposta inflamatória exacerbada resulta em manifestação grave com grande destruição tecidual, mas quando esta resposta é regulada as manifestações clínicas associadas são benignas ou limitadas (BACELLAR *et al.*, 2002; FOLLADOR *et al.*, 2002).

O estudo da resposta imune de indivíduos infectados, assintomáticos é importante para o entendimento dos mecanismos imunológicos relacionados com proteção. Follador e colaboradores (2002) mostraram que pacientes com a leishmaniose subclínica produziram maiores quantidades de IL-5 e menores de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  do que os pacientes com LCL. Os autores sugerem que a capacidade de modular a resposta imune à *L. braziliensis* impede o desenvolvimento de lesões. Os pacientes com LCL apresentam resposta linfoproliferativa a e

são positivos para o teste cutâneo (Teste Montenegro) com o antígeno solúvel de leishmânia (SLA) (CARVALHO *et al.*, 1985; COUTINHO *et al.*, 1996). Em lesões ativas, foram observadas grandes quantidades de RNAm de IL-2 e IFN- $\gamma$  (PIRMEZ *et al.*, 1993). Além disso, as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) destes pacientes secretam baixos níveis de IL-10 e IL-5 e altos níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  quando estimuladas com SLA (BACELLAR *et al.*, 2002). Os diferentes perfis de resposta imunológica estão relacionados com as manifestações clínicas da doença e a incapacidade de modular resposta imune mediada por células resulta em manifestações graves, como na LCM.

Assim como os pacientes com LCL, os que desenvolvem LCM são positivos para o teste cutâneo ao antígeno do parasito (BITTENCOURT & BARRAL, 1991; BACELLAR *et al.*, 2002). Entretanto, quando as CMSP destes pacientes foram estimuladas com SLA, secretaram concentrações ainda mais elevadas de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e baixas concentrações de IL-10 do que os pacientes com LCL. Além disso, quando estas células foram estimuladas com SLA, em presença de IL-10 exógena, não houve redução na produção de IFN- $\gamma$  (BACELLAR *et al.*, 2002). Esta falha no mecanismo de modulação da resposta inflamatória, pode estar relacionada com a menor expressão de receptores para IL-10 por células presentes na lesão de pacientes com LCM (FARIA *et al.*, 2005). Estes dados sugerem fortemente que a natureza destrutiva na LCM é resultado de uma resposta inflamatória hiperreativa não modulada.

Os pacientes com LD apresentam pouca resposta linfoproliferativa ao SLA e podem ser positivos ou negativos para o teste cutâneo com o antígeno do parasito. Além disso, as células destes pacientes produzem quantidades de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  consideradas baixas, se comparadas com as de pacientes com LCL, ou altas, se comparadas com as de pacientes com LCD. Uma resposta inflamatória moderada favorece a disseminação da doença, mas garante o controle do parasitismo. A LD pode ser considerada como uma forma intermediária entre a LCL e a LD (CARVALHO *et al.*, 1994; TURETZ *et al.*, 2002; LEOPOLDO *et al.*, 2006).

A proporção e atuação de diferentes populações celulares parecem ser importantes no curso da infecção. Foi mostrado que pacientes com LCL e LM durante a fase ativa da doença apresentam uma maior proporção de linfócitos T CD4+ do que T CD8+. Nos pacientes com LCL, a cura das lesões foi associada com decréscimo na proporção de T CD4+ e aumento de T CD8+ ou à equiparação destas proporções, sugerindo a participação destas células no controle da infecção. Nos pacientes com LM não foi observado este padrão (COUTINHO, *et al.*, 1996; DA-CRUZ *et al.*, 2002). A importância de diferentes fatores envolvidos com a definição dos padrões da resposta inflamatória à *Leishmania* pode ser melhor definida por meio da utilização de modelos experimentais.

#### 1.4 – O MODELO MURINO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O modelo murino da leishmaniose é a ferramenta mais utilizada no estudo da interação entre parasito e hospedeiro mamífero. Neste, diferentes linhagens de camundongos isogênicos apresentam padrões distintos de resposta a diferentes espécies de *Leishmania*, reproduzindo alguns aspectos das manifestações clínicas observados na doença humana. A partir de estudos com este modelo tornou-se mais clara a relação existente entre o perfil de resposta imuno-inflamatória, envolvendo diferentes populações celulares e seus produtos com desenvolvimento da doença (GRIMALDI, 1982; LOUIS *et al.*, 1998; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

A resposta imune celular na infecção por *Leishmania* é complexa e envolve diferentes populações celulares. Dentre estas, as células dendríticas, os neutrófilos, macrófagos e linfócitos são as mais importantes. As células dendríticas imaturas estão preferencialmente residentes em tecidos periféricos. Ao entrarem em contato com os parasitos e/ou seus antígenos no sítio de inoculação, estas células migram para os órgãos linfóides secundários

estimulando a diferenciação de linfócitos não primados, (VON *et al.*, 1998; GUERMONPREZ *et al.*, 2002). Foi demonstrado a partir de sistema *in vitro* que células dendríticas são potentes apresentadoras de antígenos de *Leishmania* (SHANKAR & TITUS, 1997). Na interação com *L. amazonensis*, Favali e colaboradores (2007) mostraram que a presença de promastigotas vivas ou seus antígenos reduziu a expressão de CD1a e CD80 por células dendríticas e a capacidade destas de estimular a proliferação e produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos autólogos. Na infecção por *L. braziliensis*, estas células foram ativadas e secretaram grandes quantidades de IL-12 (VARGAS-INCHAUSTEQUI *et al.*, 2008). Carvalho e colaboradores (2008) mostraram que células que apenas entraram em contato com antígenos dos parasitos foram potenciais indutoras de linfoproliferação e secretaram grandes quantidades de IL-12. As células que fagocitaram parasitos secretam grandes quantidades de TNF- $\alpha$ , mas não induziram eficiente ativação de linfócitos. Estes resultados mostram que o parasito influencia a ativação e função destas células.

Sabe-se que os neutrófilos são as primeiras células que migram para sítios inflamatórios, participando da fagocitose e destruição dos parasitos, através da produção de moléculas reativas de oxigênio, de nitrogênio e enzimas líticas. Os neutrófilos estão envolvidos com resposta primária aos parasitos por serem capazes de produzir quimiocinas e citocinas, inclusive IL-12, participando, desta forma, da indução e regulação das respostas imunes (CASSATELLA *et al.*, 1995; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; PETERS *et al.*, 2008). O contato e a natureza da interação neutrófilo-macrófago podem ser importantes na definição do curso da infecção (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004; ALLENBACH *et al.*, 2006; AFONSO *et al.*, 2008; GUEIRARD *et al.*, 2008). Além disso, diversos trabalhos mostram que a depleção destas células, antes ou durante as primeiras semanas de infecção, pode resultar em alguns casos no aumento da carga parasitária, tornando camundongos resistentes em susceptíveis (LIMA *et al.*, 1998; TACCHINI-COTTIER *et al.*, 2000; ROUSSEAU *et al.*,

2001; CHEN *et al.*, 2005; MCFARLANE *et al.*, 2008). Assim, o recrutamento e ativação de neutrófilos é importante para controle da infecção com *Leishmania*. Pouco é conhecido sobre a biologia da interação entre estas células e *L. braziliensis*, não estando bem estabelecida a sua participação no curso da infecção por esta espécie.

Os macrófagos são as principais células hospedeiras de *Leishmania* e participam na destruição dos parasitos. Além disso, podem atuar na regulação da resposta imune por serem capazes de produzir citocinas e quimiocinas (STAFFORD *et al.*, 2002). *In vitro*, macrófagos de camundongos CBA foram capazes de controlar a infecção por *L. major*, mas foram susceptíveis a infecção por *L. amazonensis*. *L. amazonensis* não só inibiu a ativação dos macrófagos, mas foi resistente aos mecanismos de destruição induzidos por IFN- $\gamma$ . A ativação dos macrófagos em resposta a TNF- $\alpha$  e IFN-  $\gamma$  foi responsável pelo controle da infecção por *L. major*, por um mecanismo parcialmente dependente de NO (GOMES *et al.*, 2003). Na infecção por *L. braziliensis*, macrófagos de camundongos BALB/c produziram IL-12 e expressaram TNF- $\alpha$ , CCL3 e CCL4, sendo capazes de controlar a infecção por um mecanismo dependente de NO (WELBY-BORGES, 2008). Estes resultados enfatizam a importância do parasito na definição do curso da infecção.

Já os linfócitos, participam do controle da resposta imune efetora específica e de memória (HOLIDAY *et al.*, 1991). Em camundongos resistentes à *L. major*, a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com anticorpo específico exacerbou a infecção, e em camundongos resistentes, promoveu o controle (TITUS *et al.*, 1987). Na infecção por *L. amazonensis*, a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> resultou na ausência de lesão e no menor recrutamento de macrófagos (SOONG *et al.*, 1997). Estes resultados demonstram a importância destas células na definição do curso da infecção. Foi demonstrado que linfócitos T CD8<sup>+</sup> participam da resposta de camundongos C57BL/6 promovendo resistência a infecção por *L. major* no modelo intradérmico de infecção com baixas doses. Quando deficientes em células T CD8<sup>+</sup>

estes animais não são capazes de conter a infecção por 100 promastigotas metacíclicas inoculadas na derme da orelha (BELKAID *et al.*, 2002).

O modelo murino mais estudado é o de infecção por *L. major*, um dos principais agentes causadores da doença no Velho Mundo. Neste modelo, o perfil de citocinas que é produzido está relacionado com a definição do curso da infecção. Camundongos resistentes desenvolvem uma resposta do tipo T “helper” 1 (Th1) com produção de IFN- $\gamma$ , o que induz a ativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos e eliminação do parasito. Estes camundongos desenvolvem lesões pequenas que não ulceram e curam. Por outro lado, camundongos susceptíveis desenvolvem resposta do tipo T “helper” 2 (Th2) caracterizada pela produção de IL-4. Este padrão de resposta Th2 induz a desativação dos macrófagos e multiplicação dos parasitos. Estes camundongos desenvolvem lesões progressivas que ulceram e necrosam (HEINZEL *et al.*, 1989, 1991).

Na infecção por *L. major*, camundongos BALB/c foram utilizados no estudo dos mecanismos de susceptibilidade por desenvolverem doença progressiva associada com produção de grandes quantidades de IL-4 e pequenas quantidades de IFN- $\gamma$ . Por outro lado, mecanismos de resistência foram estudados em camundongos C57BL/6, capazes de controlar a infecção, correlacionada com a produção de grandes quantidades de IFN- $\gamma$  (LOCKSLEY *et al.*, 1987; HEINZEL *et al.*, 1989, 1991). Camundongos CBA infectados com *L. major* desenvolveram lesões pequenas que regrediram com o tempo. Estes animais produziram IFN- $\gamma$ , IL-10, mas IL-4 só foi detectada nas primeiras semanas de infecção, caracterizando uma resposta imune celular do tipo Th1. Por outro lado, estes camundongos infectados com *L. amazonensis* desenvolvem lesões que aumentam progressivamente e ulceram, seguida de disseminação dos parasitos e morte dos animais. Estes animais produzem IL-4 e IL-10, mas não IFN- $\gamma$ , resposta Th2. (LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000). Na infecção por *L. braziliensis*, camundongos BALB/c e C57BL/6 são resistentes, mas o primeiro desenvolve uma lesão que

evolui para cura espontânea e o segundo não mostra sinais aparentes de lesão macroscópica (MAIOLI *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2005). Nestes animais, o controle da infecção está relacionado com o desenvolvimento de resposta Th1 (DEKREY *et al.*, 1998; MAIOLI *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2007; VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.*, 2008).

*L. donovani* e *L. infantum chagasi* causam doença visceral, caracterizada pela proliferação dos parasitos em macrófagos no fígado, baço e medula óssea. Camundongos BALB/c e C57BL/6 reduzem o parasitismo no fígado, mas mantêm infecção crônica no baço e desenvolvem esplenomegalia. O controle da infecção envolve a produção de IFN- $\gamma$  (MURRAY & DELPH-ETIENNE, 2000), IL-12 (ENGWERDA *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2006) e TNF- $\alpha$  (ENGWERDA *et al.*, 2004), citocinas que favorecem a destruição dos parasitos por induzem a formação e maturação de granulomas. A produção predominante de IL-10 favorece a exacerbação da infecção (MURRAY *et al.*, 2002).

No modelo de infecção intradérmico, camundongos BALB/c inoculados com  $10^4$  promastigotas metacíclicas de *L. infantum* controlaram a carga parasitária na pele. A presença do parasito induziu infiltrado inflamatório tipo misto, com predomínio de neutrófilos nas fases iniciais e aumento na quantidade de linfócitos nas fases mais tardias. Contudo, houve disseminação dos parasitos para linfonodo, baço e fígado e os camundongos desenvolveram doença visceral. A carga parasitária aumentou no baço e nas fases mais tardias da infecção foi reduzida no fígado. Houve persistência dos parasitos no linfonodo (AHMED *et al.*, 2003).

Diversos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de investigar quais células permanecem infectadas no linfonodo após o controle da infecção. Foi mostrado que as células dendríticas são as principais células que albergavam os parasitos no linfonodo (MOLL *et al.*, 1995). O que foi confirmado num estudo mais detalhado que utilizou um painel de marcadores específicos para macrófagos, granulócitos, células endoteliais, e células dendríticas. Foi mostrado que 30 a 40% dos parasitos mantinham infecção em células

dendríticas e macrófagos, mas que 60 a 70% destes não estavam associados com nenhum dos marcadores utilizados (STENGER *et al.*, 1996). Os fibroblastos reticulares foram mostrados como as células que mantêm 60 a 70% das amastigotas de *L. major* nos linfonodos de camundongos C57BL/6. A manutenção da infecção foi relacionada com a menor ativação de mecanismos microbicidas por estas células, em especial a baixa produção de NO (BOGDAN *et al.*, 2000).

A participação de células T reguladoras (TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup>) produzindo IL-10 nos sítios de infecção favorece a persistência dos parasitos. Na infecção por *L. major*, camundongos C57BL/6 deficientes para o receptor de IL-10 ou tratados com anti-IL-10 montaram uma resposta polarizada Th1 e eliminaram os parasitos, mostrando que a produção desta citocina é importante prevenir a esterilização da infecção. Adicionalmente, células T reguladoras foram isoladas do linfonodo de camundongos C57BL/6 após o controle da infecção. *In vitro*, elas foram capazes de proliferar e secretaram grandes quantidades de IL-10 em cultura mista com células dendríticas infectadas. A transferência destas células para camundongos que controlaram a infecção induziu o aumento da carga parasitária e exacerbação da infecção enquanto que a depleção destas células preveniu a reativação da infecção (BELKAID *et al.*, 2002; SUFFIA *et al.*, 2006). Estes resultados mostram que a persistência do parasitismo depende de mecanismos que envolvem a produção de IL-10 e manutenção de baixo potencial microbicida pelas células infectadas.

A persistência dos parasitos no linfonodo após o controle da infecção e desaparecimento dos sinais clínicos da doença parece ter relação com a manutenção de resposta imune protetora. Uzonna e colaboradores (2001) mostraram que camundongos BALB/c infectados por alta dose de promastigotas de *L. major*, 10<sup>6</sup>, produziram grandes quantidades de IL-4 e pouca de IFN- $\gamma$  e desenvolveram linfadenomegalia extrema com alta carga parasitária e lesões progressivas, sendo classificados neste estudo como sintomático.

Quando infectados por  $3 \times 10^3$ , dose intermediária, produziram quantidades equivalente de IFN- $\gamma$  e IL-4, anticorpos anti-leishmania, desenvolveram linfadenomegalia e controlaram a infecção, mas os parasitos persistiram no linfonodo. Estes foram considerados oligossintomáticos. Já os infectados por  $1,1 \times 10^2$ , baixa dose, eliminaram os parasitos, foram assintomáticos e produziram grandes quantidades de IFN- $\gamma$ , na ausência de anticorpos anti-leishmania e linfadenomegalia. Quando animais assintomáticos e oligossintomáticos foram reinfectados, apenas os oligossintomáticos foram capazes de controlar a infecção secundária. Camundongos que receberam células de camundongos oligossintomáticos antes de serem infectados com alta dose foram capazes de controlar a infecção. Estes resultados demonstram que a manutenção de parasitismo em níveis que não causam doença grave é importante para manutenção de imunidade protetora. Além disso, sugerem que o desenvolvimento de linfadenomegalia tem relação com a carga parasitária e pode ser um indicador de resposta protetora.

A contenção dos parasitos na pele e no linfonodo está associada com resistência à infecção e a disseminação para vísceras como baço e fígado, está associado com susceptibilidade. Laskay e colaboradores (1995) investigaram a cinética de disseminação de *L. major* em diferentes linhagens de camundongos. Foi mostrado que em camundongos BALB/c, susceptíveis à infecção, ocorre disseminação dos parasitos do sítio cutâneo de inoculação para o linfonodo de drenagem, baço, fígado, pulmão e medula óssea num período de 10 a 24 horas após infecção. Nos camundongos C57BL/6, CBA/J e C3H/HeJ, resistentes à infecção, os parasitos são retidos na pele e no linfonodo de drenagem. Interessante que nos camundongos C57BL/6, a depleção de células NK1.1 ou o tratamento com anticorpo anti-IFN- $\gamma$ , mas não a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> antes da infecção, induziu disseminação com uma cinética semelhante à dos camundongos susceptíveis. Adicionalmente, o tratamento de camundongos susceptíveis com IL-12 recombinante antes da infecção preveniu

a disseminação. Estes resultados indicam que a resposta imune inata tem participação na contenção dos parasitos no sítio primário, evento relacionado com o controle da infecção.

Uma provável via de disseminação dos parasitos do sítio primário para os órgãos internos é a hematogênica. Martinez e colaboradores (1992) isolaram parasitos a partir de cultura de monócitos derivados do sangue periférico de pacientes com LCM. O agente identificado foi *L. braziliensis*. Em modelos experimentais, foi demonstrada a capacidade intrínseca de *L. braziliensis* em causar doença disseminada. Almeida e colaboradores (1996) demonstraram que em hamsters a infecção com *L. braziliensis* pode produzir lesões metastáticas secundárias viscerais a partir de lesão cutânea primária e lesões secundárias metastáticas cutâneas a partir de infecção visceral primária. A observação de infiltrados inflamatórios nas paredes de vasos sanguíneos contendo células parasitadas sugere disseminação por via hematogênica.

Independente das possíveis vias de disseminação, o estudo da interação entre células parasitadas e os tecidos do hospedeiro vêm contribuindo para o entendimento dos mecanismos celulares relacionados com a permanência das células parasitadas no sítio de infecção ou migração para outros tecidos. A partir do desenvolvimento e utilização de ensaios de adesão de monócitos com tecido inflamado *in vitro*, Carvalhal e colaboradores (2004) mostraram que estas células aderem ao tecido inflamado. Entretanto, a infecção por *Leishmania* inibe significativamente esta adesão e parece estar relacionada com alterações na função de integrinas da família beta-1 e alterações na expressão de receptores de quimiocinas (PINHEIRO *et al.*, 2006). Indicando que o parasito é capaz de interferir com a adesão dos fagócitos aos tecidos inflamados e interferir com os mecanismos de disseminação.

Além do controle exercido pelos mecanismos imunes sobre a disseminação dos parasitos, outros fatores intrínsecos das diferentes espécies de *Leishmania* parecem contribuir na determinação de tropismo e permanência destes nos diferentes tecidos. Callahan e

colaboradores (1996) investigaram a sensibilidade de diferentes espécies à temperatura. Foi mostrado que espécies mais associadas com doença visceral (*L. infantum chagasi* e *L. donovani*) são mais resistentes a altas temperaturas do que espécies associadas com doença cutânea (*L. major* e *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. tropica*, *L. braziliensis* e *L. panamensis*). As cepas de *L. braziliensis* testadas mostraram-se mais resistentes à temperatura que as cepas de *L. amazonensis*. Entretanto, evidências de que espécies que causam doença cutânea serem isoladas de pacientes com doença visceral (BARRAL *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 2002) indicam que outros fatores devem participar da determinação destes fenômenos.

A dose e o sítio de inoculação podem ser determinantes no curso da infecção. Camundongos BALB/c susceptíveis à infecção por *L. major*, ao serem inoculados com  $10^2$  promastigotas desenvolveram resposta Th1 e foram capazes de controlar a infecção (DOHERTY & COFFMAN *et al.*, 1996). Em camundongos C57BL/6 foram observados resultados semelhantes. Quando infectados com  $10^6$  promastigotas de *L. major* desenvolveram lesões que aumentaram de tamanho rapidamente, mas regrediram em seguida acompanhadas pelo controle da carga parasitária. Por outro lado, quando infectados com baixa dose,  $10^2$ , não foram observadas lesões aparentes, mas houve persistência dos parasitos e a carga parasitária manteve-se intermediária (LIRA, *et al.*, 2000). Com relação ao sítio de inoculação, foi mostrado que camundongos BALB/c e CB6F1 que são susceptíveis à infecção por *L. major* e *L. amazonensis*, quando infectados em regiões anteriores do tronco foram capazes de controlar a infecção e curaram as lesões. Quando a infecção foi realizada em regiões posteriores ao tronco, entretanto, desenvolveram lesões que aumentaram (KIRKPATRICK *et al.*, 1987). Resultados semelhantes foram observados por Nabors e colaboradores (1995) que mostraram que camundongos CB6F1 infectados no dorso por *L. major* desenvolveram resposta Th2 e infecção crônica. Estes animais desenvolveram resposta Th1 e controlaram a infecção quando os parasitos foram inoculados na pata.

Belkaid e colaboradores (1998) desenvolveram um modelo intradérmico de infecção por *L. major* que consiste na injeção de pequenas quantidades do parasito mais saliva do vetor na derme da orelha de camundongos. A vantagem de utilizar este modelo é que a derme é o local onde a infecção ocorre naturalmente. Camundongos C57BL/6 e BALB/c foram susceptíveis à infecção em presença de saliva. O mesmo perfil observado nos trabalhos realizados com o modelo convencional de infecção com altas doses na pata. Entretanto, a intensidade e desfecho da infecção parecem ser diferentes. Comparando o curso da infecção nos camundongos C57BL/6 que foram inoculados com parasitos e saliva, em modelos de infecção diferentes, subcutâneo e intradérmico, os estudos mostram que adição de saliva exacerba a infecção. Quando o inóculo foi injetado na pata, os camundongos desenvolvem lesões que aumentaram de tamanho nos primeiras semanas e regrediram em seguida, indicando tendência de cura em tempos mais tardios. Entretanto, quando o inóculo foi injetado na orelha, as lesões foram menores nas primeiras semanas e aumentaram lentamente nas semanas seguintes, mas sem sinais aparentes de cura (THEODOS *et al.*, 1991; BELKAID *et al.*, 1998).

Assim, tanto a dose quanto o local da infecção podem influenciar o curso da doença, e a realização de trabalhos utilizando modelos experimentais mais próximos da infecção natural, podem contribuir com informações mais precisas a cerca dos fatores que contribuem para o controle ou exacerbação da infecção.

## 1.4.1 – ASPECTOS HISTOLÓGICOS DAS LESÕES NO MODELO MURINO DA LEISHMANIOSE

### 1.4.1.1 – LESÃO

Nas fases iniciais da infecção, o infiltrado inflamatório das lesões é predominantemente neutrofílico com macrófagos e ocasionais eosinófilos de permeio, acompanhados por congestão vascular e edema. Este padrão é observado em linhagens que desenvolvem resistência ou susceptibilidade à infecção. Nas fases mais tardias, o infiltrado torna-se predominantemente linfocitário nos camundongos que desenvolvem resistência ou macrofágico monomórfico nos camundongos que desenvolvem susceptibilidade à infecção por *L. major* ou *L. amazonensis* (ANDRADE *et al.*, 1984; BARRAL-NETTO *et al.*, 1987; LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000).

Os padrões de resposta tecidual observado em diferentes linhagens de camundongos que desenvolvem resistência ou susceptibilidade à infecção são semelhantes aos observados nas diferentes formas clínicas da LTA. Camundongos A/J mostraram-se resistentes á infecção por *L. amazonensis* e desenvolveram lesões nodulares, com infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, plasmócitos e por muitos linfócitos. Granulomas e áreas focais de necrose fibrinóide e fibrose intersticial e periférica foram observados. Este padrão é semelhante ao observado nas LCL e LCM. Por outro lado, camundongos BALB/c mostraram-se susceptíveis à infecção e desenvolveram lesões com infiltrado macrofágico monomórfico com parasitismo intenso e extensas áreas de necrose do tipo coagulativa, padrão semelhante ao observado na LD (ANDRADE *et al.*, 1984; BARRAL-NETTO *et al.*, 1987)

Aspectos similares foram observados por Lemos de Souza e colaboradores (2000). Neste trabalho, camundongos CBA infectados com *L. major* desenvolveram lesões pequenas

que regrediram com o tempo. O infiltrado inflamatório nestas lesões foi constituído por infiltrado mononuclear misto, composto por macrófagos, linfócitos e poucos plasmócitos e granulócitos. Associado ao controle da carga parasitária e cura das lesões foi observado fibrose, necrose fibrinóide e granulomas. Estes animais produziram IFN- $\gamma$  e montaram resposta imune celular do tipo Th1. Por outro lado, camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* desenvolveram resposta Th2 com produção de grandes quantidades de IL-4 e pouca de IFN- $\gamma$ . Nestes animais as lesões que aumentaram progressivamente. O infiltrado inflamatório na lesão foi do tipo macrofágico monomórfico, com intenso parasitismo, áreas de necrose lítica, micro-abcessos e úlceras, seguida de disseminação dos parasitos, resultando na morte desses animais.

Mudanças no perfil de resposta imune são acompanhadas por modificações no padrão de resposta histológica. Camundongos BALB/c susceptíveis a infecção por *L. amazonensis* quando imunizados com antígenos solúveis de promastigotas por via endovenosa, tornaram-se parcialmente resistentes e sofreram alterações no padrão da resposta tecidual que passou a assemelhar-se ao de camundongos resistentes. Nestes animais, o infiltrado inflamatório das lesões foi do tipo misto, com poucos macrófagos parasitados, plasmócitos e eosinófilos. Reação granulomatosa com células epitelióides e gigantes multinucleadas foram observadas (BARRAL-NETTO *et al.*, 1987).

#### 1.4.1.2 – LINFONODO

O padrão de resposta tecidual nos linfonodos que drenam as lesões cutâneas também mostra associação com os perfis de resistência e susceptibilidade. Nas fases iniciais da infecção, os linfonodos de animais resistentes e susceptíveis apresentam características semelhantes. Dilatação dos seios subcapsulares com infiltração de células mononucleares

macrófágicas contendo antígenos parasitários ou parasitos íntegros foram observados (ANDRADE *et al.*, 1984; LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000). Nas fases tardias, nos camundongos CBA, resistentes à infecção por *L. major*, o padrão de resposta tecidual nos linfonodos foi macrofágico epitelióides com acúmulo de macrófagos formando estruturas granulomatóides dispersas no parênquima. Formas amastigotas foram observadas nestas estruturas. Nos camundongos susceptíveis, infectados com *L. amazonensis*, o padrão tecidual foi macrofágico plasmocitário difuso. O linfonodo foi gradualmente ocupado por macrófagos de citoplasma amplos, freqüentemente parasitados. Centros germinativos mostraram-se reativos. Nestes animais, o linfonodo foi todo substituído por células de aspecto plasmocitóide e macrófagos parasitados. Houve alteração da estrutura do linfonodo (LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000).

Na infecção por *L. mexicana*, camundongos BALB/c mostraram aumento progressivo da carga parasitária no linfonodo. A análise histopatológica mostrou que no início da infecção houve hiperplasia folicular e centros germinativos reativos com corpos apoptóticos. Nas fases tardias foram observadas plasmocitose sinusoidal, intensa infiltração por macrófagos infectados, seguida de destruição de centros germinativos e ruptura da cápsula do linfonodo. Nos camundongos C57BL/6 que controlaram a infecção, as alterações foram discretas e ocorreram plasmocitose sinusoidal e infiltração de macrófagos parasitados. Contudo, houve um padrão diferenciado na localização da maior parte das células parasitadas. Nos camundongos BALB/c, os macrófagos infectados ocuparam todo o linfonodo, mas nos camundongos C57BL/6 estes macrófagos estiveram principalmente na região paracortical (AGUILAR-TORRENTERA *et al.*, 2002a).

No linfonodo, também foi demonstrado que intervenções no perfil de resposta imune do hospedeiro podem induzir modificações no padrão histológico, associadas com resistência ou susceptibilidade. O tratamento com IL-12 recombinante nas fases iniciais da infecção de

camundongos BALB/c por *L. major*, induziu a formação de granulomas e redução da carga parasitária no linfonodo destes animais. Camundongos não tratados mostraram alta carga parasitária, na ausência de resposta granulomatosa (SCHOPF *et al.*, 2001).

### 1.4.1.3 – BAÇO E FÍGADO

Camundongos BALB/c são susceptíveis à infecção por *L. mexicana*. Estes animais desenvolvem lesão cutânea progressiva acompanhada pelo desenvolvimento de lesões secundárias e disseminação dos parasitos para baço e para o fígado. A presença do parasito induz alterações histológicas neste órgão. Foram observados agregados de histiócitos parasitados na polpa branca e na polpa vermelha. No fígado, observou-se infiltrado inflamatório nos sinusóides e em espaços porta com histiócitos parasitados. Não foram observadas alterações no baço e no fígado dos camundongos C57BL/6, resistentes à infecção (AGUILAR-TORRENTERA *et al.*, 2002b).

Em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* foi observado no baço infiltrado inflamatório difuso composto por macrófagos parasitados e poucos neutrófilos de permeio. No fígado, infiltrado mononuclear com células parasitadas foi observado nas paredes dos vasos sanguíneos e dispersos no parênquima (ABREU-SILVA *et al.*, 2004).

Murray (2001) descreveu detalhadamente a dinâmica de formação e maturação dos granulomas no curso da infecção de camundongos BALB/c por *L. donovani*. Nestes animais, as fases iniciais da infecção são caracterizadas pela elevada carga parasitária no fígado que é controlada nas fases mais tardias. A redução na carga parasitária relacionou-se com o desenvolvimento e maturação de granulomas. A análise histológica mostrou que nas primeiras semanas de infecção houve agregados irregulares de macrófagos e linfócitos dispersos no parênquima. Estes agregados aumentaram em número e na segunda semana de infecção, já

formavam granulomas definidos, compostos por células mononucleares, histiócitos e poucos macrófagos epitelióides parasitados. Neutrófilos não foram observados. Macrófagos parasitados mostraram-se dispersos. Houve discreta deposição de colágeno em alguns granulomas. Hepatócitos mantiveram-se intactos e não houve necrose. Nas fases mais tardias, os granulomas tornaram-se maiores e bem definidos, muitas vezes formando agregados. Paralelo à redução do parasitismo, foi observado o aumento do número de células epitelióides formando agregados, além de infiltração de células mononucleares no entorno do granuloma e reposição de colágeno. Entretanto, com 16 semanas de infecção apenas 43% dos granulomas tornaram-se maduros. Nos imaturos, foram observadas células parasitadas sem deposição de colágeno.

No baço, inicialmente foram observados na polpa vermelha poucos macrófagos infectados. No curso da infecção, paralelo ao aumento gradual da quantidade de macrófagos parasitados e intensidade do parasitismo, foi observado desestruturação da arquitetura do baço, caracterizada pela substituição da polpa vermelha por macrófagos parasitados e involução e coalescência dos folículos linfóides (MURRAY, 2001).

Camundongos BALB/c infectados com alta dose de *L. donovani* desenvolveram hepatoesplenomegalia, associada com alta carga parasitária. Esplenócitos destes animais não proliferaram e nem secretaram IFN- $\gamma$  quando estimulados, *in vitro*, com SLA. Nas fases iniciais da infecção, houve expressão de grandes quantidades de RNAm de IL-4, aumento progressivo da expressão de IL-10, na ausência de IFN- $\gamma$  e IL-12 (MELBY *et al.*, 1998). Neste mesmo modelo, foi mostrado que quando os camundongos foram infectados com baixa dose de parasitos, nas fases mais tardias da infecção, houve redução da carga parasitária no baço e no fígado. No baço, a redução da carga parasitária foi acompanhada pelo aumento da quantidade de linfócitos e células dendríticas nos primeiros dias da infecção, seguido do deslocamento destas células da região periarteriolar e da zona marginal para a polpa

vermelha, onde foram observadas as células infectadas. No curso da infecção, foi verificado aumento do número de esplenócitos positivos para IL-12 e redução dos positivos para IL-10. Poucas células foram positivas para IFN- $\gamma$ . Estes resultados sugerem que o controle parcial da infecção está relacionado com a produção de IL-10 e IL-12, associado à migração de linfócitos e células dendríticas para o sítio da infecção (MELBY *et al.*, 2001)

No modelo murino as características histológicas das lesões constituem importantes indicadores do controle ou do estabelecimento da infecção, sendo possíveis correlações entre as principais alterações histológicas com manifestações clínicas, associando-as ao prognóstico da doença (ANDRADE *et al.*, 1984; BARRAL-NETTO *et al.*, 1987; LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000).

## 1.5 – MODELOS DE INFECÇÃO COM *Leishmania braziliensis*

Embora *L. braziliensis* seja o principal agente etiológico da leishmaniose no Brasil, existem poucos estudos sobre aspectos da infecção por esta espécie. Hamsters têm sido utilizados em estudos de infecção por *L. braziliensis* (MCKINNEY & HENDRICKS, 1980; TRAVE *et al.*, 1988; KAHL *et al.*, 1991). Estes animais, quando infectados desenvolveram lesão no sítio de inoculação dos parasitos, inicialmente uma pápula que aumenta e ulcera (MCKINNEY & HENDRICKS, 1980; KAHL *et al.*, 1991). O infiltrado inflamatório nestas lesões foi do tipo misto, com a presença de linfócitos e plasmócitos, ocorreu formação de granulomas. Fibrose e necrose foram observadas (MCKINNEY & HENDRICKS, 1980; KAHL *et al.*, 1991). Ocorreu disseminação dos parasitos da lesão cutânea inicial para órgãos internos (ALMEIDA *et al.*, 1996).

Trabalhos com primatas não humanos vêm sendo desenvolvidos. Estes animais são susceptíveis à infecção com *L. braziliensis* e desenvolvem amplo espectro de doença,

variando desde lesões auto-limitadas, semelhante à LCL, que tendem a cura espontânea, até lesões mucosas (TEVA *et al.*, 2003; SOUZA-LEMOS *et al.*, 2008). Nestes animais, o infiltrado inflamatório das lesões é do tipo misto. Mastócitos, granulócitos, células mononucleares e linfócitos estão presentes. Durante a fase ativa das lesões, neutrófilos são predominantes. Na fase crônica, reação granulomatosa é característica e ocorre persistência dos parasitos (SOUZA-LEMOS *et al.*, 2008).

O modelo murino é o mais utilizado para o estudo da infecção por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c são os mais susceptíveis, mas não desenvolvem lesões graves de longa duração (NEAL & HALE, 1983; CHILDS, *et al.*, 1984). Contudo, quando ocorre pré-exposição à saliva do vetor, ou quando a infecção é realizada em presença da saliva ocorre exacerbação da infecção (SAMUELSON *et al.*, 1991; LIMA & TITUS, 1996; DONNELLY *et al.*, 1998; BEZERRA & TEIXEIRA, 2001; MOURA *et al.*, 2007).

Moura e colaboradores (2005) adaptaram o modelo de infecção intradérmica em orelha (BELKAID *et al.*, 1998) para estudar a infecção por *L. braziliensis*. Os resultados mostraram que este modelo reproduziu alguns aspectos da infecção natural. Camundongos BALB/c infectados com  $10^5$  promastigotas de fase estacionária desenvolveram lesão única, ulcerada, com bordas elevadas e fundo necrótico, semelhante ao observado em pacientes com LCL. Desta forma, este constitui um bom modelo para o estudo de aspectos da infecção da resposta imuno-inflamatória por *L. braziliensis*.

### **1.5.1 – RESPOSTA HISTOLÓGICA NO MODELO MURINO DE INFECÇÃO COM *Leishmania braziliensis***

A análise histopatológica das lesões de hamsters infectados por *L. braziliensis* isolada de diferentes forma clínicas, LCL ou LCM, mostrou a ausência de aspectos histológicos

característicos para cada isolado. Foi observado infiltrado inflamatório do tipo misto composto por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos. Havia focos de necrose associado ao acúmulo de neutrófilos formando micro-abscesso. O parasitismo variou de intenso a escasso. Em alguns casos houve o desenvolvimento de resposta inflamatória granulomatosa, com granulomas bem organizados. Nestes casos, houve reduzida infiltração neutrofilica e amastigotas não foram detectadas (KAHL *et al.*, 1991).

A infecção de hamsters por *L. braziliensis* resultou em disseminação dos parasitos e desenvolvimento de lesões secundárias. No linfonodo e no baço destes animais foram observados infiltrados inflamatórios, compostos por agregados de histiócitos com plasmócitos, linfócitos e poucos eosinófilos de permeio. No linfonodo, estes agregados localizaram-se nas regiões cortical e medular, enquanto que no baço, localizaram-se na polpa vermelha. No fígado, foram observados infiltrado de histiócitos com raros eosinófilos. Nas lesões cutâneas secundária, houve infiltrado com macrófagos parasitados e grande quantidade de neutrófilos (ALMEIDA *et al.*, 1996). Alguns linfonodos distantes do sítio primário de infecção mostram-se reativos. Em alguns animais houve formação de granulomas no linfonodo, baço e fígado. Nestes casos, parasitos não foram observados (KAHL, *et al.*, 1991).

Em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* mais saliva, ocorreu exacerbação da infecção com o desenvolvimento de lesões nodulares contendo macrófagos densamente parasitados. Micro-abscesso focais de linfócitos e neutrófilos foram observados (SAMUELSON *et al.*, 1991). Neste mesmo modelo, foi mostrado que nas fases iniciais da infecção em presença de saliva, o infiltrado inflamatório é difuso, neutrófilos e eosinófilos estão presentes. Com o avanço da infecção, as lesões aumentam e houve acúmulo de macrófagos parasitados e persistência de neutrófilos e eosinófilos. Nos animais infectados sem saliva, as lesões regrediram e macrófagos epitelióides com poucos parasitos foram observados. A inflamação reduziu progressivamente e foi acompanhada por fibrose

(DONNELLY *et al.*, 1998). Camundongos C57BL/6 infectados por *L. braziliensis*, apresentaram infiltrado inflamatório nas lesões predominantemente linfocítico, mas quando tratados com TGF- $\beta$  recombinante, ocorreu exacerbação da infecção e alteração no infiltrado, que passou a ser composto principalmente por macrófagos densamente parasitados (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992b).

No modelo de infecção intradérmica em orelha de camundongos BALB/c com *L. braziliensis*, as lesões foram inicialmente compostas por um infiltrado inflamatório focal de monócitos, linfócitos, neutrófilos e poucos parasitos. No auge do desenvolvimento das lesões, o infiltrado inflamatório foi constituído predominantemente por macrófagos infectados. Em fases mais tardias, foram observados macrófagos, linfócitos, poucos plasmócitos e parasitos. Estes animais desenvolveram uma resposta imune do tipo Th1. Apesar disso, os parasitos persistiram no linfonodo de drenagem, mesmo após a cura da lesão (MOURA *et al.*, 2005).

Sabe-se que o envolvimento do linfonodos na infecção por *L. braziliensis* em humanos é relevante manifestação clínica (BARRAL *et al.*, 1992, 1995; SOUSA *et al.*, 1995). No modelo murino, têm sido evidenciada a persistência de *L. braziliensis* no linfonodo de camundongos que controlam a infecção (SOUZA-NETO *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2007). Entretanto, a resposta tecidual no linfonodo desses camundongos foi pouco estudada.

## 1.6 – IMUNORREGULAÇÃO POR CITOCINAS NA LEISHMANIOSE MURINA

Um fator importante na definição de resposta Th1 ou Th2 são as citocinas presentes nas primeiras horas de infecção (YAMAKAMI *et al.*, 2002). Foi mostrado que IL-4 é capaz de modular a resposta Th1, inibindo a produção de IFN- $\gamma$  e regulando a ativação de macrófagos, além de ser um potente indutor de respostas Th2 (TANAKA *et al.*, 1993).

Camundongos geneticamente resistentes à infecção com *L. major*, ao expressarem elevados níveis desta citocina desenvolveram doença progressiva (LEAL *et al.*, 1993). Por outro lado, camundongos susceptíveis à infecção, quando deficientes na expressão de IL-4 ou quando tratados com anti-IL-4, apresentaram um aumento na expressão de IFN- $\gamma$  e foram capazes de controlar o desenvolvimento das lesões e a carga parasitária (SADICK *et al.*, 1990; KOPF *et al.*, 1996; UZONNA *et al.*, 2001). Estes dados indicam a importância de IL-4 na progressão da doença. Na infecção por *L. braziliensis*, foi proposto que a baixa capacidade de causar lesões na maioria das linhagens de camundongos pode estar relacionada com o fato desta espécie não ter induzido a produção de grandes quantidades de IL-4 (DEKREY *et al.*, 1998). Entretanto, camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* mais saliva, produziram até três vezes mais IL-4, e desenvolveram lesões maiores do que os animais infectados apenas com parasitos, sem saliva. O tratamento com anti-IL-4 reverteu este efeito (LIMA & TITUS, 1996).

Além de IL-4, IL-10 também é uma citocina relacionada com susceptibilidade à infecção com *Leishmania* (MURPHY *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 2002; PADIGEL *et al.*, 2003). Camundongos susceptíveis a *L. major*, quando deficientes na produção de IL-10 ou tratados com anti-IL-10, sendo ao mesmo tempo, deficientes na produção de IL-4, controlaram a carga parasitária e desenvolvem lesões menores, comparadas as lesões de camundongos selvagens ou não tratados (KANE *et al.*, 2001; NOBEN-TRAUTH; 2003). Alguns trabalhos têm indicado a importância da produção de IL-10 para a persistência dos parasitos em camundongos resistentes, mesmo após a cura das lesões (BELKAID *et al.*, 2001, 2002; VIANA DA COSTA *et al.*, 2002). Camundongos resistentes à infecção por *L. braziliensis*, quando tratados com TGF- $\beta$  recombinante, produziram maior quantidade de RNAm de IL-10 e tornaram-se susceptíveis, mostrando a relação desta citocina com a exacerbação da infecção (BARRAL *et al.*, 1993).

O TGF- $\beta$  participa da resposta Th2 e atua na definição do perfil de susceptibilidade durante a infecção com *Leishmania* (BARRAL-NETTO & BARRAL 1994). *In vitro*, TGF- $\beta$  foi capaz de bloquear o desenvolvimento de linfócitos Th1 induzido por IL-12, além de promover a inativação de macrófagos, reduzindo a produção de NO (DING *et al.*, 1990; SCHMITT *et al.*, 1994). Camundongos susceptíveis à infecção com *L. major*, quando tratados com anti-TGF- $\beta$ , aumentaram a produção de NO, reduziram a carga parasitária e controlaram a infecção (LI *et al.*, 1999). Macrófagos infectados por *L. braziliensis* produziram TGF- $\beta$  biologicamente ativo. O tratamento com a citocina recombinante aumentou a carga parasitária e o bloqueio com anticorpo monoclonal específico, reduziu os níveis de infecção. *In vivo*, o tratamento com a citocina recombinante resultou em exacerbação da infecção por parasitos virulentos ou avirulentos e foi capaz de ativar infecção latente (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992b; BARRAL *et al.*, 1993).

O IFN- $\gamma$  é o principal marcador da resposta Th1. Esta citocina é capaz de induzir ativação de macrófagos, capacitando-os a destruir formas amastigotas intracelulares. Os mecanismos efetores clássicos dessa destruição são a produção de superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ), via complexo NADPH oxidase, e a síntese de NO, a partir de L-arginina, catalisada pela enzima NO sintetase induzível (iNOS) presente nestas células (GREEN *et al.*, 1990; LIEW *et al.*, 1990; GREEN *et al.*, 1991; NACY *et al.*, 1991; EVANS *et al.*, 1993). *In vivo*, camundongos C57BL/6 deficientes na produção de IFN- $\gamma$  ou que não expressam o receptor para esta citocina, foram incapazes de conter a infecção (WANG *et al.*, 1994; SWIHART *et al.*, 1995). Camundongos C3H/HeN tratados com anti-IFN- $\gamma$  tornaram-se susceptíveis à infecção com *L. major*, enquanto que camundongos BALB/c infectados e tratados com esta citocina, mostraram-se resistentes à infecção (SCOTT, 1991). Na infecção por *L. braziliensis*, camundongos BALB/c tratados com anti-IFN- $\gamma$  ou deficientes da produção desta citocina, desenvolveram lesões progressivas (DEKREY *et al.*, 1998; SOUZA-NETO *et al.*, 2004;

ROCHA *et al.*, 2007).

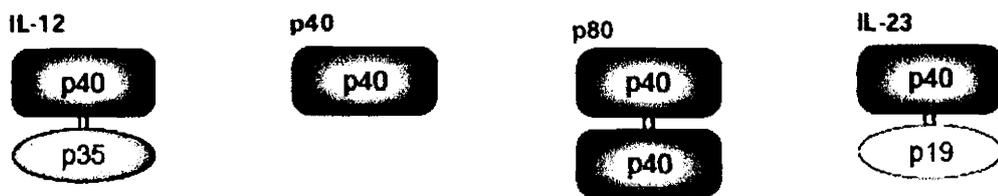
TNF- $\alpha$  é uma citocina que participa da resposta imune protetora contra o parasito e que atua de maneira sinérgica com o IFN- $\gamma$ , ampliando a resposta de resistência, *in vitro* e *in vivo* (BOGDAN *et al.*, 1990; GREEN *et al.*, 1990; LIEW *et al.*, 1990; MOLL *et al.*, 1990; DENG *et al.*, 1993). O tratamento de camundongos resistentes a *L. major* com anti-TNF- $\alpha$ , levou ao aumento da carga parasitária e ao desenvolvimento de lesões progressivas. Por outro lado, o tratamento de camundongos susceptíveis com TNF- $\alpha$  recombinante induziu proteção (TITUS *et al.*, 1989; LIEW *et al.*, 1990). Camundongos deficientes na produção de TNF- $\alpha$  são altamente susceptíveis a infecção por *L. braziliensis* (ROCHA *et al.*, 2007).

Outra citocina envolvida com resposta de resistência é a IL-12. Esta citocina atua na determinação do fenótipo de células T CD4<sup>+</sup> e está diretamente relacionada com a indução e manutenção de resposta protetora (HSIEH *et al.*, 1993; MACATONIA *et al.*, 1993; SEDER *et al.*, 1993; STOBIE *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2002). *In vivo*, camundongos susceptíveis tratados na primeira semana de infecção com IL-12 recombinante são capazes de curar a infecção por *L. major* (HEINZEL *et al.*, 1993). Por outro lado, camundongos resistentes quando incapazes de produzir p35 e/ou p40, tornaram-se susceptíveis à infecção por *L. braziliensis* e desenvolveram lesões progressivas (SOUZA-NETO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2007).

## 1.7 – P40

A p40, polipeptídeo com aproximadamente 40-kDa, foi primeiramente descrita como subunidade da IL-12 ou IL-12 $\beta$  (KOBAYASHI *et al.*, 1989). Sua seqüência é homóloga à porção extracelular de receptores da família de citocinas hematopoiéticas (MERBERG *et al.*, 1992).

Quando combinado com p35 ou IL-12 $\alpha$ , de aproximadamente 35-kDa, forma a citocina heterodimérica, IL-12p70 (KOBAYASHI *et al.*, 1989). No entanto, quando combinada com p19, forma IL-23, citocina da mesma família e que desempenha algumas funções similares a IL-12 (OPPMANN *et al.*, 2000). Além destas, tem sido mostrado que p40 pode ser secretada como um monômero ou como um homodímero, p80 (Figura 02) (GILLESSEN *et al.*, 1995).



**Figura 02. Diferentes formas de apresentação da p40.** P40 pode ser secretada como um monômero ou homodímero (p80), além de constituir as citocinas heterodiméricas IL-12 (p40+p35) e IL-23 (p40+p19). Modificado de Brombacher e colaboradores (2003).

P40 pode ser produzida por queratinócitos, células epiteliais, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas em resposta a diversos estímulos, tais como produtos derivados de microrganismos e infecções por bactérias, protozoários e fungos (MULLER *et al.*, 1994; BELLADONNA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2005; MIKOLS *et al.*, 2006; CHARMOY *et al.*, 2007).

IL-12R $\beta_2$ , a cadeia beta do receptor da IL-12, apresenta grande afinidade por p40 (PRESKY *et al.*, 1998). Suas principais funções biológicas estão relacionadas com a produção de IL-12 e IL-23, mas podem também ser mediadas pelo seu monômero ou homodímero, p80. Estas citocinas participam da resposta imune celular a diferentes patógenos, inclusive *Leishmania*.

### 1.7.1 – P40 MONÔMERO E HOMODÍMERO

P40 é expressa em elevados níveis, maiores do que p19 e p35, podendo ser secretada em sua forma monomérica ou homodimérica, p80 (HEINZEL *et al.*, 1997). P40 e p80 foram detectadas no soro de camundongos tratados com LPS, sendo que p80 representou até 40% do total de p40 circulante (MATTNER *et al.*, 1993; GILLESSEN *et al.*, 1995; GATELY *et al.*, 1996). Diversos trabalhos demonstram que p40 e p80 são capazes de mediar eventos específicos, inibição competitiva de IL-12 ou atuar como estímulo quimiotático.

Foi demonstrado que p80 murina recombinante interage com IL-12R $\beta_1$ , competindo com a IL-12 pela ligação com o receptor e, desta forma, funcionando como antagonista (MATTNER *et al.*, 1993). O tratamento com p80 foi capaz de proteger camundongos da reação de Shwartzman, induzida pela injeção de LPS, caracterizada por inflamação sistêmica. Nesta abordagem, p80 reduziu a produção de IFN- $\gamma$  e, conseqüentemente a resposta inflamatória, aumentando a sobrevivência destes animais (GILLESSEN *et al.*, 1995). O tratamento com p80 inibiu a resposta imune celular, sendo capaz de bloquear a produção de IFN- $\gamma$  induzida por IL-12, ou inibindo funções mediadas pela IL-23 (SHIMOZATO *et al.*, 2006).

A ação imunodepressora de p40 e p80 foi demonstrada também em sistemas experimentais de infecção por patógenos. Yoshimoto e colaboradores (1998) mostraram que camundongos C57BL/6 geneticamente modificados para produzir elevadas concentrações de p40, foram mais susceptíveis a infecção com *Plasmodium berghei* XAT e NK65. Após estímulo com antígenos do parasito, estes animais não montaram resposta imune celular eficiente e produziram baixos níveis de IFN- $\gamma$  e elevados de IL-4 e IL-10.

Além de ação inibitória sobre o sistema imune, alguns trabalhos mostram que p80 é capaz de induzir algum nível de ativação do sistema, seja pelo estímulo para a produção de

citocinas Th1 ou influência sobre a capacidade migratória de diferentes populações celulares. Foi demonstrado que o estímulo, *in vitro*, de células da microglia e macrófagos peritoneais com p80 induziu a expressão de TNF- $\alpha$ , iNOS e produção de NO, independente de p35 (PAHAN *et al.*, 2001; JANA *et al.*, 2003). Durante a infecção de camundongos deficientes em p35 e p40 com BCG, o tratamento com p80 restaurou a capacidade destes animais de responder a infecção (HOLSCHER *et al.*, 2001).

Quanto ao estímulo migratório, Ha e colaboradores (1999) mostraram que p40 foi capaz de induzir a migração de macrófagos, *in vitro e in vivo*. Redução na migração foi observada após o tratamento com anti-IL-12R $\beta_1$  ou com p40 modificada, com deleção de cinco aminoácidos da cadeia c-terminal. Por outro lado, Russell e colaboradores (2003) mostraram que o tratamento de camundongos com p80, mas não com IL-12 ou p40, induziu migração de macrófagos. Neste trabalho, camundongos deficientes na expressão de IL-12R $\beta_1$ , mas não os deficientes em IL-12R $\beta_2$  e p35, apresentaram uma menor migração de macrófagos peritoneais quando tratados com p80. *In vitro*, p80 induziu a migração de macrófagos em níveis semelhantes ao induzido por quimiocinas CCL2 (JE). Macrófagos deficientes na expressão de IL-12R $\beta_1$  e transfectados com plasmídeos codificando IL-12R $\beta_1$  com porção citoplasmática alterada, não migraram em resposta a p80.

Em resposta a estímulo parasitário, Khader e colaboradores (2006) mostraram que a migração de células dendríticas do pulmão para os linfonodos drenantes após infecção com *Mycobacterium tuberculosis* foi reduzida em camundongos deficientes na produção de p40, mas não nos deficientes em p35. A impossibilidade de produzir p19 não afetou a capacidade migratória destas células. O tratamento de DCs de camundongos deficientes em p40, com p80, reduziu a produção de IL-10 e restaurou a capacidade destas células de migrarem e estimularem linfócitos T.

Na infecção com *Leishmania*, Nigg e colaboradores (2007) mostraram que DCs

infectadas com *L. major* produziram níveis semelhantes de p40 e IL-12p70. Contudo, DCs de camundongos BALB/c, susceptíveis, produziram duas vezes mais p80 do que células de camundongos C57BL/6, resistentes. Charmoy e colaboradores (2007) mostraram que neutrófilos de camundongos BALB/c infectados com *L. major* também produziram níveis elevados de p80, mas não produziram IL-12p70, sugerindo a participação de p80 na indução de susceptibilidade neste sistema.

### 1.7.2 – INTERLEUCINA-12

IL-12 foi primeiramente identificada como sendo produto de células B de linhagem transformadas pelo vírus Epstein-Barr, com a capacidade de induzir a ativação de células NK, produção de IFN- $\gamma$  e proliferação de linfócitos T (KOBAYASHI *et al.*, 1989). Esta citocina é um heterodímero composto por uma cadeia leve (p35) e por uma cadeia pesada (p40). A junção destas duas cadeias forma a citocina biologicamente ativa, IL-12p70, e a expressão de ambas as cadeias são necessárias para a produção do heterodímero, mas p35 só é secretada quando combinada com p40 (KOBAYASHI *et al.*, 1989; GUBLER *et al.*, 1991; WOLF *et al.*, 1991; PODLASKI *et al.*, 1992).

O receptor de IL-12 é composto por duas cadeias, IL-12R $\beta_1$  e IL-12R $\beta_2$ . A expressão conjunta destas duas cadeias é necessária para ligação desta citocina ao seu receptor, com alta afinidade e transdução de sinal e ativação de JAK-STAT (PRESKY *et al.*, 1996). STAT4 é o principal fator de transcrição responsável pelos efeitos celulares específicos da IL-12 (KAPLAN *et al.*, 1996; THIERFELDER *et al.*, 1996). Este receptor é expresso em baixos níveis por células NK e está presente, principalmente, em linfócitos ativados. A ativação de linfócitos T, via TCR, estimulou a transcrição das duas cadeias deste receptor, especialmente a cadeia  $\beta_2$ . IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , co-estimulação por CD28 e a sinalização determinada pela

própria IL-12, também estimularam a expressão do receptor de IL-12. Além disso, linfócitos Th1 e não Th2 expressam este receptor (ROGGE *et al.*, 1997; SZABO *et al.*, 1997).

Células dendríticas, monócitos/macrófagos e neutrófilos são as principais fontes de IL-12 em resposta a produtos provenientes de microrganismos, incluindo bactérias, parasitos intracelulares e fungos (MA & TRINCHIERI *et al.*, 2001).

A eficiência relativa dos diversos indutores de IL-12 depende, em parte, da expressão diferencial de TLR (KADOWAKI *et al.*, 2001). Citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13 e a interação de CD40 com CD40L, são capazes de potencializar a produção de IL-12 (KELSALL *et al.*, 1996; STUBER *et al.*, 1996; HAYES *et al.*, 1998). IFN- $\gamma$  induz a expressão de ambas, p35 e p40, e estabelece uma relação de estimulação mútua entre células que produzem estas duas citocinas (MA *et al.*, 1996). Além disso, o tratamento prévio com IL-4 e IL-13 ou a interação via CD40, podem estimular a expressão, *in vitro*, principalmente, de p40 (D'ANDREA *et al.*, 1995; KATO *et al.*, 1996). Por outro lado, IL-10 é um potente inibidor da produção de IL-12 e, como TGF- $\beta$ , reduzem a expressão de ambas, p35 e p40 (ASTE-AMEZAGA *et al.*, 1998; DU & SRIRAM, 1998).

IL-12 estimula a proliferação de células pré-ativadas, mas não de todas as células em repouso. Esta capacidade é relacionada com a produção de IL-2, já que o tratamento com anti-IL-2 anulou o efeito (PERUSSIA *et al.*, 1992). Esta citocina é capaz de estimular a proliferação e a diferenciação de linfócitos B (DUBOIS *et al.*, 1998). Além disso, é um potente estímulo para a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T e células NK (KOBAYASHI *et al.*, 1989; CHAN *et al.*, 1991). Quando presente durante a expansão clonal, IL-12 é capaz de primar linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> a produzirem altos níveis de IFN- $\gamma$  (SEDER *et al.*, 1993; MANETTI *et al.*, 1994). Esta produção é dependente de STAT4 e da presença de baixos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 (HUNTER, *et al.*, 1995; CARTER & MURPHY, 1999). Além destas, IL-2, IL-18 e CD28 atuam como potencializadores (BARBULESCU *et al.*, 1998; WALKER

*et al.*, 1999; HODGE *et al.*, 2002).

Manetti e colaboradores (1993) demonstraram que IL-12, *in vitro*, promoveu a diferenciação de linfócitos T em células com fenótipo Th1. Em resposta a estímulo específico, a adição de IL-12 recombinante em culturas de linfócitos favoreceu a diferenciação de clones que produziram elevadas concentrações de IFN- $\gamma$  e baixas concentrações de IL-4. Na ausência de IL-12 exógeno, o perfil de produção destas células foi inverso, altas concentrações de IL-4 e baixas de IFN- $\gamma$ . Hsieh e colaboradores (1993) mostraram que o estímulo de linfócitos T não primados com antígenos *Listeria monocytogenes*, *in vitro*, induziu a diferenciação destes em células Th1. A neutralização de IL-12 elevou os níveis de IL-10 e bloqueou o desenvolvimento de células Th1. Estes trabalhos demonstram a capacidade de IL-12 em induzir resposta Th1.

As funções pró-inflamatórias de IL-12 são mediadas por sua habilidade de estimular resistência inata e gerar resposta Th1, importantes na resistência a diferentes tipos de infecção. A produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos durante a interação com linfócitos T é importante para a proliferação e produção de citocinas Th1 (PERUSSIA *et al.*, 1992; MARUO *et al.*, 1996). Sua participação na indução de Th1 foi estudada em modelos experimentais utilizando animais deficientes em sua produção, bloqueio com anticorpo específico ou o tratamento com a citocina recombinante. A utilização destas estratégias confirmaram que IL-12 é necessária na indução e manutenção de imunidade contra patógenos, incluindo *Toxoplasma gondii* e *Leishmania major* (PARK *et al.*, 2000; YAP *et al.*, 2000).

Estudos realizados com diferentes espécies de *Leishmania* mostraram que IL-12 desempenha importante papel não só no estabelecimento, mas também na manutenção de uma resposta imune eficaz no controle da infecção (MATTNER *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 2000; HONDOWICZ *et al.*, 2002; CHAKIR *et al.*, 2003; SCOTT *et al.*, 2004; MURRAY *et al.*,

2006). A participação desta citocina foi estudada, principalmente, na infecção por *L. major* (MATTNET *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 2000; SCOTT *et al.*, 2004).

Camundongos resistentes à infecção por *L. major*, montaram uma resposta Th1 com produção de elevados níveis de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de IL-4. Quando deficientes na produção de IL-12, estes animais desenvolveram lesões progressivas e IL-4 é o principal produto de células do linfonodo reestimuladas *in vitro* com antígenos do parasito (MATTNER *et al.*, 1996). Camundongos C57BL/6 deficientes na produção de p40 foram capazes de controlar a infecção por *L. major*, quando tratados com IL-12 recombinante durante as primeiras semanas de infecção. No entanto, esta resistência não foi mantida por longo prazo e quando desafiados, estes animais desenvolveram doença progressiva. A transferência de linfócitos Th1 de camundongos selvagens que curaram a lesão foi capaz de conferir resistência em camundongos RAG<sup>-/-</sup>, mas não camundongos p40<sup>-/-</sup> (PARK *et al.*, 2000). Charkir e colaboradores (2003) mostraram que camundongos que não expressam IL-12R $\beta_2$  foram susceptíveis a infecção por *L. major* e desenvolveram lesões semelhante as de camundongos BALB/c, altamente susceptíveis. Contudo, as lesões dos animais IL-12R $\beta_2$  ulceraram antes que as do BALB/c. Juntos, estes resultados demonstram a importância de IL-12 na infecção com *Leishmania*.

Na infecção com *L. braziliensis*, foi mostrado que camundongos deficientes na expressão de p35 e/ou p40 não foram capazes de controlar a infecção e desenvolvem lesões progressivas com alta carga parasitária. Nestes animais, ocorreu disseminação dos parasitos (SOUZA-NETO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2007).

### 1.7.3 – INTERLEUCINA-23

Oppmann e colaboradores (2000) identificaram a p19 e mostraram que quando dimerizada com p40 forma a IL-23. Esta citocina é capaz de interagir com a IL-12R $\beta_1$ , mas falha na interação com IL-12R $\beta_2$ .

IL-23 liga ao complexo IL-23R, composto por IL-12R $\beta_1$  e IL-23R. A interação desta citocina com o receptor, ativa JAK-STAT, JAK2, TYK2 e STAT1, -3, -4 e -5, mas a ativação de STAT4 é menor do que a induzida por IL-12. IL-23R é expresso por células T e NK e o tratamento com anti-IL-12R $\beta_1$  e anti-IL-23R, bloqueou a resposta de células NK a IL-23 e confirma a especificidade da ligação. A principal diferença na sinalização de IL-23R em relação a IL-12R é que IL-23 induz uma menor fosforização de STAT4 do que IL-12. Além disso, existem evidências de que a maior parte da STAT4 induzida por IL-23 tende a formar heterodímero com STAT3, enquanto que tendem a formar homodímeros quando induzida por IL-12 (PARHAM *et al.*, 2002).

Células endoteliais, células dendríticas, macrófagos e linfócitos T produzem IL-23 (OPPMANN *et al.*, 2000; PARHAM *et al.*, 2002). Esta citocina desempenha algumas funções semelhantes a IL-12, mas sua capacidade em estimular linfócitos T de memória, é uma das funções específicas de IL-23. Linfócitos T não primados expressaram baixos níveis de IL-12R $\beta_2$ , proliferaram e produziram IFN- $\gamma$  quando estimuladas com IL-12, mas não com IL-23. Por outro lado, células T de memória expressaram IL-23R e proliferaram em resposta a IL-23, mas não a IL-12 (OPPMANN *et al.*, 2000; PARHAM *et al.*, 2002).

Dentre as principais funções biológicas de IL-23, está a sua capacidade de induzir resposta imune celular. Belladonna e colaboradores (2002) mostraram que IL-23 atua sobre células dendríticas induzindo a produção de IL-12p70, estimulando a apresentação de antígenos e desenvolvimento de resposta imune celular tardia a antígenos sintéticos *in vivo*.

Camundongos transgênicos que superexpressaram p19 desenvolveram inflamação sistêmica, caracterizada pela infiltração de linfócitos e macrófagos. Estes animais apresentaram elevadas concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 no soro, foram neutrofilicos, anêmicos, e inférteis. Transferência de células hematopoiéticas destes animais para animais recipientes normais induziu o mesmo fenótipo (WIEKOWSKI *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de resistência a diversos patógenos quando, determinada pela dependência de p40 e independência de p35, sugerem indiretamente a importância de IL-23 (DECKEN *et al.*, 1998; CARR *et al.*, 1999; HOLSCHER *et al.*, 2001; LEHMANN *et al.*, 2001; ELKINS *et al.*, 2002; LIEBERMAN *et al.*, 2004). Camundongos deficientes na produção de p35 infectados com *Francisella tularensis* foram capazes de controlar a infecção, enquanto que os deficientes na produção de p40 desenvolveram infecção crônica, com alta carga parasitária (ELKINS *et al.*, 2002). Por outro lado, o tratamento de camundongos deficientes na produção de p40, susceptíveis, com IL-23 aumentou a resistência destes animais a *Toxoplasma gondii* (LIEBERMAN *et al.*, 2004). Resistência a infecção ou menor susceptibilidade em camundongos deficientes na produção de p35 a *Salmonella enteritidis*, *Mycobacterium tuberculosis* ou a cytomegalovírus, foi relacionada com a capacidade destes animais em desenvolverem resposta imune celular do tipo Th1, com elevada produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (CARR *et al.*, 1999; HOLSCHER *et al.*, 2001; LEHMANN *et al.*, 2001).

Indiretamente, IL-23 é capaz de induzir inflamação local por meio de sua capacidade em estimular células T ativadas ou de memória a produzirem elevados níveis de IL-17 (AGGARWAL *et al.*, 2003). IL-17 é uma citocina envolvida com a indução de imune inata, inflamação e imunidade contra patógenos. Esta citocina pode estimular células epiteliais, endoteliais e macrófagos a produzirem um perfil de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que atraem neutrófilos e, desta forma, induzindo inflamação local. Células dendríticas estimuladas *in vitro* com antígenos de *Klebsiella pneumoniae* produziram IL-23, o que

induziu a produção de IL-17 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (HAPPEL *et al.*, 2003). Ye e colaboradores (2001, 2001) mostraram que a infecção de camundongos C57BL/6 com *Klebsiella pneumoniae* induziu a produção de IL-17. A Produção de elevados níveis desta citocina estimulou a produção local de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2, G-CSF acompanhado por um aumento no recrutamento de neutrófilos, controle da carga bacilar e aumento da sobrevivência dos animais. Quando incapazes de produzir IL-17 ou quando não expressam o receptor para esta citocina, estes animais apresentaram níveis reduzidos de MIP-2 e G-CSF com menor recrutamento de neutrófilos, aumento da carga parasitária acompanhada de disseminação dos bacilos e morte dos animais. Wu e colaboradores (2007) mostraram que durante os momentos iniciais da infecção com *Mycoplasma pneumoniae* camundongos BALB/c produziram elevados níveis pulmonares de IL-23 e IL-17. O bloqueio de IL-23p19 apenas ou o bloqueio de IL-23p19 + p40 levou a redução dos níveis de IL-17, menor infiltração de neutrófilos, menor atividade da mieloperoxidase e aumento da carga bacilar.

Na infecção com *Leishmania* pouco se conhece sobre a participação de IL-23. Trabalhos realizados comparando a infecção de camundongos deficientes em p35 com os deficientes em p40 mostraram que ambos foram susceptíveis à infecção (MATTNER *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 2002; MURRAY *et al.*, 2006). Contudo, os camundongos deficientes em p40, quando infectados com *L. donovani* apresentaram uma maior carga parasitária dos que os deficientes em p35 (MURRAY *et al.*, 2006). Estes dados sugerem que mecanismos mediados por p40, possivelmente, via IL-23 sejam fundamentais para o controle da infecção.

Camundongos BALB/c que são deficientes em p35 produziram IL-23, mas não IL-12. Quando infectados com *L. braziliensis*, estes animais mostram-se incapazes de controlar a infecção e desenvolveram lesões que aumentaram. Entretanto, nestes animais as lesões são menores do que as desenvolvidas por camundongos p35/p40<sup>-/-</sup> (ROCHA *et al.*, 2007).

A importância de p40 é bem conhecida na infecção por *L. major*, mas tem sido pouco

investigada na infecção por *L. braziliensis*. Até o momento, poucos trabalhos foram realizados com o objetivo de estudar o efeito da ausência desta citocina na infecção por esta espécie de parasito. Foi demonstrado que p35 e p40 são necessárias para o controle da infecção (SOUZA-NETO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2007). Contudo, os trabalhos desenvolvidos utilizaram o modelo convencional de infecção subcutânea na pata com altas doses de parasitos e não evidenciaram aspectos morfológicos da resposta inflamatória, associados com resistência ou susceptibilidade. Desta forma, a participação de p40 na infecção por *L. braziliensis* não foi avaliada num modelo experimental próximo da infecção natural e, além disso, não foram investigados aspectos histopatológicos dos sítios inflamatórios nos camundongos selvagens e deficientes em p40, que pudessem esclarecer quais eventos induzidos por esta molécula são importantes para o controle da infecção.

A hipótese do presente trabalho é que a ausência de p40 altera o perfil da resposta inflamatória à *Leishmania braziliensis* e torna camundongos C57BL/6 susceptíveis à infecção por via intradérmica.

Avaliou-se comparativamente em camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes na produção de p40 o desenvolvimento de lesões, a carga parasitária, a ocorrência de disseminação e a resposta inflamatória nas orelhas, linfonodos, baços e fígados.

## **2 – OBJETIVOS**

---

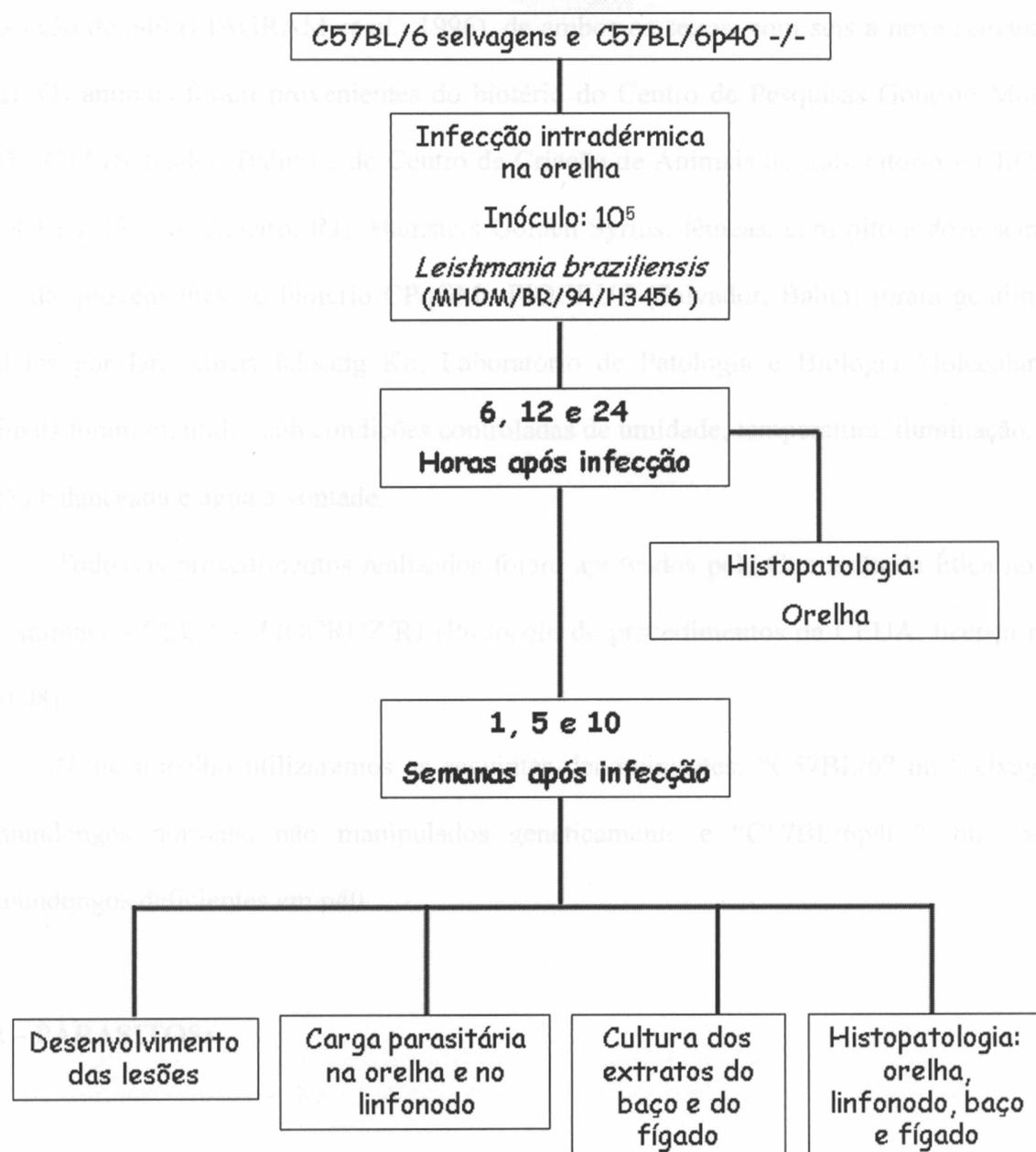
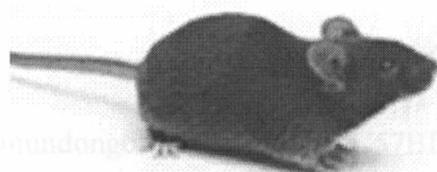
### **2.1 – OBJETIVO GERAL**

Avaliar a participação p40 no curso da infecção de camundongos C57BL/6 por *Leishmania braziliensis*, utilizando o modelo de infecção intradérmica em orelha.

### **2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o desenvolvimento de lesões em resposta à infecção causada por *L. braziliensis* em camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes na produção de p40.
- Avaliar a carga parasitária na orelha e no linfonodo de drenagem.
- Avaliar a ocorrência de disseminação dos parasitos para baço e fígado.
- Analisar o padrão morfológico da resposta inflamatória nas orelhas infectadas nos linfonodos de drenagem, nos baços e fígados.

## 3 – DESENHO EXPERIMENTAL



*Leishmania (Viannia) braziliensis*, MHOM/BR/94/H3456, foi isolada de aspirado de linfonodo de um paciente com leishmaniose cutânea localizada, do Estado do Ceará. Esta cepa foi identificada a partir da amplificação de uma região do gene da *G6PD* por PCR (ROB) (10).

## 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 – ANIMAIS:

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, selvagens e deficientes na produção de p40 (MAGRAM *et al.*, 1996), de ambos os sexos, com seis a nove semanas de vida. Os animais foram provenientes do biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ (Salvador, Bahia) e do Centro de Criação de Animais de Laboratório – CECAL - FIOCRUZ (Rio de Janeiro, RJ). Hamsters Golden Syrius, fêmeas, com oito a doze semanas de vida, provenientes do biotério CPqGM– FIOCRUZ (Salvador, Bahia) foram gentilmente cedidos por Dr. Albert Icksang Ko, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular. Os animais foram mantidos sob condições controladas de umidade, temperatura, iluminação, com ração balanceada e água à vontade.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – FIOCRUZ/RJ (Protocolo de procedimentos da CEUA, licença nº L-060/08).

Neste trabalho utilizaremos as seguintes denominações: “C57BL/6” ou “selvagens” camundongos normais, não manipulados geneticamente e “C57BL/6p40<sup>-/-</sup>” ou “p40<sup>-/-</sup>” camundongos deficientes em p40.

### 4.2 – PARASITOS:

*Leishmania (Viannia) braziliensis*, MHOM/BR/94/H3456, foi isolada de aspirado de linfonodo de um paciente com leishmaniose cutânea localizada do Estado do Ceará. Esta cepa foi identificada a partir da amplificação de uma região do gene da G6PD por PCR (ROSATO,

2004). A virulência foi mantida em ciclos de infecção e isolamento a partir do linfonodo poplíteo de hamsters Golden Syrius infectados. Os parasitos foram cultivados até a sexta passagem, em meio de cultura Schneider's (SIGMA), suplementado com 20% de soro bovino fetal (GIBCO) e 0,05 mg/mL de Gentamicina (SIGMA), a 24 °C.

Suspensões de promastigotas em fase estacionária foram lavadas com solução salina estéril 0,9 % por centrifugação a 1750 x g (3.000 rpm), durante 10 minutos, a 4 °C, 3 vezes. Após lavagem, os parasitos foram ressuspensos em solução salina, passados em seringa com agulha 26 G½ (INJEX) por no máximo 10 vezes para desagregação de rosetas. O número de parasitos foi estimado utilizando-se câmara de Neubauer (BOECO), em microscópio invertido (Olympus). Após contagem, a concentração de parasitos foi ajustada para 10<sup>5</sup> promastigotas em volume de 10 µL.

### **4.3 – INFECÇÃO INTRADÉRMICA:**

Camundongos C57BL/6 selvagens e C57BL/6p40<sup>-/-</sup> foram anestesiados com solução de Ketamina em combinação com Xilasina (Agener), 100 e 10 mg/Kg, respectivamente, por via intraperitoneal, utilizando agulha 22 G 1<sup>1/4</sup> (BD). Os animais foram inoculados na derme da orelha direita com 10<sup>5</sup> promastigotas (volume de 10 µL) utilizando-se seringa de precisão (HAMILTON) e agulha ultra-fina 30 G½ (BD). Como controle da infecção, camundongos selvagens receberam na orelha o mesmo volume de solução salina estéril.

#### **Grupos experimentais:**

- 1 – C57BL/6 selvagens injetados com salina
- 2 – C57BL/6 selvagens infectados por 10<sup>5</sup> promastigotas de *L. braziliensis*
- 3 – C57BL/6p40<sup>-/-</sup> infectados por 10<sup>5</sup> promastigotas de *L. braziliensis*

Os camundongos foram eutanasiados em atmosfera de CO<sub>2</sub>, 6, 12, 24 horas, 1, 5 e 10 semanas após a infecção e obtidas as orelhas infectadas. Os linfonodos retro-auriculares, baços e fígados foram obtidos com 1, 5 e 10 semanas. Estes órgãos foram pesados com auxílio de uma balança de precisão e, posteriormente, utilizados para diferentes análises.

#### **4.4 – TAMANHO DAS LESÕES:**

Para acompanhamento do tamanho das lesões, a espessura das orelhas infectadas e não infectadas foram medidas semanalmente, até a 10ª semana de infecção, em grupos de 12 animais, com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo). O tamanho das lesões foi expresso pela diferença da espessura em mm, das orelhas infectadas em relação às orelhas contralaterais não infectadas.

#### **4.5 – CARGA PARASITÁRIA:**

Para avaliar a intensidade do parasitismo, diluição limitante (TITUS *et al.*, 1985) foi realizada a partir de macerados das orelhas e dos linfonodos retro-auriculares dos camundongos selvagens e dos deficientes em p40 (6 animais/grupo), 1, 5 e 10 semanas após a infecção. Os órgãos foram macerados em 1,0 mL de meio de cultura Schneider's (SIGMA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (GIBCO), 0,05 mg/mL de Gentamicina (SIGMA), 5 unidades/mL de Penicilina (SIGMA) e 5,0 µg de Streptomicina (SIGMA). As suspensões foram submetidas a diluições seriadas (8-14 diluições), das quais foram plaqueadas oito replicatas (100 µL cada) em placas de 96 poços contendo 35 µL meio NNN (Nichols, Novy e Mc Neal) suplementado com 35% de sangue de ovino desfibrinado. O

número de parasitos viáveis foi determinado considerando-se a máxima diluição na qual foram encontrados (TAVARES, 2006), após 7 a 21 dias de incubação a 24 °C. Os valores da carga parasitária obtidos foram ajustados pelo peso dos órgãos, sendo expressos em número de parasitos por miligrama (mg) de tecido.

#### **4.6 – DISSEMINAÇÃO:**

Para avaliar a ocorrência de disseminação de parasitos, após 1, 5 e 10 semanas de infecção, os baços e fígados retirados dos animais infectados (4 animais/grupo) foram macerados em 1,0 mL de meio de cultura Schneider's (SIGMA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (GIBCO), 0,05 mg/mL de Gentamicina (SIGMA), 5 unidades/mL de Penicilina (SIGMA) e 5,0 µg de Streptomicina (SIGMA). As suspensões obtidas foram submetidas a duas diluições seriadas (1/10), as quais foram plaqueadas em triplicatas em placas de 24 poços contendo 350 µL meio NNN. Após 7 a 21 dias de incubação a 24 °C, as placas foram analisadas com auxílio de um microscópio invertido (Olympus) para verificação da presença de formas promastigotas dos parasitos.

#### **4.7 – ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA:**

O aspectos qualitativos das lesões e semi-quantitativos dos tipos celulares presentes nos infiltrados inflamatórios, foram analisados em 3 animais de cada grupo, a partir de cortes histológicos de orelhas, 6, 12 e 24 horas, 1, 5 e 10 semanas após a infecção e dos linfonodos retro-auriculares, baços e fígados, 1, 5 e 10 semanas após a infecção. Os órgãos foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas, e posteriormente, mantidos em álcool 70% até o

processamento. Após fixação, as amostras foram incluídas em parafina. Secções de 3-5  $\mu\text{m}$  foram colocadas em lâminas de vidro e coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E) e cobertas com lamínulas. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica. Foram avaliados: edema, congestão vascular, vasodilatação e infiltração inflamatória. As alterações foram graduadas como ausentes, discretas, moderadas ou intensas. Em relação ao infiltrado inflamatório, além de intensidade, foi avaliada semi-quantitativamente a composição fenotípica das células inflamatórias, considerando-as como linfócitos, macrófagos, plasmócitos e granulócitos neutrófilos. Foi avaliada a ocorrência de granulomas, necrose de coagulação e necrose fibrinóide. A presença de parasitos em células inflamatórias foi avaliada em cortes histológicos corados pelo H&E.

#### **4.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA:**

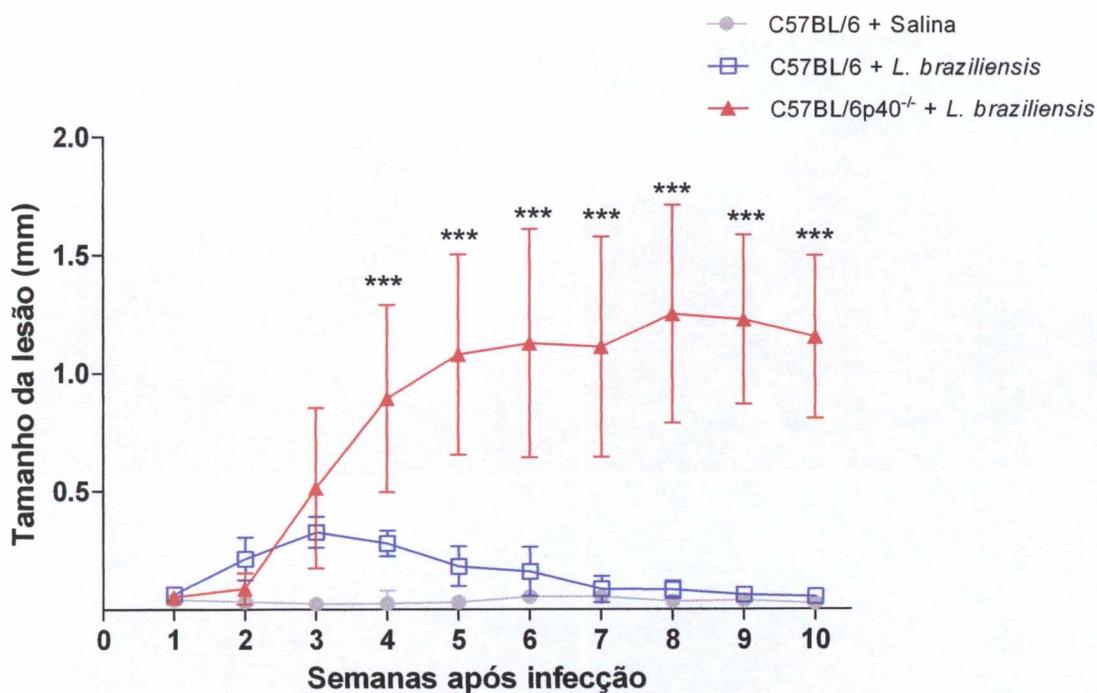
Todos os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes com grupos compostos por 3 a 12 animais. Para a detecção de diferenças estatisticamente significantes entre dados de dois grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para a detecção de diferenças entre dados de três ou mais grupos, foi utilizado o teste paramétrico One-Way ANOVA e o pós-teste de Tukey ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunns. O programa GraphPad Prism versão 5.0 (2007) foi utilizado para realização das análises e construção do gráficos.

## 5 – RESULTADOS

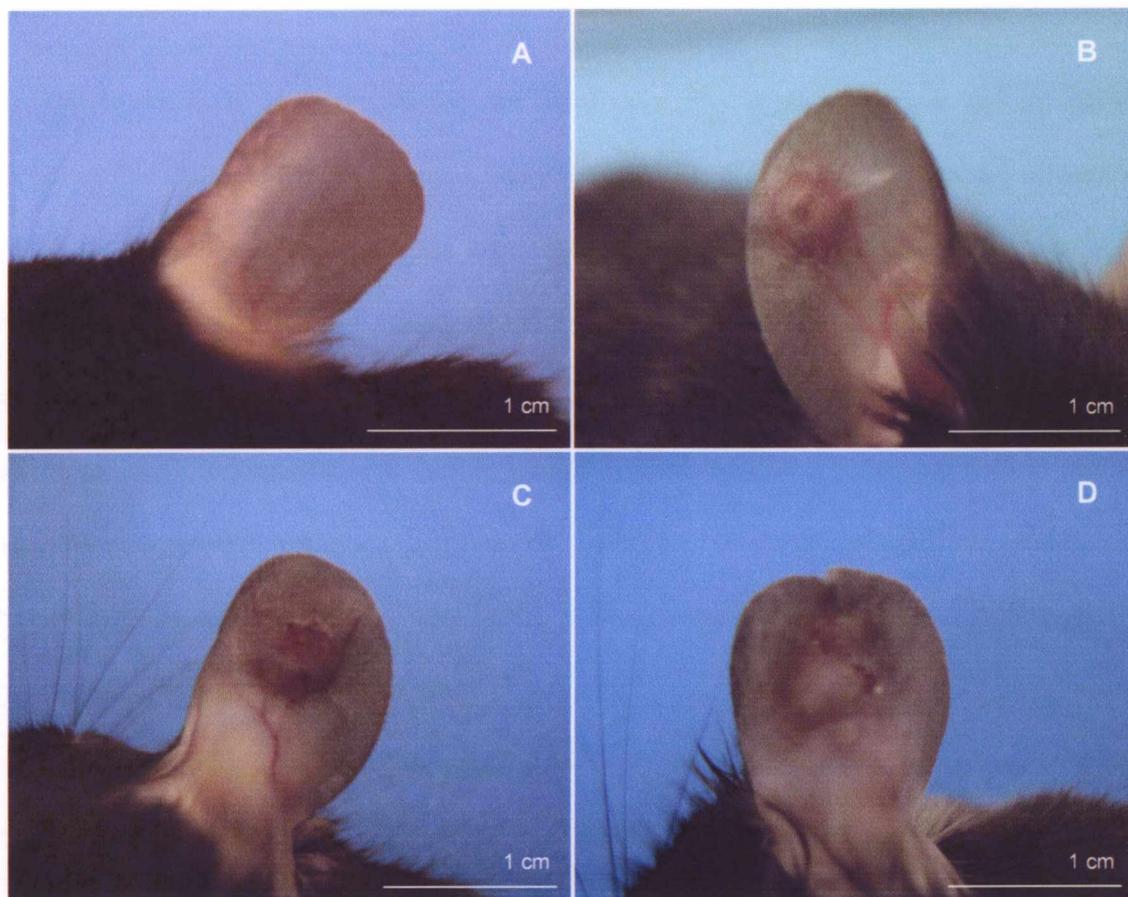
---

### 5.1 – DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES

O tamanho das lesões causadas por *L. braziliensis* em camundongos C57BL/6 e em C57BL/6p40<sup>-/-</sup> foi monitorado até a 10<sup>a</sup> semana de infecção. Observou-se que o curso nestes dois grupos foi distinto (Figura 03). Na 2<sup>a</sup> semana de infecção, as lesões foram maiores nos animais selvagens, em média 0,21 mm, quando comparadas com as lesões dos animais deficientes em p40, 0,08 mm. Contudo, estas diferenças não foram estatisticamente significantes. A partir da 4<sup>a</sup> semana, as diferenças tornaram-se evidentes. Camundongos C57BL/6 desenvolveram lesões pequenas, que atingiram o seu máximo na 3<sup>a</sup> semana de infecção, 0,32 mm, regredindo em seguida, de modo que na 7<sup>a</sup> semana, as lesões diminuíram, apresentando em média 0,04 mm, mantendo-se pequenas até a 10<sup>a</sup> semana, 0,05 mm. Por outro lado, em camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> as lesões aumentaram de tamanho e na 4<sup>a</sup> semana, atingiram 0,89 mm. Neste grupo, as lesões atingiram seu desenvolvimento máximo na 8<sup>a</sup> semana, com 1,29 mm, mantendo-se até a 10<sup>a</sup> semana, 1,15 mm. As lesões nos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> caracterizaram-se por uma pápula frequentemente não ulcerada (Figura 04, B). Houve ulceração em 2 de um grupo de 12 animais, a partir da 5<sup>a</sup> semana de infecção. Nestes casos, as lesões apresentaram bordas elevadas e fundo plano granuloso, (Figura 04, C e D). A injeção de solução salina na orelha dos camundongos C57BL/6 não induziu o desenvolvimento de lesão (Figura 03).



**Figura 03.** Tamanho das lesões nos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup>, ambos infectados com 10<sup>5</sup> promastigotas de *L. braziliensis*. O tamanho das lesões foi monitorado semanalmente, até a 10 semanas após a infecção, por meio da medida da diferença em milímetros (mm) da espessura das orelhas infectadas e contralaterais não infectadas. Os resultados são mostrados em média ± desvio padrão da medida de 12 animais por grupo. O teste estatístico One-Way ANOVA e o pós-teste de Tukey's foram utilizados na detecção de diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos. Asteriscos indicam diferença entre C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup> infectados. \*\*\* significa p<0,0001. Os resultados mostrados são representativos de três experimentos.

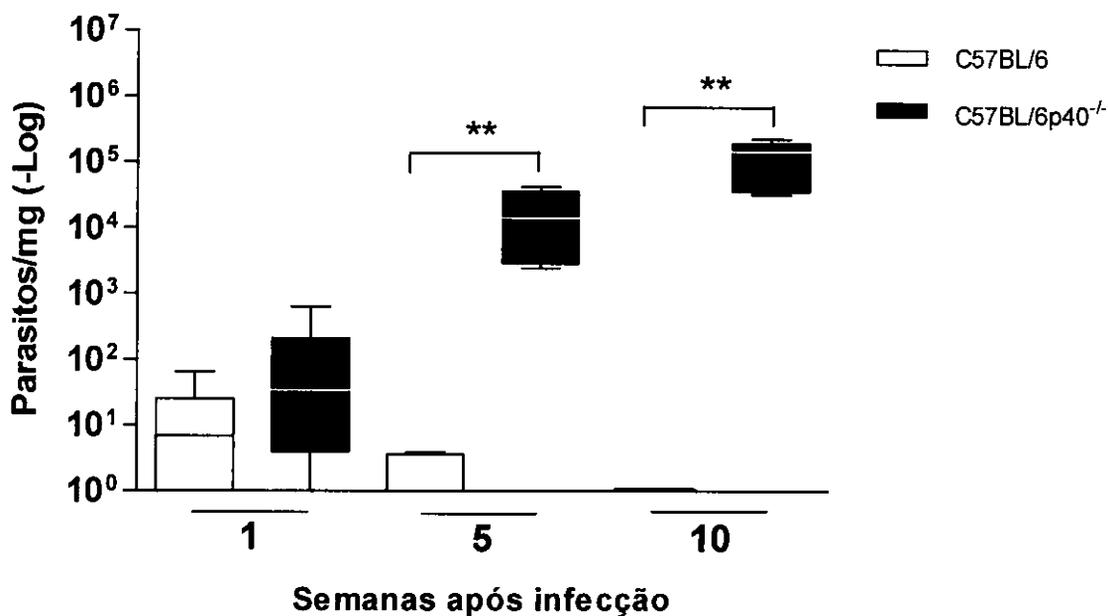


**Figura 04. Aspecto das lesões nos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup>.** Após a primeira semana de infecção com  $10^5$  promastigotas de *L. braziliensis*, não foi observada lesão macroscópica aparente (A). Lesão nodular sem ulceração observada a partir da terceira semana de infecção (B). Lesão ulcerada com bordas elevadas e fundo plano granuloso observada após cinco (C) e dez (D) semanas de infecção.

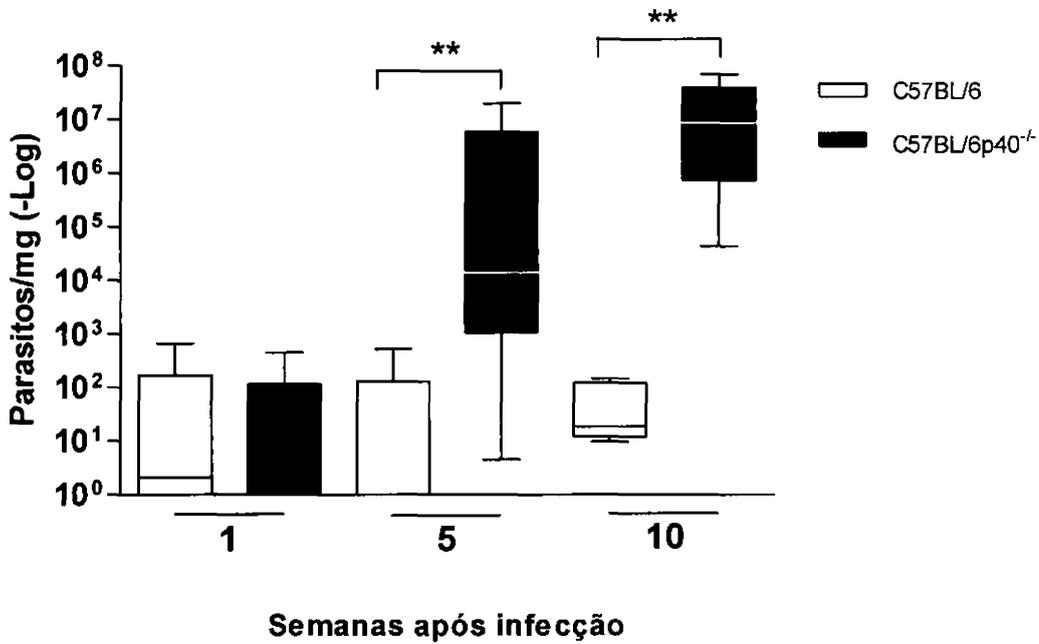
## 5.2 – CARGA PARASITÁRIA NA ORELHA E NO LINFONODO

A intensidade do parasitismo foi analisada nas orelhas e nos linfonodos retro-auriculares dos animais C57BL/6 e dos C57BL/6p40<sup>-/-</sup>, 1, 5 e 10 semanas após a infecção, por diluição limitante. Uma semana após a infecção, a carga parasitária nas orelhas dos animais selvagens atingiu em média 15,08 parasitos por mg de tecido. Na quinta semana de infecção, a carga reduziu para 1,233 parasitos/mg e na décima semana não foram detectados parasitos nas culturas. Diferentemente, em camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> a carga parasitária aumentou progressivamente. Na primeira semana de infecção, a carga atingiu em média 129,3 parasitos/mg, na quinta semana  $1,82 \times 10^4$  parasitos/mg, e na décima semana  $1,21 \times 10^5$  parasitos/mg (Figura 05).

Nos linfonodos retro-auriculares, uma semana após a infecção, foi observado que camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> apresentaram uma carga parasitária em torno de 76,52 parasitos/mg. Nestes animais, a carga aumentou progressivamente. Na quinta semana de infecção atingiu  $3,59 \times 10^6$  parasitos/mg e na décima semana  $1,83 \times 10^7$  parasitos/mg. Em camundongos C57BL/6 os parasitos persistiram, sendo mantida carga parasitária ao final do período analisado. Estes animais apresentaram na primeira semana de infecção 112,20 parasitos/mg, na quinta semana 88,18 parasitos/mg e na décima semana 57,49 parasitos/mg (Figura 06).

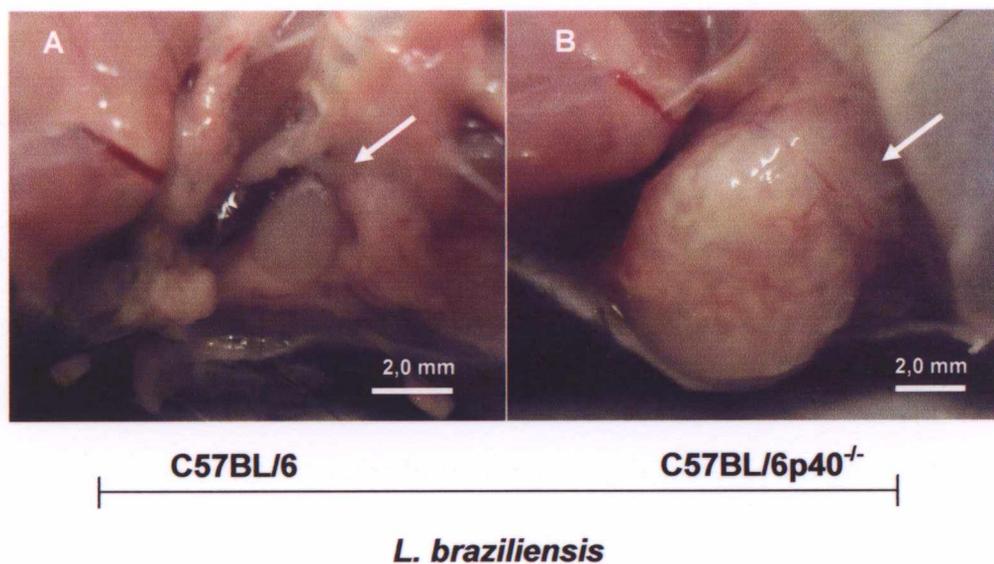


**Figura 05. Carga parasitária nas orelhas dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup>.** Após 1, 5 e 10 semanas de infecção com 10<sup>5</sup> promastigotas de *L. braziliensis*, a quantidade de parasitos no sítio de inoculação foi estimada por diluição limitante em grupos de 6 animais. A carga parasitária está expressa em número de parasitos por miligrama de tecido e é mostrada em Log<sub>10</sub>. Os dados representados no *Box plot* indicam primeiro quartil, mediana, segundo quartil, valor máximo e valor mínimo. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para a detecção de diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos. \*\* significa p<0,01. Os resultados mostrados são representativos de dois experimentos.

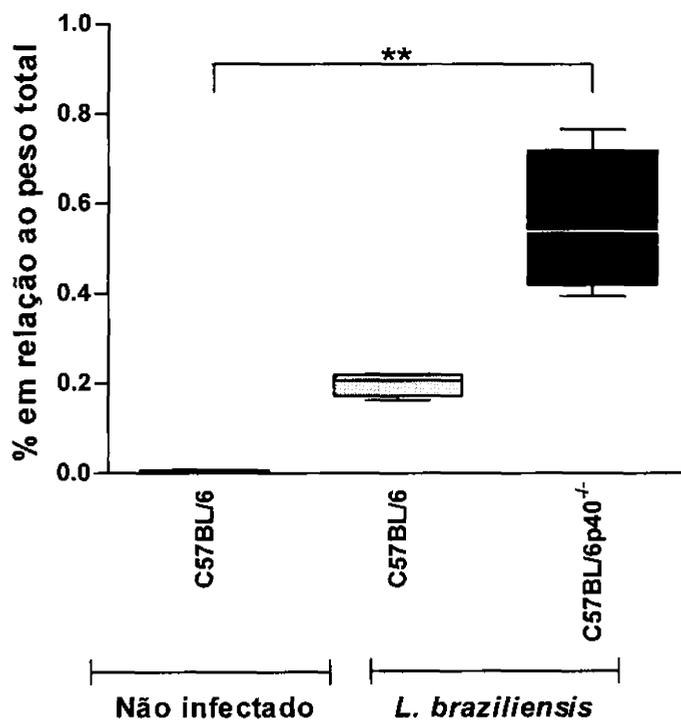


**Figura 06.** Carga parasitária nos linfonodos retro-auriculares dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup>. Após 1, 5 e 10 semanas de infecção com 10<sup>5</sup> promastigotas de *L. braziliensis*, a quantidade de parasitos foi estimada por diluição limitante em grupos de 6 animais. A carga parasitária está expressa em número de parasitos por miligrama de tecido e é mostrada em Log<sub>10</sub>. Os dados representados no *Box plot* indicam primeiro quartil, mediana, segundo quartil, valor máximo e valor mínimo. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para a detecção de diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos. \*\* significa p<0,01. Os resultados mostrados são representativos de dois experimentos.

Camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup> desenvolveram linfadenomegalia após dez semanas de infecção (Figura 07). Em camundongos C57BL/6 não infectados, o linfonodo retro-auricular representou em média 0,0027 % do peso total destes animais, enquanto que em camundongos C57BL/6 infectados, o linfonodo representou 0,1995 %. Nos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> infectados o aumento foi mais expressivo, e o linfonodo representou 0,5587 % do peso total destes animais (Figura 08). Nos camundongos C57BL/6, este aumento foi equivalente a 73 vezes o peso do linfonodo, em relação a camundongos não infectados, e nos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> este aumento foi equivalente a 206 vezes.



**Figura 07.** Aspecto do linfonodo retro-auricular dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup>. Após 10 semanas de infecção com 10<sup>5</sup> promastigotas de *L. braziliensis*, foi observado o desenvolvimento de linfadenomegalia nos camundongos selvagens (A) e nos deficientes na produção de p40 (B).



**Figura 08. Linfadenomegalia nos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup>.** O desenvolvimento de linfadenomegalia observada nos camundongos selvagens e deficientes em p40, ambos infectados com  $10^5$  promastigotas de *L. braziliensis*, foi avaliado a partir do peso do linfonodo retro-auricular obtido 10 semanas após infecção em grupos de 4 animais. O peso do órgão foi aferido com auxílio de uma balança de precisão e foi ajustado pelo peso de cada animal, sendo mostrado em percentagem do peso do total. Como controle foram utilizados camundongos C57BL/6 não infectados. Os dados representados no *Box plot* indicam primeiro quartil, mediana, segundo quartil, valor máximo e valor mínimo. O teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn's foram utilizados para a detecção de diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos. \*\* significa  $p < 0,01$ . Os resultados mostrados são representativos de três experimentos.

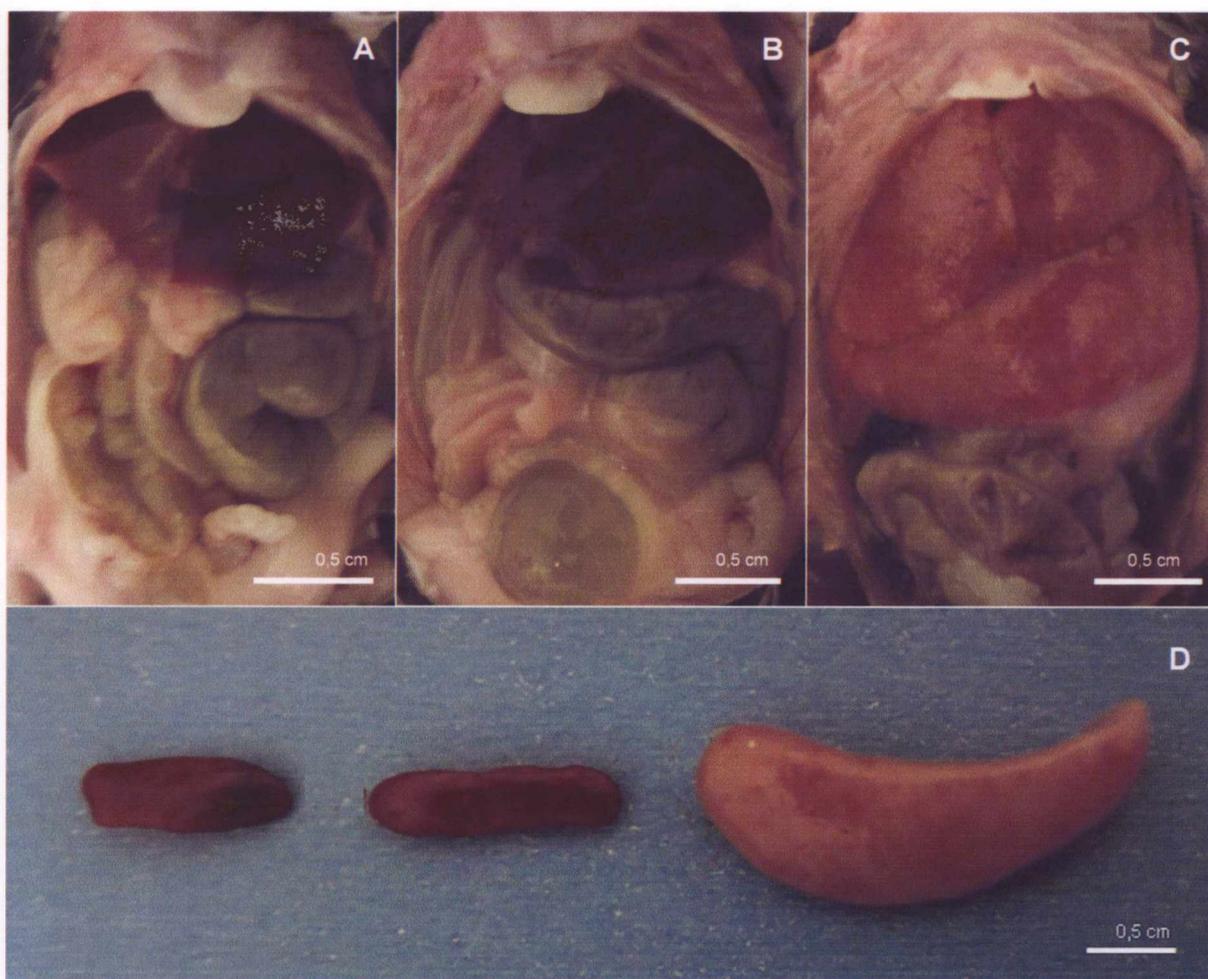
### 5.3 – VISCERALIZAÇÃO DA INFECÇÃO

A presença de parasitos no baço e no fígado dos camundongos C57BL/6 e dos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> foi analisada, 1, 5 e 10 semanas após a infecção. Nos camundongos C57BL/6 não ocorreu disseminação dos parasitos para estes órgãos. Por outro lado, foram encontrados parasitos no baço e no fígado de todos os camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> analisados, na quinta e na décima semana de infecção (Tabela 01).

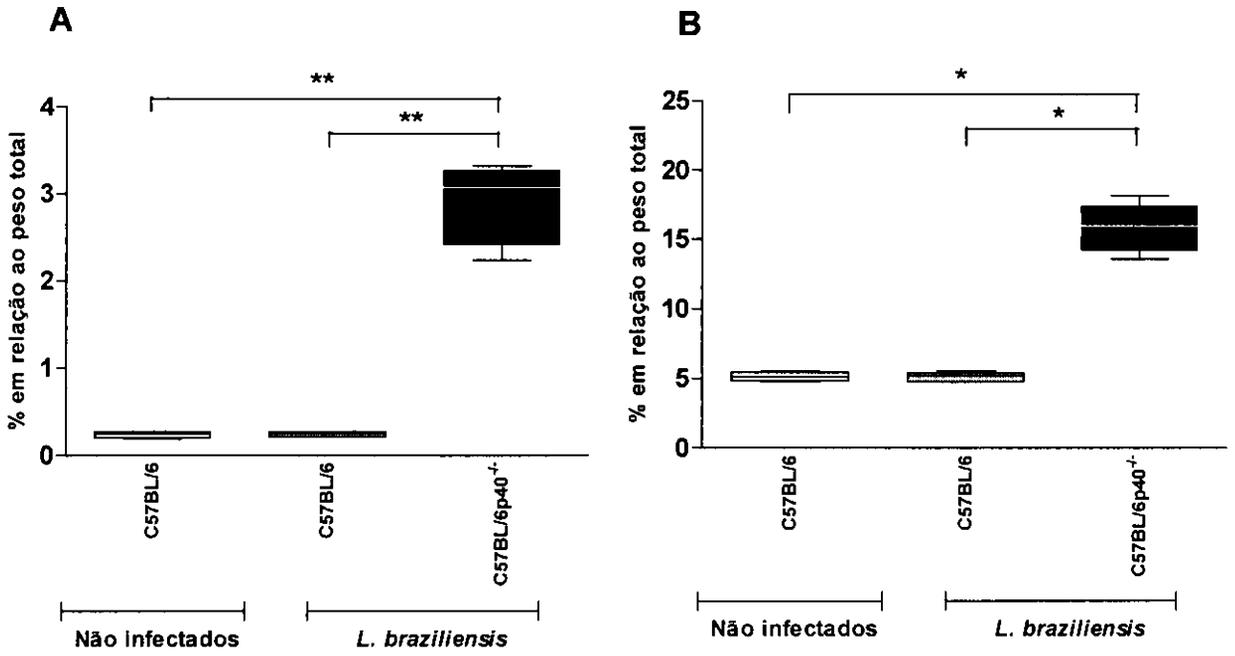
**Tabela 01.** Disseminação de *L. braziliensis* na infecção de camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup>.

		Nº de culturas positivas / Nº de animais		
C57BL/6	Órgão	Semanas após a infecção		
		1	5	10
Selvagens	Baço	0/4	0/4	0/4
	Fígado	0/4	0/4	0/4
p40 <sup>-/-</sup>	Baço	0/4	4/4	4/4
	Fígado	0/4	4/4	4/4

Camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> desenvolveram hepatomegalia e esplenomegalia em resposta à infecção por *L. braziliensis* (Figura 09). Com 10 semanas de infecção, o baço destes animais representou em média 2,8930 % do peso total e o fígado 15,84 %, o que correspondeu a um aumento de 12 vezes o peso do baço e 3 vezes o peso do fígado em relação a camundongos C57BL/6 com o mesmo período de infecção (Figura 10). Camundongos C57BL/6 não apresentaram sinais de alterações nestes órgãos em resposta a infecção.



**Figura 09.** Aspecto do fígado e do baço dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup>. Após 10 semanas de infecção com 10<sup>5</sup> promastigotas de *L. braziliensis*, foram observadas alterações do aspecto macroscópico do fígado e do baço dos camundongos deficientes em p40. Fotografias representativas do fígado de camundongos C57BL/6 não infectados (A), C57BL/6 (B) e C57BL/6p40<sup>-/-</sup> (C). Em (D), é mostrado o aspecto do baço nestes grupos, da esquerda para a direita: camundongos não infectados, selvagens e deficientes em p40.



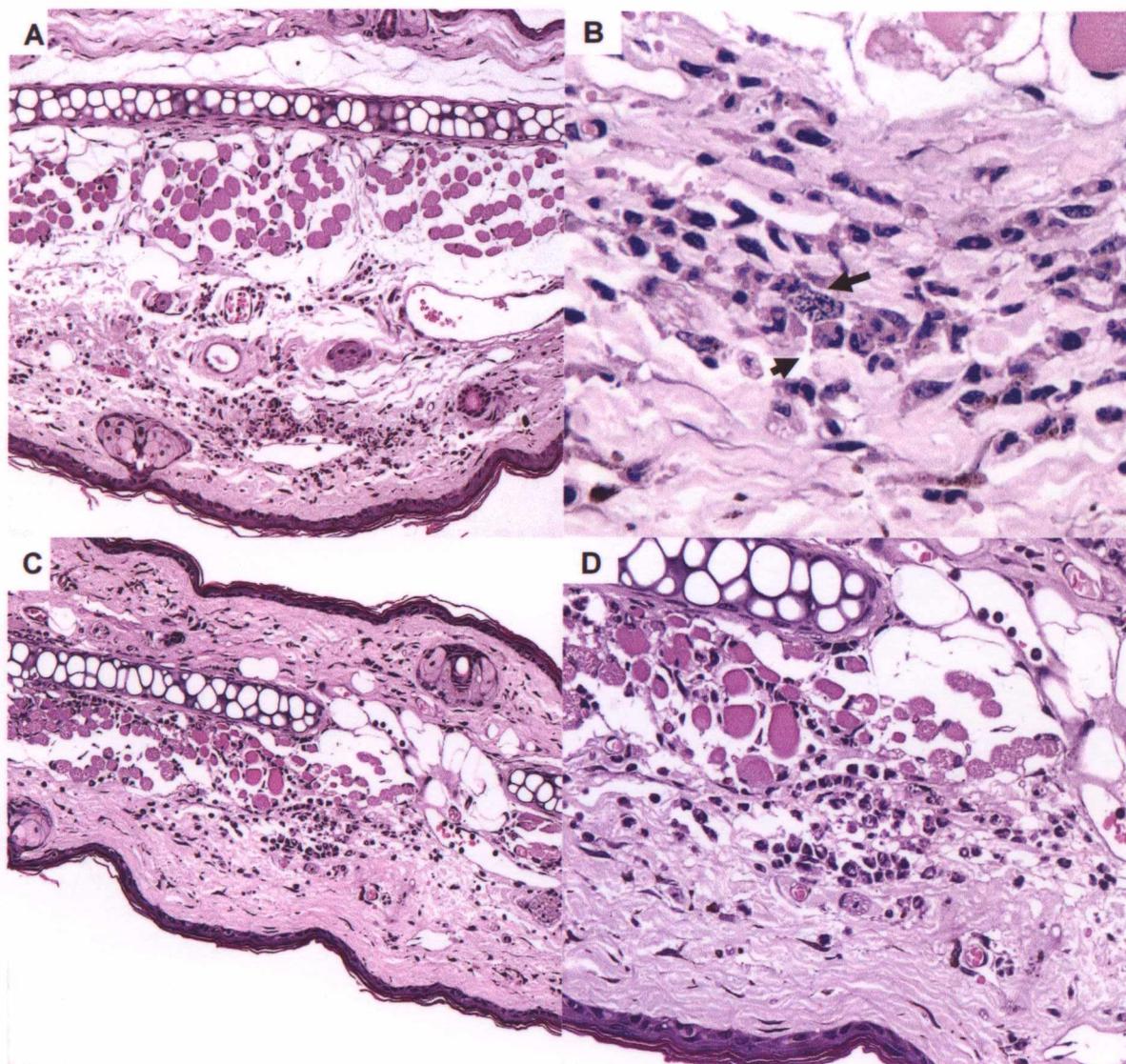
**Figura 10. Hepatomegalia e esplenomegalia em camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup>.** Após 10 semanas de infecção com  $10^5$  promastigotas de *L. braziliensis*, avaliou-se o desenvolvimento de esplenomegalia (A) e hepatomegalia (B) a partir do peso dos baços e fígados em grupos de 4 animais. O peso dos órgãos foi ajustado em relação ao peso de cada animal e mostrado em porcentagem do peso do total. Como controle foram utilizados camundongos C57BL/6 não infectados. Os dados representados no *Box plot* indicam primeiro quartil, mediana, segundo quartil, valor máximo e valor mínimo. O teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn's foram utilizados para a detecção de diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos. \* significa  $p < 0,05$  \*\* significa  $p < 0,01$ . Os resultados mostrados são representativos de três experimentos.

## 5.4 – RESPOSTA INFLAMATÓRIA

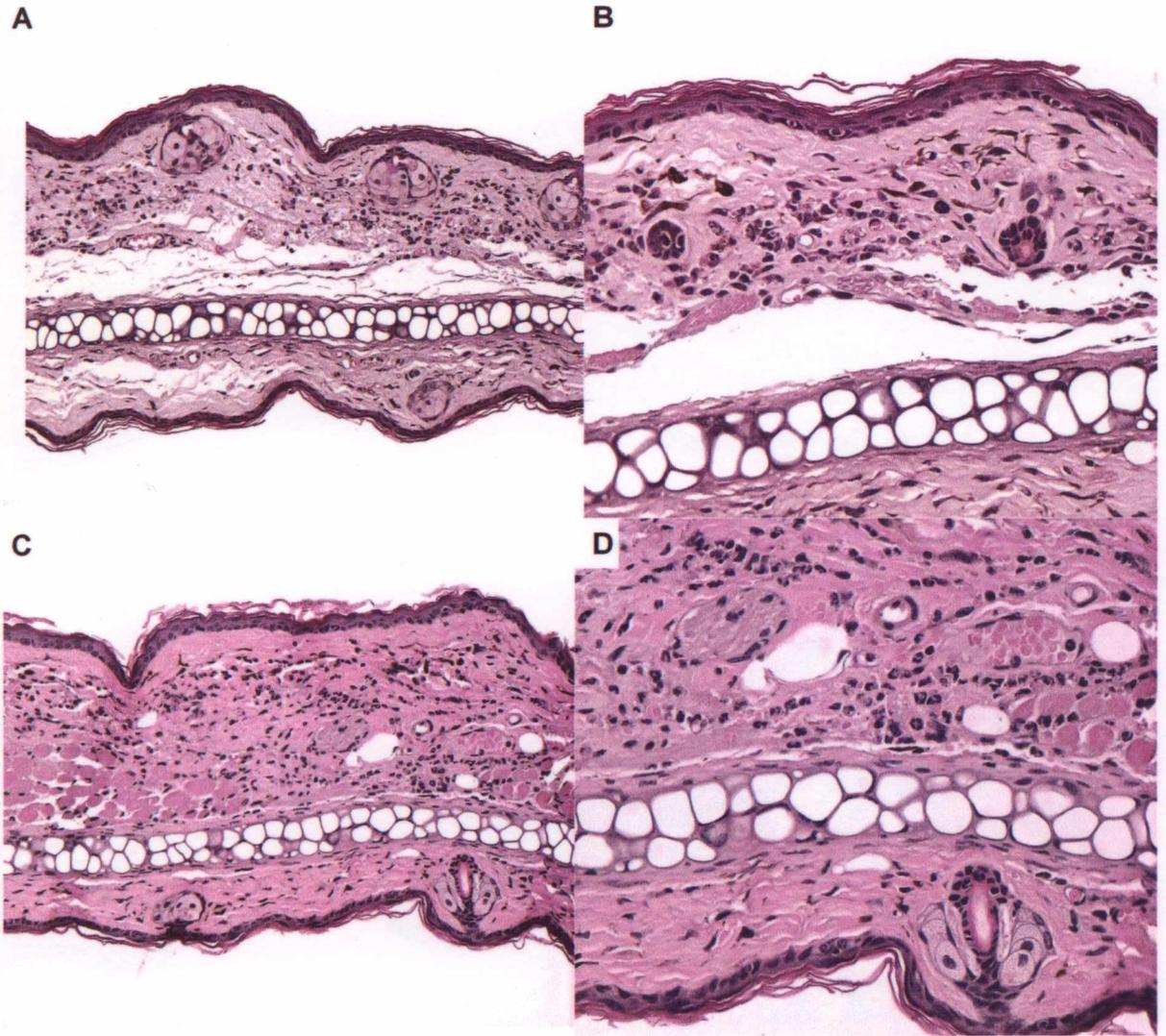
A resposta inflamatória à infecção por *L. braziliensis* em camundongos C57BL/6 selvagens e em deficientes na produção de p40 foi analisada em secções histológicas coradas por H&E, das orelhas infectadas 6, 12, 24 horas, 1, 5 e 10 semanas após infecção e dos linfonodos, baços e fígados 1, 5 e 10 semanas após infecção.

### 5.4.1 – ORELHA:

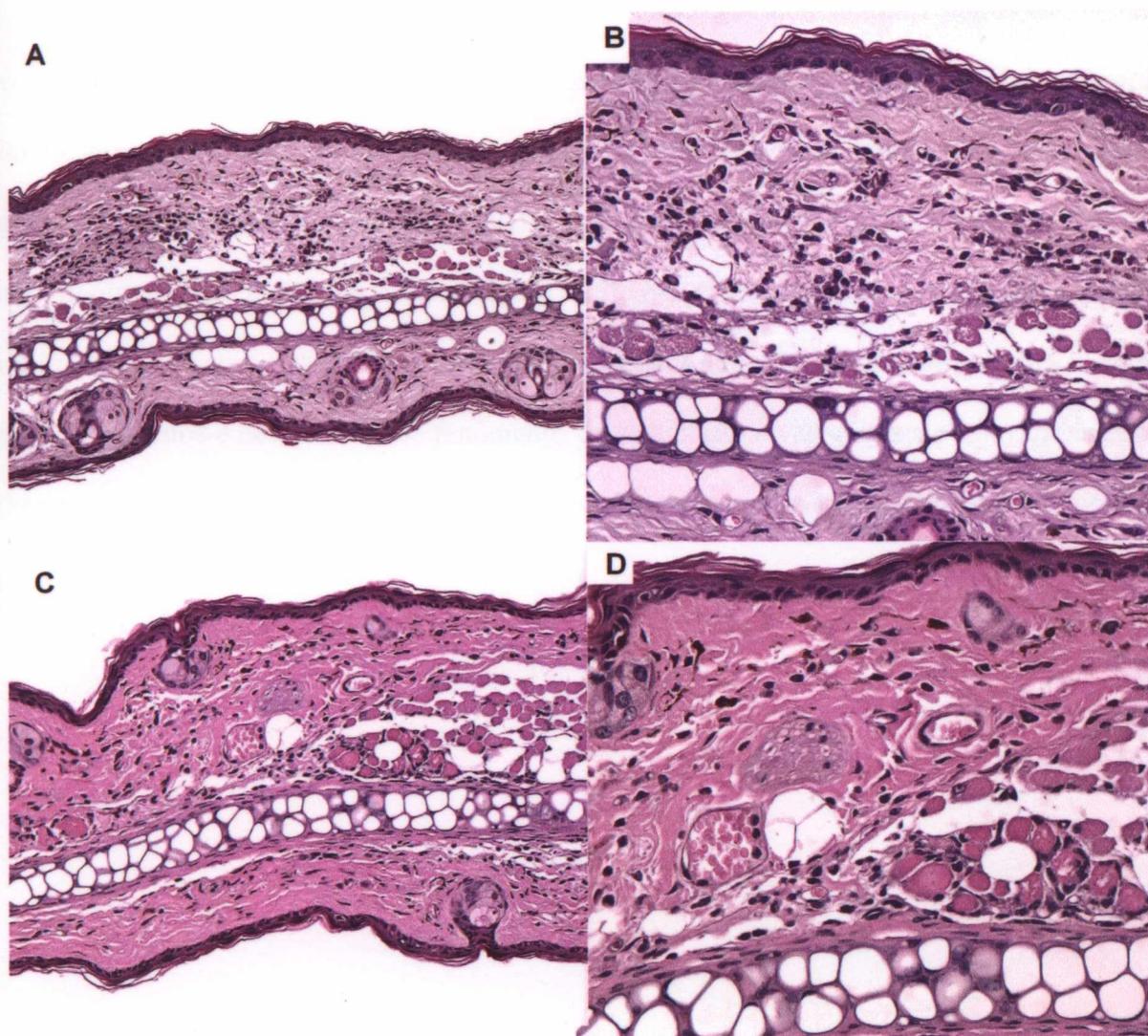
Nas fases iniciais, entre 6 horas e 24 horas, observou-se reação inflamatória aguda discreta caracterizada por dilatação e congestão vasculares, notadamente de vênulas, certo grau de leucoestase com aderência de neutrófilos à parede de vênulas, edema discreto a moderado, e discreta infiltração intersticial de neutrófilos (Figura 11 B-D), de permeio a “debris” celulares. Seis horas após a inoculação, tanto animais selvagens quanto os p40<sup>-/-</sup> mostram processos inflamatórios qualitativamente semelhantes, mas a intensidade da infiltração neutrofilica foi menor nos animais p40<sup>-/-</sup> (Figura 11 A-C). Após 12 horas de inoculação, tanto a natureza quanto a intensidade da inflamação foi semelhante em animais de ambos os grupos (Figura 12 A-D). No ponto de 24 horas após a inoculação, o infiltrado neutrofilico foi menos intenso nos animais p40<sup>-/-</sup> (Figura 13 A-D). Neste ponto, em ambos os grupos foram observados alguns macrófagos infectados no infiltrado inflamatório.



**FIGURA 11. Padrão tecidual na lesão cutânea 6 horas após infecção.** Verificou-se reação inflamatória aguda caracterizada por dilatação, congestão vascular, leucoestase com aderência de neutrófilos à parede de vênulas e edema em ambos os grupos. **A** – C57BL/6: 100x. **B** – C57BL/6; o infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico (indicado) e presença de fragmentos celulares do inóculo e mastócitos degranulados (indicado), 1000x. **C** – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: 100x. **D** – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: 200x.

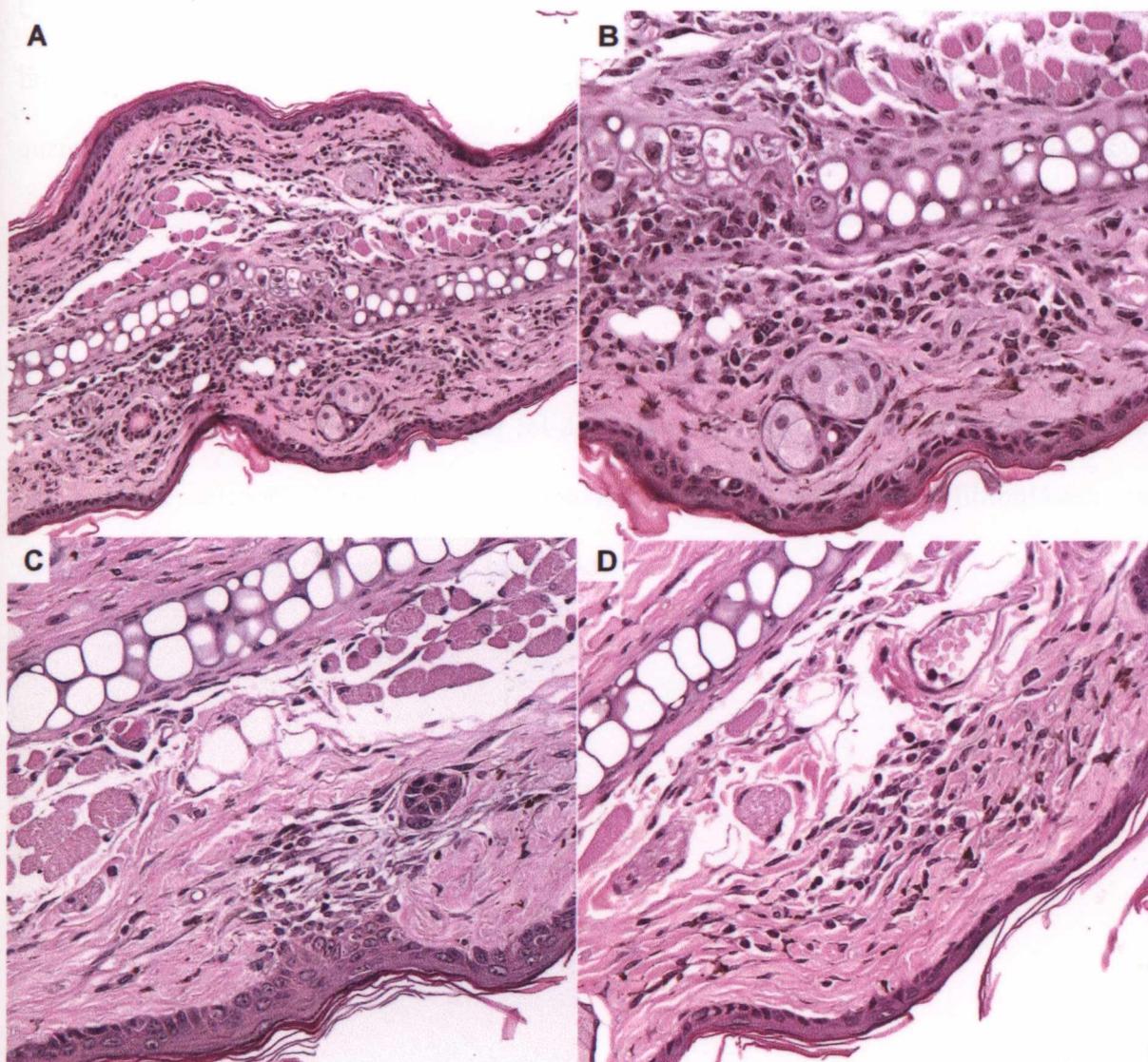


**FIGURA 12. Padrão tecidual na lesão cutânea 12 horas após infecção.** Verificou-se reação inflamatória aguda com intensidades semelhantes em ambos os grupos. **A** – C57BL/6: 100x. **B** – C57BL/6: 200x. **C** – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: 100x. **D** – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: 200x.



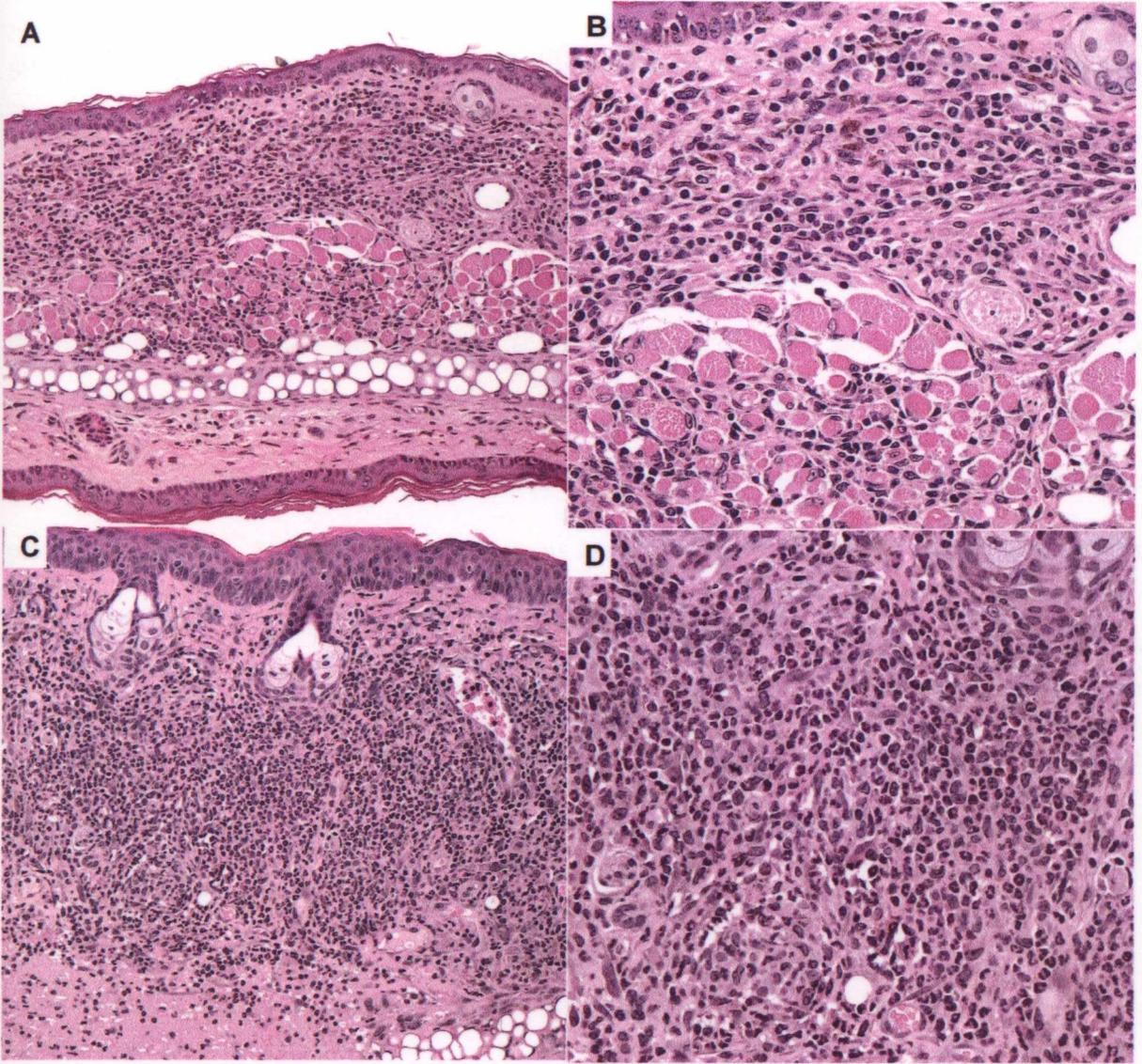
**FIGURA 13. Padrão tecidual na lesão cutânea 24 horas após infecção.** Verificou-se reação inflamatória aguda com infiltrado neutrofílico menos intenso nos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup>. A – C57BL/6: 100x. B – C57BL/6: 200x. C – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: 100x. D – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: 200x.

Após a primeira semana de infecção, observou-se nos animais selvagens edema, vasodilatação e congestão vascular discreta (Figura 14 A). Foi observada infiltração inflamatória mista, discreta a moderada, com predomínio de macrófagos tendo neutrófilos e poucos linfócitos de permeio (Figura 14 B). Algumas poucas amastigotas foram identificadas no citoplasma de macrófagos, em alguns animais. Camundongos p40<sup>-/-</sup> mostraram um infiltrado inflamatório discreto (Figura 14 C), constituído essencialmente por macrófagos, poucos linfócitos e neutrófilos. Os fenômenos de exsudação e vasodilatação estavam ausentes (Figura 14 D). Neste grupo, não foram identificados parasitos nos cortes histológicos corados por H&E.



**FIGURA 14. Padrão tecidual na lesão cutânea 1 semana após infecção. A – C57BL/6:** verificou-se o aumento da intensidade da reação inflamatória nos animais selvagens, 100x. **B – C57BL/6:** infiltrado inflamatório misto com predomínio de macrófagos, neutrófilos e poucos linfócitos, 200x. **C – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>:** reação inflamatória discreta, 200x. **D – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>:** infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos. Poucos neutrófilos foram observados, 200x.

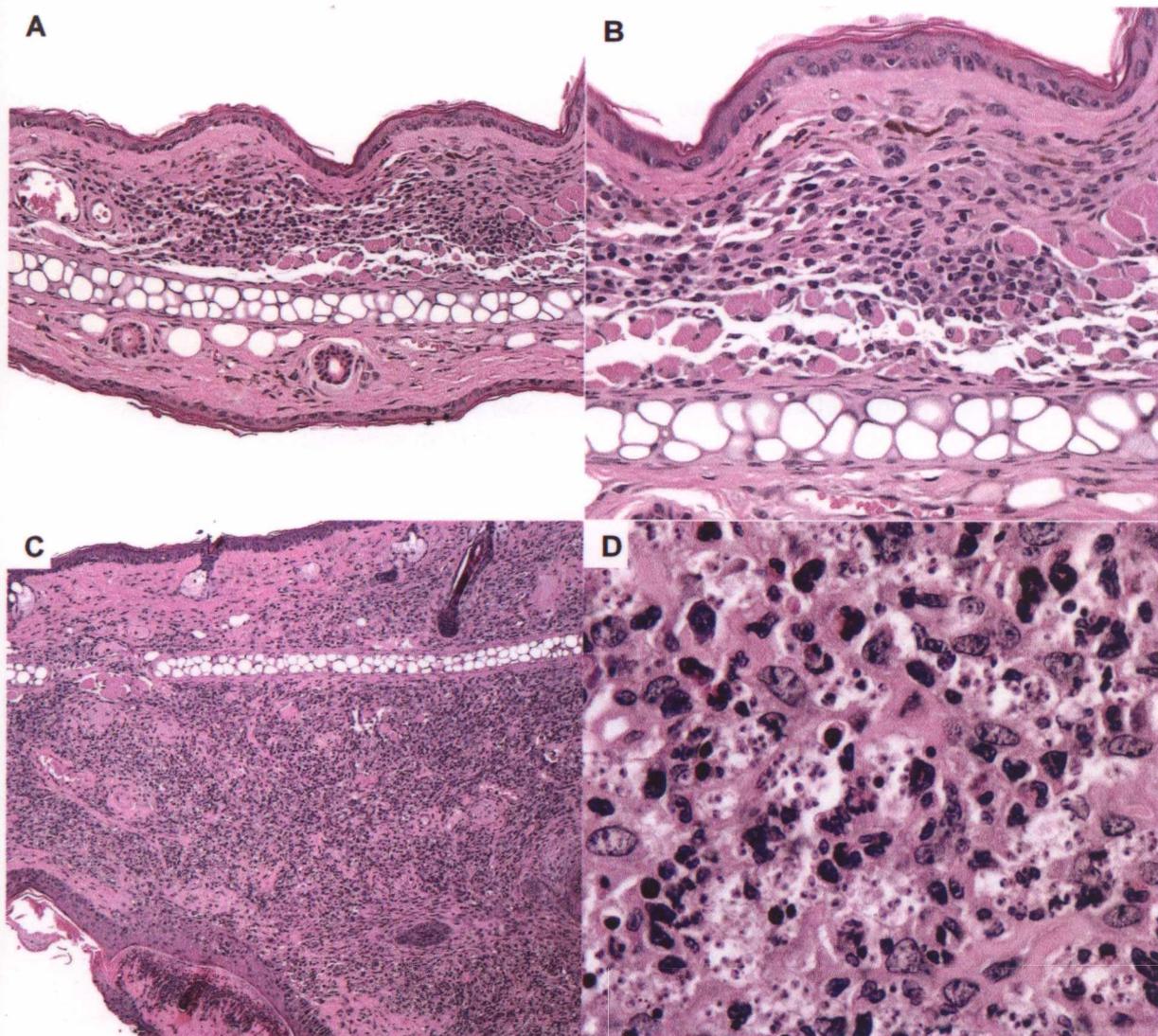
Ambos os grupos mostraram processo inflamatório intenso na derme (Figura 14 A e C), com densa infiltração inflamatória mista, constituída por macrófagos, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos ocasionais após a quinta semana de infecção. Nos animais  $p40^{-/-}$ , a quantidade de neutrófilos foi maior que nos camundongos selvagens e os plasmócitos estiveram ausentes (Figura 15 C e D). Associada à infiltração celular, houve edema, congestão vascular e vasodilatação moderados. Um animal  $p40^{-/-}$  mostrou ulceração na pele (não mostrado). Foram encontrados parasitos em todos os animais. Nos camundongos selvagens o parasitismo de macrófagos foi discreto e nos  $p40^{-/-}$  foi intenso. Nesta fase, tanto em animais selvagens quanto  $p40^{-/-}$ , notou-se discreta proliferação fibroblástica com deposição de colágeno na derme (não mostrado).



**FIGURA 15. Padrão tecidual na lesão cutânea 5 semanas após infecção.** Verificou-se intensa resposta inflamatória em ambos os grupos. **A** – C57BL/6: processo inflamatório difuso, 100x. **B** - C57BL/6: infiltrado inflamatório misto, 200x. **C** - C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: processo inflamatório intenso, 100x. **D** - C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: grande quantidade de neutrófilos no infiltrado inflamatório, 200x.

Na décima semana de infecção as diferenças tornaram-se evidentes entre os dois grupos. Nos camundongos selvagens, houve difuso na derme infiltrado inflamatório discreto a moderado (Figura 16 A), constituído por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e raros neutrófilos. Edema e congestão vascular foram mínimos. Não foram identificados parasitos nas secções coradas pelo H&E. Houve fibrose discreta com proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno paralelo à derme (Figura 16 B). Por outro lado, nos animais p40<sup>-/-</sup> a inflamação foi intensa, com densa infiltração inflamatória (Figura 16 C) mista, rica em macrófagos densamente parasitados, tendo neutrófilos de permeio, poucos linfócitos e plasmócitos (Figura 16 D). Em alguns animais havia certo grau de fibrose na derme, e em um deles observou-se extensa necrose de coagulação (não mostrado).

Em nenhum animal, selvagem ou p40<sup>-/-</sup>, foi observado nas lesões macrófagos de aspecto epitelióide, células gigantes multinucleadas ou granulomas. Não foi vista necrose fibrinóide ou caseosa. A tabela 02 apresenta um resumo das principais observações.



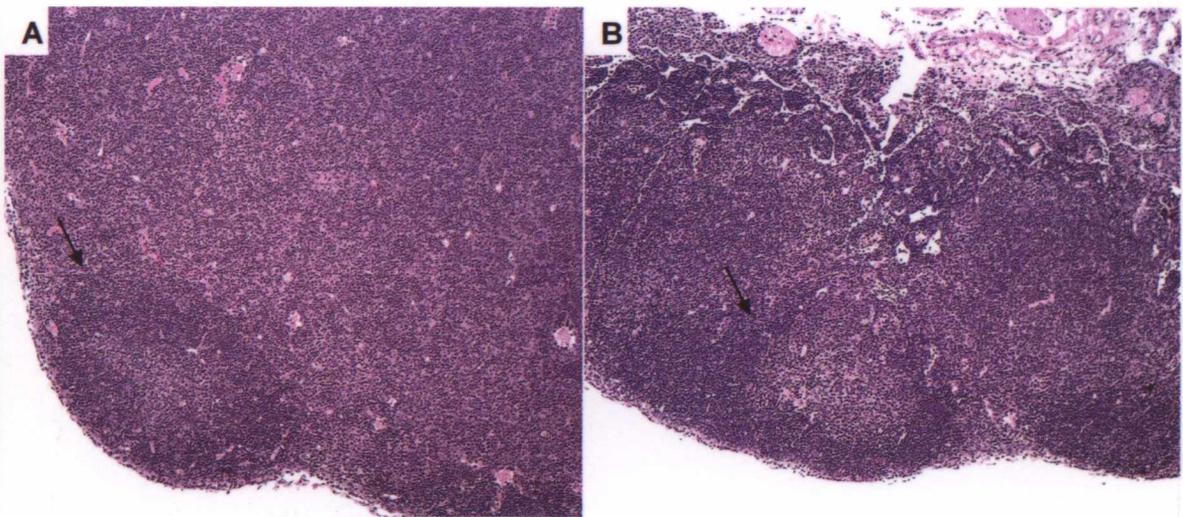
**FIGURA 16. Padrão tecidual na lesão cutânea 10 semanas após infecção.** Verificou-se intensa resposta inflamatória. **A** – C57BL/6: infiltrado inflamatório difuso, 100x. **B** – C57BL/6: infiltrado inflamatório com macrófagos, linfócitos e plasmócitos, 200x. **C** – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: resposta inflamatória intensa, 100x. **D** – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: parasitismo intenso de macrófagos, 1000x.

**Tabela 02:** Principais aspectos histopatológicos observados nas lesões cutâneas dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup> no curso da infecção por *L. braziliensis*.

	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6p40<sup>-/-</sup></b>
<b>Inflamação</b>	Discreta. Persiste após dez semanas de infecção	Moderada a intensa
<b>Infiltrado</b>	Misto, composto por neutrófilos, macrófagos e linfócitos	Monomórfico com predomínio de macrófagos Infiltração neutrofilica menos intensa na primeira semana
<b>Parasitismo</b>	Discreto	Moderado a intenso
<b>Perfil das lesões</b>	Sem lesão macroscópica evidente Fibrose discreta	Nodular, raramente ulcerada Fibrose discreta

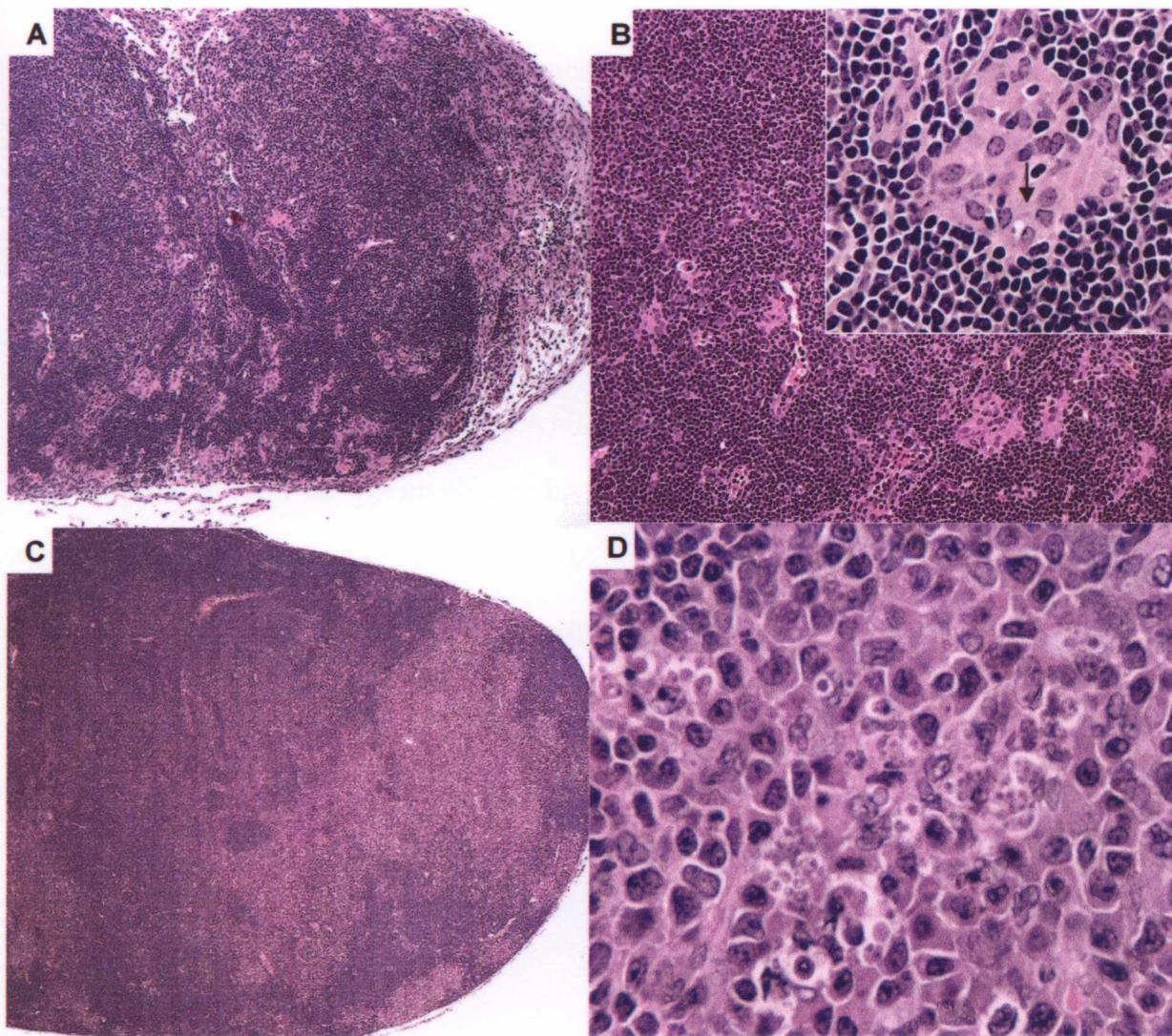
#### 5.4.2 – LINFONODO:

Em ambos os grupos, os linfonodos apresentaram arquitetura geral preservada após a primeira semana de infecção. Alguns folículos linfóides discretamente reativos foram observados (Figura 17, A e B). Houve nos seios subcapsulares e medulares, histiocitose discreta a moderada, com plasmocitose discreta, e poucos macrófagos contendo poucos parasitos (não mostrado).



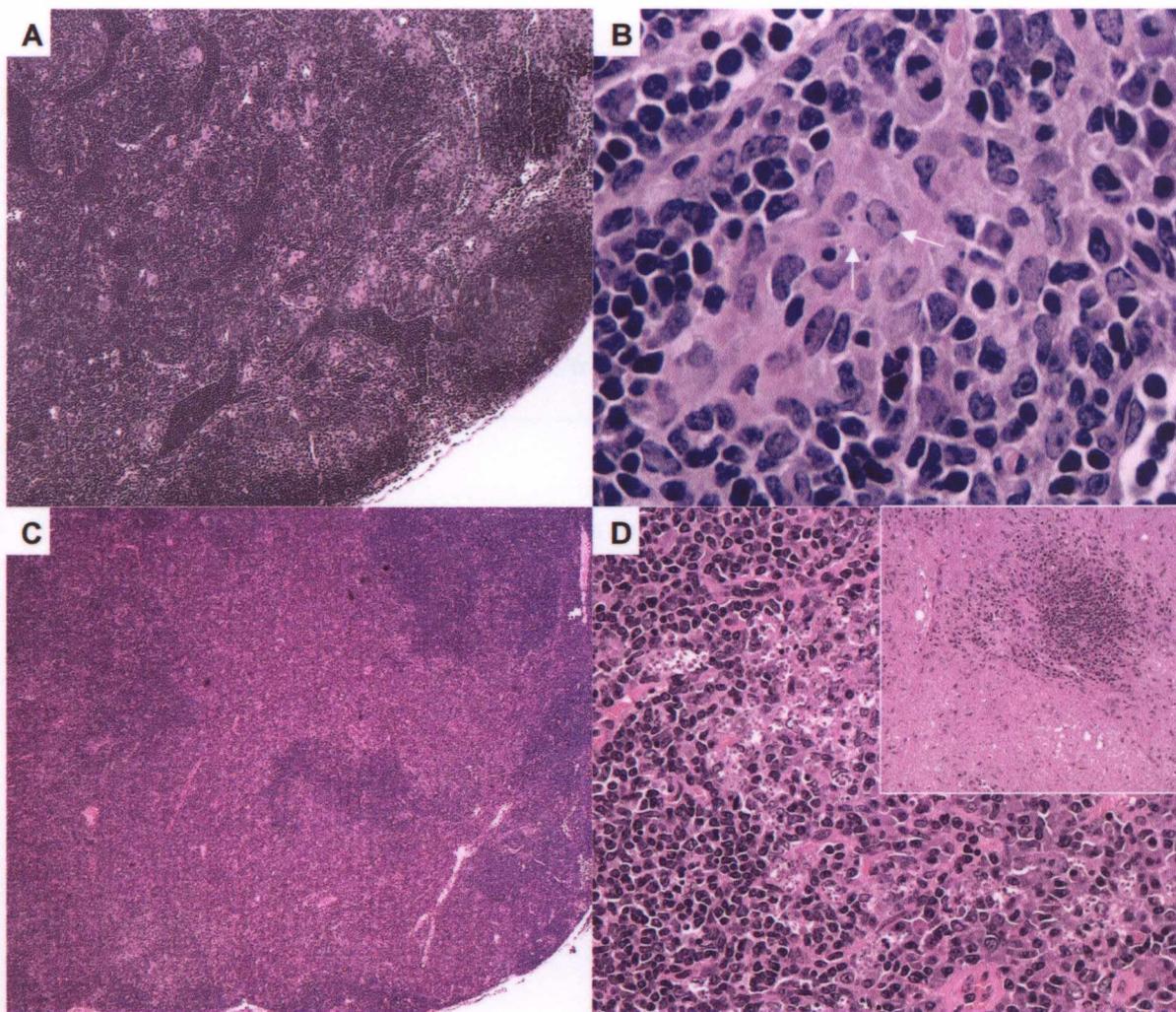
**FIGURA 17. Padrão tecidual no linfonodo retro-auricular 1 semana após infecção.** Neste período não foram encontradas diferenças entre os diferentes grupos. **A** – C57BL/6, 100x. **B** – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: estrutura preservada e folículos linfóides reativos (indicado), 100x.

Na quinta semana após a infecção, nos camundongos selvagens foram observados no parênquima macrófagos epitelióides, formando pequenos granulomas, contendo poucos parasitos (Figura 18 B e detalhe). Foi observada histiocitose discreta a moderada nos seios subcapsulares e medulares, com plasmocitose discreta. A arquitetura do linfonodo nestes animais manteve-se preservada (Figura 18 A e B). Nos camundongos  $p40^{-/-}$ , não foram observados granulomas (Figura 18, C). Houve histiocitose e plasmocitose moderadas a intensas, com parasitismo intenso nos seios subcapsulares, medulares e nas regiões parafoliculares (Figura 18 C e D).



**FIGURA 18. Padrão tecidual no linfonodo retro-auricular 5 semana após infecção.** Neste período as diferenças entre os grupos foram evidentes. **A** – C57BL/6: houve moderada histiocitose nos seios subcapsulares. A arquitetura do órgão foi preservada, 100x. **B** – C57BL/6: ocorreu o desenvolvimento de granulomas no parênquima, 200x. No detalhe, um granuloma contendo poucos parasitos, 400x. **C** – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: histiocitose e plasmocitose por todo órgão sem formação de granulomas. Arquitetura alterada, 100x. **D** – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: parasitismo intenso, 400x.

Na décima semana de infecção, nos camundongos selvagens houve histiocitose e plasmocitose discretas a moderadas nos seios subcasulares e medulares (Figura 19 A), com granulomas contendo poucos parasitos (Figura 19 B). Foi observada hiperplasia folicular moderada com centros germinativos reativos (Figura 19 A). Nos camundongos p40<sup>-/-</sup>, houve atrofia completa dos folículos na cortical. Houve histiocitose e plasmocitose intensas ocupando todo o linfonodo (Figura 19 C), acompanhadas por macrófagos intensamente parasitados (Figura 19 D). Foram observadas extensas áreas de necrose multi-focal (Figura 19 D, detalhe), com infiltração neutrofílica e formação de micro-abscessos (não mostrado). A tabela 03 apresenta um resumo com as principais observações.



**FIGURA 19. Padrão tecidual no linfonodo retro-auricular 10 semanas após infecção.**

**A** – C57BL/6: arquitetura do linfonodo manteve-se preservada, 100x. **B** – C57BL/6: granulomas contendo poucos parasitos, 1000x. **C** – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: histiocitose e plasmocitose intensas nos seios subcapsulares e medulares. A arquitetura do órgão foi alterada, 100x. **D** – C57BL/6p40<sup>-/-</sup>: Nota-se parasitismo intenso de macrófagos, 400x. No detalhe, áreas de necrose foram observadas, 100X.

**Tabela 03:** Principais aspectos histopatológicos observados nos linfonodos retro-auriculares dos camundongos C57BL/6 e C57BL/6p40<sup>-/-</sup> no curso da infecção por *L. braziliensis*.

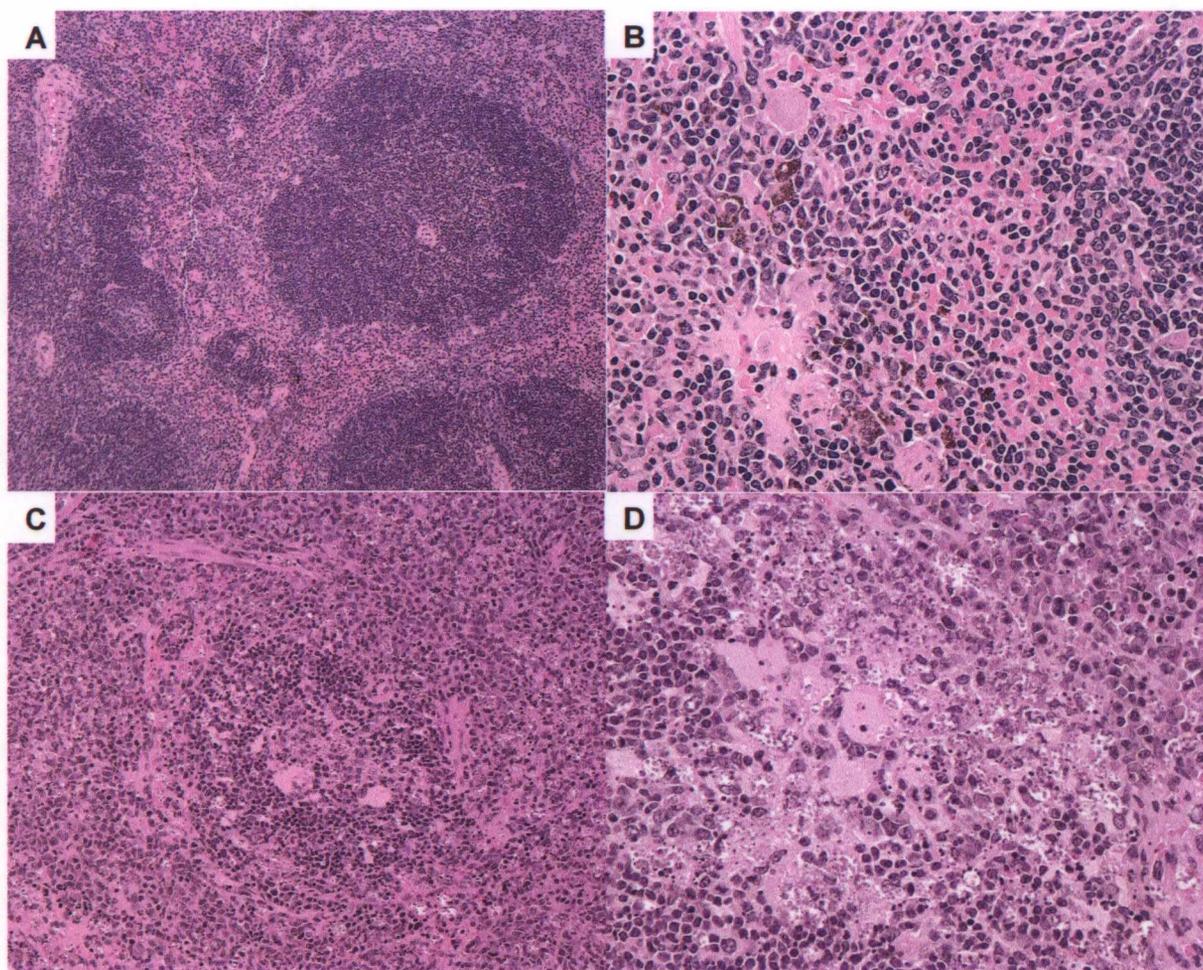
	C57BL/6	C57BL/6p40 <sup>-/-</sup>
<b>Inflamação</b>	Moderada hipertrofia folicular Granulomas	Histiocitose e plasmocitose em todo o linfonodo Atrofia folicular Necrose
<b>Parasitismo</b>	Escasso	Intenso

### 5.4.3 – BAÇO:

Não foram observadas alterações na arquitetura do baço e nem parasitismo em ambos os grupos após a primeira semana de infecção. Em camundongos  $p40^{-/-}$  houve discreta hiperplasia da polpa branca com folículos linfóides mostrando alguns centros germinativos reativos (não mostrado).

Cinco semanas após infecção, nos animais selvagens foram observados alguns centros germinativos na polpa branca, que assim como a polpa vermelha, mostraram-se normais (não mostrado). Nos camundongos  $p40^{-/-}$ , houve plasmocitose e histiocitose discretas da polpa branca (Figura 20 A). Alguns macrófagos parasitados foram observados (Figura 20 B). Neste ponto, não houve alteração da arquitetura do órgão em nenhum dos grupos.

Completa desestruturação do baço foi observada nos animais  $p40^{-/-}$  dez semanas após a infecção. Nestes animais foi observada completa atrofia dos folículos (Figura 20 C), deposição de matriz hialina, histiocitose e plasmocitose intensas, com macrófagos parasitados intensamente (Figura 20 D). Nos animais selvagens, o baço manteve sua estrutura normal com nítida distinção entre polpa branca e polpa vermelha (não mostrado).



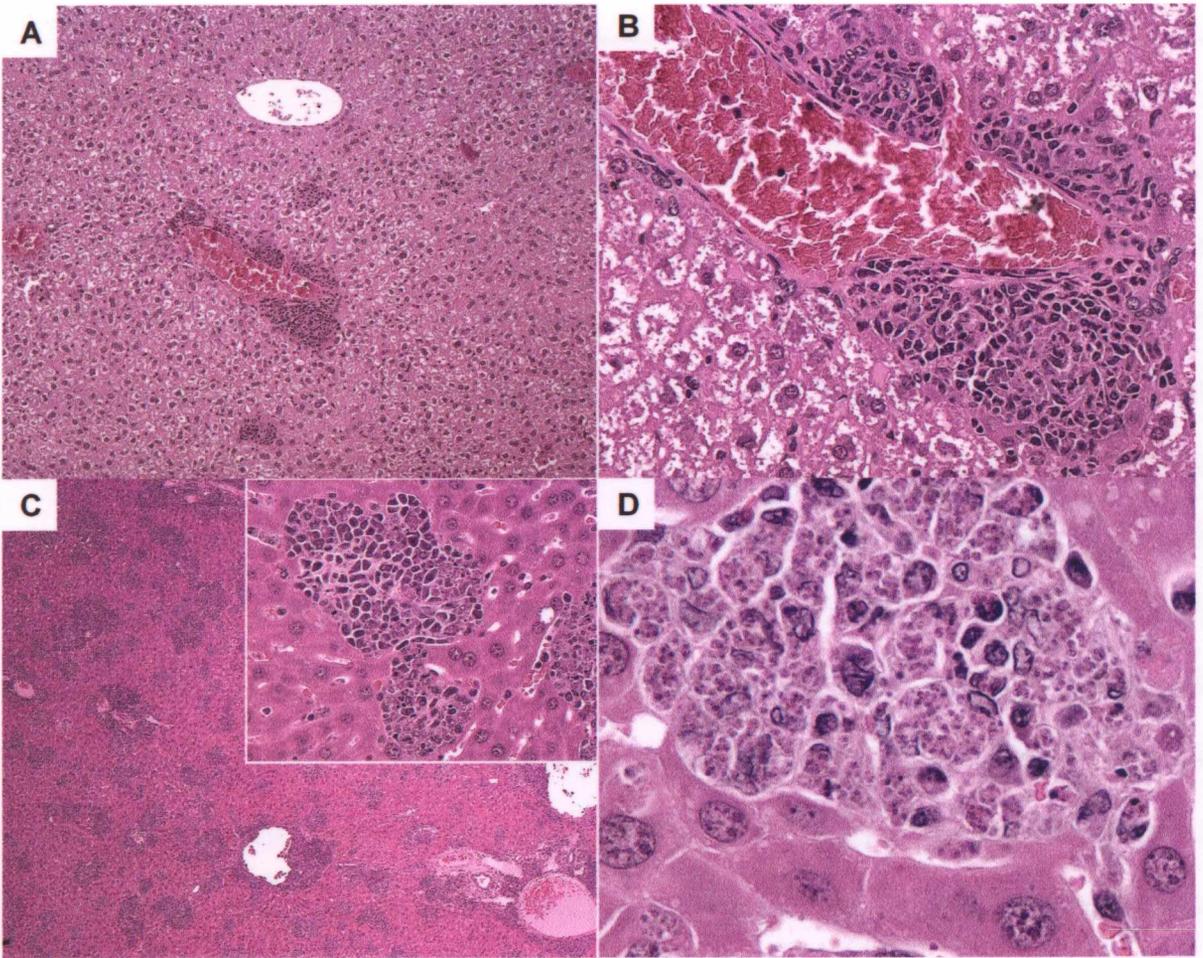
**FIGURA 20. Padrão tecidual no baço dos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> 5 e 10 semanas após infecção. A – 5 semanas: histiocitose e plasmocitose discreta, 100x. B – 5 semanas: parasitismo de macrófagos mostrou-se discreto nesta fase, 200x. C – 10 semanas: houve atrofia total dos folículos linfóides seguida pela perda da arquitetura do órgão, 100x. D – 10 semanas: o parasitismo de macrófagos foi intenso, 200x.**

#### 5.4.4 – FÍGADO:

Não foram observadas alterações nos fígados de ambos os grupos após a primeira semana infecção. Na quinta e na décima semanas, o fígado dos animais selvagens manteve-se inalterado (não mostrado).

Com cinco semanas de infecção, foram observados nos camundongos p40<sup>-/-</sup>, agregados de células inflamatórias mononucleares nos sinusóides e em espaços porta formando estruturas granulomatóides (Figura 21 A), constituídas por macrófagos, alguns infectados e poucos linfócitos de permeio (Figura 21 B).

Dez semanas após a infecção, nos animais p40<sup>-/-</sup> foram observados agregados macrofágicos parasitados intensamente (Figura 21 D), tanto no parênquima quanto nos espaços porta (Figura 21 C). Estes infiltrados foram intra-sinosoidais, confluentes, assumindo configurações geográficas (Figura 21 C e detalhe).



**FIGURA 21. Padrão tecidual no fígado dos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup> 5 e 10 semanas após infecção. A – 5 semanas: infiltrados inflamatórios foram observado, 100x. B – 5 semanas: infiltrados associados a vasos sanguíneos, 200x. C – 10 semanas: estes agregados se fundiram, assumindo configurações geométricas, 40x. No detalhe, infiltrados intrasinusoidais, 100x D – 10 semanas: infiltrado mononuclear com macrófagos parasitados intensamente, 1000x.**

## 6 – DISCUSSÃO

---

As funções biológicas de p40 podem ser mediadas por seu homodímero ou pelas citocinas IL-12 e IL-23 (KOBAYASHI *et al.*, 1989; GILLESSEN *et al.*, 1995; OPPMANN *et al.*, 2000). IL-12 é capaz de induzir e manter imunidade protetora à infecção por *L. major* (HEINZEL *et al.*, 1993; SYPEK *et al.*, 1993; PARK *et al.*, 2000, 2002). Por outro lado, p80 pode determinar susceptibilidade por competir com IL-12 na ligação com o receptor (NIGG *et al.*, 2007). Como IL-12, IL-23 promove resposta imune celular e é potente indutora de inflamação (BELLADONNA *et al.*, 2002; AGGARWAL *et al.*, 2003; HAPPEL *et al.*, 2003). Sua participação na infecção por *L. major* vêm sendo evidenciada de modo indireto, a partir de estudos comparativos com camundongos deficientes em p35 e deficientes em p40 (MATTNER *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 2002). No que se refere à infecção por *L. braziliensis*, a participação de p40 foi pouco investigada. Os trabalhos realizados neste modelo demonstraram que camundongos de linhagens resistentes à infecção, quando deficientes em p40, tornaram-se susceptíveis (SOUZA-NETO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2007). Entretanto, nestes trabalhos não foram investigados aspectos histológicos das lesões que permitissem o estabelecimento de correlações entre p40 e resposta inflamatória associada ao controle ou exacerbação da infecção.

No presente trabalho foi analisado o curso da infecção por *L. braziliensis* em camundongos C57BL/6 selvagens e C57BL/6 deficientes em p40. O modelo de infecção intradérmico (BELKAID *et al.*, 1998; MOURA *et al.*, 2005) foi utilizado, favorecendo o estudo da participação de p40 em condições mais próximas da infecção natural. O tamanho das lesões nos camundongos selvagens atingiu o máximo na terceira semana de infecção, e regrediu nas semanas seguintes. Por outro lado, nos camundongos deficientes em p40 as lesões cresceram progressivamente. Estes resultados estão de acordo com observações

anteriores (SOUZA-NETO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2007) e confirmam que p40 se faz necessária para que camundongos C57BL/6 sejam capazes de controlar a infecção.

Dentre os mecanismos nos quais p40 está envolvida, incluem-se a capacidade de IL-12 em induzir o desenvolvimento e manutenção de linfócitos produtores de IFN- $\gamma$  (PARK *et al.*, 2000, 2002; USUI *et al.*, 2006; PAKPOUR *et al.*, 2008). IL-23 também pode participar neste contexto, estimulando células T a produzirem IFN- $\gamma$  (OPPMANN *et al.*, 2000; PARHAM *et al.*, 2002). Na infecção por *L. braziliensis*, resistência à infecção está associada com resposta Th1 (DEKREY *et al.*, 1998; SOUZA-NETO *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2007) e camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  tornam-se susceptíveis (DEKREY *et al.*, 1998; SOUZA-NETO *et al.*, 2004). Assim, a deficiência em p40 poderia limitar a capacidade dos camundongos C57BL/6 de montarem uma resposta imune celular do tipo Th1, determinando susceptibilidade nestes animais.

As lesões nos camundongos p40<sup>-/-</sup> consistiram numa pápula, freqüentemente sem ulceração, semelhantes às observadas anteriormente (SOUZA-NETO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2007). Este tipo de lesão ocorre em indivíduos com LCD ou em camundongos imunodeficientes (BITTENCOURT & FREITAS, 1983; TERABE *et al.*, 1999). Na doença humana, as lesões extensas que ocorrem na LCM estão associadas à produção de grandes quantidades de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Por outro lado, as lesões não ulceradas na LCD, correlacionam-se com grande produção de IL-10 e poucos linfócitos no infiltrado inflamatório (BITTENCOURT & FREITAS *et al.*, 1983; MARSDEN *et al.*, 1994; BACELLAR *et al.*, 2002), mostrando associação entre resposta imuno-inflamatória e gravidade das lesões. A partir de estudos experimentais foi demonstrado que linfócitos T CD4<sup>+</sup> funcionais são necessários para o desenvolvimento da úlcera e sugerido que a ativação e produção de citocinas pró-inflamatórias por estas células contribuem para o seu desenvolvimento (TERABE *et al.*, 1999, b, 2000). A análise histológica nos camundongos p40<sup>-/-</sup> mostrou que

poucos linfócitos estiveram presentes nas lesões destes animais. Além disso, sabe-se que estes animais produzem pequenas quantidades de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , quando comparados com os camundongos selvagens (SOUZA-NETO *et al.*, 2004). É possível que na ausência de p40, os poucos linfócitos presentes nas lesões não sejam ativados o suficiente para induzir destruição tecidual e formação da úlcera. Contudo, a concentração de grande quantidade de células no infiltrado inflamatório constitui um ambiente favorável à ocorrência de necrose induzida por compressão e isquemia, levando à destruição tecidual, o que poderia explicar a ocorrência de lesões ulceradas em alguns animais.

Analisaram-se os aspectos qualitativos das lesões e foi feita semi-quantificação dos tipos celulares presentes no infiltrado inflamatório nos camundongos selvagens e deficientes em p40. Em ambos os grupos, entre seis e 24 horas após a infecção, a reação tecidual foi característica de inflamação aguda. Foram observados congestão vascular, leucoestase, edema e infiltração celular predominante de neutrófilos. Poucos macrófagos foram observados. Este padrão foi semelhante ao descrito nas fases iniciais da infecção por diferentes espécies de *Leishmania* (ANDRADE *et al.*, 1984; BARRAL-NETTO *et al.*, 1987; LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000). Contudo, a infiltração neutrofílica 24 horas após a infecção foi menos intensa nos camundongos p40<sup>-/-</sup>. As diferenças tornaram-se mais evidentes com uma semana de infecção. O infiltrado inflamatório nos camundongos selvagens foi constituído por uma população mista de células, com neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Por outro lado, nos camundongos p40<sup>-/-</sup>, o infiltrado foi discreto, constituído essencialmente por macrófagos. Poucos neutrófilos foram observados.

Os neutrófilos são as primeiras células que migram para os sítios inflamatórios na resposta aguda, participando da fagocitose e destruição de microorganismos, através da produção de enzimas líticas e moléculas reativas de oxigênio e de nitrogênio. Estas células estão envolvidas na resposta inicial induzida por diferentes patógenos, e são capazes de

produzir quimiocinas e citocinas, inclusive IL-12, participando, desta forma, da indução e regulação das respostas imunes (CASSATELLA *et al.*, 1995; BLISS *et al.*, 1999; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; NATHAN, 2006; SUKHUMAVASI *et al.*, 2007; PETERS *et al.*, 2008). O contato e a natureza da interação neutrófilo-macrófago podem ser importantes na definição do curso da infecção (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004; ALLENBACH *et al.*, 2006; AFONSO *et al.*, 2008; GUEIRARD *et al.*, 2008). Diversos trabalhos mostraram que a depleção de neutrófilos, antes ou durante as primeiras semanas de infecção, pode resultar em aumento da carga parasitária, tornando camundongos resistentes em susceptíveis (LIMA *et al.*, 1998; TACCHINI-COTTIER *et al.*, 2000; ROSSEAU *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2005; MCFARLANE *et al.*, 2008). Além disso, Smith e colaboradores (2007) mostraram que camundongos C57BL/6 deficientes na produção de p40 apresentam menor quantidade de neutrófilos circulantes que os animais selvagens. Em outros modelos de infecções, tanto o bloqueio de p40, quanto a ausência do receptor de IL-17, resultaram em menor infiltração de neutrófilos para o sítio inflamatório, menor ativação das células que migraram e aumento da carga parasitária, associados à redução da produção de IL-17, CXCL2 e TNF- $\alpha$  (YE *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2007). Estes resultados sugerem que um mecanismo dependente de p40, mediado por IL-23 e IL-17 está envolvido no recrutamento de neutrófilos. IL-23 pode ser produzida por células dendríticas ou NK em resposta a antígenos parasitários (OPPMAN *et al.*, 2000; SIMITS *et al.*, 2004). Esta citocina induz a produção de IL-17 (HAPPEL *et al.*, 2003) e CXCL2, promovendo a infiltração e ativação de neutrófilos (GREENBERGER *et al.*, 1996). Assim, como mostrado em outros modelos, é possível que o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório, nos momentos iniciais da infecção por *L. braziliensis* seja importante para o controle desta infecção. Nos camundongos deficientes na produção de p40, a menor infiltração de neutrófilos poderia ser determinada pela ausência de quimiocinas

cuja produção é induzida por IL-17 em resposta a IL-23, podendo contribuir para a exacerbação da infecção nestes animais.

Nas lesões dos camundongos  $p40^{-/-}$ , o infiltrado inflamatório foi do tipo misto, composto principalmente por macrófagos intensamente parasitados, com poucos linfócitos e plasmócitos. Nestes animais, o perfil de resposta tecidual foi semelhante ao descrito em camundongos susceptíveis das linhagens BALB/c e CBA infectados com *L. amazonensis* (ANDRADE 1984; BARRAL-NETTO *et al.*, 1987; LEMOS DE SOUZA 2000). Nos camundongos selvagens, o infiltrado inflamatório foi do tipo misto, composto por neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos, semelhante ao observado na infecção de camundongos da linhagem CBA com *L. major* ou por outras espécies, em modelos que controlam a infecção. Nesse contexto, ocorre também o desenvolvimento de granulomas que constituem importantes elementos de contenção e destruição dos parasitos (ANDRADE *et al.*, 1984; BARRAL-NETTO *et al.*, 1987; LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000), diferentemente do observado nos camundongos C57BL/6 selvagens, onde a redução do parasitismo nas lesões ocorreu em ausência de granulomas. Este padrão foi semelhante ao descrito em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*, nos quais as células presentes no infiltrado inflamatório foram capazes de controlar a infecção também na ausência de organização granulomatosa (MOURA *et al.*, 2005). Porém, é importante assinalar que os camundongos C57BL/6 selvagens, resistentes à infecção com *L. braziliensis*, apesar de não desenvolverem granulomas no sítio da inoculação do parasito, o fazem nos linfonodos. A presença de granulomas neste órgão linfóide pode ter relação com a contenção dos parasitos e ausência de disseminação para os órgãos internos.

A análise da carga parasitária nas lesões dos camundongos selvagens e deficientes em  $p40$  correspondeu as observações histopatológicas. Na primeira semana de infecção, ambos os grupos apresentam quantidades semelhantes de parasitos nas lesões. A carga parasitária foi

aparentemente maior nos camundongos  $p40^{-/-}$ , mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. A partir deste ponto, a carga reduziu nos camundongos selvagens, mas nos camundongos  $p40^{-/-}$  aumentou progressivamente. Pode-se inferir que a incapacidade de produzir p40 limita o controle do parasitismo nestes animais. Nas fases mais iniciais da infecção, o envolvimento de p40 no controle da carga parasitária pode estar relacionado com o recrutamento e ativação de neutrófilos. Estas células possuem mecanismos microbicidas que as habilitam como células efetoras na destruição dos parasitos (PEARSON & STEIGBIGEL, 1981). A observação de que a depleção de neutrófilos resultou no aumento da carga parasitária em outros modelos (LIMA *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2005; TACCHINNE-CORTTIER *et al.*, 2008) reforça esta proposição. Nas fases mais tardias da infecção, o envolvimento de p40 com os mecanismos microbicidas podem ser mediados pela produção de IL-12. O controle da carga parasitária na infecção com *Leishmania* depende da ativação de mecanismos efetores de células hospedeiras, levando à produção de moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio (LIEW *et al.*, 1990; b). IL-12 induz a produção de IFN- $\gamma$  por células NK (OPPMANN *et al.*, 2000) e linfócitos T (SEDER *et al.*, 1993; MANETTI *et al.*, 1994) favorecendo, dessa forma, a produção de NO, que é uma molécula microbicida importante (JAMES *et al.*, 1995). Na infecção por *L. braziliensis*, a produção de NO é determinante no curso da infecção. Camundongos C57BL/6  $iNOS^{-/-}$  são incapazes de controlar o parasitismo (ROCHA *et al.*, 2007). Além disso, IL-12 está envolvida com a indução (USUI *et al.*, 2006) e manutenção de linfócitos Th1 produtores de IFN- $\gamma$  (PARK *et al.*, 2000, 2002; PAKPOUR *et al.*, 2008). IL-23 também pode participar do controle da infecção por estimular células T a produzirem IFN- $\gamma$  (OPPMANN *et al.*, 2000; PARHAM *et al.*, 2002) e IL-17 (AGGARWAL *et al.*, 2003). A produção destas citocinas manteria a atividade microbicida no curso da infecção, limitando a multiplicação dos parasitos. Em camundongos  $p40^{-/-}$  estes mecanismos devem atuar em níveis reduzidos ou ausentes, o que explicaria o aumento da carga parasitária.

A cura das lesões cutâneas em humanos é seguida pela redução do infiltrado inflamatório, com deposição de fibras colágenas e reconstituição do tecido epitelial (BIDDLESTONE *et al.*, 1994). Nos camundongos BALB/c, que controlam a infecção por *L. braziliensis*, foi descrito padrão semelhante (MOURA *et al.*, 2005). No presente trabalho, o controle da infecção nos camundongos selvagens foi acompanhado da redução na intensidade da reação inflamatória. Entretanto, na décima semana após a infecção, estes animais apresentaram infiltrado inflamatório residual, mas sem detecção de parasitos por nenhuma das análises realizadas. Em humanos, o mesmo pode acontecer. Mendonça e colaboradores (2004) evidenciaram a presença de infiltrado inflamatório mononuclear residual em lesões de pacientes com LTA, com 24 a 70 meses após a cura das lesões. Nestes casos, não foram detectados parasitos em cultura de extratos de material coletado, mas detectada a presença de material genético de *Leishmania*, evidenciando a persistência do parasito. Em alguns casos, na ausência de infiltrado inflamatório residual foi detectado material genético dos parasitos e na cultura de extratos amostras do tecido foram isoladas promastigotas de *L. braziliensis*. Estas evidências apontam para a capacidade destes parasitos em persistir nos tecidos após a cura clínica, e mesmo os camundongos C57BL/6 selvagens que controlaram a infecção, parecem não serem capazes de eliminar completamente os parasitos ou seus antígenos, mantendo uma resposta inflamatória. Este modelo pode ser interessante para o estudo da persistência da inflamação na ausência de parasitos, e esclarecimento aspectos importantes da patogênese da leishmaniose. Há uma suposição de que a persistência de baixa estimulação antigênica é capaz de sustentar uma resposta inflamatória persistente e destrutiva. O modelo aqui apresentado poderá ser útil no desvendamento de eventuais mecanismos envolvidos na persistência da infamação e que poderão ser alvo de estratégias terapêuticas.

Linfadenopatia é uma manifestação comum na LTA causada por *L. braziliensis*, podendo ocorrer nas fases iniciais da infecção, concomitantemente com lesões cutâneas, ou

ser a única manifestação clínica (BARRAL, *et al.*, 1992, 1995; SOUSA *et al.*, 1995). O linfonodo é um importante sítio de iniciação de resposta imune celular ao parasito (MOLL *et al.*, 1993). A remoção cirúrgica do linfonodo ou a manipulação genética que interfere com a formação deste órgão, transformou camundongos resistentes em susceptíveis (REED *et al.*, 1986; EHRCHEN *et al.*, 2008). No presente trabalho foi observado que tanto os camundongos selvagens quanto os deficientes em p40 desenvolveram linfadenomegalia em resposta à infecção. Nos camundongos p40<sup>-/-</sup> o linfonodo retro-auricular drenante cresceu mais do que nos camundongos selvagens. Adicionalmente, a carga parasitária no linfonodo dos camundongos p40<sup>-/-</sup> aumentou progressivamente o que também foi observado na lesão. Nos camundongos selvagens a carga parasitária foi controlada, mas os parasitos persistiram. Dessa forma, é possível considerar que a deficiência em p40 interfere no controle do parasitismo também no linfonodo, como observado nas lesões cutâneas. Além disso, o grau de linfadenopatia desenvolvida parece ser um indicador do controle ou exacerbação da infecção. Em camundongos BALB/c infectados por *L. major* foi demonstrado correlação entre o grau de linfadenomegalia e o curso da infecção. Camundongos que controlaram a infecção desenvolveram linfadenomegalia moderada e os susceptíveis, desenvolveram linfadenomegalia acentuada (UZONNA *et al.*, 2001). Em trabalhos anteriores, foi observada a persistência de *L. braziliensis* no linfonodo em camundongos que controlaram a infecção (MOURA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2007). Os mecanismos que medeiam a persistência dos parasitos incluem o baixo potencial microbicida das células hospedeiras e a produção de IL-10 que pode modular a resposta efetora e impedir a esterilização da infecção (BOGDAN *et al.*, 2000; BELKAID *et al.*, 2000; SUFFIA *et al.*, 2006). Contudo, este evento parece estar relacionado com manutenção da imunidade protetora (UZONNA *et al.*, 2001).

A análise histológica dos linfonodos retro-auriculares dos camundongos selvagens e deficientes em p40 mostrou que no curso da infecção, estes animais desenvolvem distintos

perfis de resposta. Em camundongos  $p40^{-/-}$ , observou-se histiocitose e plasmocitose ocupando todo o linfonodo e acúmulo progressivo de macrófagos parasitados. Nestes animais, a arquitetura do linfonodo foi alterada. Este perfil é semelhante ao observado em camundongos e hamsters susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. major* (KAHL *et al.*, 1991; LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000; SCHOPF *et al.*, 2001). Nos camundongos selvagens, ocorreu a formação de granulomas, perfil de resposta semelhante ao observado na infecção de camundongos CBA que são resistentes à infecção por *L. major* (LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000). Os diferentes padrões de resposta tecidual no linfonodo também refletem o estado da resposta imunológica, e intervenções imunoterápicas são capazes de modificá-los. Camundongos BALB/c infectados por *L. major*, exibiram no linfonodo o mesmo padrão tecidual observado nos camundongos  $p40^{-/-}$  infectados por *L. braziliensis*. Contudo, o tratamento de camundongos BALB/c infectados por *L. major* com IL-12 recombinante, resultou no aumento da expressão de RNAm de IFN- $\gamma$ , e reduziu a expressão de IL-4. A mudança do padrão de expressão de citocinas foi acompanhada pelo desenvolvimento de granulomas e controle da infecção (SCHOPF *et al.*, 2001). O granuloma na infecção por *Mycobacterium* é um elemento importante na contenção da infecção. A formação, maturação e manutenção dos granulomas são influenciadas principalmente por TNF- $\alpha$  (BOTHÁ & RIFFEL, 2003), mas envolvem outras moléculas como NO (FLYNN *et al.*, 1998) IFN- $\gamma$  (COOPER *et al.*, 1993) e IL-12 (COOPER *et al.*, 1997). A falha em alguns destes mecanismos pode resultar na reativação da infecção latente com aumento da carga bacilar e disseminação. Assim, é possível supor que a produção de p40 em camundongos selvagens seja importante no controle do parasitismo no linfonodo. Nos camundongos deficientes, a ausência de p40 poderia inibir o desenvolvimento de granulomas, favorecendo o aumento da carga parasitária. Além disso, é possível que, do ponto de vista histológico no

linfonodo, o granuloma seja um elemento importante na contenção dos parasitos também na infecção por *Leishmania*.

Uma característica intrínseca à infecção por *L. braziliensis* é a disseminação do parasito para diferentes órgãos e, em particular, para sítios de mucosa, como observado na LCM (MARSDEN *et al.*, 1994). Contudo, *L. braziliensis* está associada com leishmaniose cutânea, e a disseminação para órgãos internos ocorre, principalmente, em situação de imunodeficiência. Existem relatos de doença visceral causada por *L. braziliensis* em indivíduos co-infectados, *Leishmania* e HIV (SILVA *et al.*, 2002). Em modelos experimentais, hamsters são susceptíveis, e também desenvolvem doença visceral. Uma possível via de disseminação é a hematogênica (ALMEIDA *et al.*, 1996). Neste trabalho, foi observada a ocorrência de disseminação para baço e fígado acompanhada de hepatomegalia nos camundongos p40<sup>-/-</sup>, semelhante ao observado anteriormente (SOUZA-NETO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2007). A contenção dos parasitos na pele e no linfonodo de drenagem parece ser importante indicador do controle da infecção. Laskay e colaboradores (1995) mostraram que na infecção com *L. major*, ocorre disseminação dos parasitos da pele para o linfonodo e para outros órgãos nos camundongos susceptíveis. Nos camundongos resistentes, os parasitos são retidos na pele e no linfonodo de drenagem por um período maior de tempo, sem evidência de disseminação para outros órgãos. Camundongos susceptíveis ou parcialmente resistentes a *L. amazonensis* desenvolvem o mesmo perfil, com ocorrência de disseminação precoce nos camundongos susceptíveis e em camundongos parcialmente resistentes, que controlam a infecção apenas nas fases iniciais, a disseminação ocorre em fases mais tardias da infecção (ANDRADE *et al.*, 1984; BARRAL *et al.*, 1983; LEMOS DE SOUZA 2000). Interessante que o tratamento com IL-12 preveniu a disseminação em camundongos susceptíveis (LASKAY *et al.*, 1995). Estes dados sugerem que quando incapazes de produzir p40 linhagens de camundongos resistentes desenvolvem curso da

infecção semelhante ao observado em camundongos susceptíveis. É possível que a incapacidade de conter o parasitismo na ausência dos mecanismos efetores induzidos por p40 favoreça a disseminação nestes animais.

A análise histopatológica realizada neste trabalho evidenciou que nos camundongos p40<sup>-/-</sup>, houve uma intensa histiocitose e plasmocitose no baço, com macrófagos parasitados, seguido de atrofia dos folículos linfóides e perda da estrutura deste órgão. Perfil semelhante foi descrito em camundongos BALB/c susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*, *L. mexicana* ou *L. donovani* (MURRAY *et al.*, 2001; AGUILAR TORRENTERA *et al.*, 2002; ABREU-SILVA *et al.*, 2004). Atrofia de folículos linfóides e desorganização da arquitetura do baço, foi freqüente em cães potencialmente susceptíveis à infecção natural por *L. chagasi* (SANTANA *et al.*, 2008). Estes dados sugerem que alterações na arquitetura deste órgão estão associadas com o desenvolvimento de susceptibilidade à infecção. No fígado dos camundongos p40<sup>-/-</sup> também foram observados agregados macrofágicos parasitados. Contudo, estes agregados não constituíram num granuloma maduro, analogamente ao verificado em camundongos BALB/c infectados por *L. mexicana* (AGUILAR TORRENTERA *et al.*, 2002b). Camundongos BALB/c e C57BL/6 responderam igualmente à infecção por *L. donovani*, e foram capazes de controlar o parasitismo no fígado, mas desenvolveram infecção crônica no baço. Quando incapazes de produzir p40, houve aumento da carga parasitária no fígado, associado com produção de pequenas quantidades de IFN- $\gamma$ . A análise da resposta inflamatória mostrou a presença de poucos granulomas imaturos no parênquima hepático. Nos camundongos p35<sup>-/-</sup>, o padrão tecidual foi semelhante, mas a carga parasitária foi maior nos camundongos p40<sup>-/-</sup> (MURRAY *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram observados em camundongos BALB/c tratados com anti-IL-12p40 (EGWERDA *et al.*, 1998). Foi mostrado que a neutralização de p40 reduziu a produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  além da expressão de iNOS, moléculas importantes para a formação, maturação dos granulomas e destruição dos parasitos

(ENGWERDA *et al.*, 1998; MURRAY & DELPH-ETIENNE *et al.*, 2000; ENGWERDA *et al.*, 2004). Assim, a impossibilidade de produzir p40 pode ser um fator limitante na capacidade de camundongos C57BL/6 de conterem a infecção por *L. braziliensis*, tanto no baço quanto no fígado.

A participação de p40 na indução de resposta inflamatória no fígado tem sido investigada também em outros modelos de infecção. No modelo experimental de esquistossomose, foi demonstrada a importância de IL-23 na manifestação da doença, caracterizada por intensa resposta inflamatória. Camundongos deficientes em p40 desenvolvem inflamação menos intensa que os camundongos selvagens, com menor produção de IFN- $\gamma$  e IL-17. O tratamento com anti-IL-17 ou a infecção em camundongos deficientes em p19, que não produzem IL-23, resultou numa resposta inflamatória menos intensa, com menor recrutamento de granulócitos (RUTITZKY *et al.*, 2005, 2008). Estes resultados demonstram a importância de p40 na indução de resposta inflamatória por meio da produção de IL-23 e estimulação de IL-17. Interessante que a depleção de neutrófilos durante as fases iniciais da infecção de camundongos BALB/c por *L. donovani*, resultou no aumento na produção de IL-4, bloqueou a maturação dos granulomas associados à menor expressão de iNOS e aumento da carga parasitária (MCFARLANE *et al.*, 2008). Nestes estudos, foi evidenciada a importância dos neutrófilos na indução de proteção. Estes resultados demonstram a participação de p40 na indução de resposta inflamatória, dependente da produção de IL-17 e da produção de citocinas e quimiocinas envolvidas com o recrutamento de neutrófilos. Assim, é possível que a deficiência em p40 nos camundongos C57BL/6 infectados por *L. braziliensis*, induza um menor recrutamento de neutrófilos, favorecendo o desenvolvimento de doença visceral caracterizada por uma resposta inflamatória que apesar de intensa, foi ineficiente no controle da infecção.

No presente trabalho, pela primeira vez, utilizou-se o modelo de infecção intradérmica

em orelha para avaliar a participação de p40 na infecção por *L. braziliensis*. Foi mostrado que camundongos deficientes em p40 não foram capazes de conter a infecção, desenvolvendo lesões progressivas, acompanhadas por intenso parasitismo e doença visceral. Estes resultados confirmam a importância da produção de p40 para o controle da infecção por *L. braziliensis* em camundongos C57BL/6, evidenciada anteriormente a partir do modelo convencional de infecção subcutânea. Nos camundongos C57BL/6p40<sup>-/-</sup>, a susceptibilidade à infecção foi associada com alterações nos padrões da resposta inflamatória, sendo esta uma observação nova, até então não descrita neste modelo. A evidência de que a incapacidade de produzir p40 resultou num menor recrutamento de neutrófilos durante as fases iniciais da infecção, aponta para a necessidade de estudos futuros que avaliem a cinética do recrutamento de neutrófilos para os sítios inflamatórios induzidos por *L. braziliensis*, a participação destas células na definição curso da infecção e aspectos de sua interação com esta espécie de *Leishmania*.

## 7 – CONCLUSÕES

---

- Camundongos C57BL/6 deficientes na produção de p40 são susceptíveis à infecção por via intradérmica com *L. braziliensis*, desenvolvendo lesões progressivas e doença visceral, confirmando a importância desta molécula para o controle da infecção.
- A deficiência em p40 interfere com o recrutamento de polimorfonucleares nas fases iniciais da infecção e altera a dinâmica e composição dos infiltrados inflamatórios, essenciais para o controle da infecção por *L. braziliensis* em camundongos C57BL/6.

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; CUPOLILO, S. M.; CARDOSO, F. O.; SOUZA, C. S.; GONCALVES DA COSTA, S. C. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Vet. Parasitol.**, v. 121, n. 3-4, p. 179-187, may. 2004.

AFONSO, L.; BORGES, V. M.; CRUZ, H.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; DOSREIS, G. A.; DUTRA, A. N.; CLARENCO, J.; DE OLIVEIRA, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKY, C. I. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J. Leukoc. Biol.**, v. 84, n. 2, p. 389-396, aug. 2008.

AGGARWAL, S.; GHILARDI, N.; XIE, M. H.; DE SAUVAGE, F. J.; GURNEY, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 3, p. 1910-1914, jan. 2003.

AGUILAR TORRENTERA, F.; LAMAN, J. D.; VAN MEURS, M.; ADORINI, L.; MURAILLE, E.; CARLIER, Y. Endogenous interleukin-12 is critical for controlling the late but not the early stage of *Leishmania mexicana* infection in C57BL/6 mice. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 9, p. 5075-5080, sep. 2002a.

AGUILAR TORRENTERA, F.; LAMBOT, M. A.; LAMAN, J. D.; VAN MEURS, M.; KISS, R.; NOEL, J. C.; CARLIER, Y. Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 3, p. 273-29, mar. 2002b.

AHMED, S.; COLMENARES, M.; SOONG, L.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MUNSTERMANN, L.; MOLINA, R.; MCMAHON-PRATT, D. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 1, p. 401-410, jan. 2003.

ALLENBACH, C.; ZUFFEREY, C.; PEREZ, C.; LAUNOIS, P.; MUELLER, C.; TACCHINI-COTTIER, F. Macrophages induce neutrophil apoptosis through membrane TNF, a process amplified by *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 176, n. 11, p. 6656-6664, jun. 2006.

ALMEIDA, M. C.; CUBA-CUBA, C. A.; MORAES, M. A.; MILES, M. A. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **J. Comp. Pathol.**, v. 115, n. 3, p. 311-316, oct. 1996.

ANDRADE, Z. A.; REED, S. G.; ROTERS, S. B.; SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, v. 114, n. 1, p. 137-148, jan. 1984.

ASTE-AMEZAGA, M.; MA, X.; SARTORI, A.; TRINCHIERI, G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. **J. Immunol.**, v. 160, n. 12, p. 5936-5944, jun. 1998.

BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA, A., JR.; JERONIMO, S.; CARVALHO, E. M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228-1231, aug. 2000.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J.; CARVALHO, E. M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, dec. 2002.

BADARO, R.; JONES, T. C.; LORENCO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D., JR. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 154, n. 4, p. 639-649, oct. 1986.

BANULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv. Parasitol.**, v. 64, p. 1-109, 2007.

BARBULESCU, K.; BECKER, C.; SCHLAAK, J. F.; SCHMITT, E.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H.; NEURATH, M. F. IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 160, n. 8, p. 3642-3647, apr. 1998.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; ALMEIDA, R.; DE JESUS, A. R.; GRIMALDI JUNIOR, G.; NETTO, E. M.; SANTOS, I.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Lymphadenopathy associated with Leishmania braziliensis cutaneous infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, n. 5, p. 587-592, nov. 1992a.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E. C.; BROWNELL, C. E.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for Leishmania braziliensis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 90, n. 8, p. 3442-3446, apr. 1993.

BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A. L.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **Int. J. Dermatol.**, v. 34, n. 7, p. 474-479, jul. 1995.

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.**, v. 53, n. 3, p. 256-259, sep. 1995.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; ET AL. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that Leishmania amazonensis produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 5, p. 536-546, may. 1991.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Transforming growth factor-beta in tegumentary leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 1, p. 1-9, jan. 1994.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A.; ELLINGSWORTH, L. R.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v. 257, n. 5069, p. 545-548, jul. 1992b.

BARRAL-NETTO, M.; DE FREITAS, L. A.; ANDRADE, Z. A. Histopathologic changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of BALB/c mice. **Am. J. Pathol.**, v. 127, n. 2, p. 271-278, may. 1987.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M. C.; WYNN, T. A.; SACKS, D. L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 10, p. 1497-1506, nov. 2001.

BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN-TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D. L. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 10, p. 1941-1953, nov. 1998.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502-507, dec. 2002.

BELLADONNA, M. L.; RENAULD, J. C.; BIANCHI, R.; VACCA, C.; FALLARINO, F.; ORABONA, C.; FIORETTI, M. C.; GROHMANN, U.; PUCCETTI, P. IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 168, n. 11, p. 5448-5554, jun. 2002.

BEZERRA, H. S.; TEIXEIRA, M. J. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 349-351, apr. 2001.

BIDDLESTONE, L. R.; HEPBURN, N. C.; MCLAREN, K. M. A clinico-pathological study of cutaneous leishmaniasis in British troops from Belize. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, n. 6, p. 672-676, nov/dec. 1994.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 51-66, jan-mar. 1991.

BITTENCOURT, A. L.; RODRIGUES DE FREITAS, L. A. [Diffuse cutaneous leishmaniasis. Anatomico-pathologic aspects]. **Med. Cutan. Ibero Lat. Am.**, v. 11, n. 4, p. 265-270, 1983.

BLISS, S. K.; MARSHALL, A. J.; ZHANG, Y.; DENKERS, E. Y. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. **J. Immunol.**, v. 162, n. 12, p. 7369-7375, jun. 1999.

BOAVENTURA, V. S.; CAFE, V.; COSTA, J.; OLIVEIRA, F.; BAFICA, A.; ROSATO, A.; DE FREITAS, L. A.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, n. 2, p. 267-269, aug. 2006.

BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DORING, R.; ROLLINGHOFF, M.; DIFENBACH, A.; RITTIG, M. G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **J. Exp. Med.**, v. 191, n. 12, p. 2121-2130, jun. 2000.

BOGDAN, C.; MOLL, H.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, n. 5, p. 1131-1135, may. 1990.

BOMFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; CARVALHO, E. M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, v. 84, n. 2, p. 188-194, nov. 1996.

BOTHA, T.; RYFFEL, B. Reactivation of latent tuberculosis infection in TNF-deficient mice. **J. Immunol.**, v. 171, n. 6, , p. 3110-3118, sep. 2003.

BRASIL, M. D. S. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2. ed., 2007. 182 p.

BROMBACHER, F.; KASTELEIN, R. A.; ALBER, G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. **Trends Immunol.**, v. 24, n. 4, p. 207-212, apr. 2003.

CALLAHAN, H. L.; PORTAL, I. F.; BENSINGER, S. J.; GROGL, M. *Leishmania* spp: temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for tropism in vivo. **Exp. Parasitol.**, v. 84, n. 3, p. 400-409, dec. 1996.

CARR, J. A.; ROGERSON, J. A.; MULQUEEN, M. J.; ROBERTS, N. A.; NASH, A. A. The role of endogenous interleukin-12 in resistance to murine cytomegalovirus (MCMV) infection and a novel action for endogenous IL-12 p40. **J. Interf. Cytok. Res.**, v. 19, n. 10, p. 1145-1152, oct. 1999.

CARTER, L. L.; MURPHY, K. M. Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (Stat)4 in interferon gamma production from CD4(+) versus CD8(+) T cells. **J. Exp. Méd.**, v. 189, n. 8, p. 1355-1360, apr. 1999.

CARVALHAL, D. G.; BARBOSA, A., JR.; D'EL-REI HERMIDA, M.; CLARENCIO, J.; PINHEIRO, N. F., JR.; VERAS, P. S.; DOS-SANTOS, W. L. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. **Exp. Parasitol.**, v. 107, n. 3-4, p. 189-119, jul/aug. 2004.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.** v. 6, n. 4, p. 315-325, apr. 1994.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; JOHNSON, W. D., JR. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. **J. Infect. Dis.**, v. 165, n. 3, p. 535-540, mar. 1992.

CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P. D.; COSTA, J. L.; REED, S.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 135, n. 6, p. 4144-4148, dec. 1985.

CARVALHO, E. M.; TEIXEIRA, R. S.; JOHNSON, W. D., JR. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. **Infect. Immun.**, v. 33, n. 2, p. 498-500, aug. 1981.

CARVALHO, L. P.; PEARCE, E. J.; SCOTT, P. Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania braziliensis*: infected cells produce high levels of TNF-alpha, whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell responses. **J. Immunol.**, v. 181, n. 9, p. 6473-6480, nov. 2008.

CASSATELLA, M. A.; MEDA, L.; GASPERINI, S.; D'ANDREA, A.; MA, X.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 1, p. 1-5, jan. 1995.

CHAKIR, H.; CAMPOS-NETO, A.; MOJIBIAN, M.; WEBB, J. R. IL-12Rbeta2-deficient mice of a genetically resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection and develop a parasite-specific Th2 immune response. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 4, p. 241-249, apr. 2003.

CHAN, S. H.; PERUSSIA, B.; GUPTA, J. W.; KOBAYASHI, M.; POSPISIL, M.; YOUNG, H. A.; WOLF, S. F.; YOUNG, D.; CLARK, S. C.; TRINCHIERI, G. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. **J. Exp. Med.**, v. 173, n. 4, p. 869-879, apr. 1991.

CHARMOY, M.; MEGNEKOU, R.; ALLENBACH, C.; ZWEIFEL, C.; PEREZ, C.; MONNAT, K.; BRETON, M.; RONET, C.; LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTTIER, F. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. **J. Leukoc. Biol.**, v. 82, n. 2, p. 288-299, aug. 2007.

CHEN, L.; ZHANG, Z. H.; WATANABE, T.; YAMASHITA, T.; KOBAYAKAWA, T.; KANEKO, A.; FUJIWARA, H.; SENDO, F. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. **Parasitol. Int.**, v. 54, n. 2, p. 109-118 jun. 2005.

CHILDS, G. E.; LIGHTNER, L. K.; MCKINNEY, L.; GROVES, M. G.; PRICE, E. E.; HENDRICKS, L. D. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 78, n. 1, p. 25-34, Feb. 1984.

COOPER, A. M.; DALTON, D. K.; STEWART, T. A.; GRIFFIN, J. P.; RUSSELL, D. G.; ORME, I. M. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 6, p. 2243-2247, dec. 1993.

COOPER, A. M.; MAGRAM, J.; FERRANTE, J.; ORME, I. M. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. **J. Exp. Méd.**, v. 186, n. 1, p. 39-45, jul. 1997.

COSTA, J. M.; MARSDEN, P. D.; LLANOS-CUENTAS, E. A.; NETTO, E. M.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; ROSA, A. C.; CUBA, C. C.; MAGALHAES, A. V.;

BARRETO, A. C. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **J. Trop. Méd. Hyg.**, v. 89, n.6, p. 319-323, dec. 1986.

COSTA, J. M.; VALE, K. C.; FRANCA, F.; SALDANHA, A. C.; DA SILVA, J. O.; LAGO, E. L.; MARSDEN, P. D.; MAGALHAES, A. V.; E SILVA, C. M.; SERRA NETO, A.; ET AL. [Spontaneous healing of leishmaniasis caused by *Leishmania viannia braziliensis* in cutaneous lesions. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, v. 23, n. 4, p. 205-208, oct/dec. 1990.

COUTINHO, S. G.; OLIVEIRA, M. P.; DA-CRUZ, A. M.; DE LUCA, P. M.; MENDONCA, S. C.; BERTHO, A. L.; SOONG, L.; MCMAHON-PRATT, D. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. **Exp. Parasitol.**, v. 84, n. 2, p.144-155, nov. 1996.

DA-CRUZ, A. M.; BITTAR, R.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; NOGUEIRA, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; AZEREDO-COUTINHO, R. B.; COUTINHO, S. G. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 2, p. 251-256, mar. 2002.

D'ANDREA, A.; MA, X.; ASTE-AMEZAGA, M.; PAGANIN, C.; TRINCHIERI, G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. **J. Exp. Med.**, v. 181, n. 2, p. 537-546, feb. 1995.

DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n.7, p. 861-870, oct. 2003.

DECKEN, K.; KOHLER, G.; PALMER-LEHMANN, K.; WUNDERLIN, A.; MATTNER, F.; MAGRAM, J.; GATELY, M. K.; ALBER, G. Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 10, p. 4994-5000, oct. 1998.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect Immun**, v.66, n.2, p. 827-829, feb. 1998.

DENG, W.; THIEL, B.; TANNENBAUM, C. S.; HAMILTON, T. A.; STUEHR, D. J. Synergistic cooperation between T cell lymphokines for induction of the nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v. 151, n. 1, p. 322-329, jul. 1993.

DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 1, p. 35-41, jan. 2005.

DING, A.; NATHAN, C. F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D. J.; SRIMAL, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. **J. Immunol.**, v. 145, n. 3, p. 940-944, aug. 1990.

DOHERTY, T. M.; COFFMAN, R. L. *Leishmania major*: effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c mice. **Exp. Parasitol.**, v. 84, n. 2, p. 124-135, nov. 1996.

D'OLIVEIRA JUNIOR, A.; COSTA, S. R.; BARBOSA, A. B.; ORGE, M. D. L. G.; CARVALHO, E. M. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, p. 15-20, jan/feb. 1997.

DONNELLY, K. B.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. **J. Parasitol.**, v. 84, n. 1, p. 97-103, feb. 1998.

DU, C.; SRIRAM, S. Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 64, n. 1, p. 92-97, jul. 1998.

DUBOIS, B.; MASSACRIER, C.; VANBERVLIET, B.; FAYETTE, J.; BRIERE, F.; BANCHEREAU, J.; CAUX, C. Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 161, n. 5, p. 2223-2231, sep. 1998.

EHRCHEN, J. M.; ROTH, J.; ROEBROCK, K.; VARGA, G.; DOMSCHKE, W.; NEWBERRY, R.; SORG, C.; MULLER-TIDOW, C.; SUNDERKOTTER, C.; KUCHARZIK, T.; SPAHN, T. W. The absence of cutaneous lymph nodes results in a Th2 response and increased susceptibility to *Leishmania major* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 9, p. 4241-4250, sep. 2008.

ELKINS, K. L.; COOPER, A.; COLOMBINI, S. M.; COWLEY, S. C.; KIEFFER, T. L. In vivo clearance of an intracellular bacterium, *Francisella tularensis* LVS, is dependent on the p40 subunit of interleukin-12 (IL-12) but not on IL-12 p70. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 4, p. 1936-1948, apr. 2002.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; STAGER, S.; ALEXANDER, C. E.; STANLEY, A. C.; KAYE, P. M. Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani* infection. **Am. J. Pathol.**, v. 165, n. 6, p. 2123-2133, dec. 2004.

ENGWERDA, C. R.; MURPHY, M. L.; COTTERELL, S. E.; SMELT, S. C.; KAYE, P. M. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 2, p. 669-680, feb. 1998.

EVANS, T. G.; THAI, L.; GRANGER, D. L.; HIBBS, J. B., JR. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 151, n. 2, p. 907-915, jul. 1993.

FARIA, D. R.; GOLLOB, K. J.; BARBOSA, J., JR.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P. R.; LESSA, H.; CARVALHO, L. P.; ROMANO-SILVA, M. A.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; DUTRA, W. O. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 12, p. 7853-7859, dec. 2005.

FAVALI, C.; TAVARES, N.; CLARENCIO, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 82, n. 6, p. 1401-1406, dec. 2007.

FLYNN, J. L.; SCANGA, C. A.; TANAKA, K. E.; CHAN, J. Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. **J. Immunol.**, v. 160, n. 4, p. 1796-1803, feb. 1998.

FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; BACELLAR, O.; ARAUJO, C. B.; CARVALHO, L. P.; ALMEIDA, R. P.; CARVALHO, E. M. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n. 11, p. E54-58, jun. 2002.

FOSSIEZ, F.; DJOSSOU, O.; CHOMARAT, P.; FLORES-ROMO, L.; AIT-YAHIA, S.; MAAT, C.; PIN, J. J.; GARRONE, P.; GARCIA, E.; SAELAND, S.; BLANCHARD, D.; GAILLARD, C.; DAS MAHAPATRA, B.; ROUVIER, E.; GOLSTEIN, P.; BANCHEREAU, J.; LEBECQUE, S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **J. Exp. Méd.**, v. 183, n. 6, p. 2593-2603, jun. 1996.

GALVAO, C. E.; SILVA, A. C.; SALDANHA, A. C.; SILVA, C. M.; COSTA MDO, R.; COSTA, J. M. [Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia braziliensis* in the state of Maranhao, Brazil]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 26, n. 2, p. 121-123, apr/jun. 1993.

GAMA, M. E.; COSTA, J. M.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n.8, p. 889-893, dec. 2004.

GATELY, M. K.; CARVAJAL, D. M.; CONNAUGHTON, S. E.; GILLESSEN, S.; WARRIER, R. R.; KOLINSKY, K. D.; WILKINSON, V. L.; DWYER, C. M.; HIGGINS, G. F., JR.; PODLASKI, F. J.; FAHERTY, D. A.; FAMILLETTI, P. C.; STERN, A. S.; PRESKY, D. H. Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 795, p. 1-12, oct. 1996.

GILLESSEN, S.; CARVAJAL, D.; LING, P.; PODLASKI, F. J.; STREMLO, D. L.; FAMILLETTI, P. C.; GUBLER, U.; PRESKY, D. H.; STERN, A. S.; GATELY, M. K. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 1, p. 200-206, jan. 1995.

GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F.; TAVARES RDA, S.; WIETZERBIN, J.; DE FREITAS, L. A.; VERAS, P. S. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 4, p. 251-260, apr. 2003.

GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B., JR.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania* major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **J. Immunol.**, v. 144, n. 1, p. 278-283, jan. 1990.

GREEN, S. J.; NACY, C. A.; MELTZER, M. S. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. **J. Leukoc. Biol.**, v. 50, n. 1, p. 93-103, jul. 1991.

GREENBERGER, M. J.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L.; DANFORTH, J. M.; LAICHALK, L. L.; MCGILLICUDDY, D. C.; STANDIFORD, T. J. Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine *Klebsiella pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, v. 173, n. 1, p. 159-165, jan. 1996.

GRIMALDI JUNIOR., G. Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 77, n. 2, p. 195-215, apr/jun. 1982.

GUBLER, U.; CHUA, A. O.; SCHOENHAUT, D. S.; DWYER, C. M.; MCCOMAS, W.; MOTYKA, R.; NABAVI, N.; WOLITZKY, A. G.; QUINN, P. M.; FAMILLETTI, P. C.; ET AL. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 10, p. 4143-4147, may. 1991.

GUEIRARD, P.; LAPLANTE, A.; RONDEAU, C.; MILON, G.; DESJARDINS, M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cell. Microbiol.**, v. 10, n. 1, p. 100-111, jan. 2008.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THERY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 621-667, 2002.

HA, S. J.; LEE, C. H.; LEE, S. B.; KIM, C. M.; JANG, K. L.; SHIN, H. S.; SUNG, Y. C. A novel function of IL-12p40 as a chemotactic molecule for macrophages. **J. Immunol.**, v. 163, n. 5, p. 2902-2908, sep. 1999.

HAPPEL, K. I.; ZHENG, M.; YOUNG, E.; QUINTON, L. J.; LOCKHART, E.; RAMSAY, A. J.; SHELLITO, J. E.; SCHURR, J. R.; BAGBY, G. J.; NELSON, S.; KOLLS, J. K. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. **J. Immunol.**, v. 170, n. 9, p. 4432-4436, may. 2003.

HAYES, M. P.; MURPHY, F. J.; BURD, P. R. Interferon-gamma-dependent inducible expression of the human interleukin-12 p35 gene in monocytes initiates from a TATA-containing promoter distinct from the CpG-rich promoter active in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. **Blood**, v. 91, n. 12, p. 4645-4651, jun. 1998.

HEINZEL, F. P.; HUJER, A. M.; AHMED, F. N.; RERKO, R. M. In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. **J. Immunol.**, v. 158, n. 9, p. 4381-4388, may. 1997.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.**, v. 169, n. 1, p. 59-72, jan. 1989.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; MUTHA, S. S.; LOCKSLEY, R. M. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 16, p. 7011-7015, aug. 1991.

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, v. 177, n. 5, p. 1505-1509, may. 1993.

HODGE, D. L.; SCHILL, W. B.; WANG, J. M.; BLANCA, I.; REYNOLDS, D. A.; ORTALDO, J. R.; YOUNG, H. A. IL-2 and IL-12 alter NK cell responsiveness to IFN-gamma-inducible protein 10 by down-regulating CXCR3 expression. **J. Immunol.**, v. 168, n. 12, p. 6090-6098, jun. 2002.

HOLADAY, B. J.; SADICK, M. D.; WANG, Z. E.; REINER, S. L.; HEINZEL, F. P.; PARSLAW, T. G.; LOCKSLEY, R. M. Reconstitution of Leishmania immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1- and Th2-like cell lines. **J. Immunol.**, v. 147, n. 5, p. 1653-1658, sep. 1991.

HOLSCHER, C.; ATKINSON, R. A.; ARENDSE, B.; BROWN, N.; MYBURGH, E.; ALBER, G.; BROMBACHER, F. A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection. **J. Immunol.**, v. 167, n. 12, p. 6957-6966, dec. 2001.

HONDOWICZ, B.; SCOTT, P. Influence of parasite load on the ability of type 1 T cells to control Leishmania major infection. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 2, p. 498-503, feb. 2002.

HSIEH, C. S.; MACATONIA, S. E.; O'GARRA, A.; MURPHY, K. M. Pathogen-induced Th1 phenotype development in CD4+ alpha beta-TCR transgenic T cells is macrophage dependent. **Int. Immunol.**, v. 5, n. 4, p. 371-382, apr. 1993.

HUNTER, C. A.; CHIZZONITE, R.; REMINGTON, J. S. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. **J. Immunol.**, v. 155, n. 9, p. 4347-4354, nov. 1995.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 4, p. 533-547, dec. 1995.

JANA, M.; DASGUPTA, S.; SAHA, R. N.; LIU, X.; PAHAN, K. Induction of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by interleukin-12 p40 monomer and homodimer in microglia and macrophages. **J. Neurochem.**, v. 86, n. 2, p. 519-528, jul. 2003.

JONES, T. C.; JOHNSON, W. D., JR.; BARRETTO, A. C.; LAGO, E.; BADARO, R.; CERF, B.; REED, S. G.; NETTO, E. M.; TADA, M. S.; FRANCA, T. F.; ET AL. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to Leishmania braziliensis braziliensis. **J. Infect. Dis.**, v. 156, n. 1, p. 73-83, jul. 1987.

KADOWAKI, N.; HO, S.; ANTONENKO, S.; MALEFYT, R. W.; KASTELEIN, R. A.; BAZAN, F.; LIU, Y. J. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 6, p. 863-869, sep. 2001.

KAHL, L. P.; BYRAM, J. E.; DAVID, J. R.; COMERFORD, S. A.; VON LICHTENBERG, F. Leishmania (Viannia) braziliensis: comparative pathology of golden hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 2, p. 218-232, feb. 1991.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, jan. 2001.

KAPLAN, M. H.; SUN, Y. L.; HOEY, T.; GRUSBY, M. J. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. **Nature**, v. 382, n. 6587, p. 174-177, jul. 1996.

KATO, T.; HAKAMADA, R.; YAMANE, H.; NARIUCHI, H. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. **J. Immunol.**, v. 156, n. 10, p. 3932-2928, may. 1996.

KELSALL, B. L.; STUBER, E.; NEURATH, M.; STROBER, W. Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 795, p. 116-126, oct. 1996.

KHADER, S. A.; PARTIDA-SANCHEZ, S.; BELL, G.; JELLEY-GIBBS, D. M.; SWAIN, S.; PEARL, J. E.; GHILARDI, N.; DESAUVAGE, F. J.; LUND, F. E.; COOPER, A. M. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 7, p. 1805-1815, jul. 2006.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med. Vet. Entomol.**, v. 4, n. 1, p.1-24, jan. 1990.

KIRKPATRICK, C. E.; NOLAN, T. J.; FARRELL, J. P. Rate of Leishmania-induced skin-lesion development in rodents depends on the site of inoculation. **Parasitology**, v. 94, pt. 3, p. 451-465, jun. 1987.

KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R. M.; CLARK, S. C.; CHAN, S.; LOUDON, R.; SHERMAN, F.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 170, n. 3, p. 827-845, sep. 1989.

KOPF, M.; BROMBACHER, F.; KOHLER, G.; KIENZLE, G.; WIDMANN, K. H.; LEFRANG, K.; HUMBORG, C.; LEDERMANN, B.; SOLBACH, W. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with Leishmania major. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 3, p. 1127-1136, sep. 1996.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of Leishmania in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421-424, jul/sep. 1987.

LASKAY, T.; DIEFENBACH, A.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Early parasite containment is decisive for resistance to Leishmania major infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 8, p. 2220-2227, aug. 1995.

LEAL, L. M.; MOSS, D. W.; KUHN, R.; MULLER, W.; LIEW, F. Y. Interleukin-4 transgenic mice of resistant background are susceptible to Leishmania major infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 2, p. 566-569, feb. 1993.

LEHMANN, J.; BELLMANN, S.; WERNER, C.; SCHRODER, R.; SCHUTZE, N.; ALBER, G. IL-12p40-dependent agonistic effects on the development of protective innate and adaptive immunity against Salmonella enteritidis. **J. Immunol.**, v. 167, n. 9, p. 5304-5315, nov. 2001.

LEMOS DE SOUZA, V.; ASCENCAO SOUZA, J.; SILVA, T. M. C.; VERAS, P. S. T.; FREITAS, L. A. R. Different Leishmania species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 15, p. 1807-1815, dec. 2000.

LEOPOLDO, P. T.; MACHADO, P. R.; ALMEIDA, R. P.; SCHRIEFER, A.; GIUDICE, A.; DE JESUS, A. R.; HO, J. L.; GUIMARAES, L. H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. **BMC Infect. Dis.**, v. 6, p. 75, 2006.

LI, J.; HUNTER, C. A.; FARRELL, J. P. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. **J. Immunol.**, v. 162, n. 2, p. 974-979, jan. 1999.

LIEBERMAN, L. A.; CARDILLO, F.; OWYANG, A. M.; RENNICK, D. M.; CUA, D. J.; KASTELEIN, R. A.; HUNTER, C. A. IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12. **J. Immunol.**, v. 173, n. 3, p. 1887-1893, aug. 2004.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.**, v. 145, n. 12, p. 4306-4310, dec. 1990a.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Immunology**, v. 71, n. 4, p.556-559, dec. 1990b.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J. Immunol.**, v. 144, n. 12, p. 4794-4797, jun. 1990c.

LIEW, F. Y.; PARKINSON, C.; MILLOTT, S.; SEVERN, A.; CARRIER, M. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, v. 69, n. 4, p. 570-573, apr. 1990d.

LIMA, G. M.; VALLOCHI, A. L.; SILVA, U. R.; BEVILACQUA, E. M.; KIFFER, M. M.; ABRAHAMSOHN, I. A. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, v. 64, n. 2-3, p. 145-151, dec. 1998.

LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 12, p. 5442-5445, dec. 1996.

LIRA, R.; DOHERTY, M.; MODI, G.; SACKS, D. Evolution of lesion formation, parasitic load, immune response, and reservoir potential in C57BL/6 mice following high- and low-dose challenge with *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 9, p. 5176-5182, sep. 2000.

LLANOS CUENTAS, E. A.; CUBA, C. C.; BARRETO, A. C.; MARSDEN, P. D. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis* infections. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 6, p. 845-846, 1984.

LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; GARDNER, K. D., JR. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.**, v. 138, n. 5, p. 744-749, sep-oct. 1987.

LOUIS, J.; HIMMELRICH, H.; PARRA-LOPEZ, C.; TACCHINI-COTTIER, F.; LAUNOIS, P. Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 10, n. 4, p. 459-464, aug. 1998.

MA, X.; TRINCHIERI, G. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. **Adv. Immunol.**, v. 79, p. 55-92, 2001.

MA, X.; CHOW, J. M.; GRI, G.; CARRA, G.; GEROSA, F.; WOLF, S. F.; DZIALO, R.; TRINCHIERI, G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 1, p. 147-157, jan. 1996.

MACATONIA, S. E.; HSIEH, C. S.; MURPHY, K. M.; O'GARRA, A. Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent. **Int. Immunol.**, v. 5, n. 9, p. 1119-1128, sep. 1993.

MAGALHAES, A. V.; MORAES, M. A.; RAICK, A. N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J. M.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. [Histopathology of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 4. Histopathological classification]. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 28, n. 6, p. 421-430, nov-dec. 1986.

MAGRAM, J.; SFARRA, J.; CONNAUGHTON, S.; FAHERTY, D.; WARRIER, R.; CARVAJAL, D.; WU, C. Y.; STEWART, C.; SARMIENTO, U.; GATELY, M. K. IL-12-deficient mice are defective but not devoid of type 1 cytokine responses. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 795, p. 60-70, oct. 1996.

MAIOLI, T. U.; TAKANE, E.; ARANTES, R. M.; FIETTO, J. L.; AFONSO, L. C. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. **Parasitol. Res.**, v. 94, n. 3, p. 207-212, oct. 2004.

MANETTI, R.; GEROSA, F.; GIUDIZI, M. G.; BIAGIOTTI, R.; PARRONCHI, P.; PICCINNI, M. P.; SAMPOGNARO, S.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; TRINCHIERI, G.; ET AL. Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. **J. Exp. Med.**, v. 179, n. 4, p. 1273-1283, apr. 1994.

MANETTI, R.; PARRONCHI, P.; GIUDIZI, M. G.; PICCINNI, M. P.; MAGGI, E.; TRINCHIERI, G.; ROMAGNANI, S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **J. Exp. Med.**, v. 177, n. 4, p. 1199-1204, apr. 1993.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Tres Bracos, Bahia-Brazil. **Rev. Soc. Brás. Med. Trop.**, v. 27, n. 2, p. 93-101, apr-jun. 1994.

MARTINEZ, J. E.; ALBA; ARIAS, L.; ESCOBAR, M. A.; SARAIVIA, N. G. Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 4, p. 392-394, jul-aug. 1992.

MARUO, S.; TOYO-OKA, K.; OH-HORA, M.; TAI, X. G.; IWATA, H.; TAKENAKA, H.; YAMADA, S.; ONO, S.; HAMAOKA, T.; KOBAYASHI, M.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; FUJIWARA, H. IL-12 produced by antigen-presenting cells induces IL-2-

independent proliferation of T helper cell clones. **J. Immunol.**, v. 156, n. 5, p.1748-1755, mar. 1996.

MATTNER, F.; FISCHER, S.; GUCKES, S.; JIN, S.; KAULEN, H.; SCHMITT, E.; RUDE, E.; GERMAN, T. The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 9, p. 2202-2208, sep. 1993.

MATTNER, F.; MAGRAM, J.; FERRANTE, J.; LAUNOIS, P.; DI PADOVA, K.; BEHIN, R.; GATELY, M. K.; LOUIS, J. A.; ALBER, G. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, n. 7, p. 1553-1559, jul. 1996.

MCFARLANE, E.; PEREZ, C.; CHARMOY, M.; ALLENBACH, C.; CARTER, K. C.; ALEXANDER, J.; TACCHINI-COTTIER, F. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 2, p. 532-541, feb. 2008.

MCKINNEY, L. A.; HENDRICKS, L. D. Experimental infection of *Mystromys albicaudatus* with *Leishmania braziliensis*: pathology. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, n. 5, p. 753-760, sep. 1980.

MELBY, P. C.; YANG, J.; ZHAO, W.; PEREZ, L. E.; CHENG, J. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 8, p. 4719-4725, aug. 2001.

MELBY, P. C.; YANG, Y. Z.; CHENG, J.; ZHAO, W. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 1, p.18-27, jan, 1998.

MENDONCA, M. G.; DE BRITO, M. E.; RODRIGUES, E. H.; BANDEIRA, V.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **J. Infect. Dis.**, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, mar. 2004.

MERBERG, D. M.; WOLF, S. F.; CLARK, S. C. Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family. **Immunol. Today**, v. 13, n. 2, p. 77-78, feb. 1992.

MIKOLS, C. L.; YAN, L.; NORRIS, J. Y.; RUSSELL, T. D.; KHALIFAH, A. P.; HACHEM, R. R.; CHAKINALA, M. M.; YUSEN, R. D.; CASTRO, M.; KUO, E.; PATTERSON, G. A.; MOHANAKUMAR, T.; TRULOCK, E. P.; WALTER, M. J. IL-12 p80 is an innate epithelial cell effector that mediates chronic allograft dysfunction. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 174, n. 4, p. 461-470, aug. 2006.

MOLL, H.; BINODER, K.; BOGDAN, C.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M. Production of tumour necrosis factor during murine cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 12, n. 5, p. 483-494, sep. 1990.

MOLL, H.; FUCHS, H.; BLANK, C.; ROLLINGHOFF, M. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 7, p. 1595-1601, jul. 1993.

MONTEIRO, M. C.; LIMA, H. C.; SOUZA, A. A.; TITUS, R. G.; ROMAO, P. R.; CUNHA, F. Q. Effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extracts on leukocyte migration induced by *Leishmania major*. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, v. 76, n. 1, p. 88-94, jan. 2007.

MOURA, T. R.; NOVAIS, F. O.; OLIVEIRA, F.; CLARENCIO, J.; NORONHA, A.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 9, p. 5827-5834, sep. 2005.

MOURA, T. R.; OLIVEIRA, F.; NOVAIS, F. O.; MIRANDA, J. C.; CLARENCIO, J.; FOLLADOR, I.; CARVALHO, E. M.; VALENZUELA, J. G.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I. Enhanced *Leishmania braziliensis* Infection Following Pre-Exposure to Sandfly Saliva. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 1, n. 2, p. E84, 2007.

MULLER, G.; SALOGA, J.; GERMANN, T.; BELLINGHAUSEN, I.; MOHAMADZADEH, M.; KNOP, J.; ENK, A. H. Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12. **J. Clin. Invest.**, v. 94, n. 5, p. 1799-1805, nov. 1994.

MURPHY, M. L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E. N.; HUNTER, C. A.; FARRELL, J. P. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 10, p. 2848-2856, oct. 2001.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, n. 5, p. 249-267 oct. 2001.

MURRAY, H. W.; DELPH-ETIENNE, S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 1, p. 288-293, jan. 2000.

MURRAY, H. W.; LU, C. M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A. L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R. L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 11, p. 6284-6293, nov. 2002.

MURRAY, H. W.; TSAI, C. W.; LIU, J.; MA, X. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 7, p. 4370-4374, jul. 2006.

NABORS, G. S.; NOLAN, T.; CROOP, W.; LI, J.; FARRELL, J. P. The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c x C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. **Parasite Immunol.**, v. 17, n. 11, p. 569-579, nov. 1995.

NABORS, G. S.; NOLAN, T.; CROOP, W.; LI, J.; FARRELL, J. P. The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c x C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. **Parasite Immunol.**, v. 17, n. 11, p. 569-579, nov. 1995.

NACY, C. A.; NELSON, B. J.; MELTZER, M. S.; GREEN, S. J. Cytokines that regulate macrophage production of nitrogen oxides and expression of antileishmanial activities. **Res. Immunol.**, v. 142, n. 7, p. 573-576, sep. 1991.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 3, p. 173-182, mar. 2006.

NEAL, R. A.; HALE, C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, v. 87, pt 1, p. 7-13, aug. 1983.

NIEVES, E.; PIMENTA, P. F. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 37, n. 1, p. 134-140, jan. 2000.

NIGG, A. P.; ZAHN, S.; RUCKERL, D.; HOLSCHER, C.; YOSHIMOTO, T.; EHRCHEN, J. M.; WOLBING, F.; UDEY, M. C.; VON STEBUT, E. Dendritic cell-derived IL-12p40 homodimer contributes to susceptibility in cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **J. Immunol.**, v. 178, n. 11, p. 7251-7258, jun. 2007.

NOBEN-TRAUTH, N.; LIRA, R.; NAGASE, H.; PAUL, W. E.; SACKS, D. L. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 170, n. 10, p. 5152-5158, may. 2003.

OLIVEIRA, M. A.; TADOKORO, C. E.; LIMA, G. M.; MOSCA, T.; VIEIRA, L. Q.; LEENEN, P. J.; ABRAHAMSOHN, I. A. Macrophages at intermediate stage of maturation produce high levels of IL-12 p40 upon stimulation with *Leishmania*. **Microbes Infect.**, v. 7, n. 2, p. 213-223, feb. 2005.

OLIVEIRA, M. P.; LIMA, M. C.; CALHEIROS, A. S.; MARTINS, M. A.; ANTAS, P. R.; DE LUCA, P. M.; PIRMEZ, C. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: human mast cell line activation induced by logarithmic and stationary promastigote derived-lysates. **Exp. Parasitol.**, v. 109, n. 2, p. 72-99, feb. 2005.

OPPMANN, B.; LESLEY, R.; BLOM, B.; TIMANS, J. C.; XU, Y.; HUNTE, B.; VEGA, F.; YU, N.; WANG, J.; SINGH, K.; ZONIN, F.; VAISBERG, E.; CHURAKOVA, T.; LIU, M.; GORMAN, D.; WAGNER, J.; ZURAWSKI, S.; LIU, Y.; ABRAMS, J. S.; MOORE, K. W.; RENNICK, D.; DE WAAL-MALEFYT, R.; HANNUM, C.; BAZAN, J. F.; KASTELEIN, R. A. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 715-725, nov. 2000.

PADIGEL, U. M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J. P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. **J. Immunol.**, v. 171, n. 7, p. 3705-3710, oct. 2003.

PAHAN, K.; SHEIKH, F. G.; LIU, X.; HILGER, S.; MCKINNEY, M.; PETRO, T. M. Induction of nitric-oxide synthase and activation of NF-kappaB by interleukin-12 p40 in microglial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 11, p. 7899-7905, mar. 2001.

PAKPOUR, N.; ZAPH, C.; SCOTT, P. The central memory CD4+ T cell population generated during *Leishmania major* infection requires IL-12 to produce IFN-gamma. **J. Immunol.**, v. 180, n. 12, p. 8299-8305, jun. 2008.

PARHAM, C.; CHIRICA, M.; TIMANS, J.; VAISBERG, E.; TRAVIS, M.; CHEUNG, J.; PFLANZ, S.; ZHANG, R.; SINGH, K. P.; VEGA, F.; TO, W.; WAGNER, J.; O'FARRELL, A. M.; MCCLANAHAN, T.; ZURAWSKI, S.; HANNUM, C.; GORMAN, D.; RENNICK,

- D. M.; KASTELEIN, R. A.; DE WAAL MALEFYT, R.; MOORE, K. W. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. **J. Immunol.**, v. 168, n. 11, p. 5699-5708, jun. 2002.
- PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B. D.; SCOTT, P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v. 165, n. 2, p. 896-902, jul. 2000.
- PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B.; KOPF, M.; SCOTT, P. The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 168, n. 11, p. 5771-5777, jun. 2002.
- PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M.; OSELKA, G. W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. **J. Pediatr., Rio de Janeiro**, v. 78, n. 2, p. 120-127, mar-apr. 2002.
- PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.**, v. 127, n. 4, p. 1438-1443, oct. 1981.
- PERUSSIA, B.; CHAN, S. H.; D'ANDREA, A.; TSUJI, K.; SANTOLI, D.; POSPISIL, M.; YOUNG, D.; WOLF, S. F.; TRINCHIERI, G. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. **J. Immunol.**, v. 149, n. 11, p. 3495-3502, dec. 1992.
- PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, aug. 2008.
- PINHEIRO, N. F., JR.; HERMIDA, M. D.; MACEDO, M. P.; MENGEL, J.; BAFICA, A.; DOS-SANTOS, W. L. *Leishmania* infection impairs beta 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. **Infect. Immun.**, v. n74, n. 7, p. 3912-3921, jul. 2006.
- PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEICAO-SILVA, F.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J Clin Invest**, v.91, n.4, Apr, p.1390-5. 1993.
- PODLASKI, F. J.; NANDURI, V. B.; HULMES, J. D.; PAN, Y. C.; LEVIN, W.; DANHO, W.; CHIZZONITE, R.; GATELY, M. K.; STERN, A. S. Molecular characterization of interleukin 12. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 294, n. 1, p. 230- 237, apr. 1992.
- PRESKY, D. H.; MINETTI, L. J.; GILLESSEN, S.; WILKINSON, V. L.; WU, C. Y.; GUBLER, U.; CHIZZONITE, R.; GATELY, M. K. Analysis of the multiple interactions between IL-12 and the high affinity IL-12 receptor complex. **J. Immunol.**, v. 160, n. 5, p. 2174-2179, mar. 1998.
- PRESKY, D. H.; YANG, H.; MINETTI, L. J.; CHUA, A. O.; NABAVI, N.; WU, C. Y.; GATELY, M. K.; GUBLER, U. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 24, p. 14002-14007, nov. 1996.

RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97 Suppl 1, p. 17-28, oct. 2003.

REED, S. G. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 8, 15, p. 3442-3446, apr. 1993.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C.; GOMES, N. A.; MONIZ-DE-SOUZA, M. C.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; ARNHOLDT, A. C.; CALICH, V. L.; COUTINHO, S. G.; LOPES, M. F.; DOSREIS, G. A. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v. 172, n. 7, p. 4454-4462, apr. 2004.

RIDLEY, D. S.; MARSDEN, P. D.; CUBA, C. C.; BARRETO, A. C. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 4, p. 508-514, 1980.

ROCHA, F. J.; SCHLEICHER, U.; MATTNER, J.; ALBER, G.; BOGDAN, C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 8, p. 3823-3832, aug. 2007.

ROGGE, L.; BARBERIS-MAINO, L.; BIFFI, M.; PASSINI, N.; PRESKY, D. H.; GUBLER, U.; SINIGAGLIA, F. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. **J. Exp. Méd.**, v. 185, n. 5, p. 825-831, mar. 1997.

ROSATO, A. B. **Avaliação do polimorfismo genético de *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2004. 90 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; FERRUA, B.; MICHIELS, J. F.; ANJUERE, F.; FRAGAKI, K.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiol.**, v. 1, p. 17, 2001.

ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; FERRUA, B.; MICHIELS, J. F.; ANJUERE, F.; FRAGAKI, K.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiol.**, v. 1, p. 17, 2001.

RUSSELL, T. D.; YAN, Q.; FAN, G.; KHALIFAH, A. P.; BISHOP, D. K.; BRODY, S. L.; WALTER, M. J. IL-12 p40 homodimer-dependent macrophage chemotaxis and respiratory viral inflammation are mediated through IL-12 receptor beta 1. **J. Immunol.**, v. 171, n. 12, p. 6866-6874, dec. 2003.

RUTITZKY, L. I.; BAZZONE, L.; SHAINHEIT, M. G.; JOYCE-SHAIKH, B.; CUA, D. J.; STADECKER, M. J. IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. **J. Immunol.**, v. 180, n. 4, p. 2486-2495, feb. 2008.

RUTITZKY, L. I.; LOPES DA ROSA, J. R.; STADECKER, M. J. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. **J. Immunol.**, v. 175, n. 6, p. 3920-3926, sep. 2005.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 11, p. 845-858, nov. 2002.

SADICK, M. D.; HEINZEL, F. P.; HOLADAY, B. J.; PU, R. T.; DAWKINS, R. S.; LOCKSLEY, R. M. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. **J. Exp. Med.**, v. 171, n. 1, p. 115-127, jan. 1990.

SAMUELSON, J.; LERNER, E.; TESH, R.; TITUS, R. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **J. Exp. Med.**, v. 173, n. 1, p. 49-54, jan. 1991.

SCHMITT, E.; HOEHN, P.; HUELS, C.; GOEDERT, S.; PALM, N.; RUDE, E.; GERMANN, T. T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n. 4, p. 793-798, apr. 1994.

SCHOPF, L. R.; ERICKSON, J.; HAYES, L.; CHUNG, C.; LAVIGNE, L.; SYPEK, J. Alterations of intralésional and lymph node gene expression and cellular composition induced by IL-12 administration during leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 23, n. 2, p. 71-84, feb. 2001.

SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 147, n. 9, p. 3149-3155, nov. 1991.

SCOTT, P.; ARTIS, D.; UZONNA, J.; ZAPH, C. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 318-338, oct. 2004.

SEDER, R. A.; GAZZINELLI, R.; SHER, A.; PAUL, W. E. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 21, p. 10188-10192, nov. 1993.

SHANKAR, A. H.; TITUS, R. G. The influence of antigen-presenting cell type and interferon-gamma on priming and cytokine secretion of *Leishmania major*-specific T cells. **J. Infect. Dis.**, v. 175, n. 1, p. 151-157, jan. 1997.

SHIMOZATO, O.; UGAI, S.; CHIYO, M.; TAKENOBU, H.; NAGAKAWA, H.; WADA, A.; KAWAMURA, K.; YAMAMOTO, H.; TAGAWA, M. The secreted form of the p40 subunit of interleukin (IL)-12 inhibits IL-23 functions and abrogates IL-23-mediated antitumour effects. **Immunology**, v. 117, n. 1, p. 22-28, jan. 2006.

SILVA, E. S.; PACHECO, R. S.; GONTIJO, C. M.; CARVALHO, I. R.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 44, n. 3, p. 145-149, may/jun. 2002.

SMITH, E.; ZARBOCK, A.; STARK, M. A.; BURCIN, T. L.; BRUCE, A. C.; FOLEY, P.; LEY, K. IL-23 is required for neutrophil homeostasis in normal and neutrophilic mice. **J. Immunol.**, v. 179, n. 12, p. 8274-8279, dec. 2007.

SOONG, L.; CHANG, C. H.; SUN, J.; LONGLEY, B. J., JR.; RUDDLE, N. H.; FLAVELL, R. A.; MCMAHON-PRATT, D. Role of CD4<sup>+</sup> T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, v. 158, n. 11, p. 5374-5383, jun. 1997.

SOUSA ADE, Q.; PARISE, M. E.; POMPEU, M. M.; COEHLLO FILHO, J. M.; VASCONCELOS, I. A.; LIMA, J. W.; OLIVEIRA, E. G.; VASCONCELOS, A. W.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceara, Brazil. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, v. 53, n. 4, p. 380-385, oct. 1995.

SOUZA-NETO, S. M.; CARNEIRO, C. M.; VIEIRA, L. Q.; AFONSO, L. C. *Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 289-294, may. 2004.

STAFFORD, J. L.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 187-248, 2002.

STENGER, S.; DONHAUSER, N.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 4, p. 1501-1514, apr. 1996.

STOBIE, L.; GURUNATHAN, S.; PRUSSIN, C.; SACKS, D. L.; GLAICHENHAUS, N.; WU, C. Y.; SEDER, R. A. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 15, p. 8427-8432, jul. 2000.

STUBER, E.; STROBER, W.; NEURATH, M. Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 2, p. 693-698, feb. 1996.

SUFFIA, I. J.; RECKLING, S. K.; PICCIRILLO, C. A.; GOLDSZMID, R. S.; BELKAID, Y. Infected site-restricted Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 3, p. 777-788, mar. 2006.

SUKHUMAVASI, W.; EGAN, C. E.; DENKERS, E. Y. Mouse neutrophils require JNK2 MAPK for *Toxoplasma gondii*-induced IL-12p40 and CCL2/MCP-1 release. **J. Immunol.**, v. 179, n. 6, p. 3570-3577, sep. 2007.

SWIHART, K.; FRUTH, U.; MESSMER, N.; HUG, K.; BEHIN, R.; HUANG, S.; DEL GIUDICE, G.; AGUET, M.; LOUIS, J. A. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4<sup>+</sup> T cell response. **J. Exp. Med.**, v. 181, n. 3, p. 961-971, mar. 1995.

SYPEK, J. P.; CHUNG, C. L.; MAYOR, S. E.; SUBRAMANYAM, J. M.; GOLDMAN, S. J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S. F.; SCHAUB, R. G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **J. Exp. Med.** v. 177, n. 6, p. 1797-1802, jun. 1993.

SZABO, S. J.; DIGHE, A. S.; GUBLER, U.; MURPHY, K. M. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 5, p. 817-824, mar. 1997.

TACCHINI-COTTIER, F.; ZWEIFEL, C.; BELKAID, Y.; MUKANKUNDIYE, C.; VASEI, M.; LAUNOIS, P.; MILON, G.; LOUIS, J. A. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 165, n. 5, p. 2628-2636, sep. 2000.

TANAKA, T.; HU-LI, J.; SEDER, R. A.; FAZEKAS DE ST GROTH, B.; PAUL, W. E. Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon gamma production by naive T cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 13, p. 5914-5918, jul. 1993.

TAVARES, D.; DA CONCEICAO RIBEIRO, R.; CARLOS DA SILVA, A. Inflammatory lesion and parasite load are inversely associated in *Leishmania amazonensis* infected mice genetically selected according to oral tolerance susceptibility. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 4, p. 957-964, apr. 2006.

TERABE, M.; HATABU, T.; TAKAHASHI, H.; ITO, M.; ONODERA, T.; MATSUMOTO, Y. *Leishmania amazonensis* infection in nude mice. **Exp. Anim.**, v. 48, n. 2, p. 119-123, apr. 1999a.

TERABE, M.; KURAMOCHI, T.; HATABU, T.; ITO, M.; UEYAMA, Y.; KATAKURA, K.; KAWAZU, S.; ONODERA, T.; MATSUMOTO, Y. Non-ulcerative cutaneous lesion in immunodeficient mice with *Leishmania amazonensis* infection. **Parasitol. Int.**, v. 48, n. 1, p. 47-53, mar. 1999b.

TERABE, M.; KURAMOCHI, T.; ITO, M.; HATABU, T.; SANJOBA, C.; CHANG, K. P.; ONODERA, T.; MATSUMOTO, Y. CD4(+) cells are indispensable for ulcer development in murine cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 8, p. 4574-4577, aug. 2000.

TEVA, A.; PORROZZI, R.; CUPOLILLO, E.; PIRMEZ, C.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; GRIMALDI, G., JR. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*-induced chronic granulomatous cutaneous lesions affecting the nasal mucosa in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. **Parasitology**, v. 127, n. pt 5, p. 437-447, nov. 2003.

THEODOS, C. M.; RIBEIRO, J. M.; TITUS, R. G. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 5, p. 1592-1598, may. 1991.

THIERFELDER, W. E.; VAN DEURSEN, J. M.; YAMAMOTO, K.; TRIPP, R. A.; SARAWAR, S. R.; CARSON, R. T.; SANGSTER, M. Y.; VIGNALI, D. A.; DOHERTY, P. C.; GROSVELD, G. C.; IHLE, J. N. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. **Nature**, v. 382, n. 6587, p. 171-174, jul. 1996.

TITUS, R. G.; MARCHAND, M.; BOON, T.; LOUIS, J. A. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol.**, v. 7, n. 5, p. 545-555, sep. 1985.

TITUS, R. G.; MILON, G.; MARCHAL, G.; VASSALLI, P.; CEROTTINI, J. C.; LOUIS, J. A. Involvement of specific Lyt-2+ T cells in the immunological control of experimentally

induced murine cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, v. 17, n. 10, p. 1429-1433, oct. 1987.

TITUS, R. G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v. 170, n. 6, p. 2097-2104, dec. 1989.

TRAVI, B.; REY-LADINO, J.; SARAVALIA, N. G. Behavior of *Leishmania braziliensis* s.l. in golden hamsters: evolution of the infection under different experimental conditions. **J. Parasitol.**, v. 74, n. 6, p. 1059-1062, dec. 1988.

TURETZ, M. L.; MACHADO, P. R.; KO, A. I.; ALVES, F.; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA, R. P.; MOBASHERY, N.; JOHNSON, W. D., JR.; CARVALHO, E. M. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 12, p. 1829-1834, dec. 2002.

USUI, T.; PREISS, J. C.; KANNO, Y.; YAO, Z. J.; BREM, J. H.; O'SHEA, J. J.; STROBER, W. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 3, p. 755-766, mar. 2006.

UZONNA, J. E.; BRETSCHER, P. A. Anti-IL-4 antibody therapy causes regression of chronic lesions caused by medium-dose *Leishmania major* infection in BALB/c mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 11, p. 3175-3184, nov. 2001.

VAN ZANDBERGEN, G.; HERMANN, N.; LAUFS, H.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4177-4184, aug. 2002.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J. Immunol.**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, dec. 2004.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, L. *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. **J. Immunol.**, v. 180, n. 11, p. 7537-7545, jun. 2008.

VIANA DA COSTA, A.; HUERRE, M.; DELACRE, M.; AURIAULT, C.; CORREIA COSTA, J. M.; VERWAERDE, C. IL-10 leads to a higher parasite persistence in a resistant mouse model of *Leishmania major* infection. **Parasitol. Int.**, v. 51, n. 4, p. 367-379, dec. 2002.

WALKER, W.; ASTE-AMEZAGA, M.; KASTELEIN, R. A.; TRINCHIERI, G.; HUNTER, C. A. IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN-gamma. **J. Immunol.**, v. 162, n. 10, p. 5894-5901, may. 1999.

WANG, Z. E.; REINER, S. L.; ZHENG, S.; DALTON, D. K.; LOCKSLEY, R. M. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Méd.**, v. 179, n. 4, p. 1367-1371, apr. 1994.

WELBY-BORGES, M. **Avaliação dos perfis de resposta de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados *in vitro* com *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis*.** 2008. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

WIEKOWSKI, M. T.; LEACH, M. W.; EVANS, E. W.; SULLIVAN, L.; CHEN, S. C.; VASSILEVA, G.; BAZAN, J. F.; GORMAN, D. M.; KASTELEIN, R. A.; NARULA, S.; LIRA, S. A. Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. **J. Immunol.**, v. 166, n. 12, p. 7563-7570, jun. 2001.

WOLF, S. F.; TEMPLE, P. A.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; DICIG, M.; LOWE, L.; DZIALO, R.; FITZ, L.; FERENZ, C.; HEWICK, R. M.; ET AL. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. **J. Immunol.**, v. 146, n. 9, p. 3074-30781, may. 1991.

WORLD.HEALTH.ORGANIZATION. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, v. 77, n. 44, p. 365-370, nov. 2002.

WU, Q.; MARTIN, R. J.; RINO, J. G.; BREED, R.; TORRES, R. M.; CHU, H. W. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. **Microbes Infect.**, v. 9, n. 1, p. 78-86, jan. 2007.

YAMAKAMI, K.; AKAO, S.; TADAKUMA, T.; NITTA, Y.; MIYAZAKI, J.; YOSHIZAWA, N. Administration of plasmids expressing interleukin-4 and interleukin-10 causes BALB/c mice to induce a T helper 2-type response despite the expected T helper 1-type response with a low-dose infection of *Leishmania major*. **Immunology**, v. 105, n. 4, p. 515-523, apr. 2002.

YAP, G.; PESIN, M.; SHER, A. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 165, n. 2, p. 628-631, jul. 2000.

YE, P.; GARVEY, P. B.; ZHANG, P.; NELSON, S.; BAGBY, G.; SUMMER, W. R.; SCHWARZENBERGER, P.; SHELLITO, J. E.; KOLLS, J. K. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 25, n. 3, p. 335-340, sep. 2001.

YE, P.; RODRIGUEZ, F. H.; KANALY, S.; STOCKING, K. L.; SCHURR, J.; SCHWARZENBERGER, P.; OLIVER, P.; HUANG, W.; ZHANG, P.; ZHANG, J.; SHELLITO, J. E.; BAGBY, G. J.; NELSON, S.; CHARRIER, K.; PESCHON, J. J.; KOLLS, J. K. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 4, p. 519-527, aug. 2001.

YOSHIMOTO, T.; WANG, C. R.; YONETO, T.; WAKI, S.; SUNAGA, S.; KOMAGATA, Y.; MITSUYAMA, M.; MIYAZAKI, J.; NARIUCHI, H. Reduced T helper 1 responses in IL-12 p40 transgenic mice. **J. Immunol.**, v. 160, n. 2, p. 588-594, jan. 1998.