



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE RESPOSTA DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE BALB/C
INFECTADOS *IN VITRO* COM *Leishmania
amazonensis* OU *Leishmania braziliensis*.**

MARCUS WELBY-BORGES

Salvador - Bahia

2008



004073

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

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

**AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE RESPOSTA DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE BALB/C
INFECTADOS *IN VITRO* COM *Leishmania
amazonensis* OU *Leishmania braziliensis*.**

MARCUS WELBY-BORGES

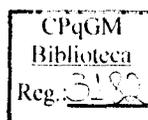
PROFESSOR ORIENTADOR:

LUIZ ANTÔNIO RODRIGUES DE FREITAS

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em
Patologia, área de concentração em Patologia
Experimental.

Salvador – Bahia

2008



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

Welby-Borges, Marcus

W438a Avaliação dos perfis de resposta de macrófagos peritoneais de balb/c infectados *in vitro* com *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* [manuscrito] / Marcus Welby-Borges - 2008.

97 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.

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

1. Macrófagos. 2. *Leishmania Braziliensis*. 3. *Leishmania Amazonensis*. I. Título.

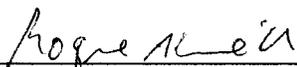
CDU 616.993.161

" AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE RESPOSTA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE BALB/C INFECTADOS *in vitro* COM *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania brasiliensis*"

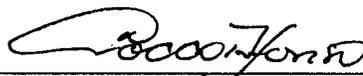
MARCUS WELBY BORGES OLIVEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Roque Pacheco de Almeida
Professor Adjunto
UFS



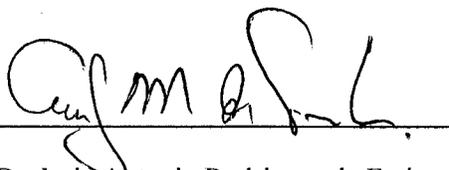
Dr. Luis Carlos Crocco Afonso
Professor Associado
UFOP



Dr. Fabiola Cardillo
Pesquisadora Associada
FIOCRUZ



Dr. Aldina Maria Prado Barral
Pesquisadora Titular
FIOCRUZ



Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas
Pesquisador Titular
FIOCRUZ

Fontes de Financiamento:
CNPq
FAPESB

Aos meus pais, irmãos e em especial à minha mãe
por todo o amor, paciência, dedicação, alegria e estímulo.

AGRADECIMENTOS

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

Obrigado:

Dr. Luiz A. R. de Freitas pela orientação.

A Sírio Melo pela intensa contribuição na coleta e organização de dados desse trabalho.

A Valderes e a Gilberto Cafezeiros, pela contribuição em algumas atividades deste estudo.

A Dra. Patrícia Veras, Dra. Tânia Correia, Tânia Regina, Ivana Gomes, Cláudio, Juliana, Taís, Cláudia Dias, Luciano, Viviane pelo constante estímulo e companheirismo.

A todos os estudantes de iniciação científica do laboratório pelo clima sempre alegre e em especial a Luis Fernando e Júlia pela colaboração.

Dr. Washington Luís Conrado dos Santos e Dra. Fabíola Cardillo pelos esclarecimentos de dúvidas a respeito de alguns procedimentos estatísticos e técnicos, respectivamente.

Dr. Ricardo Ribeiro e Dra. Milena Soares pela disponibilização de equipamentos do LETI.

A toda equipe da Biblioteca do CPqGM, pela boa vontade e dedicação no atendimento.

Aos Professores do curso de pós-graduação pelo empenho nas suas atividades de ensino.

Dra. Aldina Barrai pela disponibilidade e atenção na resolução das questões relacionadas ao curso.

Rosália Meires pela atenção, dedicação e amizade e aos demais servidores que atuam na coordenação de ensino pelos serviços prestados.

Aos amigos dos demais laboratórios deste centro pelos diversos empréstimos e contribuições, sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

A direção deste Centro de Pesquisas pela oportunidade e pela excelente infra-estrutura.

Aos companheiros de turma do doutorado pelo incentivo e companheirismo, em especial a colega e amiga Tânia Regina.

A Ricardo pela representação junto ao colegiado do curso.

Aos Amigos Cris, Gyselle, Danilo e Lila. A meus pais, meus irmãos Samuel, Samya e Márcia pelo constante estímulo e a tantos outros que anonimamente vibraram e torceram pela concretização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO:	13
1.1 LEISHMANIOSE: ASPECTOS GERAIS	13
1.2 LEISHMANIOSES: ASPECTOS CLÍNICOS	14
1.3 O PARASITO.....	16
1.4 O MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	19
1.5 IMUNOREGULAÇÃO POR CITOCINAS NA LEISHMANIOSE MURINA	24
1.6 MACRÓFAGOS E SEU PAPEL NA IMUNIDADE CONTRA <i>LEISHMANIA</i>	27
1.7 MECANISMOS DE DESTRUIÇÃO DE <i>LEISHMANIA</i> POR MACRÓFAGOS	29
1.8 QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES NA LEISHMANIOSE.....	31
2.OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL.....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. JUSTIFICATIVA	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 ANIMAIS.....	39
4.2 PARASITOS	39
4.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS	40
4.4 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS	40
4.5 AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS E CONTAGEM DE LEISHMANIAS POR MACRÓFAGOS	41
4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA	41
4.7 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO	43
4.8 PREPARAÇÃO DE DNA COMPLEMENTAR POR RT-PCR.....	43
4.9 BLOQUEIO DA PRODUÇÃO DE NO E DOADOR DE NO	44
4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAm DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES	45
4.11 CARGA PARASITÁRIA	47
4.12 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE ARGINASE DE La E Lb.....	48
4.13 ESTATÍSTICA E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	48
5. RESULTADOS	50
5.1 CINÉTICA DA INFECÇÃO DE M ϕ S PERITONEIAS DE BALB/c INFECTADOS COM PROMASTIGOTAS EM FASE ESTACIONÁRIA DE La OU Lb.....	50

5.2 EFEITO DO IFN- γ NO PERCENTUAL DE INFECÇÃO DE M ϕ S PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c COM La OU Lb	52
5.3 EFEITO DA SINERGIA ENTRE IFN- γ E TNF- α NO PERCENTUAL DE INFECÇÃO DE M ϕ S PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c COM La OU Lb	54
5.4 DIFERENÇAS NA AÇÃO MICROBICIDA DOS M ϕ S E EFEITO DO IFN- γ E DA SINERGIA ENTRE IFN- γ E TNF- α NA VIABILIDADE DE La OU Lb ISOLADAS DE M ϕ S PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS	56
5.5 PRODUÇÃO DE NO POR M ϕ S PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM La OU Lb	58
5.6 EFEITO DO BLOQUEIO E DA INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO NA VIABILIDADE DE La OU Lb ISOLADAS DE M ϕ S PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS	60
5.7 EFEITO DO TRATAMENTO IN VIVO COM AMG NA CARGA PARASITÁRIA DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM La OU Lb.....	62
5.8 PRODUÇÃO DE IL-12 POR M ϕ S PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM La OU Lb	65
5.9 PRODUÇÃO DE TGF- β POR M ϕ S PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM La OU Lb	66
5.10 EXPRESSÃO DE RNAm DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E RECEPTORES DE QUIMIOCINAS POR M ϕ S PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM La OU Lb	68
5.11 ATIVIDADE DA ARGINASE DE La OU Lb.....	80
6. DISCUSSÃO.....	82
7. CONCLUSÕES.....	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

AMG - aminoguanidina

CCL - quimiocina CC ligante

CCR - receptores de CC quimiocinas

cDNA - DNA complementar

CXCL - quimiocina CXC ligante

CRG - "chemokine regulated by interferon- γ " (quimiocina regulada por interferon- γ)

CXCR - receptores de CXC quimiocinas

DEPC - "diethyl pyrocarbonate" (pirocarbonato dietílico)

DNA - ácido desoxiribonucleico

dNTPs - desoxinucleotídeos trifosfatados

ELISA - "enzyme-linked immunosorbent assay" (ensaio imunossorvente ligado à enzima)

ELR - seqüência dos aminoácidos glutamato-leucina-arginina

neutrófilos derivado de células epiteliais)

GIPLs - glicoinositolfosfolipídeos

gp63 - protease de superfície de promastigotas

GRO - "growth-related oncogene" (oncogene relacionado ao crescimento)

HPRT - "hipoxantine-phosphoribosil-transferase"

IFN - "interferon"

IL- interleucina

iNOS - "inducible nitric oxide synthase" (óxido nítrico sintetase induzível)

IP-10 - "interferon- γ inducible protein" (proteína induzida por interferon- γ)

JE - homólogo murino para a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) humano

KC - homólogo murino para o oncogene relacionado ao crescimento- α (GRO- α) humano

kD- kilodalton

La - *Leishmania amazonensis*

Lb - *Leishmania braziliensis*

LCD - leishmaniose cutânea difusa

LCL - leishmaniose cutânea localizada

LCM - leishmaniose cutâneo-mucosa

Lm - *Leishmania major*

LPG - lipofosfoglicano

LPS - lipopolissacarídeo

MCP - “monocyte chemotatic protein” (proteína quimiotática de monócitos)

MIF - “migration inhibitory factor” (fator inibidor da migração)

MIG - “monokine induced by interferon- γ ” (monocina induzida por interferon- γ)

M ϕ / M ϕ s - macrófago / macrófagos

MIP - “macrophage inflammatory protein” (proteína inflamatória de macrófagos)

Mu - murino

NK - “natural killers” (células matadoras naturais)

NO - “nitric oxide” (óxido nítrico)

pb - pares de base

PBS - “phosphate buffered saline” (salina fosfatada a 150mM, pH 7,4)

PCR - “polimerase chain reaction” (reação da polimerase em cadeia)

PKC - proteína cinase C

PPG - proteofosfoglicano

RANTES - “regulated on activation, normal T cell expressed and secreted” (quimiocina regulada pela ativação de linfócitos T normais)

RNA - ácido ribonucleico

RNAm - RNA mensageiro

RT-PCR - “reverse transcriptase polimerase chain reaction” (transcrição reversa seguida de reação da polimerase em cadeia)

SBF - soro bovino fetal

SDF - “stromal-cell-derived factor” (fator derivado de células estromais)

SNAP - “S-nitroso-N-acetylpenicillamine”

TGF - “transforming growth factor” (fator de crescimento transformador)

Th - “T helper” (linfócitos T auxiliares)

TNF - “tumor necrosis factor” (fator de necrose tumoral)

RESUMO

AValiação DOS PERFIS DE RESPOSTA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE BALB/C INFECTADOS *IN VITRO* COM *Leishmania amazonensis* OU *Leishmania braziliensis*. **MARCUS WELBY-BORGES**

Macrófagos (M ϕ s) são células do sistema imunológico que desempenham importante papel na defesa contra *Leishmania*. Neste trabalho, foram investigados alguns fatores e mecanismos que podem estar envolvidos na determinação dos perfis de resposta de M ϕ s peritoneais de BALB/c infectados *in vitro* com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. Observou-se que IFN- γ não foi capaz de reduzir a infecção causada por ambas as espécies de *Leishmania*. A sinergia entre IFN- γ e TNF- α leva a uma diminuição do percentual de infecção dos M ϕ s por La e Lb no tempo de 72 h. Tanto o pré-tratamento com IFN- γ quanto com IFN- γ e TNF- α não alterou a viabilidade de *L. amazonensis* isoladas de M ϕ s em relação ao grupo que não sofreu pré-tratamento. No entanto, *L. braziliensis* se mostrou susceptível a ação dessas citocinas, já que o pré-tratamento dos M ϕ s com IFN- γ foi capaz de diminuir o número de parasitos viáveis isolados. A sinergia entre IFN- γ e TNF- α se mostrou bastante efetiva nesse grupo uma vez que o número de Lb isoladas a partir dos M ϕ s infectados mostrou-se bastante reduzido. Embora não tenha sido detectada produção de NO nos grupos de M ϕ s infectados com La e Lb, o bloqueio da produção dessa molécula, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é capaz de aumentar a infecção por Lb, mas não altera a infecção por La. A avaliação da produção de IL-12, revelou que M ϕ s infectados com Lb produzem maior quantidade dessa citocina e apresentam uma maior expressão de RNAm de TNF- α nas primeiras 6h após infecção que os infectados por La. Por outro lado, a infecção com La induz uma maior produção de TGF- β , maior expressão de RNAm de IL-10 e menor expressão de RNAm de quimiocinas e receptores dessas moléculas em relação ao grupo infectado com Lb. A investigação da atividade de arginase de La e Lb demonstrou que promastigotas de La apresentam uma elevada atividade de arginase, apresentando-se aproximadamente 50 a 100 vezes maior que nos promastigotas de Lb. Esses dados correlacionam-se com a maior carga parasitária e maior sobrevivência desse parasito no interior dos M ϕ s, enquanto que a menor atividade dessa enzima em Lb pode estar relacionada com a baixa carga parasitária, alta susceptibilidade aos mecanismos microbicidas dos M ϕ s e uma conseqüente diminuição na sobrevivência dessa espécie de *Leishmania*. Esses dados demonstram que La e Lb induzem perfis diferentes de resposta à infecção, tanto *in vitro* quanto *In vivo*, e sugerem que fatores produzidos pelo parasito, a exemplo de arginase, podem estar envolvidos no desenvolvimento desses perfis diferenciados de resposta.

Palavras-chave: Macrófago, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, Citocinas, Quimiocinas, Óxido nítrico, Arginase.

ABSTRACT

AVALIATION OF THE RESPONSE PROFILES OF THE PERITONEALS MACROPHAGE INFECTED *IN VITRO* WITH *Leishmania amazonensis* or *Leishmania braziliensis*. **MARCUS WELBY-BORGES**

Macrophages (M ϕ s) are cells that play an important role in the control of infection by *Leishmania*. In this work, we investigated some factors and mechanisms that could be related to the different responses of BALB/c peritoneal M ϕ s infected *in vitro* with *L. amazonensis* or *L. braziliensis*. We observed that IFN- γ alone was not able to reduce the infection by both *Leishmania* species. However, association of IFN- γ and TNF- α resulted in a decrease of the percentual of M ϕ s infected by Lb 72 h after infection, but not by La. Pre-treatment with IFN- γ or IFN- γ plus TNF- α did not change the viability of *L. amazonensis* compared to non-treated group. Nevertheless, *L. braziliensis* was susceptible to the action of IFN- γ because pre-treatment with this cytokine was sufficient to reduce the number of viable Lb isolated from M ϕ s. The synergy of IFN- γ and TNF- α was highly effective in this group and resolved the infection. We were not able to detect NO production by M ϕ s infected with La or Lb. However, NO inhibition, *in vitro* and *in vivo*, increased Lb infection and did not change La infection. Lb infected M ϕ s produced more IL-12 than La infected ones. Furthermore, M ϕ s infected with Lb expressed more mRNA to TNF- α , chemokines and chemokine receptors than M ϕ s infected with La. On the other hand, La induced a high production of TGF- β and IL-10 by M ϕ s in relation to Lb. Arginase activity of parasites was evaluated and showed that La promastigotes had an arginase activity 50 to 100 times higher than Lb promastigotes. These data correlated to high parasite burden and survival of La in the M ϕ s. On the contrary, low arginase activity in Lb is related to a low parasite burden and high susceptibility of the Lb to the M ϕ s killing mechanisms. These data demonstrate that La and Lb induce different responses to infection, *in vitro* and *in vivo*, and suggest that factors produced by parasite, such as arginase, could be involved in the development of these profiles.

Key words: Macrophage, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, Cytokines, chemokines, Nitric oxide, Arginase.

1. INTRODUÇÃO:

1.1 LEISHMANIOSE: ASPECTOS GERAIS

A leishmaniose é uma doença endêmica de amplo espectro, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que ocorre em diversas regiões tropicais e subtropicais do globo. O quadro global de leishmaniose permanece estável há alguns anos. No entanto, estima-se que em todo o mundo pelo menos 350 milhões de pessoas estão sob risco de contrair leishmaniose. Destas, cerca de 12 milhões podem apresentar alguma forma clínica da doença, dos quais aproximadamente 1,5 milhões surgiram até o ano de 2004 segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). No Brasil os casos vêm aumentando nos últimos anos, principalmente nas regiões cujos sistemas ecológicos têm sofrido maior interferência do homem, bem como nas áreas urbanas desprovidas de infra-estrutura sanitária. As regiões Norte e Nordeste apresentam o maior número de casos registrados de 1980 a 2003, com 36,2 e 36,9 %, respectivamente. Dentre os estados da região Nordeste, o maior número de casos provém do Maranhão, Ceará e Bahia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Em humanos, a infecção por *Leishmania* apresenta diversas formas clínicas relacionadas com a espécie do parasito e com a capacidade do hospedeiro em montar uma resposta imune eficaz contra o patógeno (TURK & BRYCESON, 1971). A doença pode envolver pele e mucosas, na forma tegumentar, e órgãos internos na forma visceral (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995). A diversidade de manifestações

clínicas e a possibilidade de surgimento de lesões desfigurantes, incapacitante a às vezes fatais levou a OMS a incluir a doença entre as onze endemias infecto-parasitárias mais importantes do mundo (TDR, 2007).

1.2 LEISHMANIOSES: ASPECTOS CLÍNICOS

As leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies de *Leishmania* e a depender da espécie infectante pode apresentar-se clinicamente sob duas formas diferentes: visceral ou tegumentar, como comentado anteriormente.

No Velho Mundo as espécies responsáveis pela leishmaniose tegumentar incluem a *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* (ASHFORD & BETTINI, 1987). As espécies descritas no Novo Mundo são a *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. peruviana*, *L. colombiensis*, *L. shawi*, *L. amazonensis* e *L. mexicana* (GRIMALDI & TESH, 1993).

A leishmaniose tegumentar apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, podendo causar lesões desfigurantes, a depender do agente e da resposta imune do hospedeiro à infecção (TURK & BRYCESON, 1971). A leishmaniose cutânea localizada (LCL) e a cutâneo-mucosa (LCM) constituem o polo de maior responsividade da doença, enquanto a leishmaniose cutânea difusa (LCD) representa o polo menos responsivo.

Parasitas do complexo *L. donovani* estão relacionados, tanto no Novo quanto no Velho Mundo, com a infecção de células do sistema fagocítico mononuclear de órgãos internos como fígado, baço e medula óssea. No entanto, *L. infantum*, *L. donovani* e *L. chagasi* podem também causar LCL e LCM. No Novo Mundo os parasitos que causam

LCL e LCM são agrupados nos complexos *L. braziliensis* e *L. mexicana*. Parasitos do complexo *L. braziliensis* geralmente causam LCL e LCM enquanto parasitos do complexo *L. mexicana*, na maioria dos casos, não afetam a mucosa, causando apenas lesões cutâneas limitadas que curam sem que necessariamente sejam tratadas (BARRAL *et al.*, 1991; GHALIB *et al.*, 1992).

A *L. amazonensis*, associada comumente com lesões localizadas de pele, pode também estar relacionada com LCM e leishmaniose visceral (LV) em alguns casos (BARRAL *et al.*, 1991). No Velho Mundo, *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. major* são agentes causadores da LCL, entretanto *L. tropica* pode causar doença visceral (BITTENCOURT & BARRAL-NETO, 1995).

Na LCL as lesões surgem no local da picada do flebótomo sob a forma de uma pequena pápula que se desenvolve em um nódulo ulcerado no centro. O aspecto mais freqüente observado nos casos de pacientes com LCL é uma úlcera localizada, com bordas elevadas e fundo plano, presente nas áreas mais expostas do corpo, que tende a cicatrizar espontaneamente ou a apresentar curso indolente. Com menos freqüência, as lesões podem aumentar de tamanho, tornando-se nodulares ou verrucosas, com ou sem ulcerações (GRIMALDI, 1982).

Nos pacientes com LCM a lesão mucosa pode aparecer algumas semanas ou anos após o desaparecimento da lesão inicial, devido a um provável quadro de disseminação hematogênica do parasito, para sítios da mucosa nasal, palato, úvula, faringe e lábio superior, causando destruição desses sítios e podendo ocorrer perfuração do septo nasal (MAUEL & BEHIN, 1981; MARSDEN *et al.*, 1986). Alguns autores, frente à natureza crônica e destrutiva da LCM, têm considerado essa forma clínica como pólo hiperresponsivo da doença devido à intensa resposta imune mediada

por células aos antígenos de *Leishmania* (CASTES *et al.*, 1983; CARVALHO *et al.*, 1985; COUTINHO *et al.*, 1987).

Na LCD as lesões evoluem formando pápulas, nódulos ou infiltrações difusas, de distribuição simétrica na face, tronco e membros, podendo disseminar-se para todo o corpo. Os pacientes com esta forma da doença não apresentam resposta de hipersensibilidade do tipo tardia a antígenos do parasito apresentando uma reação de Montenegro negativa (CASTES *et al.*, 1983). Nestes casos verifica-se disseminação dos parasitos de um sítio para outro através do sistema linfático, sem ocorrer visceralização (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995; MAUEL & BEHIN, 1981). A resposta imunológica nessa forma clínica é caracterizada pela ausência da produção de IFN- γ e uma elevada produção de IL-10 nas lesões dos pacientes (TURETZ *et al.*, 2002).

1.3 O PARASITO

Leishmania são parasitos digenéticos, pertencentes ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, cujo ciclo de vida apresenta três estágios em diferentes hospedeiros: um flebótomo (vetor) e um hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas de fase estacionária metacíclicas e logarítmica de crescimento podem ser encontradas no interior do trato digestivo do inseto vetor, enquanto a forma amastigota é parasito intracelular de células do sistema fagocítico mononuclear. O ciclo de vida desses protozoários tem início quando flebátomos fêmeas infectados pelo parasito, ao realizarem um novo repasto sangüíneo, injetam formas promastigotas

metacíclicas de *Leishmania* junto com saliva na pele do hospedeiro mamífero. Esses parasitos são posteriormente fagocitados por macrófagos e no seu interior assumem a forma amastigota, iniciando um processo de replicação intracelular no interior de compartimentos fagolisossomais, que permite a manutenção dos parasitos no tecido (TITUS et al, 1993).

A capacidade de sobrevivência no interior das células do hospedeiro vertebrado reflete a adaptação evolutiva desses parasitos para evadir e resistir aos mecanismos efetores das respostas imunes do hospedeiro (HOWARD *et al.*, 1980a e b; MOSSER & ROSSENTHAL, 1994). Diversas estratégias podem ser utilizadas por estes organismos para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, dentre as quais se pode destacar a atividade de moléculas secretadas ou expressas na superfície do parasito, a exemplo de PPG (proteofosfoglicano), LPG (lipofosfoglicano), gp63 ou PSP (protease de superfície de promastigotas) e GIPLs (glicoinositolfosfolípídeos).

Diversos trabalhos têm evidenciado que o LPG e o gp63, principais moléculas de superfície de *Leishmania*, funcionam como importantes fatores de virulência do parasito (TURCO & DESCOTEAUX, 1992; KELLEHER *et al.*, 1995; BRITTINGHAM *et al.*, 1995; STREIT *et al.*, 1996). O LPG constitui o principal glicoconjugado da superfície de formas promastigotas de *Leishmania* e protege o parasito contra destruição intracelular, através da inibição de moléculas envolvidas nos processos relacionados com ativação e quimiotaxia de monócitos, a exemplo da proteína cinase C (PKC) e IL-1 β (DESCOTEAUX *et al.*, 1992). Além disso, o LPG também está envolvido na inibição da ativação de células endoteliais humanas, diminuindo a produção de quimiocinas como MCP-1 e na proteção do parasito contra lise mediada pelo complemento e por

metabólitos reativos de oxigênio (LO *et al.*, 1998; TURCO & DESCOTEAUX, 1992; BEVERLEY & TURCO, 1998). O gp63 constitui uma glicoproteína com atividade proteolítica capaz de se ligar ao receptor de complemento expresso na superfície de macrófagos, impedindo a fixação do complemento e favorecendo o estabelecimento da infecção nessas células (BRITTINGHAM *et al.*, 1995).

Alguns trabalhos identificaram moléculas produzidas por *Leishmania* durante seu estabelecimento nos macrófagos que estão envolvidas com a sobrevivência dos parasitos no interior dessas células. Dentre estas moléculas, podem-se destacar as ecto-enzimas presentes na superfície extracelular da membrana de leishmania, responsáveis pela hidrólise seqüencial de nucleotídeos trifosfatos do meio extracelular (BERRÊDO-PINHO *et al.*, 2001; MAIOLI *et al.*, 2004), e a arginase, utilizada pelos parasitos para a produção de poliaminas essenciais a replicação do parasito (GAUR *et al.*, 2007).

Leishmania apresenta um único gene que codifica a arginase, molécula fundamental para a sobrevivência desses microorganismos, já que parasitos deficientes na expressão do gene de arginase não são capazes de sintetizar poliaminas e passam a depender das moléculas disponíveis no meio (ROBERTS *et al.*, 2004). O interior do macrófago é um dos meios mais apropriados para captação de poliaminas, principalmente se essas células estiverem produzindo a arginase I, que é responsável pela conversão de L-ornitina e putrescina em poliaminas (KROPF *et al.*, 2005). Até o momento, não existem estudos comparativos entre *L. amazonensis* e *L. braziliensis* associando a atividade de arginase à virulência e/ou infectividade desses patógenos. Abordagens que avaliem a interação entre esses parasitos e suas principais células hospedeiras, os macrófagos, podem contribuir na compreensão dessas relações.

1.4 O MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Diversos modelos vêm sendo utilizados para se estudar as relações entre *Leishmania*, seus hospedeiros mamíferos e seus insetos vetores. Dentre estes, destaca-se o modelo murino, que constitui um importante instrumento para pesquisa dessas relações, pelo fato de camundongos isogênicos apresentarem padrões distintos de resposta à infecção por uma única ou por diferentes espécies de *Leishmania*. Na leishmaniose tegumentar, esses animais reproduzem experimentalmente algumas características das manifestações clínicas observadas na doença humana.

A gravidade e o resultado da infecção são geneticamente determinados, podendo estar relacionados com o “background” genético do hospedeiro e/ou da *Leishmania*. Algumas linhagens de camundongos como C3H/He, C57BL/6, C57BL/10, ATL e CBA são resistentes à infecção por *L. major* e são susceptíveis à infecção por parasitos do complexo Mexicana, como *L. mexicana*, enquanto camundongos da linhagem BALB/c são susceptíveis a infecção por ambas as espécies de *Leishmania*. (ALEXANDER & BLACKWELL, 1986). Na infecção com *L. amazonensis* verifica-se uma maior variação no espectro de susceptibilidade, a depender da linhagem de camundongo. A maioria das linhagens investigadas desenvolve lesões que não curam (CALABRESE & COSTA, 1992; SOONG *et al.*, 1997). No que se refere à infecção com *L. braziliensis*, a maioria das linhagens descritas apresentam um perfil de resistência a esta espécie de leishmania, em geral, sem o aparecimento de lesão visível. No entanto, camundongos BALB/c desenvolvem lesões transitórias e visíveis que curam espontaneamente após algumas semanas (NEAL & HALE, 1983; CHILDS *et al.*, 1984; SAMUELSON *et al.*, 1991; DEKREY *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 1999; SOUZA-NETO *et*

al., 2004;). Estes estudos reforçam a importância de fatores relacionados à espécie de *Leishmania* no curso da infecção.

Os camundongos que apresentam um perfil de resistência desenvolvem um padrão histológico semelhante ao observado na LCL humana, com um aumento no número de linfócitos nas lesões, formação de granulomas e escasso parasitismo. Estes animais apresentam lesões localizadas e são capazes de montar uma resposta imune protetora e destruir os parasitos, apresentando cura espontânea das lesões. Nos camundongos com perfil de susceptibilidade observa-se um número reduzido de linfócitos, não se formam granulomas e o parasitismo é intenso em macrófagos. As lesões apresentam um crescimento progressivo, com ulceração e necrose lítica, podendo ocorrer visceralização, metástase e morte dos animais. Além disso, não se observa resposta imune celular protetora (BRADLEY & KIRKLEY, 1977; PÉREZ *et al.*, 1978; BEHIN *et al.*, 1979; ANDRADE *et al.*, 1984).

Alguns estudos têm demonstrado que o soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. mexicana amazonensis* aumenta a internalização do parasito por macrófagos peritoneais *in vitro* (REIS *et al.*, 1987). A administração de anticorpos monoclonais contra uma glicoproteína de 46 kD de *L. amazonensis* previne a infecção de camundongos com parasitos virulentos (ANDERSON *et al.*, 1983; CHAMPSI & McMAHON-PRATT, 1988). Embora esses trabalhos relacionem a participação de anticorpos na infecção com *Leishmania*, não há evidências de que os exerçam um papel chave na resolução da doença. Por outro lado, o envolvimento de células T CD4⁺ constitui fator crucial na determinação dos padrões de resposta relacionados com resistência ou susceptibilidade à infecção. A importância dessas células têm sido demonstrada por diversos grupos através da transferência adotiva de

células T CD4+ normais, conferindo resistência à camundongos nude (nu/nu), transferência de células T CD4+ imunes, que conferem proteção à camundongos normais, ou pela depleção de células T CD4+, que reverte camundongos resistentes em susceptíveis à infecção (MITCHELL *et al.* 1980; TITUS *et al.*, 1987; MÜLLER *et al.*, 1992). Por outro lado, como mencionado acima, as células T CD4+ também estão relacionadas com susceptibilidade à infecção com *Leishmania*, já que camundongos BALB/c, altamente susceptíveis à infecção com *L. major*, controlam a infecção quando são irradiados ou depletados de células T CD4+ antes da infecção (HOWARD *et al.*, 1981; TITUS *et al.*, 1985). Essa resistência adquirida pode ser revertida através da transferência de células T CD4+ de animais com doença progressiva para camundongos irradiados de células T (HOWARD *et al.*, 1981).

O envolvimento de células T CD4+ nos padrões de resistência ou susceptibilidade na infecção de camundongos com *Leishmania* reflete uma heterogeneidade nesse compartimento que está relacionada com o perfil de citocinas produzido por essas células.

Modelo de infecção com *L. major*

Grande parte do conhecimento acerca da resposta imune na leishmaniose resulta de estudos que se utilizaram da infecção experimental de diferentes linhagens de camundongos isogênicos com *L. major*, um dos agentes causadores da leishmaniose cutânea localizada humana no Velho Mundo. Diversos estudos têm demonstrado que a imunidade protetora contra o parasito está relacionada com o desenvolvimento de uma resposta imune mediada por células enquanto uma resposta

humoral tem pouca importância na resolução das lesões (LIEW *et al.*, 1986; SCOTT, 1989; MÜLLER *et al.*, 1992; LIEW & O'DONNELL, 1993; MCSORLEY *et al.*, 1996).

Em camundongos infectados com *L. major* que apresentam um perfil de resistência, observa-se a expansão de uma subpopulação de células T CD4+ que expressam preferencialmente citocinas ou RNAm para citocinas do tipo Th1 como IFN- γ e IL-2, enquanto células T CD4+ de camundongos susceptíveis demonstram uma maior expressão de citocinas do tipo Th2 como IL-4 e IL-10 (HEINZEL *et al.*, 1989; HEINZEL *et al.*, 1991; LOCKSLEY *et al.*, 1987; LEMOS-DE-SOUZA *et al.*, 2000).

Camundongos CBA infectados com *L. major* apresentam um infiltrado mononuclear misto, com um aumento progressivo do número de linfócitos na lesão, fibrose, necrose fibrinóide e formação de granulomas, que culmina na eliminação dos parasitos e cura espontânea das lesões. O perfil de resistência desses camundongos correlaciona-se com o fenótipo Th1, com produção aumentada de IFN- γ (LEMOS-DE-SOUZA *et al.*, 2000).

Modelo de infecção com *L. amazonensis*

Os estudos de Lemos-de-Souza e colaboradores (2000) demonstraram que camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* apresentam um infiltrado macrofágico difuso, monomórfico, com intenso parasitismo, áreas de necrose lítica, micro-abcessos e úlceras, seguida de disseminação dos parasitos, que resulta na morte desses animais. Aspectos semelhantes já haviam sido descrito quando BALB/c foram infectados com essa espécie de *Leishmania* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1987). O perfil de

susceptibilidade observado nesses animais está relacionado com o fenótipo Th2, com produção de IL-4 e ausência de resposta Th1, como amplamente descrito na literatura para outras linhagens de camundongos infectados com *Leishmania* (BOTTOMLY, 1988; LIEW & O'DONNELL, 1993; MCSORLEY *et al.*, 1996; MÜLLER *et al.*, 1992; MOSSMANN & COFFMAN, 1989; JI *et al.*, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Modelo de infecção com *L. braziliensis*

Diferente do que acontece com *L. major*, existem poucos estudos experimentais realizados com *L. braziliensis*, provavelmente pelo fato dessa espécie não induzir lesões em diversas linhagens de camundongos (NEAL & HALE, 1983; CHILDS *et al.*, 1984). Os camundongos BALB/c apresentam-se como os mais susceptíveis à *L. braziliensis*, apresentando lesões cutâneas transitórias que evoluem para a cura espontânea (CHILDS *et al.*, 1984). A análise da resposta imunológica nesses camundongos demonstrou que existe uma menor produção de IL-4 em relação a animais infectados com *L. major* e que o tratamento de animais infectados com *L. braziliensis* com anti-IFN- γ aumenta significativamente as lesões com uma evolução progressiva das lesões e susceptibilidade desses animais. Os autores consideram que um mecanismo dependente de IFN- γ seja o responsável pela morte de *L. braziliensis* em camundongos BALB/c e que a baixa infectividade deste parasito nesta linhagem de camundongo pode estar correlacionada com uma incapacidade por parte do parasito de induzir uma elevada e permanente produção de IL-4, diferente do que acontece com *L.*

major (DEKREY *et al.*, 1998). Os mecanismos que determinam essas diferenças precisam ser mais bem explorados.

Recentemente foi proposto um modelo experimental de infecção com *L. braziliensis* que mimetiza a infecção em humanos. Nesse trabalho, os autores utilizam o mesmo modelo de infecção intradérmica em orelhas proposto por Belkaid e colaboradores (1998) e utilizam 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* para inocularem camundongos BALB/c na derme da orelha. Os resultados reproduzem alguns aspectos da infecção natural como a presença de lesões ulceradas, compostas por polimormonucleares, numerosos macrófagos densamente parasitados, escassez de plasmócitos, necrose fibrinóide, disseminação dos parasitos para linfonodos e desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 (MOURA *et al.*, 2005).

1.5 IMUNORREGULAÇÃO POR CITOCINAS NA LEISHMANIOSE MURINA

Grande parte do conhecimento sobre imunoregulação por citocinas na leishmaniose deve-se aos estudos realizados no modelo murino. Falhas na montagem de uma resposta imune anti-leishmania do tipo Th1 resulta em doença progressiva e morte (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

A resposta imune do tipo Th1 é caracterizada pela secreção de IFN- γ que é tido como o principal mediador de resistência à infecção com *Leishmania*, devido a sua capacidade de ativar macrófagos, habilitando-os a destruir formas amastigotas intracelulares do parasito (NATHAN *et al.*, 1983; TITUS *et al.*, 1984). O uso de anticorpos monoclonais anti-IFN- γ administrado em camundongos resistentes durante

ou nas fases mais iniciais da infecção resulta em aumento da produção de IL-4, aumentando o tamanho das lesões (BELOSEVIC *et al.*, 1989; MÜLLER *et al.*, 1989; SADICK *et al.*, 1990). O IFN- γ recombinante sozinho, quando administrado em camundongos BALB/c durante o curso da infecção, não é capaz de gerar imunidade contra o parasito (LOCKSLEY *et al.*, 1987). Provavelmente a ação de outras citocinas pode contribuir no mecanismo de ativação de macrófagos e na conseqüente destruição dos parasitos. A ação sinérgica de IFN- γ com TNF- α ou LPS sobre os macrófagos é capaz de estimular a síntese de NO, que representa um dos principais mecanismos leishmanicidas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BOGDAN *et al.*, 1990; GREEN *et al.*, 1990; LIEW *et al.*, 1990a).

A IL-4 é um dos principais mediadores da resposta imune do tipo Th2 e funciona como uma citocina que inibe a ativação de macrófagos, juntamente com IL-10 e TGF- β , apresentando um importante papel na progressão da doença (NACY *et al.*, 1991; LIEW *et al.*, 1989; BOGDAN *et al.*, 1991). Sua ação se deve, possivelmente, a um efeito direto sobre o macrófago ou estimulando a síntese de IL-10, que atua inibindo a produção de IFN- γ e, conseqüentemente, modulando a ativação dessas células (FIORENTINO *et al.*, 1991; TANAKA *et al.*, 1993). O tratamento de camundongos BALB/c com anti-IL4 na fase inicial da infecção, torna-os capazes de produzir níveis elevados de IFN- γ , convertendo-os em resistentes à *L. major* (SADICK *et al.*, 1990).

Além de IFN- γ , IL-4 e IL-10, outras citocinas como IL-12, TNF- α , e TGF- β , podem estar envolvidas na determinação de um ou outro tipo de fenótipo Th. IL-12 é um fator produzido por células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas, e está relacionada com a estimulação de células Th1, embora na presença

de IL-4 possa também induzir células Th2 (TRINCHIERI, 1995; LAMONT & ADORINI, 1996). O tratamento de camundongos susceptíveis com IL-12 recombinante é capaz de curar a infecção com *L. major* nesses animais, desde que o tratamento seja realizado na primeira semana de infecção (HEINZEL *et al.*, 1993; SYPEK *et al.*, 1993).

O TNF- α também apresenta um importante papel no controle das lesões cutâneas de camundongos infectados com *Leishmania*. O tratamento de camundongos resistentes ou susceptíveis com TNF- α resulta na diminuição do tamanho das lesões e do número de parasitos em relação a camundongos não tratados. Além disso, o tratamento com anti-TNF- α exacerba a doença (TITUS *et al.*, 1989; LIEW *et al.*, 1990b). O mecanismo de ação de TNF- α está relacionado com o aumento da ativação de macrófagos e conseqüente destruição de parasitos (LIEW *et al.*, 1990a). Arnoldi e Mool (1998) demonstraram que a depleção de TNF- α , *in vivo*, reduz a carga de parasitos e a quantidade de células de Langerhans infectadas no linfonodo de drenagem de camundongos BALB/c infectados com *L. major*. Nesse mesmo trabalho, os autores demonstraram ainda que a administração de TNF- α recombinante reverte esse efeito, estimulando a migração e acumulação dessas células no linfonodo desses animais (ARNOLDI & MOOL, 1998). Esses dados demonstram a participação do TNF- α nos eventos relacionados com a quimiotaxia e migração de células para sítios distantes.

A ação do TGF- β tem sido descrita nos eventos iniciais da infecção relacionados com os mecanismos que promovem a inativação de macrófagos. O tratamento de camundongos BALB/c infectados com TGF- β recombinante exacerba a infecção com *L. braziliensis* nesses animais, correlacionando-se com o aumento na expressão de RNAm para IL-10 (BARRAL *et al.*, 1993). Além disso, TGF- β está relacionado com a

inibição da expressão de iNOS por macrófagos ativados por MIF nas lesões cutâneas de camundongos infectados com *L. major* (CUNHA *et al.*, 1993; STENGER *et al.*, 1994).

1.6 MACRÓFAGOS E SEU PAPEL NA IMUNIDADE CONTRA LEISHMANIA

Os macrófagos constituem uma das principais células do sistema imunológico e desempenham importantes papéis na defesa contra microrganismos tanto na imunidade inata quanto na imunidade adquirida, seja modulando ou atuando como células efetoras da resposta imune. No entanto, os macrófagos participam dessa resposta por apresentarem antígenos aos linfócitos T bem como sinais coestimuladores que desencadeiam a resposta por parte destas células.

Macrófagos desempenham importante papel no controle da infecção por *Leishmania*. Podem liberar citocinas associadas à resposta Th1 (IL-12, TNF- α) ou Th2 (IL-10, TGF- β) (WANG *et al.*, 1994), além de quimiocinas e outros fatores que contribuem para a chegada de células inflamatórias ao sítio da infecção (GERARD & GERARD, 1994; BOKOCH, 1995; PREMACK & SCHALL, 1996; JI *et al.*, 2003). O controle da infecção é dependente da capacidade dos macrófagos em destruir parasitos intracelulares (BEHIN *et al.*, 1979; NACY *et al.*, 1983) por mecanismos dependentes de NO (GREEN *et al.*, 1990; LIEW *et al.*, 1991). Macrófagos peritoneais de camundongos resistentes apresentam maior capacidade de inibição da proliferação de amastigotas de *L. major* comparados àqueles macrófagos de camundongos susceptíveis (HANDMAN *et al.*, 1979; MAUEL *et al.*, 1987). Por outro lado, macrófagos de camundongos

susceptíveis infectados com *L. major*, comparados a macrófagos de uma linhagem de camundongos resistentes, são menos sensíveis à ativação por citocinas derivadas de células T (NACY *et al.*, 1983).

Dados do nosso laboratório demonstram que macrófagos peritoneais de camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazonensis* apresentam diferentes perfis de resposta e que o tratamento com IFN- γ , apesar de induzir produção semelhante de NO, reduz a infecção causada por *L. major*, não alterando a infecção por *L. amazonensis*. O padrão de expressão de genes dessas células revelou que genes relacionados a receptores do tipo *scavenger* foram induzidos na infecção por *L. major*, a exemplo do receptor *scavenger* MARCO. Na infecção por *L. amazonensis* observou-se uma indução do gene da catalase, enzima que inibe a explosão respiratória, correlacionada com uma inibição da produção de H₂O₂ pelos macrófagos infectados com essa espécie de *Leishmania* (GOMES *et al.*, 2003). Esses resultados sugerem que diferenças encontradas na infecção de macrófagos podem estar relacionadas com a determinação dos perfis de resistência ou susceptibilidade, reforçando a importância do macrófago para o estabelecimento da infecção.

Até o momento, são escassos os trabalhos que avaliaram a interação de macrófagos com *L. braziliensis*, já que a maioria dos estudos tem focado na interação de macrófagos com *L. major*. Trabalhos que caracterizem essas interações entre *L. braziliensis* e suas células hospedeiras podem colaborar no entendimento dos mecanismos responsáveis pela resposta desenvolvida pelos hospedeiros mamíferos contra esses patógenos.

1.7 MECANISMOS DE DESTRUIÇÃO DE LEISHMANIA POR MACRÓFAGOS

Após a fagocitose de *Leishmania* pelos fagócitos, ocorre um aumento no consumo de oxigênio por essas células. Existe uma correlação entre explosão respiratória e formação de radicais intermediários do oxigênio (ROI) (STAFFORD *et al.*, 2002), que são moléculas microbidas importantes produzidas por células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos (DINAUER, 1993; SEGAL, 1996).

No modelo murino da infecção por *Leishmania*, a ativação de macrófagos por citocinas como IFN- γ e TNF- α leva à produção de ROI e reativos intermediários do nitrogênio (RNI), que são responsáveis pela atividade leishmanicida (JAMES, 1995). Durante a fagocitose de promastigotas, macrófagos podem liberar radicais, incluindo superóxido, H₂O₂ e OH, que são moléculas microbidas (MURRAY *et al.*, 1983; PEARSON *et al.*, 1983). Uma vez estabelecida a infecção por amastigota, a produção de NO por macrófagos pode levar à destruição do parasito (GREEN *et al.*, 1990; JAMES, 1995; WEI *et al.*, 1995).

Os mecanismos de destruição de *Leishmania* pelos macrófagos e demais fagócitos não são específicos para os diferentes estágios do parasito. Promastigotas e amastigotas são igualmente susceptíveis a ROI (MILLER *et al.*, 2000; MURRAY, 1982; ZARLEY *et al.*, 1991). No entanto, alguns trabalhos demonstram que amastigotas induzem uma menor explosão respiratória que promastigotas (CHANNON *et al.*, 1984; HAIDARIS *et al.*, 1982). Essas diferenças estão relacionadas à interação de moléculas de superfície de *Leishmania* com diferentes receptores de macrófagos (CHANNON *et al.*, 1984).

Abordagens que utilizam inibidores da atividade de iNOS (como LNMA e AMG), de citocinas que inibem a produção de NO (como TGF- β e IL-10) (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; CHATELAIN *et al.*, 1999; LIEW *et al.*, 1991; NELSON *et al.*, 1991; VIETH *et al.*, 1994) ou utilização de camundongos *knockout* para INOS (MURRAY *et al.*, 1999; WEI *et al.*, 1995) evidenciam o papel desta molécula na destruição de *Leishmania*. Camundongos infectados com *L. major* e tratados com inibidores de iNOS apresentam aumento da carga parasitária, desenvolvimento de lesões e inibição da destruição intracelular dos parasitos (LIEW *et al.*, 1990a). Embora ROI e RNI contribuam para a destruição de *Leishmania*, apenas a produção de RNI é essencial para a resolução da infecção. A contribuição de ROI parece ser necessária apenas nos estágios iniciais da infecção (MURRAY *et al.*, 1999).

NO também desempenha um papel regulador durante a resposta imune a *Leishmania*. Na ausência de NO derivado de INOS, IL-12 foi incapaz de prevenir o crescimento de parasitos, não houve ativação de células NK para liberação de IFN- γ e não houve, também, fosforilação de STAT-4, que é indutor importante da produção de IFN- γ por células NK (DIEFENBACH *et al.*, 1998).

Enquanto iNOS catalisa a conversão de L- arginina em NO e citrulina, a enzima arginase hidrolisa a arginina em ornitina e uréia. O balanço entre as duas enzimas é regulado competitivamente por citocinas secretadas por células Th1 e Th2: células Th1 induzem iNOS e Th2 induzem arginase I (CORRALIZA *et al.*, 1995; MODOLELL *et al.*, 1995). Citocinas, como IL-4, IL-10 e TGF- β aumentam a atividade de arginase I, que induz o crescimento de *L. major* em macrófagos (INIESTA *et al.*, 2001; INIESTA *et al.*,

2002) devido à síntese, a partir de ornitina, de poliaminas essenciais à replicação de *Leishmania* (INIESTA *et al.*, 2002).

1.8 QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES NA LEISHMANIOSE

Alguns trabalhos têm revelado que as quimiocinas e seus receptores podem desempenhar um importante papel na regulação da resposta imune, devido à capacidade dessas moléculas de promover o recrutamento seletivo de diferentes tipos celulares para os sítios inflamatórios. Além disso, esses tipos celulares podem apresentar uma expressão diferenciada dessas moléculas.

Na leishmaniose cutânea os trabalhos relacionando quimiocinas à patogenia da doença têm demonstrado que a grande quantidade de macrófagos presentes tanto nas lesões da forma localizada (LCL) quanto da forma difusa (LCD), bem como as diferenças na composição de subpopulações de células T, estão relacionadas com um padrão diferente de expressão dessas moléculas. A cura espontânea na LCL está associada com níveis elevados de CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 enquanto a progressão da doença na LCD correlaciona-se com altos níveis CCL3/MIP-1 α (RITTER *et al.*, 1996). Por outro lado, estas diferenças observadas nas duas formas da doença podem também ser correlacionadas com a atividade de determinadas moléculas expressas na superfície dos parasitos, a exemplo de LPG (lipofosfoglicano), que além de exercerem um efeito inibidor sobre as funções das células fagocíticas, como quimiotaxia, fagocitose e geração de produtos oxidativos (FRANKENBURG *et al.*, 1990; BRANDONÍSIO *et al.*, 1994), podem também diminuir a produção de algumas

quimiocinas por células endoteliais, como observado em relação aos níveis de CCL2/MCP-1 produzidos por monócitos humanos *in vitro* (LO *et al.*, 1998). Badolato e colaboradores (1996) também observaram que a infecção de macrófagos humanos com promastigotas de *L. major* estimula a produção de CXCL8/IL-8 e CCL2/MCAF/MCP-1 nas primeiras horas da infecção, e discutiram a possibilidade de que estas quimiocinas estejam envolvidas no recrutamento de células-alvo que favorecem a replicação intracelular do parasito. O problema dos estudos com material humano é que estes não permitem a análise temporal da expressão de quimiocinas. Provavelmente, ocorrem variações na expressão destas moléculas no decorrer da infecção.

Alguns modelos animais de doença têm sido utilizados no estudo das relações entre expressão de quimiocinas e processos patológicos (STRIETER *et al.*, 1996), entretanto trabalhos relacionando o envolvimento dessas moléculas na infecção de linhagens isogênicas de camundongos com *Leishmania* são ainda pouco explorados, sobretudo na infecção com *L. braziliensis*. Estudos, como o de Raccosin & Beverley (1997), utilizando Northern blots e sondas de cDNA, demonstraram que macrófagos murinos de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. major* em fase estacionária, expressam transcritos de RNAm para as quimiocinas CCL2/JE e CXCL1-3/KC (os homólogos murinos do CCL2/MCAF/MCP-1 e CXCL1-3/GRO- α humanos, respectivamente) uma hora após a infecção, sendo que outras quimiocinas e citocinas como TGF- β , IL-10, IL-12 ou iNOS não foram induzidas nas primeiras 24 horas. Embora esses dados tenham contribuído na caracterização dos perfis de quimiocinas produzidas por macrófagos infectados com *Leishmania*, os estudos *in vivo* relacionando

susceptibilidade ou resistência à infecção de camundongos por *Leishmania* têm sido escassos, bem como trabalhos que descrevam as relações entre a natureza do infiltrado inflamatório e quimiocinas nas lesões desses animais. Tem sido relatado ainda que CCL2/MCP-1 é capaz de estimular diretamente a eliminação de *Leishmania* via geração de NO por macrófagos murinos infectados com *L. donovani* (RITTER & MOLL, 2000).

Alguns trabalhos têm utilizado o estudo das quimiocinas para avaliar o papel de determinados tipos celulares na infecção de camundongos com *L. major*. A análise da expressão de RNAm para algumas quimiocinas ativadoras de células NK no linfonodo de camundongos BALB/c e C57BL/6, após os três primeiros dias de infecção com *L. major* demonstrou uma maior expressão de CXCL10/IP-10 , CCL2/MCP-1 e XCL1/Linfotactina em células de camundongos resistentes C57BL/6, enquanto CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 α e CCL4/MIP-1 β foram igualmente expressas em células de ambas as linhagens. O tratamento de camundongos susceptíveis BALB/c com CXCL10/IP-10 recombinante após infecção, apesar de aumentar a atividade de células NK nos linfonodos de drenagem desses animais, não promoveu redução no tamanho das lesões (VESTER *et al.*, 1999). ARNOLDI & MOOL (1998) demonstraram que o tratamento de camundongos BALB/c com CCL3/MIP-1 α recombinante e *L. major* reduziu de forma significativa a taxa de migração de células de Langerhans para o linfonodo de drenagem desses animais, enquanto que o tratamento com CCL2/MCP-1 e parasitos não altera a migração destas células. O tratamento de camundongos resistentes infectados com *L. major* e tratados com met-RANTES, um antagonista

funcional de CCR1 e CCR5 (receptores de CCL5/RANTES), tornou esses animais susceptíveis à infecção (SANTIAGO *et al.*, 2004).

Abordagens utilizando camundongos deficientes na produção de quimiocinas e/ou de seus receptores têm contribuído para o entendimento do papel, de diversas quimiocinas na leishmaniose. Camundongos deficientes para CCR2, CCR5 ou CCL3/MIP-1 α infectados com *L. donovani* apresentam uma baixa produção de IFN- γ durante a fase inicial da infecção. Entretanto, durante a fase crônica as concentrações de IFN- γ aumentaram nos camundongos deficientes de CCR5 e CCL3/MIP-1 α , de maneira que o aumento desta citocina correlacionou-se com uma diminuição da carga parasitária, sugerindo um papel importante para estas moléculas na geração de IFN- γ por linfócitos T (SATO *et al.*, 1999). Além disso, a ausência do receptor CCR2 em camundongos infectados com *L. donovani*, está associada com uma diminuição na migração de células de Langerhans para o linfonodo, resultando numa deficiência de células dendríticas CD8 α + e deficiência na sensibilização de linfócitos Th1 (SATO *et al.*, 2000).

Recentemente Teixeira e colaboradores (2005) demonstraram que cepas de *L. braziliensis* com genótipos diversos apesar de apresentarem uma carga parasitária semelhante, são capazes de induzir uma resposta diferenciada na expressão de quimiocinas e seus receptores em diferentes tempos e/ou intensidades, levando a um recrutamento celular distinto e respostas inflamatórias diferenciadas. A utilização de um modelo intradérmico de infecção na orelha com *L. braziliensis* demonstrou uma expressão aumentada de RNAm para CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL4/MIP-1 β , quimiocinas recrutadoras de monócitos e macrófagos, que poderia estar relacionada

com a elevada carga parasitária observada no linfonodo regional no período em que as lesões eram mais evidentes (DE MOURA *et al.*, 2005) .

No presente trabalho investigou-se as diferenças observadas na produção e/ou expressão de RNAm para citocinas, quimiocinas e seus receptores, o papel da molécula microbica NO em macrófagos peritoneias de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, carga parasitária, bem como a expressão de arginase dos parasitos, correlacionando-os com a sobrevivência dos microorganismos no interior dessas células.

A utilização de camundongos isogênicos BALB/c, que apresentam um perfil de resistência à *L. braziliensis* e susceptibilidade à *L. amazonensis*, oferece a vantagem de evitar a influência do “background” genético do hospedeiro na determinação do tipo de resposta, ao mesmo tempo em que permite considerar o papel do agente na determinação dos diferentes perfis de resposta observados.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar mecanismos celulares e moleculares relacionados com os diferentes perfis de resposta de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.

HIPÓTESE

L. amazonensis e *L. braziliensis* alteram distintamente a biologia de macrófagos infectados induzindo a produção de diferentes fatores que podem ser determinantes na resposta do hospedeiro à infecção.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) e de citocinas (TNF- α , IL-12 e TGF- β) nos sobrenadantes de culturas por meio da reação de Griess e ELISA, respectivamente.
- Analisar a expressão de RNAm para quimiocinas (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL12/MCP-5, CXCL-9/MIG, CXCL10/IP-10/CRG-2) e alguns de seus receptores (CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 e CXCR4) por RT-PCR.
- Avaliar carga parasitária contida nos macrófagos ao final de 72h de infecção.

- Investigar o papel do NO na atividade microbicida dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, através do bloqueio ou indução desse fator.
- Determinar a atividade de arginase de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

3. JUSTIFICATIVA

A resposta imuno-inflamatória na leishmaniose tegumentar tem sido estudada através da infecção experimental de camundongos com *Leishmania* e a maioria dos estudos tem demonstrado que o desenvolvimento de uma resposta mediada por células é determinante no desenvolvimento de imunidade contra o parasito.

L. amazonensis e *L. braziliensis* são os principais agentes etiológicos da leishmaniose em nosso país, sendo que *L. braziliensis* está envolvida com a forma mucocutânea da leishmaniose tegumentar no estado da Bahia.

A infecção por *L. amazonensis* é progressiva na maioria das linhagens de camundongos, enquanto *L. braziliensis* é controlada. Estas diferenças permitem avaliar como esses parasitos interferem na resposta do M ϕ à infecção, se essas respostas são diferentes e se os fatores diferentes interferem na resposta inata e/ou imune. A exemplo dos estudos de interação de *L. major* com macrófagos e da contribuição desses estudos para o entendimento da resposta do hospedeiro à infecção causada por essa *Leishmania*, as relações entre *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e macrófagos precisam ser mais bem compreendidas, devido a importância dessas células e de fatores

produzidos por elas nos eventos relacionados com atividade microbicida, quimiotaxia, tráfego leucocitário, processos inflamatórios e imunorregulação da resposta de linfócitos T.

Sendo assim, estudos que investiguem aspectos da relação entre essas espécies de parasitos e a célula hospedeira, no que se refere à produção de citocinas, quimiocinas e seus receptores, poderão contribuir na melhor compreensão da patogênese da doença causada por duas espécies de *Leishmania* presentes em nosso meio. Além disso, abre perspectivas para: a) eventual identificação de fatores dos parasitos que podem estar contribuindo com esses perfis de resposta, podendo vir a ser potenciais alvos para vacina ou terapia; b) possíveis intervenções no perfil de resposta do hospedeiro, no sentido de conter a infecção; c) auxiliar estudos futuros que visem à utilização de citocinas, quimiocinas e seus receptores como adjuvantes no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o parasito.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para realização dos experimentos, camundongos isogênicos fêmeas de 6-8 semanas da linhagem BALB/c foram obtidos do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Os animais foram mantidos em caixas de criação sob condições controladas de temperatura, umidade, luminosidade e livres de patógenos e alimentados com ração comercial balanceada e água destilada autoclavada.

4.2 PARASITOS

Utilizaram-se duas espécies de *Leishmania*: *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/94/3456) isolada do linfonodo de um paciente com leishmaniose cutânea localizada do Ceará e obtida da Dra. Margarida Pompeu (Universidade Federal do Ceará) por intermédio do Dr. Washington Luis Conrado dos Santos (Lab. de Patologia e Biointervenção/CPqGM-FIOCRUZ). A cepa de *L. amazonensis* (MHOM/BR88/BA-125), proveniente do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES/UFBA/SSA) foi isolada de um caso de leishmaniose cutânea e foi doada ao laboratório pela Dra. Aldina Barral.

A virulência e infectividade dos parasitos foram mantidas através de passagens em hamsters (*L. braziliensis*) ou camundongos C57BL/6 (*L. amazonensis*).

Antes da utilização das referidas cepas nos experimentos, os parasitos foram isolados do linfonodo popliteo dos animais citados acima e mantidos em cultura axênica

em meio Scineider's completo, suplementado com soro bovino fetal inativado a 20% (Hyclone®) e Gentamicina (SIGMA) numa concentração de 50 µg/ml.

4.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS

Camundongos BALB/c fêmeas de 6-8 semanas foram injetados com 2 ml de Tioglicolato 4% na cavidade peritoneal. Após 72 h, macrófagos peritoneais foram obtidos do exsudato inflamatório pela lavagem peritoneal utilizando-se solução salina estéril gelada e heparina numa concentração de 20UI/ml. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min. Para cultivo, foram utilizadas placas de 24 poços onde foram distribuídas triplicatas de 1×10^6 MΦ /poço (RT-PCR, ELISA e NO) ou 2×10^5 MΦ /poço contendo lamínulas de vidro (contagem de macrófagos infectados) e 2×10^5 MΦ /poço sem lamínulas (avaliação da carga parasitária) em meio RPMI completo. Após 24 h de incubação a 37° C e 5% de CO₂, as culturas foram lavadas com meio RPMI para remoção das células não aderentes e incubadas novamente em RPMI completo.

4.4 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS

Após obtenção, os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* em fase estacionária numa proporção de 10 parasitos/MΦ. Após o pulso de 6 horas, as culturas foram lavadas com meio RPMI para a remoção de parasitos não internalizados. A avaliação da produção de NO, citocinas, expressão de quimiocinas e receptores, avaliação da carga parasitária e contagem de

lamínulas foram realizadas em grupos de células utilizadas imediatamente após o período de pulso de 06 horas e após períodos de caça de 24, 48 e 72 horas.

4.5 AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS e CONTAGEM DE LEISHMANIAS POR MACRÓFAGOS

Seguido o período de 72 horas de infecção os macrófagos foram lavados e fixados em etanol absoluto por 10 min. As lamínulas nas quais as células estavam aderidas foram submetidas à bateria de coloração para hematoxilina-eosina. Depois de coradas, as lamínulas foram randomizadas para posterior contagem às cegas do número de macrófagos infectados, bem como do número de parasitos por células em cada grupo estudado. As contagens de pelo menos 100 células/campo das lamínulas foram realizadas por um examinador previamente treinado, e conferidas por um outro examinador diferente.

4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

A investigação do perfil de produção IL-12 e TGF- β por ELISA de captura, nos tempos pré-determinados, foi realizada em sobrenadantes de cultura de M ϕ s submetidos aos diferentes tratamentos.

Para IL-12, utilizamos o anticorpo de captura purificado anti-IL-12 (clone C.15.6 - Pharmingem # 18491D) na concentração de 2 μ g/ml. O referido anticorpo foi diluído em tampão de carbonato 1M pH 9.6, plaqueado em placas de 96 poços (50 μ l/poço) e incubado 12-18 horas a 4°C. Em seguida, o excesso de anticorpos de captura foi removido através de lavagem com PBS contendo 0,05% de detergente Tween. Os

sítios de ligações inespecíficas foram bloqueados com PBS contendo 10% de soro bovino fetal inativado (SFB) por 2 horas, a temperatura ambiente.

A curva padrão foi construída realizando diluições seriadas (1:2) IL-12 recombinante em PBS contendo 10% de SFB, a partir de 1 $\mu\text{g/ml}$. Em seguida, foi adicionado à placa 100 μl /poço do padrão diluído e das amostras (sobrenadantes das culturas) em triplicata, incubados por 16-18 horas 4°C. Após quatro lavagens, foram adicionados 100 μl /poço do anticorpo de detecção anti-IL12 marcado com biotina (clone C.17.8 - Pharmingem # 18482D), na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$, incubado durante 45 minutos, à temperatura ambiente.

Após seis lavagens, adicionou-se o conjugado avidina-peroxidase (Sigma 2.5 $\mu\text{g/ml}$) por 30 minutos. Para revelação, as placas foram lavadas 8 vezes e posteriormente incubadas com o substrato TMB (Sigma). A reação foi interrompida pela adição de ácido fosfórico diluído 1:20 em água destilada. A leitura foi realizada a 450nm e analisamos os resultados pelo programa Softmax.

O ensaio de ELISA para IL-12 detecta p40 e tem um limite de detecção que varia entre 10-30 pg/ml.

Para TGF- β , foi utilizado o kit comercial (R&D Systems) que foi utilizado seguindo as recomendações descritas pelo fabricante, para dosagem do TGF- β ativo nos sobrenadantes de cultura dos M ϕ s. Este ensaio tem um limite de detecção que varia entre 1,7-15,4 pg/ml (M= 4,61 pg/ml), conforme prospecto do fabricante.

4.7 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO

A produção de NO foi determinada através do método de Griess (DING, 1988), a partir da quantificação de nitrito nos sobrenadantes de cultura. A curva padrão de leitura foi obtida pela diluição de nitrito de sódio diluído em RPMI completo, em diluições seriadas de 1:2 a partir de 200 μ M distribuídas em triplicatas de 50 μ l, em placas de 96 poços. A detecção de nitrito nas amostras foi feita mediante a adição de igual volume do reagente à base de 1% de sulfanilamida e 0,1% de N-1-Naftiletlenodiamina (NEED). Após detecção as amostras foram submetidas a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm.

4.8 PREPARAÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA) POR RT-PCR

RNA total dos macrófagos submetidos aos diferentes tratamentos foi extraído utilizando Trizol[®] (GIBCO). Para preparação do cDNA adicionou-se 1 μ g de RNA aos tubos contendo uma solução de 5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), tampão de PCR 1X, 1 mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs/GIBCO), 1 U/ μ l de inibidor de Rnase (PROMEGA), 2,5 μ M de oligo d(T) (GIBCO) para atuarem como “primers” na síntese do cDNA, 2,5 U/ μ l de transcriptase reversa (GIBCO) e água bidestilada.

As reações com um volume final de 20 μ l foram levadas à máquina de PCR sendo submetidas a um único ciclo de incubação à 42° C por 50 minutos, 99° C por 5 minutos e 4° C por, pelo menos, 5 minutos. Após o ciclo de incubação foram adicionadas às amostras 80 μ l de água bidestilada e o cDNA foi posteriormente congelado à -20° C.

4.9 BLOQUEIO DA PRODUÇÃO DE NO E DOADOR DE NO

O bloqueio de NO foi realizado nas culturas de M ϕ s mediante o pré-tratamento com 1 mM/poço de aminoguanidina (AMG - SIGMA), um inibidor competitivo da NO sintetase induzida (iNOS), 6 h antes da infecção e até 72 h após infecção. Para induzir a síntese de NO, foi utilizado o doador de NO, S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP - CALBIOCHEM) diluído em DMSO (SIGMA) numa concentração de 100mM por poço, a cada 6h.

Para o bloqueio da produção de NO *in vivo* também foi utilizado o reagente AMG. Camundongos BALB/c foram infectados por injeção intradérmica na orelha de 1×10^5 formas promastigostas de La ou Lb. A partir de 24h após infecção, os camundongos foram submetidos ao tratamento com AMG 2%, diluída na água dos bebedouros conforme adaptação de protocolos previamente publicados na literatura (MURRAY & NATHAN, 1999; MURRAY *et al.*, 2003). Os camundongos foram monitorados a cada três dias, quando eram realizadas trocas de caixas, água e ração. Conforme previamente descrito (SAEFTEL *et al.*, 2001), os animais não apresentaram sinais de rejeição ou problemas ao tratamento, tais como perda de apetite, de peso ou do desejo de ingerir água. Após 42 dias de infecção os camundongos foram sacrificados e as orelhas (A) e linfonodos retroauriculares (B) retirados e submetidos ao teste de diluição limitante. Os grupos controles infectados receberam apenas água.

4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAm PARA CITOCINAS, QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES:

A expressão das moléculas TNF- α , IL-10, CCL3/MIP1- α , CCL4/MIP1- β , CCL5/RANTES, CCL12/MCP-5, CXCL-9/MIG, CXCL10/IP-10/CRG-2 e dos receptores CCR3, CCR4, CCR5 e CXCR4 foi realizada por PCR, utilizando “primers”, temperaturas e número de ciclos específicos para cada molécula, conforme Tabela 1.

A amplificação do cDNA por PCR consiste em um aumento exponencial do número de DNAs-alvo, a partir da utilização de “primers” específicos e da ação da Taq DNA polimerase. Para a amplificação adicionou-se 3 μ l de cDNA a uma solução contendo 2 mM de MgCl₂ (GIBCO), tampão de PCR 1X (GIBCO), 2,5 mM de dNTPs, água bidestilada, 0,025 U/ μ l de Taq DNA polimerase (GIBCO) e 0,5 pM/ μ l dos “primers” 5' e 3' (GIBCO) para as diferentes moléculas analisadas no trabalho. As reações com um volume final de 10 μ l foram levadas à máquina de PCR sendo submetidas às seguintes condições:

- 1) Desnaturação: 95° C – 3 minutos;
- 2) Desnaturação: 94° C – 1 minuto;
- 3) Temperatura de anelamento dos “primers” e nº de ciclos: variável (vide Tab. 1);
- 4) Extensão: 72° C – 2 minutos;
- 5) Extensão: 72° C – 7 minutos.

Os produtos dos PCRs foram analisados utilizando eletroforese em gel de agarose 1,8%. A análise densitométrica das bandas foi realizada por meio do *software* SCION Image Beta 4.0.2, para análise de géis 1D. Os resultados apresentados estão ajustados pela expressão do gene de expressão constitutiva HPRT.

Molécula / Seqüência dos “primers”	Fragmento amplificado	Temp. de anelamento	Nº de ciclos
Mu HPRT Sense: AGC TTG CTG GTG AAA AGG AC Anti-sense: TTA TAG TCA AGG GCA TAT CC	104 pb	58°C	35
Mu TNF-α Sense: GAT CTC AAA GAC AAC CAA CTA GTG Anti-sense: CTC CAG CTG GAA GAC TCC TCC CAG	255 pb	60°C	35
Mu IL-10 Sense: AGA AAA GAG AGC TCC ATC ATG C Anti-sense: AAT CAC TCT TCA CCT GCT CCA	454 pb	60°C	35
Mu CCL3/MIP-1α Sense: ATG AAG GTC TCC ACC ACT GCC CTT G Anti-sense: GGC ATT CAG TTC CAG GTC AGT GAG	276 pb	62°C	30
Mu CCL4/MIP-1β Sense: AAC CCC GAG CAA CAC CAT GAA G Anti-sense: CCA CAA TAG CAG AGA AAC AGC AAT	540 pb	62°C	25
Mu CCL5/RANTES Sense: CCC ACG TCA AGG AGT ATT TCT ACA CC Anti-sense: CTG GTT TCT TGG GTT TGC TGT G	310 pb	62°C	40
Mu CCL12/MCP-5 Sense: TCC ACA CTT CTA TGC CTC CT Anti-sense: TCT CAG CCT AGA CAT GAA GG	308 pb	62°C	35
Mu CXCL9/MIG Sense: GAT CAA ACC TGC CTA GAT CC Anti-sense: GGC TGT GTA GAA CAC AGA GT	398 pb	60°C	40
Mu CXCL10/CRG-2/IP-10 Sense: GAG CAG AGA TGT CTG AAT CCG Anti-sense: TCG CAC CTC CAC ATA GCT TAC AG	382 pb	62°C	40
Mu CCR3 Sense: CAA CTT GGC AAT TTC TGA CCT G Anti-sense: TTT CCA GCT GTC TTC TTC ACC T	368 pb	60°C	40
Mu CCR4 Sense: CTT GCA CCA AGG AAG GTA TCA A Anti-sense: TGG CCA GGT ATC TGT CTA TGC T	334 pb	60°C	40
Mu CCR7 Sense: CAT AGT CTT CCA GCT GCC CTA CA Anti-sense: TGC ACC ACA TTA AGG CTC CTG	377 pb	56°C	40
Mu CXCR4 Sense: GTC CAT TTC AAT AGG ATC TTC C Anti-sense: GTC AGG TAT AGT CAG GAG GAG G	414 pb	60°C	40

Tabela 1: Sequências de “primers” e moléculas utilizadas nas reações de PCR.

4.11 CARGA PARASITÁRIA:

Para a determinação da carga parasitária, foram utilizadas adaptações do protocolo descrito por Gomes e colaboradores (2000). MΦs foram cultivados, infectados e tratados como descrito anteriormente. Setenta e duas horas (72h) após a infecção, as culturas foram lavadas com meio RPMI e cultivadas com meio Schneider's completo (suplementado com 20% de soro bovino fetal Hyclone[®]) e mantidas em estufa B.O.D. 25° C. Três, cinco e sete dias após a troca do meio de cultura os parasitos isolados, na forma promastigota, foram contados utilizando-se câmaras de Neubauer.

Para os experimentos de determinação da carga parasitária em orelhas de camundongos BALB/c pré-tratados ou não com AMG e infectados com *L. braziliensis*, utilizou-se o teste quantitativo de diluição limitante (TITUS *et al.*, 1985), com algumas adaptações descritas a seguir. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e as orelhas e linfonodos foram retirados e homogeneizados em 1 ml de meio Schneider's completo. Os homogeneizados obtidos foram diluídos em séries de oito diluições distribuídas em placas de 96 poços contendo meio ágar-sangue que foram incubadas em estufa B.O.D. 25° C por 14 dias, período após o qual se procedeu a leitura das mesmas. A carga parasitária foi definida como o número de parasitos viáveis encontrados na diluição máxima. Os resultados foram expressos como log dos títulos de parasitos conforme trabalhos anteriores (LEMOS-DE-SOUZA *et al.*, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2006)

4.12 ANALISE DA ATIVIDADE DE ARGINASE DE *L. amazonensis* E *L. braziliensis*

Para avaliação da atividade de arginase dos parasitos foram realizadas adaptações em protocolos disponíveis na literatura (CORRALIZA *et al.*, 1994; KROPF *et al.*, 2003), descritas a seguir. Utilizaram-se 10^8 formas promastigotas das espécies de *Leishmania* em estudo que foram lisadas utilizando-se Triton X-100 a 0,1%. Após 30 min. foi adicionado 25 mM de Tris-HCl. A cada 100 μ l de lisado foi adicionado 10 μ l de MnCl₂ (10 mM), seguida do aquecimento das amostras por 10 min. a 56° C. A hidrólise mediada por arginase foi realizada mediante a incubação do lisado com 100 μ l de L-arginina (0,5 M, pH 9,7) a 37° por 15-120 min. A reação foi interrompida adicionando-se 900 μ l de H₂SO₄ (96%)/ H₃PO₄ (85%) / H₂O (1/3/7, v/v/v). A concentração de uréia foi medida a 540 nm após adição de 40 μ l de α -isonitrosopropiophenone (diluído em etanol a 100%) seguido do aquecimento a 95° C por 30 min. Cada unidade de enzima equivale à quantidade de enzima que catalisou a formação de 1 μ mol de uréia/min.

4.13 ESTATÍSTICA E ANÁLISE DOS RESULTADOS:

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de Normalidade. Após verificação do grau de distribuição normal das amostras estudadas, foi aplicado o teste paramétrico One-Way ANOVA, para a comparação entre três ou mais grupos independentes e o pós-teste de Newman-Keuls, para a identificação das diferenças encontradas.

Nos casos de distribuição não normal ou nos casos onde não foi possível realizar o teste para verificação do padrão de distribuição, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Walis, para detecção de diferenças estatisticamente significativas entre três

grupos independentes e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn, para a identificação das possíveis diferenças.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes, adotando-se o intervalo de confiança de 95%, quando $p < 0,05$.

Foram também definidos parâmetros para avaliação do significado biológico do aumento ou diminuição na produção ou expressão de RNAm de citocinas, quimiocinas e receptores dessas moléculas, quando a reprodutibilidade de um determinado fenômeno não foi acompanhada de significância estatística. Esses parâmetros são descritos a seguir:

- Reprodutibilidade das diferenças entre grupos em pelo menos dois experimentos quando da realização de dois ou três experimentos;
- Reprodutibilidade das diferenças entre grupos em no mínimo três experimentos quando da realização de cinco experimentos (dosagem de IL-12).

Para elaboração do resumo geral dos perfis de citocinas, quimiocinas e receptores produzidos por Mφs de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (Tab. 2) utilizou-se como critério o aumento ou redução de um intervalo na escala do eixo Y dos respectivos gráficos em relação aos controles não infectados ou grupo oposto infectado - La ou Lb, conforme parâmetros descritos acima.

5.0 RESULTADOS

5.1 Cinética da infecção de Mφs peritoneais de camundongos BALB/c com promastigotas em fase estacionária de *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*.

Foi realizada análise da cinética da infecção de Mφs infectados com *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*. Foi feito um pulso de seis horas e avaliações após períodos de caça de 24, 48 e 72 horas. A Figura 1A demonstra o percentual de Mφs infectados por ambas as espécies de *Leishmania* nos diferentes tempos. Os resultados mostram que no tempo equivalente as primeiras 6 h de pulso o percentual de Mφs infectados foi similar em ambos os grupos. No entanto, ao longo dos períodos de caça observou-se uma diminuição no percentual de Mφs infectados no grupo Lb ($p < 0,001$), enquanto que o percentual de infecção se manteve constante no grupo infectado com La durante todos os tempos avaliados. Como demonstrado na figura 1B a avaliação do número de leishmanias por macrófagos confirma os dados observados já que ao longo da infecção houve um aumento progressivo da relação leishmania/Mφ no grupo infectado com La em relação a Lb, sendo as diferenças estatisticamente significante nos tempos de 48 e 72 h pós-infecção ($p < 0,001$).

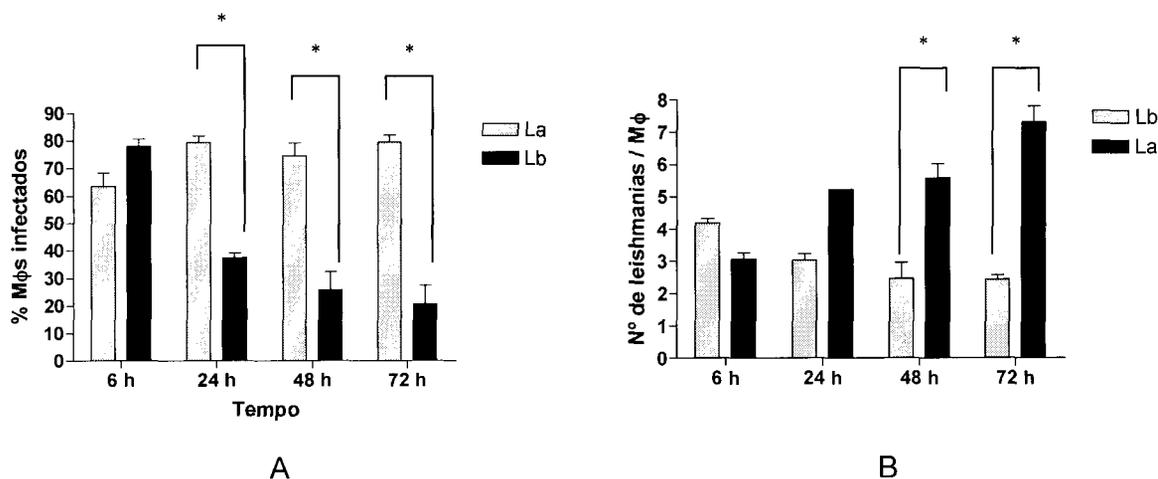


Figura 1: Cinética da infecção de Mφs peritoneais de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. Mφs peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* numa proporção de 10 leishmania/Mφ. Após o período de pulso de 06 horas e caça de 24, 48 e 72 horas, as células foram fixadas em etanol absoluto por um período de 10 min. e o percentual de Mφs infectados (A) e o número de leishmanias por Mφs (B) foi determinado por contagem das células fixadas em lamínula de vidro. Os resultados acima são referentes à média \pm o erro padrão de três experimentos independentes (* $p < 0,001$ - One-Way ANOVA).

5.2 Efeito do IFN- γ no percentual de infecção de M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.

O efeito de IFN- γ na sobrevivência de parasitos de La e Lb no interior de M ϕ s na presença ou ausência de IFN- γ foi avaliado após o período de pulso e demais períodos de caça mencionados acima. O percentual de M ϕ s infectados foi determinado como descrito na figura 1. A figura 2 (A e B) mostra que embora o percentual de infecção dos M ϕ s infectados com Lb tenha diminuído a partir do período de pulso de 6h em relação aos M ϕ s infectados com La, o pré-tratamento com IFN- γ não foi capaz de promover alteração no percentual de infecção de M ϕ s infectados em ambos os grupos nos tempos estudados. Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significantes entre esses grupos é possível observar na figura 2C que o número de leishmanias por macrófagos foi maior no grupo pré-tratado com IFN- γ e infectado com La em relação ao grupo pré-tratado com IFN- γ e infectado com Lb, sendo essas diferenças estatisticamente significantes no tempo de 72 h pós-infecção ($p < 0,01$).

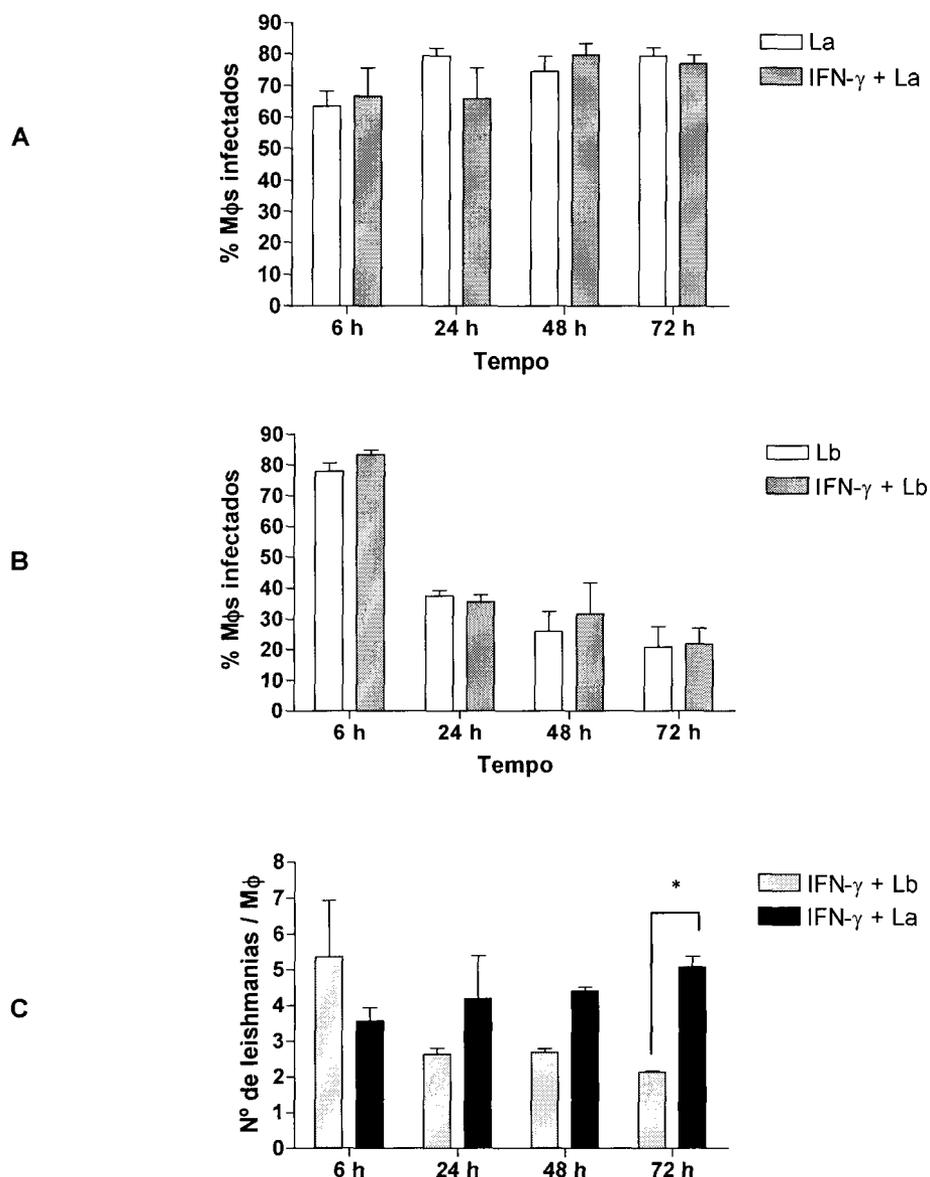


Figura 2: Efeito do IFN- γ no percentual de infecção de M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* (A) ou *L. braziliensis* (B) e no número de leishmanias por M ϕ s (C). M ϕ s peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c foram pré-tratados com IFN- γ (100 UI/poço) durante o período de 18 h e em seguida infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*

numa proporção de 10 leishmania/M ϕ . Após o período de pulso de 06 horas e caça de 24, 48 e 72 horas, as células foram fixadas e o percentual de M ϕ s infectados foi determinado como descrito na figura 1. Os resultados acima são referentes à média \pm o erro padrão de três experimentos independentes (* $p < 0,01$ - One-Way ANOVA).

5.3 Efeito da sinergia entre IFN- γ e TNF- α no percentual de infecção de M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c com *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*.

Para avaliar o efeito da sinergia entre IFN- γ e TNF- α , M ϕ s peritoneais foram pré-tratados com essas citocinas durante o período de 18 h e em seguida infectados com La e Lb e avaliados conforme descrito na figura 2. A figura 3 (A e B) mostra que nos tempos de 6 à 48h não houve alterações no percentual de infecção nos grupos infectados com La ou Lb e pré-tratados com as citocinas, em relação aos grupos não tratados, e que só após 72 h o pré-tratamento promoveu uma redução nesse percentual em ambos os grupos, mas estatisticamente significativa apenas no grupo La ($p < 0,001$).

A avaliação do número de leishmanias por macrófagos demonstrada na figura 3C evidencia as diferenças entre os grupos estudados já que ao longo da infecção houve um aumento progressivo da relação leishmania/M ϕ no grupo pré-tratado com IFN- γ e TNF- α e infectado com La em relação ao grupo pré-tratado com IFN- γ e TNF- α e infectado com Lb, sendo as diferenças estatisticamente significante nos tempos de 24, 48 e 72 h pós-infecção ($p < 0,05$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).

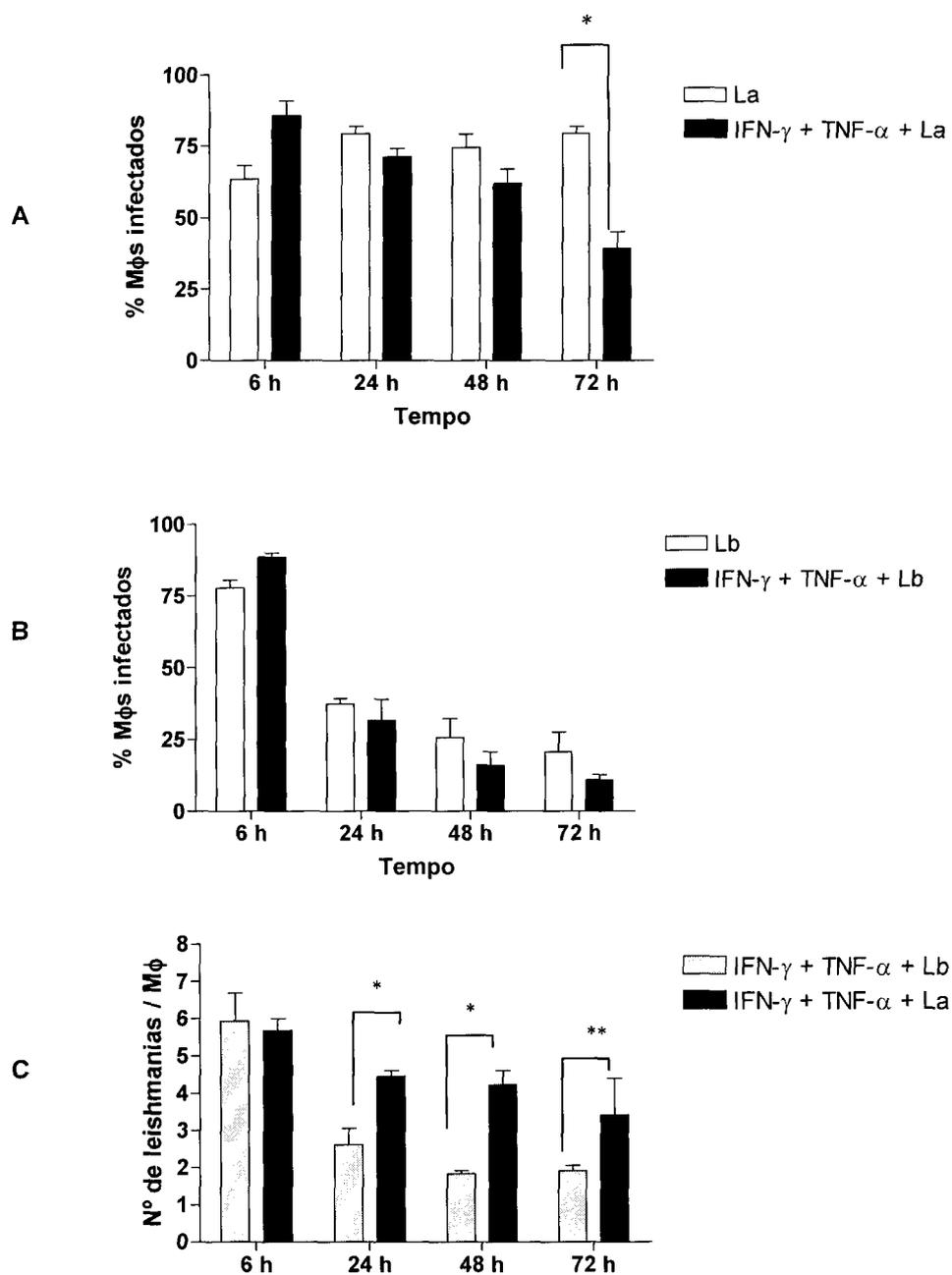


Figura 3: Efeito da sinergia entre IFN- γ e TNF- α no percentual de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* (A) ou *L. braziliensis* (B) e no número de leishmanias por M ϕ s (C). M ϕ s peritoneais

inflamatórios de camundongos BALB/c foram pré-tratados com IFN- γ (100 UI/poço) e TNF- α (100 UI/poço) durante o período de 18 h e em seguida infectados com La ou Lb e avaliados conforme descrito na figura 1. Os resultados acima são referentes à média \pm o erro padrão de três experimentos independentes (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ - One-Way ANOVA).

5.4 Diferenças na ação microbicida dos M ϕ s e efeito do IFN- γ e da sinergia entre IFN- γ e TNF- α na viabilidade de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* isoladas de M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados.

M ϕ s peritoneais sem tratamento ou pré-tratados com IFN- γ ou IFN- γ mais TNF- α foram infectados e após 72 h de infecção foram incubados em meio Schneider's completo (20% SBF) para avaliar o efeito dessas citocinas na viabilidade dos parasitos. A figura 4 mostra que os M ϕ s apresentam uma distinta resposta na sua ação microbicida sobre os parasitos de La e Lb, o que pode ser evidenciado pela alta quantidade de parasitos viáveis isolados no grupo infectado com La e baixa quantidade no grupo infectado com Lb. Além disso, tanto o pré-tratamento com IFN- γ quanto com IFN- γ mais TNF- α não alterou a viabilidade de *L. amazonensis* isolada de M ϕ s infectados em relação ao grupo que não sofreu pré-tratamento por essas citocinas. No entanto, *L. braziliensis* se mostrou susceptível a ação dessas citocinas, já que o pré-tratamento com IFN- γ foi capaz de diminuir o número de parasitos viáveis isolados ($p < 0,001$). O pré-tratamento com IFN- γ mais TNF- α se mostrou bastante efetivo nesse grupo uma vez que o número de *L. braziliensis* isolados a partir dos M ϕ s infectados

mostrou-se significativamente reduzido em relação ao grupo que não sofreu pré-tratamento ($p < 0,001$).

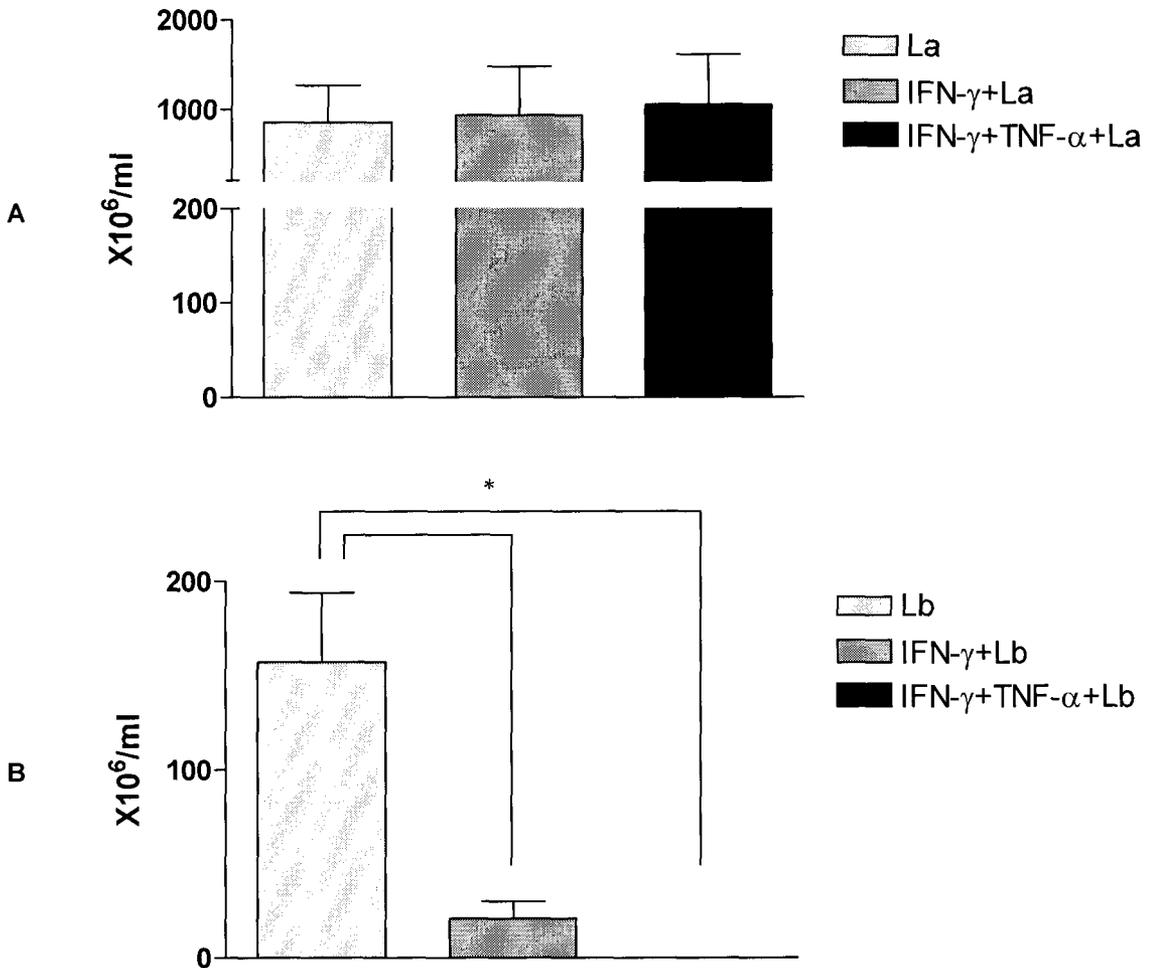


Figura 4: Efeito do IFN- γ e da sinergia entre IFN- γ e TNF- α na viabilidade de *L. amazonensis* (A) ou *L. braziliensis* (B) isoladas de M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados. M ϕ s peritoneais foram pré-tratados ou não com IFN- γ (100 UI/poço) ou IFN- γ (100 UI/poço) e TNF- α (100 UI/poço) durante o período de 18 h e em seguida infectados com La ou Lb conforme descrito na figura 2. Após 72 h de caça os macrófagos foram lavados e incubados com meio Schinerder's completo (20%

SBF). Após 3 a 5 dias os parasitos isolados foram contados em câmara de Neubauer. Os resultados acima são referentes à média \pm o erro padrão de três experimentos independentes (* $p < 0,001$ - One-Way ANOVA).

5.5 Produção de NO por M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*.

Os níveis de produção de NO em sobrenadantes de culturas de M ϕ s peritoneais pré-tratados ou não com IFN- γ e infectados com La ou Lb, conforme descrito posteriormente, foram avaliados nos diferentes períodos do estudo.

A figura 5 mostra que não foi detectada produção de níveis de NO nos grupos de M ϕ s infectados e não infectados que não receberam pré-tratamento com IFN- γ nos diferentes tempos estudados, exceto no grupo infectado com Lb, no qual observou-se uma pequena produção de NO no tempo de 6h. Nos grupos de M ϕ s infectados e não infectados e pré-tratados com IFN- γ observou-se uma progressiva produção de NO ao longo dos diferentes tempos. Não foram observadas diferenças na produção de NO nos grupos de M ϕ s pré-tratados ou não com IFN- γ e infectados com La ou Lb nos tempos estudados.

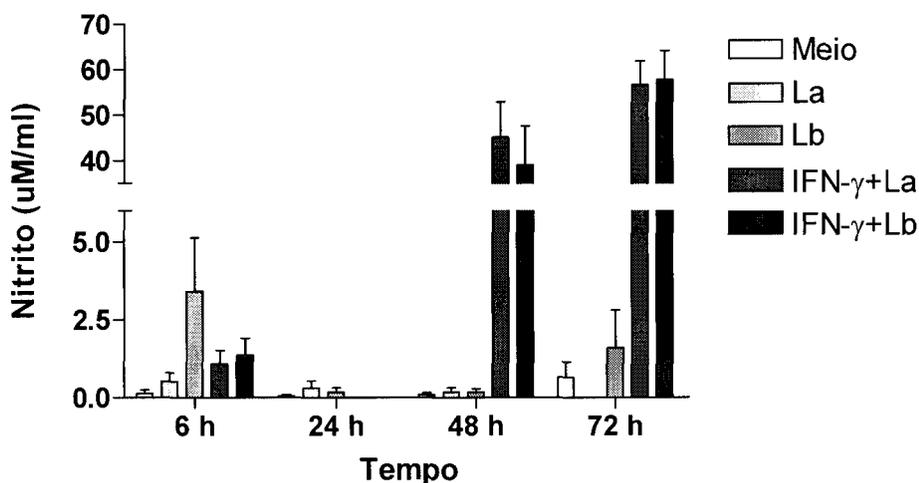


Figura 5: Produção de NO por Mφs peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*. Mφs peritoneais foram pré-tratados com IFN- γ (100 UI/poço) ou não receberam pré-tratamento durante o período de 18 h e em seguida infectados com La ou Lb conforme descrito na figura 2. Após o período de pulso de 06 horas e caça de 24, 48 e 72 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e os níveis de NO foram testados pelo método de Griess. Os resultados acima são referentes à média \pm o erro padrão de três experimentos independentes.

5.6 Efeito do bloqueio e da indução da produção de NO na viabilidade de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* isoladas de Mφs peritoneais de camundongos BALB/c infectados.

Para avaliar o efeito do bloqueio ou do aumento na produção de NO sobre a sobrevivência de La ou Lb no interior dos Mφs infectados, ambos os grupos foram tratados com AMG ou SNAP. A AMG é um inibidor da síntese de NO e o SNAP atua como um doador dessa molécula.

A figura 6 mostra que o tratamento dos Mφs infectados com La com AMG não altera a quantidade de parasitos viáveis isolados dessas células e que o tratamento com SNAP foi capaz de diminuir em três vezes o número de parasitos viáveis isolados em relação ao grupo que não sofreu tratamento ($p < 0,01$). Nos Mφs infectados com Lb a AMG aumentou o número de parasitos viáveis de forma estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$), enquanto que o tratamento com SNAP foi eficiente na destruição de parasitos pelos Mφs, de modo que não foi possível identificar a presença de parasitos viáveis isolados dessas células no tempo avaliado ($p < 0,001$).

Em síntese, o bloqueio da produção dessa molécula é capaz de aumentar a infecção por Lb, mas não altera a infecção por La. O aumento das quantidades de NO induzido por SNAP em níveis elevados (acima de $150 \mu\text{M/ml}$), torna ambas as espécies de *Leishmania* susceptíveis e diminui a carga parasitária em ambos os grupos de maneira estatisticamente significativa.

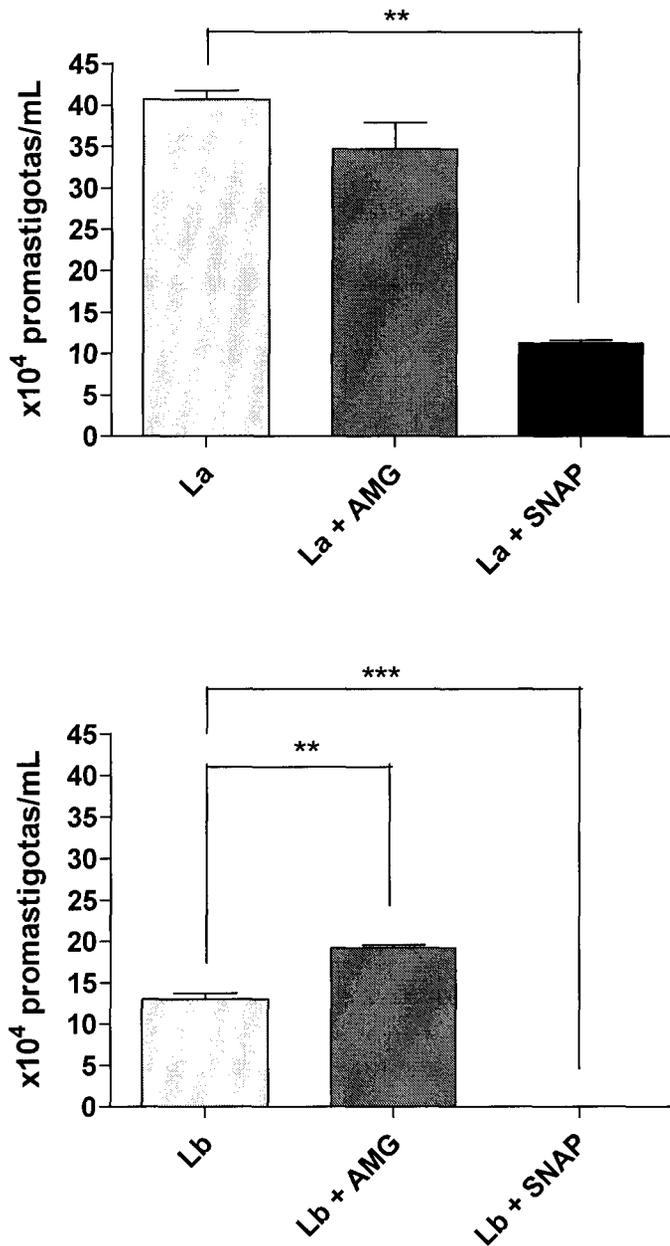


Figura 6: Efeito do bloqueio e da indução da produção de NO na viabilidade de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* isoladas de M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados. M ϕ s peritoneais foram cultivados e pré-tratados com AMG, SNAP ou sem pré-tratamento por 06 h e em seguida infectados com La ou Lb conforme descrito na figura 2. Após 6h as leishmanias foram lavadas e retiradas e os M ϕ s

reincubados em RPMI completo tiveram AMG reposta No grupo com SNAP houve reposição do reagente a cada 6h até o final do experimento. Após 48 h de caça os macrófagos foram lavados e cultivados em meio Schinerder's completo (20% SBF) para detecção de parasitos viáveis. Após 3 dias as formas promastigotas dos parasitos isolados foram contadas em câmara de Neubauer. Os resultados acima são referentes a um experimento (média \pm o desvio padrão) representativo de três experimentos independentes (** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$ - One-Way ANOVA).

5.7. Efeito do tratamento *in vivo* com AMG na carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*.

Para avaliar o papel do NO *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com La ou Lb, ambos os grupos foram tratados com AMG diluída na água dos animais numa concentração de 2%. Seis semanas após a infecção as orelhas e linfonodos retroauriculares foram retirados e submetidos ao teste de diluição limitante.

A figura 7A mostra que o tratamento com AMG não altera a carga parasitária na pele dos animais infectados com La em relação ao grupo não tratado, como anteriormente observado nos experimentos de bloqueio de NO com AMG *in vitro*. Por outro lado, nos camundongos infectados com Lb a AMG aumentou o número de parasitos viáveis na pele em relação ao grupo que não recebeu o tratamento ($p < 0,0001$).

A figura 7B mostra que não foram observadas diferenças nas cargas parasitárias nos linfonodos de drenagem de camundongos infectados com La e tratados com AMG em relação ao grupo não tratado. No grupo infectado com Lb que não recebeu

tratamento com AMG observou-se o aumento de aproximadamente 1 log de parasitos em relação aos linfonodos dos grupos La tratado e não tratado. Camundongos infectados com Lb e tratados com AMG demonstraram aumento de 1 log no parasitismo nos linfonodos em relação ao grupo não tratado e de aproximadamente 2 log em relação aos grupos La. Não foi possível avaliar a significância estatística dessas diferenças em virtude dos experimentos terem sido realizados com “pool” de linfonodos de 5 animais por grupo.

Sendo assim, o bloqueio da produção dessa molécula é capaz de aumentar a infecção por Lb, mas não altera a infecção por La nas lesões de orelha e linfonodo.

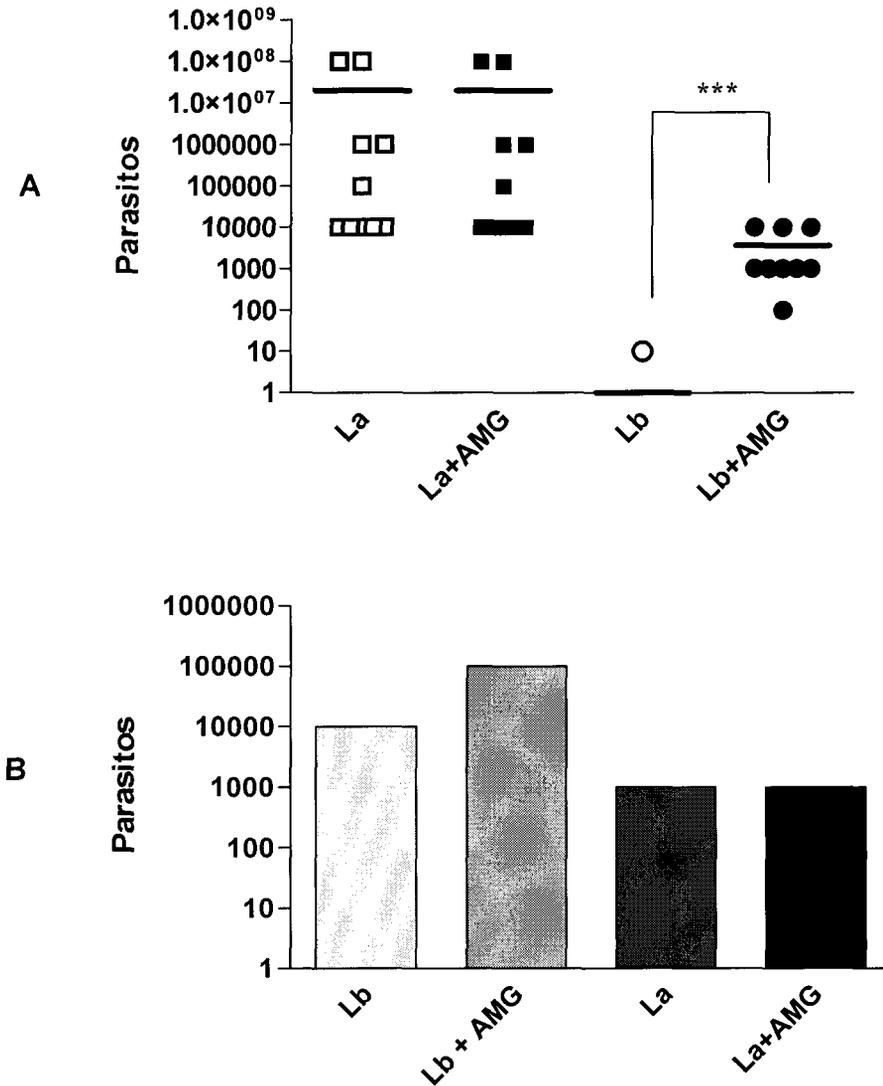


Figura 7: Efeito do tratamento *in vivo* com AMG na carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados por injeção intradérmica na orelha de 1×10^5 formas promastigostas de La ou Lb. A partir de 24h após infecção, os camundongos foram submetidos ao tratamento com AMG 2%, diluída na água dos bebedouros. Após 42 d de infecção os camundongos foram sacrificados e as orelhas (A) e linfonodos

retroauriculares (B) retirados e submetidos ao teste de diluição limitante. Os grupos controles receberam apenas água. Os resultados acima são referentes à mediana de dois experimentos independentes (N=10/grupo) (A) e de um experimento feito com pool de linfonodos de 05 animais por grupo (B). (***) $p < 0,0001$ – Kruskal-Wallis).

5.8 Produção de IL-12 por M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*.

Os níveis de produção de IL-12 em sobrenadantes de culturas de M ϕ s peritoneais infectados com La ou Lb, conforme descrito posteriormente, foram avaliados nos diferentes períodos do estudo. A figura 8 mostra que a infecção por La não foi capaz de induzir produção de IL-12 pelos M ϕ s ao longo dos diversos tempos analisados. Por outro lado a infecção com Lb induziu uma maior produção dessa citocina no tempo de 72 h em relação ao grupo La, porém não estatisticamente significativa.

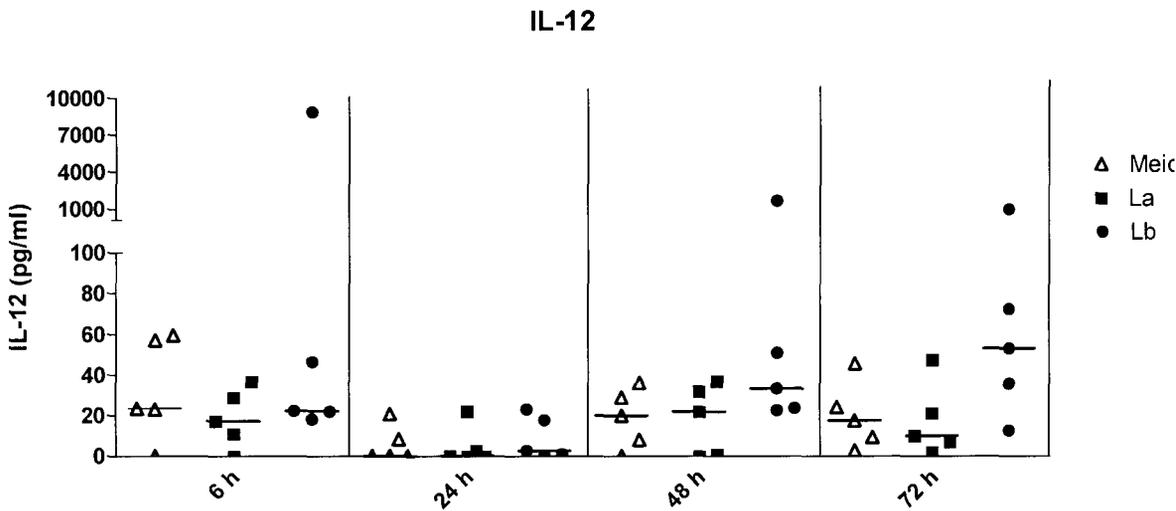


Figura 8: Produção de IL-12 por M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*. M ϕ s peritoneais foram infectados com La ou Lb conforme descrito na figura 2. No período de pulso de 06 horas e após lavagem e retirada das leishmanias não internalizadas e caça de 24, 48 e 72 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e os níveis de IL-12 foram testados por ELISA. Os resultados acima são referentes à mediana de cinco experimentos independentes.

5.9 Produção de TGF- β por M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*.

A produção de TGF- β em sobrenadantes de culturas de M ϕ s peritoneais infectados com La ou Lb foi avaliada nos diferentes períodos do estudo. A figura 9 demonstra que a produção desta citocina esteve aumentada no grupo infectado com La no tempo de 24h após infecção em relação aos grupos controle e Lb, embora essa

diferença não tenha sido estatisticamente significante. Nos demais tempos não foram observadas diferenças na produção dessa citocina nos grupos estudados.

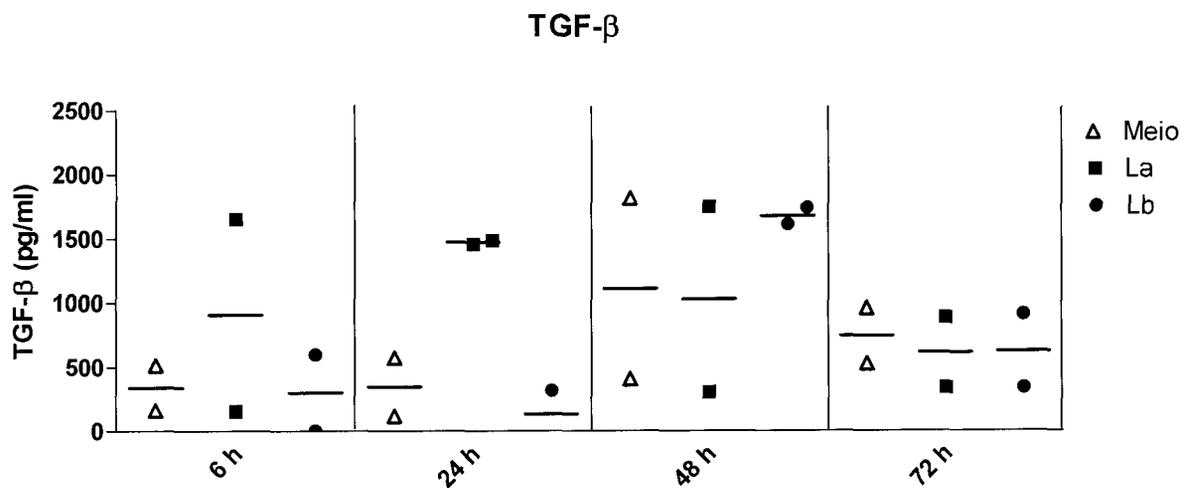


Figura 9: Produção de TGF- β por M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. M ϕ s peritoneais foram infectados com La ou Lb conforme descrito na figura 2. No período de pulso de 06 horas e após lavagem e retirada das leishmanias não internalizadas e caça de 24, 48 e 72 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e os níveis de TGF- β foram testados por ELISA. Os resultados acima são referentes à mediana de dois experimentos independentes.

5.10 Expressão de RNAm de citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas por M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*.

5.10.1 Expressão de RNAm para as citocinas TNF- α e IL-10:

A expressão de RNAm de TNF- α em M ϕ s peritoneais infectados com La ou Lb, conforme descrito posteriormente, foi avaliada nos diferentes períodos do estudo. A figura 10 mostra que a expressão de RNAm de TNF- α aumentou nas primeiras 6 h após a infecção nos M ϕ s infectados com Lb em relação aos grupos controle e La e que nos demais tempos a expressão de RNAm para essa citocina se mostrou baixa em todos os grupos estudados, não havendo diferenças na expressão de TNF- α , nos demais tempos.

A expressão de RNAm de IL-10 em M ϕ s peritoneais infectados com La ou Lb foi avaliada nos diferentes períodos do estudo. Na figura 11 pode-se observar um aumento na expressão de RNAm para essa citocina no grupo infectado com La no tempo de 24 h em relação aos grupos controle e Lb. IL-10 não apresentou diferenças na sua expressão de RNAm nos grupos de M ϕ s estudados nos tempos de 6, 48 e 72 h.

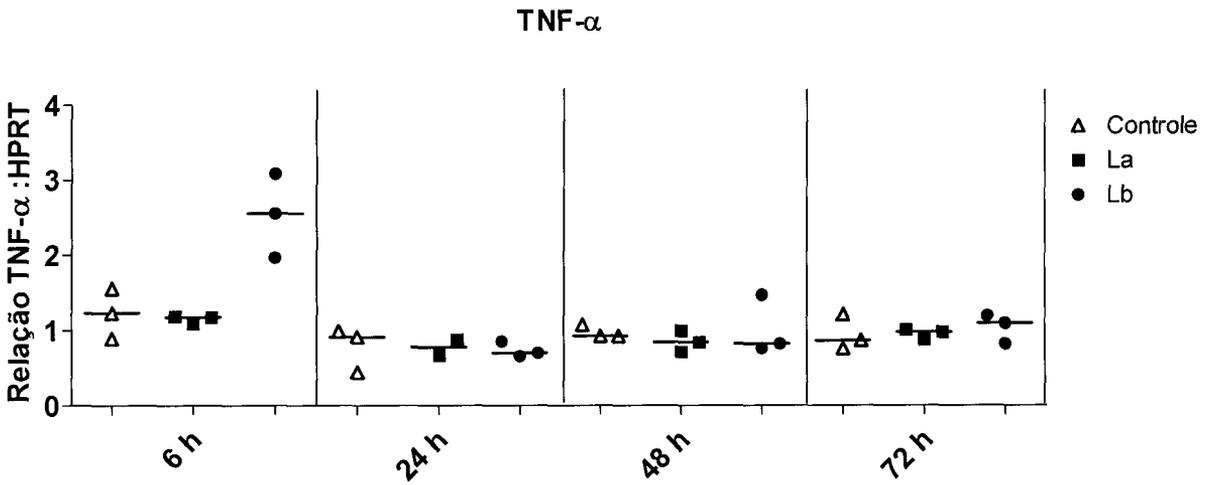


Figura 10: Expressão de RNAm de TNF- α por M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*. M ϕ s peritoneais foram infectados com La ou Lb conforme descrito na figura 2. Nos períodos de 06, 24, 48 e 72 horas após infecção o RNA total dos M ϕ s foi extraído e utilizado no RT-PCR para amplificação do RNAm de TNF- α . Os resultados apresentados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo HPRT e são referentes à mediana de três experimentos independentes.

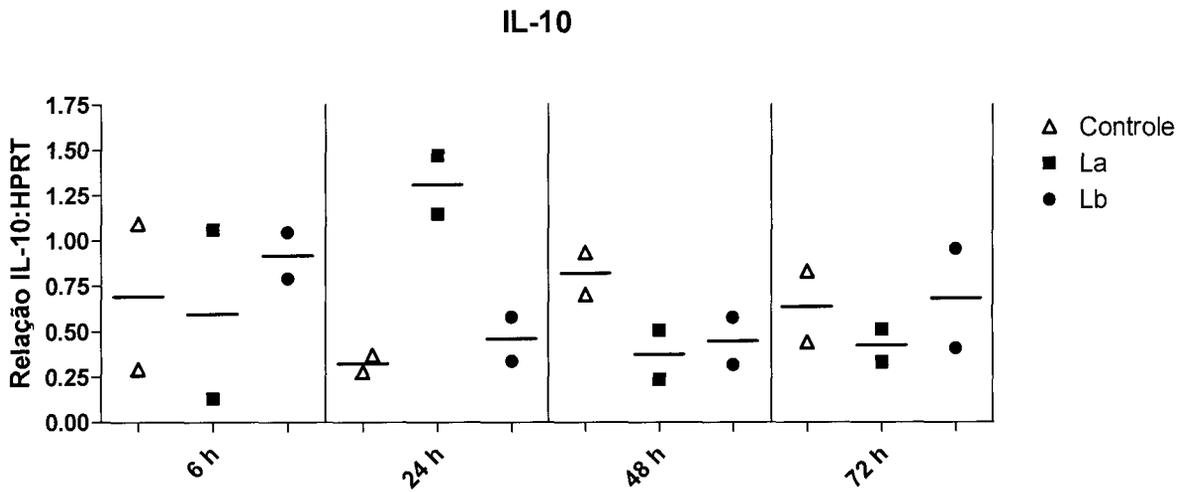


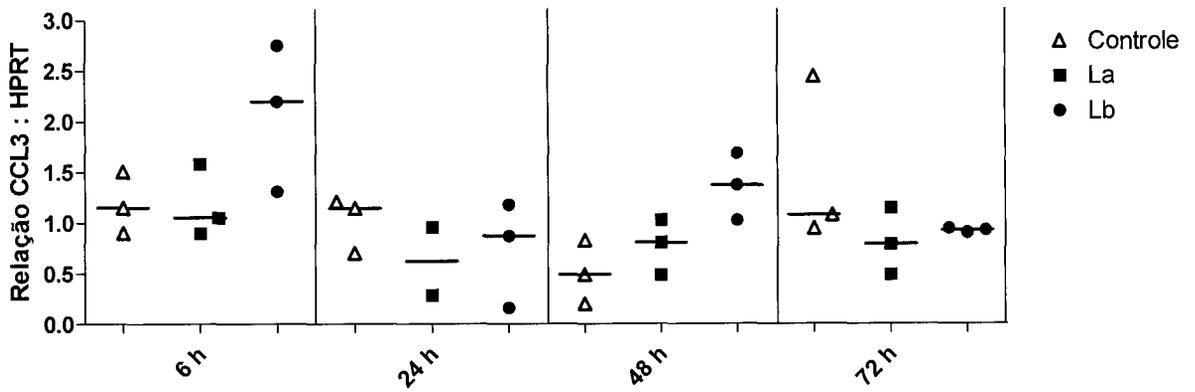
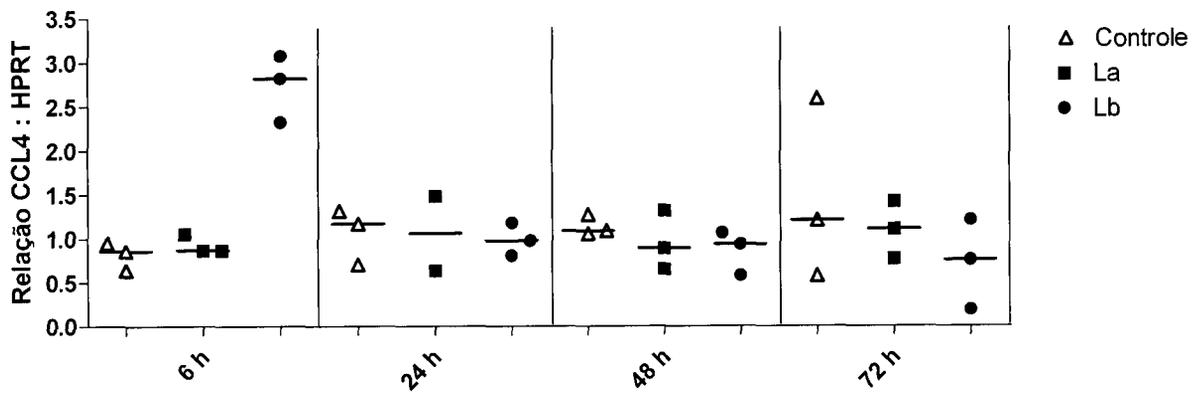
Figura 11: Expressão de RNAm de IL-10 por Mφs peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*. Mφs peritoneais foram infectados com La ou Lb conforme descrito na figura 2. Nos períodos de 06, 24, 48 e 72 horas após infecção o RNA total dos Mφs foi extraído e utilizado no RT-PCR para amplificação do RNAm de IL-10. Os resultados apresentados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo HPRT e são referentes à mediana de dois experimentos independentes.

5.10.2 Expressão de RNAm das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES e CCL12/MCP-5:

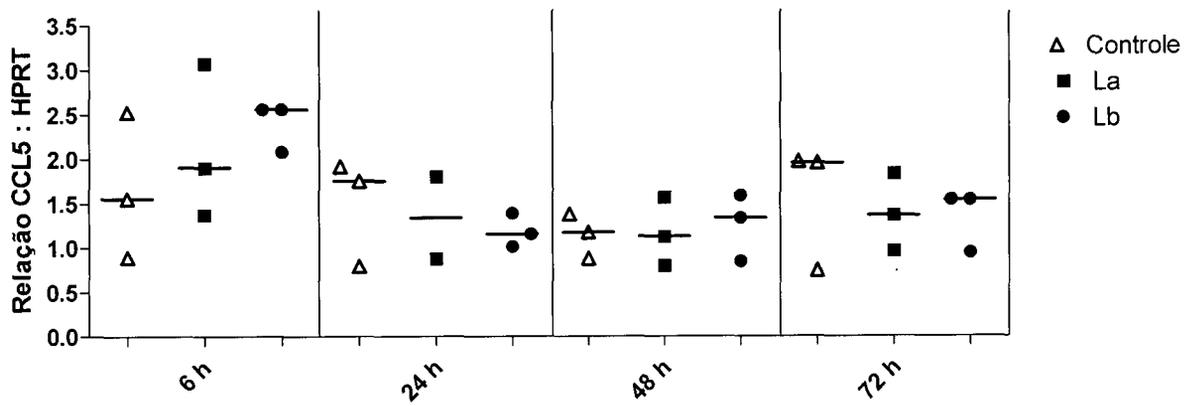
A expressão de RNAm das CC quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES e CCL12/MCP-5 foi avaliada nos diferentes períodos do estudo em Mφs peritoneais infectados com La ou Lb.

CCL3/MIP-1 α e CCL4/MIP-1 β foram mais expressas no tempo de 6h no grupo infectado com Lb em relação aos grupos controle e La, ao passo que nos demais

tempos não apresentou diferenças na sua expressão nos diferentes grupos (Fig. 12A e 12B). Com relação a expressão de RNAm de CCL12/MCP-5, observou-se que essa quimiocina foi expressa apenas no tempo de 6h nos diferentes grupos de Mφs. Nesse tempo, o grupo infectado com La apresentou uma inibição na expressão dessa quimiocina em relação ao grupo Lb (Fig. 12D). O RNAm para CCL5/RANTES foi expresso em todos os grupos estudados, não apresentando diferenças na sua expressão ao longo dos tempos (Fig. 12C).

CCL3 / MIP-1 α CCL4 / MIP-1 β 

CCL5 / RANTES



D

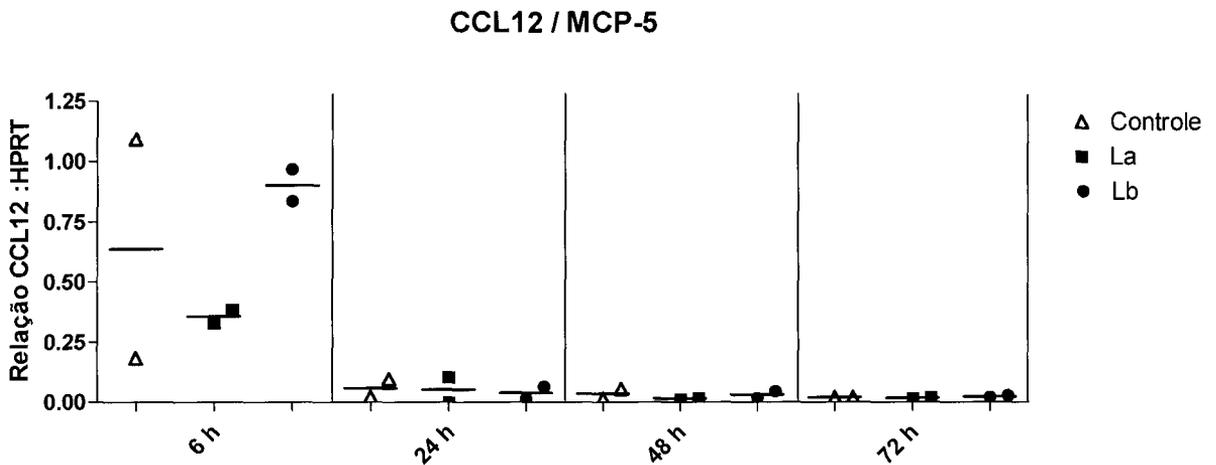


Figura 12: Expressão de RNAm de CC quimiocinas por M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. M ϕ s peritoneais foram infectados com La ou Lb conforme descrito na figura 2. Nos períodos de 06, 24, 48 e 72 horas após infecção o RNA total dos M ϕ s foi extraído e utilizado no RT-PCR para amplificação do RNAm de CCL3/MIP-1 α (A), CCL4/MIP-1 β (B), CCL5/RANTES (C) e CCL12/MCP-5 (D). Os resultados apresentados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo HPRT e são referentes à mediana de três (A, B e C) ou dois (D) experimentos independentes.

5.10.3 Expressão de RNAm das quimiocinas CXCL9/ MIG e CXCL10/IP-10/CRG-2:

A expressão de RNAm de CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10/CRG-2 foi avaliada nos diferentes períodos do estudo em M ϕ s peritoneais infectados com La ou Lb. CXCL9/MIG foi expressa em todos os grupos estudados, não apresentando diferenças na sua expressão nos períodos de 6h, 48 h e 72 h. No tempo de 24h, observou-se que

os M ϕ s infectados com La apresentaram uma inibição na expressão de RNAm para essa quimiocina em relação ao grupo Lb (Fig. 13A). Embora CXCL10/IP-10/CRG-2 tenha sido expressa em todos os grupos estudados, não foram observadas diferenças na sua expressão ao longo dos períodos analisados (Fig. 13B).

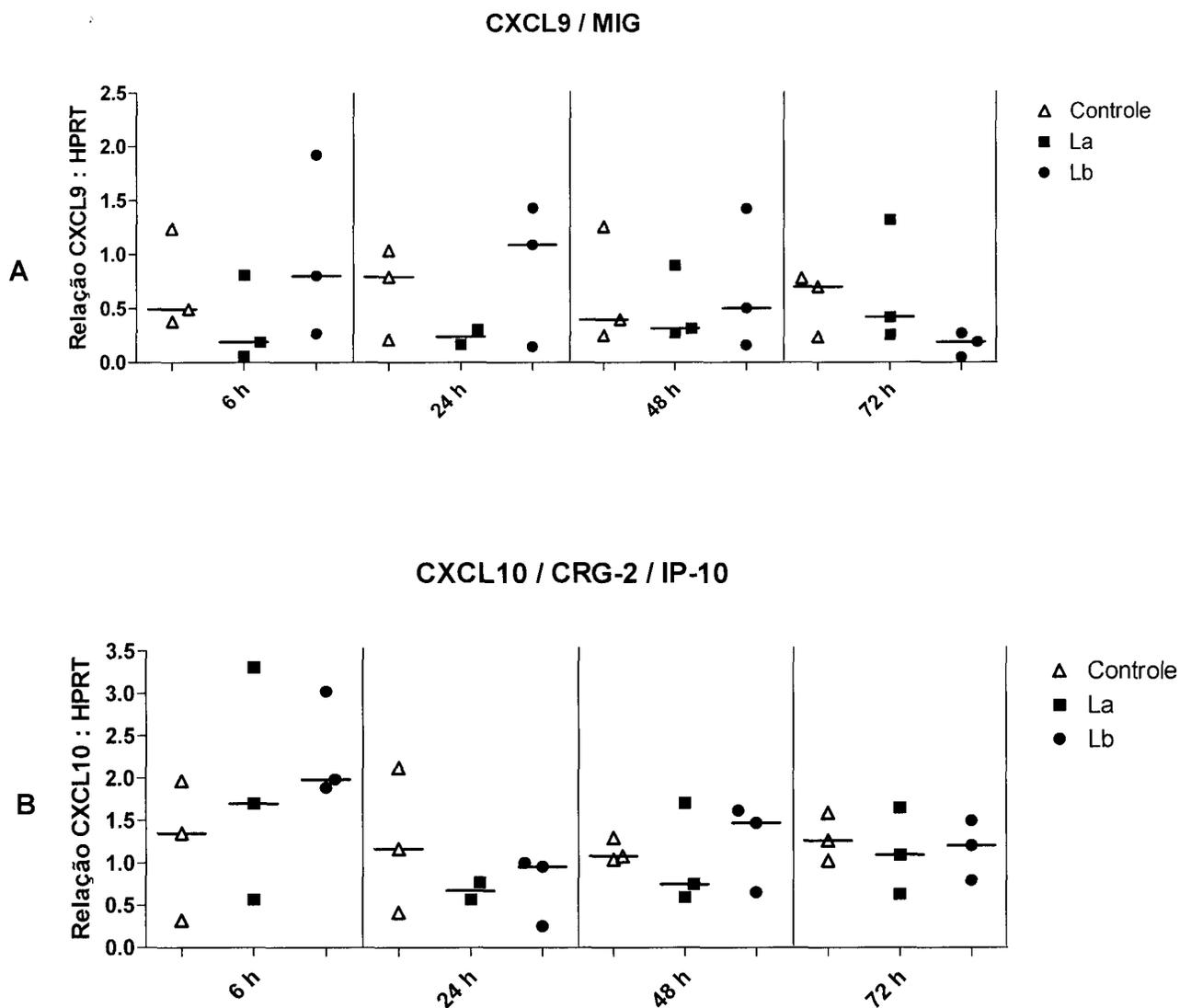


Figura 13: Expressão de RNAm de CXC quimiocinas por M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. M ϕ s peritoneais foram infectados com La ou Lb conforme descrito na figura 2. Nos períodos

de 06, 24, 48 e 72 horas após infecção o RNA total dos M ϕ s foi extraído e utilizado no RT-PCR para amplificação do RNAm de CXCL9/MIG (A) e CXCL10/IP-10/CRG-2 (B). Os resultados apresentados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo HPRT e são referentes à mediana de três experimentos independentes.

5.10.4 Expressão de RNAm para os receptores de CC quimiocinas, CCR3, CCR4, CCR5 e CCR7, e de CXC quimiocinas, CXCR4:

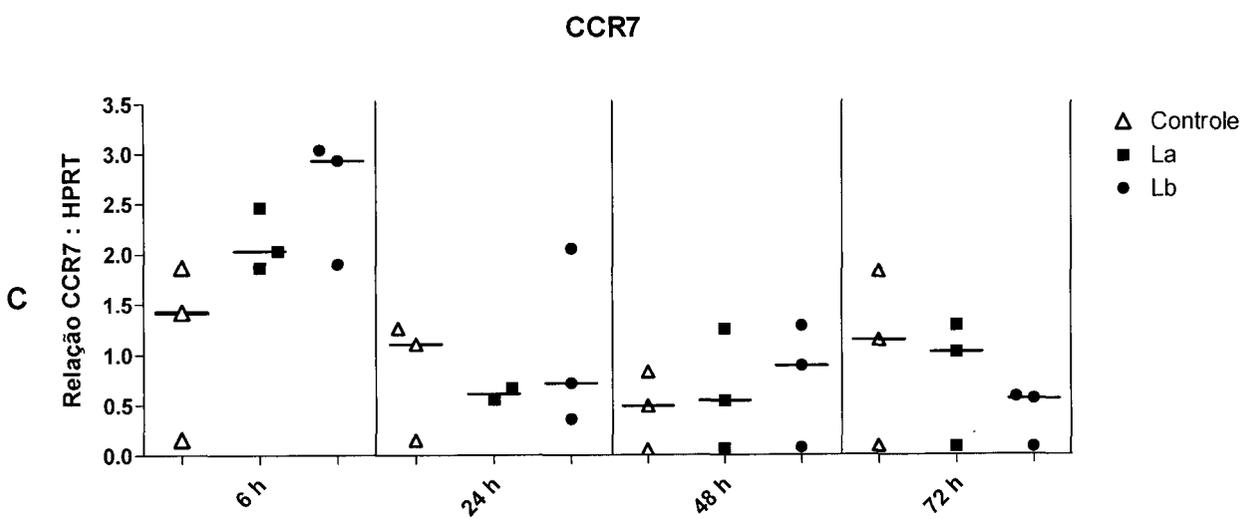
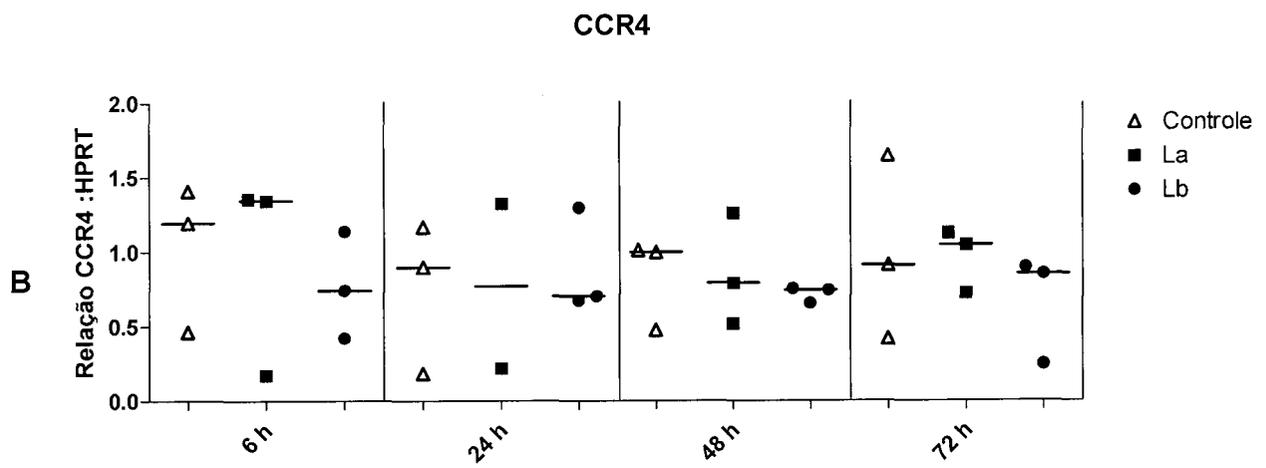
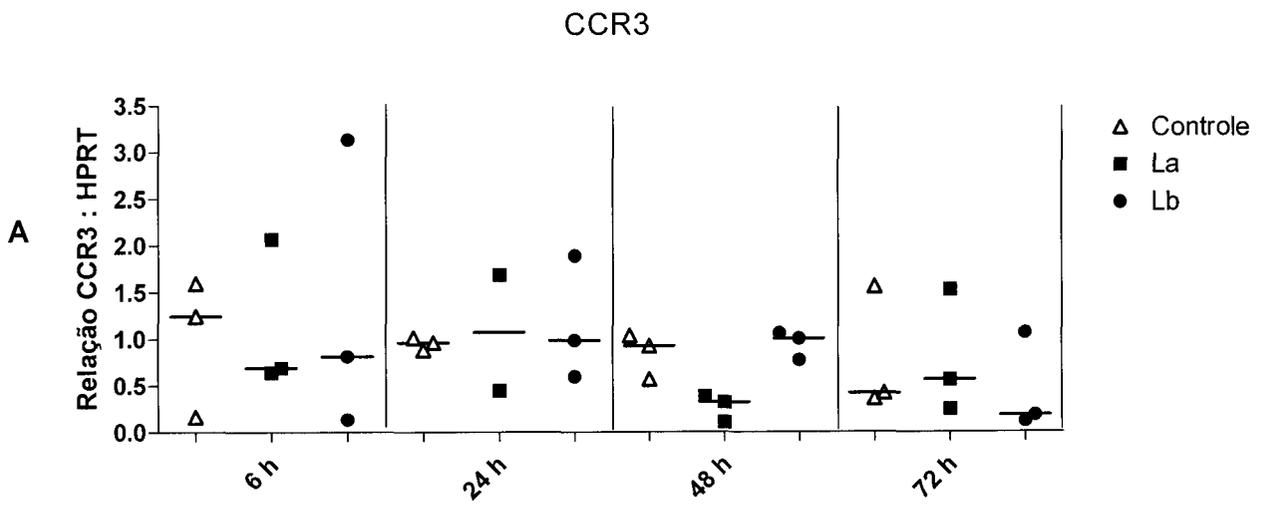
Além das quimiocinas, foi avaliada a expressão de alguns receptores de quimiocinas nos diferentes períodos do estudo em M ϕ s peritoneais infectados com La ou Lb.

CCR3 é um receptor que liga a uma grande quantidade de quimiocinas, dentre as quais podemos destacar CCL5/RANTES e CCL12/MCP-5, avaliadas nesse estudo. A expressão de RNAm de CCR3 foi observada em todos os grupos estudados, não apresentando diferenças na sua expressão nos períodos de 6h, 24 h e 72 h. No tempo de 48h, observou-se que os M ϕ s infectados com La apresentaram uma inibição na expressão de RNAm para esse receptor em relação aos grupos controle e Lb (Fig. 14A).

CCR4 tem como principais ligantes o CCL17/TARC e o CCL22/MDC/ABCD1. CCR5 liga-se a CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES, também analisadas nesse trabalho. CXCR4 é o receptor para CXCL12/SDF-1 α e β , que tem um importante papel na quimiotaxia de linfócitos T e B. CCR4, CCR5 e CXCR4, também foram expressos em

todos os grupos estudados, não apresentando diferenças na sua expressão ao longo dos tempos (Fig. 14B, 14C, e 14E, respectivamente).

CCR7 atua como receptor para as quimiocinas CCL20/MIP-3 β e CCL21/6Ckine. A expressão de RNAm para esse receptor teve o seu maior pico no período de 6h principalmente no grupo infectado com Lb em relação aos grupos controle e La. Nos tempos de 24, 28 e 72 h a sua expressão é modulada a níveis próximos aos dos demais grupos (Fig. 14D).



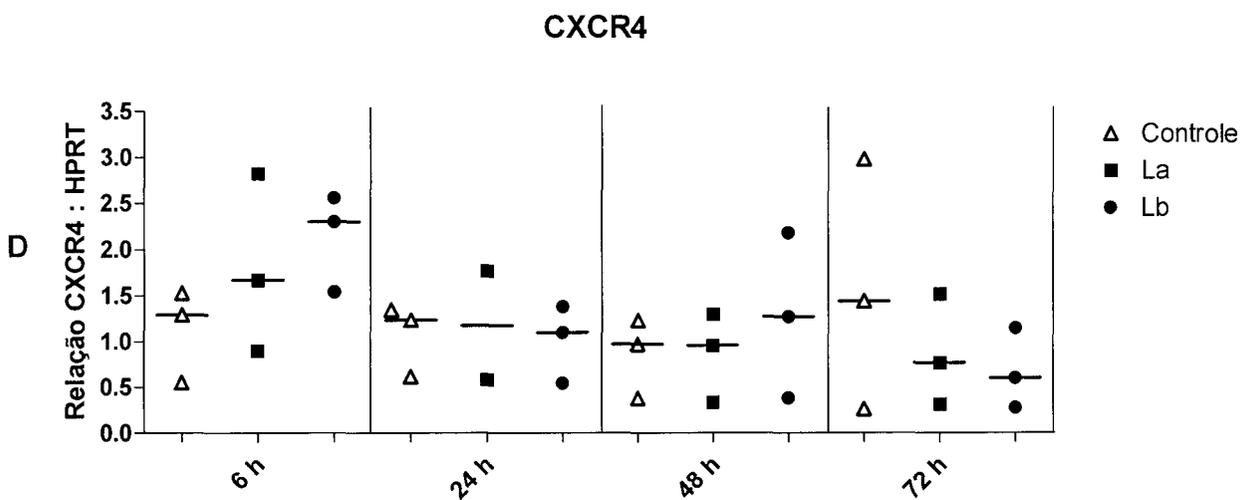


Figura 14: Expressão de RNAm de receptores de CC e CXC quimiocinas por M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*. M ϕ s peritoneais foram infectados com La ou Lb conforme descrito na figura 2. Nos períodos de 06, 24, 48 e 72 horas após infecção o RNA total dos M ϕ s foi extraído e utilizado no RT-PCR para amplificação do RNAm de CCR3 (A), CCR4 (B), CCR7(C), e CXCR4 (D). Os resultados apresentados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo HPRT e são referentes à mediana de três experimentos independentes.

Mφ de BALB/c		La				Lb			
		6h	24h	48h	72h	6h	24h	48h	72h
Citocinas	TNF- α	-	-	-	-	↑↑	-	-	-
	IL-10	-	↑↑	-	-	-	-	-	-
	IL-12	-	-	-	-	-	-	-	↑
	TGF- β	↑	↑↑	-	-	-	-	↑	-
CC	CCL3 (MIP-1 α)	-	↓	-	-	↑↑	-	↑↑	-
	CCL4 (MIP-1 β)	-	-	-	-	↑↑↑↑	-	-	-
	CCL5 (RANTES)	-	-	-	↓	↑↑	↓	-	-
	CCL12 (MCP-5)	↓	-	-	-	↑	-	-	-
CXC	CXCL9 (MIG)	-	↓	-	-	-	-	-	-
	CXCL10 (CRG-2/IP-10)	-	↓	-	-	↑	-	-	-
Receptores	CCR3	↓	-	↓	-	-	-	-	-
	CCR4	-	-	-	-	↓	-	-	-
	CCR7	↑	↓	-	-	↑↑↑	-	-	↓
	CXCR4	-	-	-	↓	↑↑	-	-	↓↓

Tabela 2: Resumo geral dos perfis de citocinas, quimiocinas e receptores produzidos por Mφs de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. [(↑) aumento ou (↓) redução de um intervalo na escala do eixo Y dos

respectivos gráficos em relação aos controles não infectados ou grupo oposto infectado - La ou Lb, conforme parâmetros descritos anteriormente no Material e Métodos]

5.11 Atividade da arginase de *L.amazonensis* ou *L. braziliensis*.

Em virtude do crescimento e susceptibilidade diferenciados entre as cepas das espécies de La e Lb no interior dos Mφs, avaliamos a atividade da arginase desses parasitos em promastigotas de fase estacionária, no intuito de estabelecer correlações entre os níveis de produção e atividade dessa enzima pelos parasitos e sobrevivência no interior dos Mφs.

Pode-se observar nos dados apresentados na figura 15 que as formas promastigotas de La apresentam uma elevada atividade de arginase apresentando-se aproximadamente de 50 a 100 vezes mais aumentada que nos promastigotas de Lb, nos diferentes experimentos realizados.

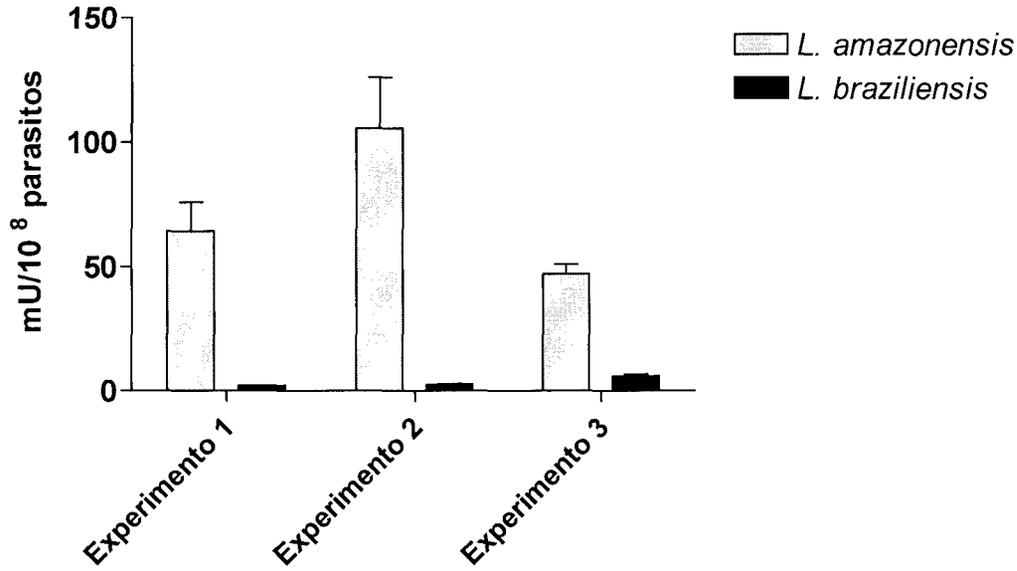


Figura 15: Atividade de arginase de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. Parasitos em fase estacionária de ambas as espécies foram lavadas em solução salina gelada e a atividade de arginase em 1×10^8 promastigotas foi determinada como descrito no material e métodos. Os resultados acima são referentes à média \pm o desvio padrão de triplicatas de três experimentos independentes.

6.0 DISCUSSÃO

A importância dos M ϕ s na infecção por *Leishmania* tem sido explorada por uma diversidade de estudos e grupos de pesquisas mediante a utilização de diferentes linhagens isogênicas de camundongos e de diferentes espécies do parasito. Neste trabalho utilizamos duas espécies de *Leishmania*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, para estudar a interação desses parasitos *in vitro* com M ϕ s peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c a fim de investigar as diferenças induzidas por esses patógenos e alguns dos mecanismos e fatores relacionados com a resposta desses M ϕ s à infecção por cada uma dessas espécies de *Leishmania*. Os resultados apresentados demonstram perfis diferenciados de resposta dessas células à infecção com La ou Lb. Os M ϕ s infectados com Lb apresentaram uma diminuição no percentual de infecção iniciada a partir dos tempos de 24, 48 e 72 h (após o pulso de 6h), enquanto que o percentual de infecção e o número de leishmanias/ M ϕ s se mantiveram constantes no grupo infectado com La ao longo desses tempos (Fig. 1 A e B). Esses dados revelam a capacidade dessas células em destruir Lb, mas não La, independente da existência de estímulos exógenos como IFN- γ (Fig. 2 B), e reforçam o importante papel dos M ϕ s no curso da infecção. Possivelmente, essas diferenças podem estar relacionadas com diferenças no reconhecimento e na conseqüente ativação de vias distintas relacionadas com morte ou sobrevivência intracelular como previamente descrito (COURRET *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2003)

IFN- γ e TNF- α são citocinas envolvidas na ativação de M ϕ s e na potencialização dos mecanismos microbicidas desencadeados no interior dessas células que são

responsáveis pela destruição de patógenos intracelulares, a exemplo de *Leishmania*. Neste estudo nós avaliamos o papel dessas citocinas na infecção e mostramos que IFN- γ não foi capaz de promover alteração no percentual de M ϕ s infectados com La ou Lb nos tempos estudados (Fig. 2 A e B). Por outro lado, o efeito da sinergia entre IFN- γ e TNF- α foi verificado mais tardiamente, no tempo de 72 h, quando o percentual de M ϕ s infectados mostrou-se reduzido em ambos os grupos de células, e ao longo da infecção na avaliação do número de leishmanias/M ϕ s (Fig. 3 A, 3B e 3C). Esses resultados são compatíveis com dados obtidos por nosso grupo quando da infecção de M ϕ s de camundongos CBA com La ou Lm, onde se observou um perfil de resposta equivalente (GOMES *et al.*, 2003). Além disso, outros trabalhos têm evidenciado que a ação de IFN- γ sobre a atividade microbicida de M ϕ s contra Lm depende da ação sinérgica dessa citocina com TNF- α ou LPS (CILLARI *et al.*, 1989; MAUEL *et al.*, 1991; ASSREUY *et al.*, 1994; JUTTNER *et al.*, 1998). Esses dados sugerem que TNF- α pode estar induzindo um segundo sinal necessário para a efetiva ativação dos macrófagos e redução do número de parasitos intracelular, como anteriormente sugerido (KAMIJO *et al.*, 1994; GOMES *et al.*, 2003).

As diferenças na ação microbicida dos M ϕ s bem como o efeito do IFN- γ e da sinergia entre IFN- γ e TNF- α na viabilidade de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* isoladas de M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c infectados foram também avaliados neste estudo. Embora o percentual de M ϕ s infectados com La ou Lb e pré-tratados com essas citocinas tenha diminuído no tempo de 72 h, os M ϕ s apresentam uma distinta resposta na sua ação microbicida sobre os parasitos de La e Lb, o que pode ser evidenciado pelas altas quantidades de parasitos viáveis isolados no grupo infectado com La e baixa

quantidade no grupo infectado com Lb. Após isolamento observou-se ainda que tanto IFN- γ sozinho quanto IFN- γ mais TNF- α não alterou a viabilidade dos parasitos La isolados do interior dos M ϕ s infectados em relação ao grupo que não sofreu pré-tratamento por essas citocinas (Fig. 4 A). Por outro lado, Lb se mostrou susceptível a ação dessas citocinas, já que IFN- γ foi capaz de diminuir o número de parasitos viáveis isolados. A associação de IFN- γ com TNF- α se mostrou efetiva nesse grupo e levou a uma redução significativa no número dos parasitos Lb isolados a partir dos M ϕ s infectados (Fig. 4 B). Rocha e colaboradores (2007) mostraram que camundongos C57BL/6 deficientes de TNF- α fazem um quadro de doença progressiva com lesões que ulceram e não curam espontaneamente. Os mesmos autores mostram também que o pré-tratamento de macrófagos de C57BL/6 tanto com IFN- γ quanto com IFN- γ e TNF- α diminui a carga parasitária de Lb no interior dessas células. No modelo de infecção de M ϕ s de camundongos CBA observou-se que essas células apresentaram uma maior expressão de RNAm de TNF- α quando infectadas com Lm em relação às infectadas com La. Além disso, esse mesmo trabalho demonstrou que a sinergia entre IFN- γ e TNF- α potencializa esses M ϕ s a reduzir o percentual de infecção por ambas as espécies de *Leishmania* (GOMES *et al.*, 2003)

Adicionalmente, a avaliação de RNAm de TNF- α em M ϕ s peritoneais infectados com La ou Lb mostrou que a expressão do gene dessa citocina aumentou nas primeiras 6 h após a infecção nos M ϕ s infectados com Lb em relação aos grupos controle e La e que nos demais tempos a expressão de TNF- α se mostrou baixa em todos os grupos estudados (Fig. 10).

Os dados apresentados neste trabalho evidenciam, portanto, que a sinergia entre IFN- γ e TNF- α sobre M ϕ s de camundongos BALB/c leva a uma redução no percentual de infecção relacionada com uma diminuição no número de Lb viáveis o que não ocorre na infecção com La. Por outro lado existe uma maior expressão de RNAm de TNF- α em M ϕ s infectados com Lb em relação aos infectados com La. Esses dados apontam para um papel protetor dessa citocina na infecção com Lb.

É amplamente conhecido que durante o processo de fagocitose o fagócito libera NO que age como um potente agente microbicida inibindo o crescimento e a função de diversos patógenos, incluindo *Leishmania*. Diante disso, foi avaliada a produção de NO pelos M ϕ s infectados com La ou Lb, tratados ou não com IFN- γ , no sentido de correlacionar a produção dessa molécula efetora com os diferentes perfis nos percentuais de infecção e viabilidade dos parasitos, anteriormente descritos. Surpreendentemente, não foram observadas diferenças na produção de NO nos grupos de M ϕ s pré-tratados ou não com IFN- γ e infectados com La ou Lb nos tempos estudados. O grau de responsividade desses macrófagos em relação à produção de NO foi evidenciado pelos altos níveis dessa molécula produzidos quando os macrófagos foram pré-tratados com IFN- γ mais TNF- α (Fig. 5).

O fato dos M ϕ s não pré-tratados com IFN- γ e infectados com La ou Lb não apresentarem níveis detectáveis ou apresentarem baixos níveis de produção de NO, sugere que esse mediador pode estar sendo produzido em níveis basais, indetectáveis pelo método de Griess. Portanto, essa possibilidade não excluiria a contribuição do NO nas diferenças observadas na infecção de M ϕ s com La ou Lb. Diante disso, para validar ou descartar a efetiva participação do NO no combate a essas espécies de *Leishmania*,

foi realizado o bloqueio ou indução da produção de NO nos diferentes grupos, utilizando-se AMG e SNAP, respectivamente. Em seguida, foi avaliada a viabilidade dos parasitos La ou Lb isolados dos M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c. O tratamento dos M ϕ s infectados com La com AMG não alterou a quantidade de parasitos viáveis isolados dessas células enquanto que o tratamento com SNAP foi capaz de diminuir em três vezes o número de parasitos viáveis isolados em relação ao grupo que não sofreu tratamento ($P < 0,01$) (Fig. 6 A). Nos M ϕ s infectados com Lb a AMG aumentou o número de parasitos viáveis de forma estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($P < 0,01$), enquanto que o tratamento com SNAP foi altamente eficiente no controle de parasitos viáveis pelos M ϕ s, não sendo possível identificar a presença de parasitos viáveis isolados dessas células no tempo avaliado ($P < 0,001$) (Fig. 6 B). Esses dados estão de acordo com outros estudos que demonstraram que o controle da infecção por La é independente de NO e que essa espécie de *Leishmania* apresenta uma maior resistência aos mecanismos microbicidas desenvolvidos pelo hospedeiro (LONARDONI *et al.* 2000; GOMES *et al.*, 2003). Em contraposição, NO parece ter um papel importante na morte de Lb que apresentou uma maior susceptibilidade a esse agente, proliferando quando o NO foi bloqueado pela AMG ou chegando à completa esterilização desses parasitos no interior dos M ϕ s quando utilizou-se o SNAP como doador de NO (Fig. 6 B). Trabalhos relacionando a resistência ou susceptibilidade de Lb á moléculas microbicidas produzidas pelos M ϕ s são ainda escassos, no entanto, os poucos trabalhos existentes têm mostrado que camundongos C57BL/6 deficientes no gene da iNOS e infectados por Lb exibem um aumento progressivo no tamanho das lesões bem como na carga parasitária (ROCHA

et al., 2007). De maneira concordante com os experimentos de bloqueio *in vitro*, pela primeira vez demonstramos que o bloqueio da produção dessa molécula *in vivo* foi capaz de aumentar a infecção por Lb, mas não alterou a carga parasitária de La nas lesões de orelha e linfonodos de drenagem da lesão. Recentemente, Giudice e colaboradores (2007) estudando diversas cepas de La e Lb isoladas de lesões de pacientes, demonstraram que 14 das 17 cepas de Lb apresentaram maior susceptibilidade ao NO de Mφs humanos, enquanto que nas cepas de La apenas 03 das 11 foram mais susceptíveis.

Os resultados apresentados neste trabalho reforçam o importante papel do NO na infecção de camundongos BALB/c com La e Lb. Os mecanismos dependentes de NO desenvolvidos pelos Mφs de camundongos BALB/c são necessários no combate à infecção com Lb ao passo que na infecção com La esses mecanismos não promovem o controle do parasitismo.

O papel da IL-12 na infecção por *Leishmania* está relacionado à sua função no desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 que permite ao hospedeiro responder de forma efetiva e desenvolver um conjunto de respostas que promovem o controle do parasito. A depender da espécie de *Leishmania* e de fatores expressos pelo parasito (LIEW *et al.*, 1997; PIEDRAFTA *et al.*, 1999), do *background* genético do hospedeiro ou da interação de ambos, a produção de IL-12 pode variar (REINER *et al.*, 1994; CARRERA *et al.*, 1996; BELKAID *et al.*, 1998). Neste modelo de estudo tanto La quanto Lb não foram capazes de induzir produção de IL-12 pelos Mφs nos tempos de 6, 24 e 48 h após a infecção. No entanto, no tempo de 72 h verificou-se uma maior produção de IL-12 nos Mφs infectados por Lb em pelo menos três dos cinco experimentos

realizados, embora essa produção não tenha sido estatisticamente significativa em relação aos grupos controle e La. Nesse tempo, Lb induziu uma produção variável dessa citocina em relação aos grupos controle e La nos diferentes experimentos realizados (Fig. 8). A alta variabilidade na produção de IL-12 no tempo de 72 h no grupo infectado com Lb provavelmente contribuiu para a falta de significância estatística. No entanto, do ponto de vista biológico, essas diferenças poderiam estar relacionadas com o curso da infecção por La e Lb *in vivo*. Embora não tenham sido avaliadas neste estudo, variações na expressão de moléculas dos parasitos a exemplo de LPG ou GIPL, de experimento para experimento, poderiam explicar essas oscilações, já que essas moléculas são capazes de inibir ou alterar a produção de IL-12 e outros fatores produzidos por Mφs (LIEW *et al.*, 1997; PIEDRAFTA *et al.*, 1999). Além disso, diferenças no estágio de maturação dos Mφs também podem influenciar na produção dessa citocina (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A capacidade de algumas leishmanias em inibir ou alterar a produção de IL-12 pode ser um mecanismo importante relacionado com a sobrevivência do parasito no interior de Mφs e manutenção de seu ciclo de vida na natureza (MCDOWELL & SACKS, 1999). Ji e colaboradores (2003) demonstraram que La é capaz de inibir a expressão de RNAm de IL-12 e outras moléculas em células de linfonodo de camundongos C57BL/6 em relação a Lm, e que isso influencia no curso da infecção. Na infecção com Lb, IL-12 também parece ser importante, pois camundongos deficientes para IL-12p35 e IL-12p35p40 tornam-se completamente susceptíveis a infecção por esse parasito (ROCHA *et al.*, 2003).

Os dados aqui apresentados mostram que M ϕ s infectados com Lb produzem IL-12, 72 h após infecção, enquanto células infectadas com La não são capazes de produzir essa citocina. Esses resultados podem ser correlacionados à resposta *in vivo* observada em camundongos infectados com La que desenvolvem uma resposta de susceptibilidade, aumento da carga parasitária e morte, enquanto que na infecção com Lb observa-se uma resposta de resistência, baixo parasitismo e cura da infecção (LEMOS-DE-SOUZA *et al.*, 2000; JI *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2007).

A produção de TGF- β na leishmaniose pode ser crítica, pois essa citocina atua modulando negativamente as funções do macrófago e favorecendo a replicação de parasitos, tendo sido descrita como um mecanismo de virulência para *L. braziliensis* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; BARRAL *et al.*, 1993). Nos M ϕ s de camundongos BALB/c a produção dessa citocina esteve aumentada no grupo infectado com La no tempos de 24 h após infecção em relação aos grupos controle e Lb, nos dois experimentos realizados (Fig. 9). Embora em outros modelos de estudo, utilizando M ϕ s de camundongos CBA infectados com La e Lm, TGF- β tenha sido produzido em níveis similares, não parecendo contribuir com a infecção (GOMES *et al.*, 2003), no nosso modelo o intenso parasitismo nos M ϕ s infectados com La pode estar correlacionado com o aumento dessa citocina nas culturas, observado no tempo de 24 h. Barral-Netto e colaboradores (1992) demonstraram que TGF- β foi capaz de suprimir a resistência à infecção por Lm e que o tratamento de camundongos C57BL/6 com essa citocina, seguido da infecção com La ou Lb, promoveu o aumento das lesões e doença nesses animais. Além disso, o mesmo grupo mostrou que o bloqueio de TGF- β em camundongos BALB/c infectados com La aumenta a resistência desses camundongos

a infecção por esse parasito, evidenciando o importante papel dessa molécula na exacerbação da infecção por *Leishmania*.

IL-10 é uma citocina que pode exercer um duplo papel na leishmaniose, seja exacerbando a infecção no contexto de uma resposta Th2 ou modulando a resposta imune do tipo Th1 como descrito em outros modelos de estudo (LEMOS-DE-SOUZA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003; PADIGEL *et al.*, 2003). Nesse trabalho, a expressão de RNAm de IL-10 em Mφs peritoneais de BALB/c foi avaliada e não apresentou diferenças nos diferentes grupos de Mφs estudados nos tempos de 6h, 48 e 72 h. No entanto, pôde-se observar um aumento na expressão de RNAm para IL-10 no grupo infectado com La no tempo de 24 h em relação aos grupos controle e Lb (Fig. 11). IL-10, assim como IL-4 e TGF-β, tem sido caracterizada como potente inibidor da produção de IFN-γ dependente de IL-12 (SCHARTON & SCOTT, 1995). Entretanto, embora a deficiência de IL-10 seja capaz de tornar camundongos BALB/c resistentes à infecção causada por Lm (KANE & MOSSER, 2001), isoladamente ela não é capaz de promover resistência e cura das lesões causadas por La e *L. mexicana* nesses animais (PADIGEL *et al.*, 2003).

Nossos dados apontam que a expressão aumentada de RNAm de IL-10 juntamente com a maior produção de TGF-β nos Mφs de BALB/c infectados com La, no tempo de 24 h, podem estar relacionadas com uma função inibitória e conseqüente susceptibilidade dessas células à infecção por essa espécie de *Leishmania*.

As quimiocinas e seus receptores também desempenham uma função importante na resposta à infecção por *Leishmania* e têm sido estudados por diversos grupos de pesquisa (STRIETER *et al.*, 1996; RITTER *et al.*, 1996; JI *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2005; VASQUEZ & SOONG, 2006). Neste estudo observou-se que a

maioria das CC quimiocinas apresentou maior expressão no tempo de 6h no grupo infectado com Lb em relação ao grupo controle e La (Fig. 11 e Tab. 2). Dentre estas, podem se destacar CCL3/MIP-1 α e CCL4/MIP-1 β , cuja expressão esteve aumentada no grupo infectado com Lb em relação aos grupos controle e La (Fig. 12 B), e CCL12/MCP-5 que foi inibida nos M ϕ s infectados com La em relação ao grupo Lb (Fig. 12 D), nesse mesmo tempo. Além disso, observou-se ainda uma inibição da expressão de RNAm de CXCL9/MIG nos M ϕ s infectados com La em relação ao grupo Lb no tempo de 24 h (Fig. 13 A). Dados anteriormente descritos mostram que CCL3/MIP-1 α e CCL4/MIP-1 β estão associados com respostas imunes do tipo Th1 (SCHRUM *et al.*, 1996). Os dados apresentados estão de acordo com resultados que mostram uma inibição de CCL4/MIP-1 β e CCL12/MCP-5 em camundongos infectados com La em relação a camundongos infectados com Lm (JI *et al.*, 2003).

Na tentativa de estabelecer uma correlação desses resultados com os perfis dos infiltrados inflamatórios de camundongos infectados por La e Lb descritos em outros modelos de estudo, podemos inferir que as diferenças na expressão de quimiocinas por M ϕ s podem contribuir nos distintos padrões de infiltrados inflamatórios observados nas lesões desses animais. Lesões de camundongos infectados com Lb apresentam um infiltrado inflamatório misto composto por polimorfonucleares e M ϕ s que controlam o parasitismo ao longo da infecção (DE MOURA *et al.*, 2005). Lesões de camundongos de diferentes linhagens infectados com La apresentam infiltrado rico em M ϕ s com vacúolos grandes e densamente parasitados, escassez de linfócitos, necrose e ulceração progressiva (ANDRADE *et al.*, 1984; LEMOS-DE-SOUZA *et al.*, 2000). Com base nos resultados apresentados nesse trabalho, sugerimos que M ϕ s infectados com

Lb apresentam maior produção de citocinas, como TNF- α , IL-12 e quimiocinas, e maior potencial de ativação, colaborando com a constituição de um infiltrado inflamatório e microambiente que favorece a resistência à infecção. Por outro lado, M ϕ s infectados com La apresentam maior produção de citocinas que inibem a ativação dessas células e a produção de quimiocinas, a exemplo de IL-10 e TGF- β , favorecendo um perfil de infiltrado inflamatório cujo microambiente proporciona uma maior susceptibilidade à infecção. Diversos trabalhos evidenciam a correlação desses infiltrados com a expressão de diferentes citocinas e quimiocinas e com resistência ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania* (RITTER *et al.*, 1996; JI *et al.*, 2003; MOURA *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Com relação à expressão de receptores ressalta-se a inibição da expressão de RNAm de CCR3 no tempo de 48h nos M ϕ s infectados com La em relação aos grupos controle e Lb (Fig. 14A). Por outro lado, CCR7, receptor para as quimiocinas CCL20/MIP-3 β e CCL21/6Ckine, teve o seu maior pico no período de 6h principalmente no grupo infectado com Lb em relação aos grupos controle e La (Fig. 14D). A expressão aumentada de RNAm de CCR3 tem sido descrita na infecção de camundongos BALB/c com uma cepa virulenta de Lb (TEIXEIRA *et al.*, 2005), por outro lado até o momento não havia sido mostrada nenhuma relação entre a expressão de CCR7 e infecção por *Leishmania*.

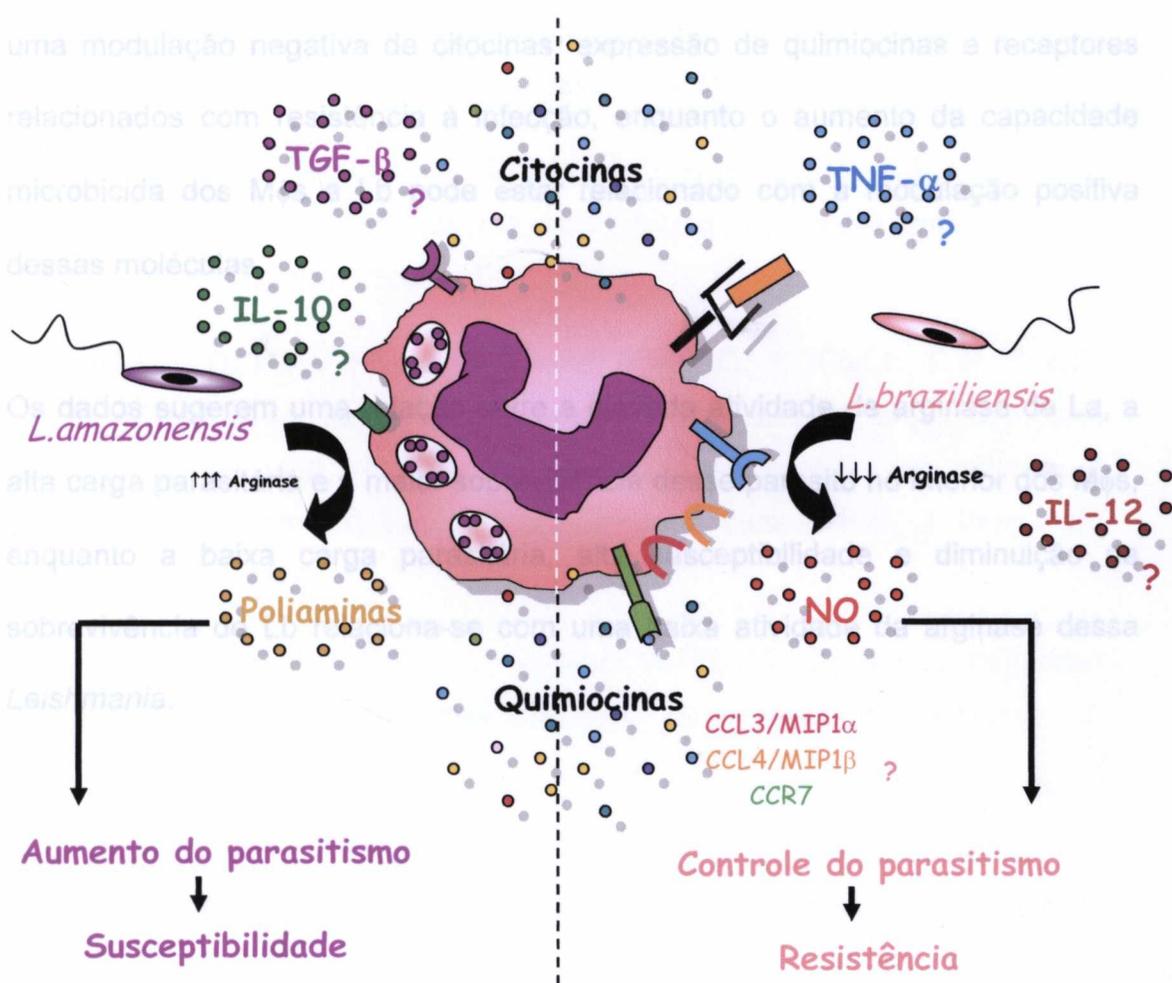
Em síntese, a maior expressão de quimiocinas e receptores nos M ϕ s infectados com Lb em relação aos infectados com La podem ser correlacionadas com as diferenças no grau de ativação dessas células e conseqüentemente com a respectiva resposta de resistência ou susceptibilidade observada nesse estudo.

Em função das diferenças na resposta de M ϕ s peritoneais de camundongos BALB/c à infecção com La ou Lb, foi investigada a atividade da arginase desses parasitos. Formas promastigotas de La apresentaram uma elevada atividade de arginase que foi aproximadamente de 50 a 100 vezes maior que nos promastigotas de Lb. Kropf e colaboradores (2003) demonstraram a relação entre atividade da arginase de parasitos de *Leishmania* e virulência. Essa enzima é usada pelo parasito para produzir poliaminas que são necessárias para a sua replicação no interior de M ϕ s (CAMARGO *et al.*, 1978). Recentemente, Gaur e colaboradores (2007) demonstraram que a arginase de *L. mexicana* subverte a atividade microbicida de macrófagos alterando a mobilização de substrato da iNOS para a síntese de poliaminas e conseqüente sobrevivência do parasito. Além disso, esses autores mostraram que a infecção com parasitos deficientes em arginase induz um aumento na síntese de IFN- γ e diminuição de IL-4 e IL-10 por células do linfonodo desses animais, além de uma maior produção de NO por macrófagos, resultando numa atenuação da infecção. Dados preliminares do nosso laboratório demonstram ainda que cepas distintas de *L. amazonensis*, isoladas de pacientes com diferentes formas clínicas de leishmaniose, apresentam uma atividade de arginase proporcional ao potencial dessas cepas em causar lesões em camundongos CBA (manuscrito em preparação).

No modelo de estudo aqui apresentado existe uma correlação entre a alta atividade de arginase em La com a maior carga parasitária e maior sobrevivência desse parasito no interior dos M ϕ s. Por outro lado, a menor atividade dessa enzima em Lb pode estar relacionada com a baixa carga parasitária, alta susceptibilidade e uma

conseqüente diminuição na sobrevivência dessa espécie de *Leishmania* aos mecanismos microbicidas dos Mφs.

Coletivamente os resultados sugerem que fatores relacionados com a espécie de *Leishmania* podem influenciar o tipo de resposta do hospedeiro mediante alterações no perfil de citocinas, quimiocinas e seus receptores e produção de NO que podem ser determinantes no curso da infecção como apresentado na figura 16.



MWelby
2008

Figura 16: Síntese da resposta de macrófagos peritoneais de BALB/c à infecção com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.

7.0 CONCLUSÕES

- ✓ Mφs peritoneais de camundongos BALB/c apresentam uma alta susceptibilidade à infecção com La, que prolifera intensamente no interior destas células, e são capazes de destruir Lb por um mecanismo dependente de NO.
- ✓ A diminuição na capacidade microbicida dos Mφs pode estar relacionada com uma modulação negativa de citocinas, expressão de quimiocinas e receptores relacionados com resistência à infecção, enquanto o aumento da capacidade microbicida dos Mφs a Lb pode estar relacionado com a modulação positiva dessas moléculas.
- ✓ Os dados sugerem uma relação entre a elevada atividade de arginase de La, a alta carga parasitária e a maior sobrevivência desse parasito no interior dos Mφs, enquanto a baixa carga parasitária, alta susceptibilidade e diminuição na sobrevivência de Lb relaciona-se com uma baixa atividade da arginase dessa *Leishmania*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGOSTINI, C.; CASSATELLA, M.; ZAMBELLO, R.; TRENTIN, L.; GASPERINI, S.; OERIN, A.; PIAZZA, F.; SIVIERO, M.; FACCO, M.; DZIEJMAN, M.; CHILOSI, M. QIN, S.; LUSTER, A.D.; SEMENZZATO, G. Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. **J. Immunol.**, **161**:6413-20, 1998.
2. ALEXANDER, J. & BLACKWELL, J.M. The immunological significance of genetically determinant cross reactivity between taxonomically distinct *Leishmania* species. IMEEE, Montpellier, 1986, p.185-91.
3. ALIBERTI, J. C.; TALVANI, A.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokine gene expression in *Trypanosoma cruzi* infected mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92**: 59-60, 1997. Suppl. 1.
4. AMICHAY, D.; GAZZINELLI, R. T.; KARUPIAH, G.; MOENCH, T. R.; SHER, A.; FARBER, J.M. Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles *in vivo*. **J. Immunol.**, **157**: 4511-20, 1996.
5. ANDERSON, S; DAVID, J. R.; McMAHON-PRATT, D. *In vivo* protection against *Leishmania mexicana* mediated by monoclonal antibodies. **J. Immunol.**, **131**: 1615-1618, 1983.
6. ANDRADE, Z.A.; REED, S. G.; ROTERS, S. B.; SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, **114**: 137-48, 1984.
7. ARNOLDI, J. & MOLL, H. Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: Regulation by Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β , and Macrophage Inflammatory Protein-1 α . **Dev. Immunol.**, **6**:3-11, 1998.

8. ASHFORD, R. W. & BETTINI, S. Ecology and Epidemiology: Old World. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.) **The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Vol. I, Biology and Epidemiology**. 1a. ed., London: Academic Press, 1987, pags. 366-414.
9. ASSREUY, J.; CUNHA, F. Q.; EPPERLEIN, M.; NORONHA-DUTRA, A.; O'DONNELL, C. A.; LIEW, F. Y.; MONCADA, S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. **Eur. J. Immunol.**, **24** (3): 672-76, 1994.
10. BADOLATO, R.; SACKS, D. L.; SAVOIA, D.; MUSSO, T. *Leishmania major*. Infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. **Exp. Parasitol.**, **82**: 21-26, 1996.
11. BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines - CXC and CC chemokines. **Adv. Immunol.**, **55**: 97-179, 1994.
12. BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E. C.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **90**: 3442-46, 1993.
13. BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, R. G.; MOMEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON JUNIOR, W.D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **44**: 536-46, 1991.
14. 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**, **257** (5069): 545-48, 1992.

15. BARRAL-NETTO, M.; FREITAS, L.A.R; ANDRADE, Z.A. Histopathologic changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of BALB/c mice. **Am. J. Pathol.**, **127**: 271-78, 1987b.
16. BEHIN, R.; MAUEL, J.; SORDAT, B. *Leishmania tropica*: pathogenicity and *in vitro* macrophage function in strains of inbred mice. **Exp. Parasitol.**, **48**: 81-91, 1979.
17. 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.**, **188** (10): 1941-53, 1998.
18. BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D.S.; MEIDE, P.H. van der; SLAYTER, M.V.; NACY, C. A. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies *in vivo* abrogates resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, **143**: 266-74, 1989.
19. BERREDO-PINHO, M.; PERES-SAMPAIO, C. E.; CHRISPIM, P. P.; BELMONT-FIRPO, R.; LEMOS, A. P.; MARTINY, A.; VANNIER-SANTOS, M. A.; MEYER-FERNANDES, J. R. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. **Arch. Biochem. Biophys.**, **391**(1): 16-24, 2001.
20. BEVERLEY, S. M. & TURCO, S.J. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. **Trends Microbiol.**, **6**: 35-40, 1998.
21. BITTENCOURT, A.L. & BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: DOERR,

- W. & SEIFERT, G. (eds.) *Tropical Pathology*. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.597-651.
22. BLISS, S. K.; MARSHALL A. J. ; ZHANG, Y.; DENKERS, E. Y. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF- α , and the chemokines Macrophage-Inflammatory Protein-1 α and -1 β in response to *Toxoplasma gondii* antigens. **J. Immunol.**, **162**: 7369-75, 1999.
23. BOGDAN, C.; MOLL, H.; SOLBACH, W.; RÖLLINGHOFF, M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **Eur. J. Immunol.**, **20**:1131-35, 1990.
24. BOGDAN, C.; STENGER, S.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. Interleukin 4 synergizes with interferon- γ to activate murine macrophages for killing of *Leishmania major* amastigotes. **Eur. J. Immunol.**, **21**: 327-333, 1991.
25. BOKOCH, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation . **Blood**, **86**: 1649-60, 1995.
26. BONECCHI, R.; BIANCHI, G.; BORDIGNON, P. P.; DÁMBROSIO, D.; LANG, R. BORSATTI, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; GRAY, P. A.; MANTOVANI, A.; SINIGAGLIA, F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. **J. Exp. Med.**, **187**:129-34, 1998.
27. BOTTOMLY, K. A functional dichotomy in CD4+ T lymphocytes. **Immunol. Today**, **9**(9): 268-74, 1988.
28. BOZIC, C. R.; KOLAKOWSKI, L.F. JR; GERARD, N.P.; GARCIA-RODRIGUEZ, C.; VON UEXKULL-GULDENBAND C; CONKLYN, M.J.; BRESLOW, R.; SHOWELL, H.J.; GERARD, C. Expression and biologic

characterization of the murine chemokine KC. **J. Immunol.**, **154**: 6048-57, 1995.

29. BRADLEY, D.J. & KIRKLEY, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. **Clin. Immunol.**, **30**: 119-29, 1977.
30. BRANDONISIO, O.; PANARO, M. A.; MARZIO, R.; MARANGI, A. FALIERO, S. M.; JIRILLO, E. Impairment of the human phagocyte oxidative response caused by *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG): *in vitro* studies. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, **8**: 57, 1994.
31. BRASIL. *Controle, Diagnóstico e Tratamento de Leishmaniose Visceral (Calazar). Normas Técnicas*. Brasília: Ministério da Saúde/Fundação Nacional da Saúde, 1996. 86 p.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Boletim Epidemiológico / FUNASA / Leishmaniose Tegumentar Americana – Ed. especial – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 1999. p. 15.**
33. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007. 182 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)**
34. BRITTINGHAM, A ; MORRISSON, C. J.; MCMASTER, W. R.; MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; MOSSER, D. M. Role of the *Leishmania* surface

- protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J. Immunol.**, **155**:3102-11, 1995.
35. CALABRESE, K.S. & COSTA, S.C.G. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **87**: 49-56, 1992. Suppl.I.
36. CAMARGO, P. E.; COELHO, J. A.; MORAES, G.; FIGUEIREDO, E. N. Trypanosoma spp., Leishmania spp. And Leptomonas spp.: Enzymes of ornithine-arginine metabolism. **Exp. Parasitol.** **46**, 141-144, 1978.
37. CARRERA, L.; GAZZINELLI, R. T.; BADOLATO, R.; HIENY, S.; MULLER, W.; KUHN, R.; SACKS, D. L. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **J. Exp. Med.**, **183** (2): 515-26, 1996.
38. CARVALHO E.M.; JOHNSON, W.D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P.D.; COSTA J.L.M.; REED, S.G.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J. Immunol.**, **135**: 4144-48, 1985.
39. CASTES, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O.; RONDÓN J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **27**: 176-86, 1983.
40. CHAMPSI, J.& McMAHON, P.D. Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. **Infect. Immunol.**, **52**: 3272-79, 1988.
41. CHANNON, J. Y.; ROBERTS, M. B.; BLACKWELL, J. M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**, **53**(2): 345-55, 1984.

42. CHATELAIN, R.; MAUZE, S.; COFFMAN, R. L. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. **Parasite Immunol.**, **21** (4): 211-18, 1999.
43. CHENSUE, S. W.; WARMINGTON, K. S.; ALLENSPACH, E. J.; LU, B.; GERARD, C.; KUNKEL, S.; LUKACS, N. W. Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. **J. Immunol.**, **163**: 165-73, 1999.
44. CHILDS, G. E.; LIGHTNER, L. K.; MCKINNEY, L.; GROVES, M. G.; PRICE, E. E.; HENDRICKS, L. D. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **78**(1): 25-34, 1984.
45. CHOE, H.; FARZAN, M.; SUN, Y.; SULLIVAN, N.; ROLLINS, B.; PONATH, P. D.; WU, L. MACKAY, C. R.; LaROSA, G. NEWMAN, W.; GERARD, N.; GERARD, C.; SODROSKI, J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. **Cell**, **85**:1135-448, 1996.
46. CILLARI, E.; DIELI, M.; MALTESE, E.; MILANO, S.; SALERNO, A.; LIEW, F. Y. Enhancement of macrophage IL-1 production by *Leishmania major* infection in vitro and its inhibition by IFN-gamma. **J. Immunol.**, **143** (6): 2001-05, 1989.
47. CLARCK-LEWIS, I.; SCHUMACHER, BAGGIOLI, M.; MOSER, B. Structure-activity relationships of interleukine-8 determined using chemically synthesized analogs: critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. **J. Biol. Chem.**, **266**: 23128-34, 1991.
48. COCCHI, F.; DeVICO, A. L.; GARZINO, D. A.; ARYA, S. K.; GALLO, R. C.; LUSSO, P. Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β as the major HIV-

- suppressive factors produced by CD8+ T cells. **Science**, **270**: 1811-15, 1995.
49. CORRALIZA, I. M.; CAMPO, M. L.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **J Immunol. Methods**, **174** (1-2): 231-35, 1994.
50. CORRALIZA, I. M.; SOLER, G.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **206** (2): 667-73, 1995.
51. COTTERELL, S. E. J.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. **Eur. J. Immunol.**, **29**: 203-14, 1999.
52. COURRET, N.; FREHEL, C.; PRINA, E.; LANG, T.; ANTOINE, J. C. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. **Parasitology**, **122**: 263-79, 2001.
53. COUTINHO, S. G.; PIRMEZ, C.; MENDONÇA, S. C. F.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; DÓREA, R. C. C. Pathogenesis and immunopathology of *Leishmania*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82**: 214-18, 1987. Suppl. 1.
54. CUNHA, F. Q.; WEISER, W. Y.; DAVID, J. R.; MOSS, D. W.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Recombinant migration inhibitory factor induces nitric oxide synthase in murine macrophages. **J. Immunol.**, **150**:1908-12, 1993.
55. CZERMAK, B. J.; SARMA, V.; BLESS, N. M.; SCHMAL, H.; FRIEDL, H. P.; WARD, P. A. *In vitro* and *in vivo* dependency of chemokine generation on C5a and TNF- α . **J. Immunol.**, **162**: 2321-25, 1999.

56. DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.**, **66**(2): 827-9, 1998.
57. DESCOTEAUX, A.; MATLASHEWSKI, G.; TURCO, S. J. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **J. Immunol.**, **149**: 3008-15, 1992.
58. DEVERGNE, O.; MARFAING-KOKA, A.; SCHALL, T. J.; LEGER-RAVET, M. B.; SADICK, M.; PEUCHMAUR, M.; CREVON, M. C.; KIM, K. J. Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells. **J. Exp. Med.**, **179**: 1689-94, 1994.
59. DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; DONHAUSER, N.; LORENZ, E.; LASKAY, T.; MACMICKING, J.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSER, I.; BOGDAN, C. Type 1 interferon (IFN α / β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. **Immunity**, **8** (1): 77-87, 1998.
60. DINAUER, M. C. The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, **30** (4): 329-69, 1993.
61. DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, **141** (7): 2407-12, 1988.
62. FALCOFF, R.; BARRAL-NETTO, M.; STIFFEL, C.; BOUTHILLIER, Y.; BARRAL, A.; FREITAS, L. A.R.; MEVEL, J.C.; MOUTON, D. Variations in susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection in lines of mice selected for high or low immunoresponsiveness. **Parasite Immunol.**, **13**: 639-47, 1991.

63. FARBER, J. M. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. **J. Leukoc. Biol.**, **61**: 246-57, 1997.
64. FIORENTINO, D. F.; ZLOTINIK, A.; VIEIRA, P.; MOSSMANN, T. R. HOWARD, M.; MOORE, K. W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, **146**: 3444-51, 1991.
65. FRANKENBURG, S.; LEIBOVICI, V.; MANSBACH, N. TURCO, S. J.; ROSEN, G. Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. **J. Immunol.**, **145**: 4284-89, 1990.
66. GAUR, U.; ROBERTS, S. C.; DALVI, R. P.; CORRALIZA, I.; ULLMAN, B.; WILSON, M. E. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, **179** (12): 8446-53, 2007.
67. GAZZINELLI, R. T.; TALVANI, A.; CAMARGO, M. M.; SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, M. A. P.; VIEIRA, L.Q.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C. S.; SILVA, J. S. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. **Braz. J. Med. Res.**, **31**: 89-104, 1998.
68. GERARD, C. & GERARD, N. P. The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte. **Curr. Opin. Immunol.**, **6**:865-873, 1994.
69. GHALIB, H. W.; ELTOUM, E. A.; KROON, C. C. M.; EL HASSAN, A. M. Identification of *Leishmania* from mucosal leishmaniasis by recombinant DNA probes. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **86**:158-160, 1992.
70. GILLITZER, R.; WOLFF, K.; TONG, D.; MULLER, C.; YOSHIMURA, T.; HARTMANN, A. A.; STINGL, G.; BERGER, R. MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions . **J. Invest. Dermatol.**, **101**:127-31, 1993.

71. GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P. T.; PEREIRA, J. M.; RILEY, L. W.; WILSON, M. E.; HO, J. L.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infect. Dis.**, **7** (7): 7 2007.
72. GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol.**, **145**: 4290-97, 1990.
73. GRIMALDI, G. J. Leishmanioses Tegumentares: Aspectos clínicos e imunopatológicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **77**: 195-215, 1982.
74. GRIMALDI, G.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **41**: 88-400, 1989.
75. GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F.; TAVARES R. D. A., 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.**, **5**: 251-260, 2003.
76. GOMES, N. A.; BARRETO-DE-SOUZA, V.; DOSREIS, G. A. Early in vitro priming of distinct T(h) cell subsets determines polarized growth of visceralizing *Leishmania* in macrophages. **Int. Immunol.**, **12** (9): 1227-33, 2000.
77. GUIMARAES, E.T.; SANTOS, L.A.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; TEIXEIRA, M.M.; DOS SANTOS, W. L.; SOARES, M. B. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c

mice. **Microbes Infect.**, **8**(5): 1219-26, 2006.

78. HAIDARIS, C. G.; BONVENTRE, P. F. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania donovani* tissue forms by activated macrophages. **J. Immunol.**, **129** (2): 850-55, 1982.
79. HANDMAN, E.; CEREDIG, R.; MITCHELL, G. F. Murine cutaneous leishmaniasis: disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, **57**, (1): 9-29, 1979.
80. HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY B. J; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon-g or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, **169**: 59-72, 1989.
81. 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.**, **88**: 7011-15, 1991.
82. 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.**, **177**:1505-1509, 1993.
83. HOGABOAN, C. M.; BONE-LARSON, C. L.; LIPINSKI, S.; LUKACS, N. W.; CHENSUE, S. W.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Differential monocyte chemoattractant protein-1 and chemokine receptor 2 expression by murine lung fibroblasts derived from Th1- and Th2-type pulmonary granuloma models. **J. Immunol.**, **163**: 2193-2201, 1999.
84. HORUK, R.; CHITNIS, CE; DARBONNE, W. C.; COLBY, T. J.; RYBICKI, A.; HADLEY, T. J.; MILLER, L. H. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor . **Science**, **261**: 1182-

4, 1993.

85. HOWARD, J. G.; HALE, C.; LIEW, F.Y. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. IV. Prophylactic effect of sublethal irradiation as a result of abrogation of suppressor T cell generation in mice genetically susceptible to *Leishmania tropica*. **J. Exp. Med.**, **153**: 557-68, 1981.
86. HOWARD, J. G., HALE, C., & CHAN-LIEW, W. L. Immunological regulation of experimental cutaneous *Leishmaniasis*. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunology**, **2**(4), 303-14, 1980.
87. HOWARD, J. G.; HALE, C.; LIEW, F.Y. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. IV. Prophylactic effect of specific suppression of cell-mediated immunity. **J. Exp. Med.**, **152**: 594-607, 1980.
88. HOWARD, J. G.; LIEW, F.Y.; HALE, C.; NICKLIN, S. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. II. Further characterization of the protective immunity against fatal *L. tropica* infection induced by irradiated promastigotes. **J. Immunol.**, **132**: 450-55, 1984.
89. INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N (omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. **J. Exp. Med.**, **193** (6): 777-84, 2001.
90. INIESTA V, GÓMEZ-NIETO LC, MOLANO I, MOHEDANO A, CARCELÉN J, MIRÓN C, ALONSO C, CORRALIZA I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite Immunol.** **24**(3):113-18, 2002
91. JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, **59** (4): 533-47, 1995.

92. JIA, G.Q.; GONZALO, J. A.; LLOYD, C.; KREMER, L.; LU, L.; MARTINEZ-A, C.; WERSHIL, B. K.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C. Distinct Expression and function of the novel mouse chemokine monocyte chemoattractant protein-5 in lung allergic inflammation. **J. Exp. Med.**, **184**: 1939-51, 1996.
93. JUTTNER, S.; BERNHAGEN, J.; METZ, C. N.; ROLLINGHOFF, M.; BUCALA, R.; GESSNER, A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. **J. Immunol.**, **161** (5): 2383-90, 1998.
94. KAMIJO, R.; SHAPIRO, D.; GERECITANO, J.; LE, J.; BOSLAND, M.; VILCEK, J. Biological functions of IFN-gamma and IFN-alpha/beta: lessons from studies in gene knockout mice. **Hokkaido Igaku Zasshi**, **69** (6): 1332-38, 1994.
95. KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J. Immunol.**, **166** (2): 1141-7, 2001.
96. KELLEHER, M.; MOODY, S. F.; MIRABILE, P. OSBORN, A. H.; BACIC, A.; HANDMAN, E. Lipophosphoglycan blocks attachment of *Leishmania major* amastigotes to macrophages. **Infect. Immun.**, **63**: 43-50, 1995.
97. KROPF, P.; FUENTES, J. M.; FAHRNICH, E.; ARPA, L.; HERATH, S.; WEBER, V.; SOLER, G.; CELADA, A.; MODOLELL, M.; MULLER, I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **Faseb J.**, **19**(8): 1000-2, 2005.
98. KROPF, P.; HERATH, V.; WEBER, M.; MODOLELL, M.; MULLER, I. factors influencing *Leishmania major* infection in IL-4-deficient BALB/c mice. **Paras. Immun.**, **25**: 439-47, 2003.

99. LAMONT, A. G. & ADORINI, L. IL-12: a key cytokine in immune regulation. **Immunol. Today.**, **17**: 214-17, 1996.
100. LEMOS DE SOUZA, V.; ASCENCAO SOUZA, J.; CORREIA SILVA, T. M.; SAMPAIO TAVARES VERAS, P.; RODRIGUES DE-FREITAS, L. A. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes Infect.**, **2**: 1807-15, 2000.
101. LIEW, F.Y. Cell-mediated immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitol. Tod**, **2**: 264-70, 1986.
102. LIEW, F.Y.; Li, Y.; MILLOT, S. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.**, **145**: 4306-4310, 1990a.
103. LIEW, F. Y.; LI, Y.; MOSS, D.; PARKINSON, C.; ROGERS, M. V.; MONCADA, S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Eur. J. Immunol.**, **21** (12): 3009-14, 1991.
104. LIEW, F.Y.; MILLOT, S.; Li, Y.; LELCHUCK, R.; CHAN, W. L.; ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon gamma from host-protective T-cells is inhibited by interleukin IL-3 and IL-4 produced by disease promoting T-cells in leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, **19**: 1227-32, 1989.
105. LIEW, F.Y. and O'DONNELL, C.A. Immunology of Leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, **32**: 161-59, 1993.
106. LIEW, F.Y.; PARKINSON,C.; MILLOT, S.; SEVERN, A.; CARRIER, M. J.

- Tumor necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. I. TNF- α mediates host-protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, **69**: 570-73, 1990b.
107. LIEW, F. Y.; WEI, X. Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, **352** (1359): 1311-15, 1997.
108. LO, S. K.; BOVIS, L.; MATURA, R.; ZHU, B.; HE, S.; LUM, H.; TURCO, S. J.; HO, J. L. *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: Modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. **J. Immunol.**, **160**: 1857-65, 1998.
109. LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; GARDNER, K. D.; Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T cells subsets. **Ann. Inst. Pasteur/Immunol.**, **138**: 744-749, 1987.
110. LOETSCHER, M.; GERBER, B.; LOETSCHER, P. Chemokine receptor specific for IP-10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. **J. Exp. Med.**, **184**: 1101-59, 1996.
111. LONARDONI, M. V.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. **Infect. Immun.**, **68** (11): 6355-61, 2000.
112. LUKACS, N. W.; KUNGEL, S. L.; STRITER, R. M.; WARMINGTON, K.; CHENSUE, S. W. The role of macrophage inflammatory protein 1 α in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. **J. Exp. Med.**, **177**: 1551-9, 1993.
113. LUSTER, A. D. Chemokines: Chemotactic cytokines that mediate the inflammation. **N. Engl. J. Med.**, **12**:436-45, 1998.

114. MCDOWELL, M. A.; SACKS, D. L. Inhibition of host cell signal transduction by *Leishmania*: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. **Curr. Opin. Microbiol.**, 2 (4): 438-43, 1999.
115. 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.**, 94 (3): 207-12, 2004.
116. MARSDEN, P. D.; TADA, M. S.; BARRETO, A. C.; CUBA, C. C. Mucosal leishmaniasis. **Trans, R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 80 (4):859-75, 1986.
117. MARSDEN, P. D.; TADA, M. S.; BARRETO, A. C.; CUBA, C. C. Spontaneous healing of *Leishmania brazillensis braziliensis* skin ulcers. **Trans, R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 78 (4):561-2, 1984.
118. MAUEL, J. & BEHIN, R. Immunology of Leishmaniasis. (eds.). In: LEVANDOWSKY, M. & HUTNER, S.H. *Biochemistry and physiology of protozoa*. 2.ed. New York: Academic Press,1981. v.4. p. 385-429.
119. MAUEL, J.; BUCHMULLER-ROUILLER, Y. Effect of lipopolysaccharide on intracellular killing of *Leishmania enriettii* and correlation with macrophage oxidative metabolism. **Eur. J. Immunol.**, 17 (2): 203-8, 1987.
120. MAUEL, J.; CORRADIN, S. B.; BUCHMULLER ROUILLER, Y. Nitrogen and oxygen metabolites and the killing of *Leishmania* by activated murine macrophages. **Res. Immunol.**, 142 (7): 577-80, 1991.
121. McSORLEY, S.; PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, C.A.; LIEW, F.-Y. Immunology of Murine Leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, 14: 451-64, 1996.
122. MERCHÁN-HAMANN, E. Diagnóstico macroregional das situações das endemias das regiões Norte e Nordeste. **Inf. Epidemiol. SUS**, 6: 43-114, 1997.

123. MILLER, M. A.; MCGOWAN, S. E.; GANTT, K. R.; CHAMPION, M.; NOVICK, S. L.; ANDERSEN, K. A.; BACCHI, C. J.; YARLETT, N.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. **J. Biol. Chem.**, **275** (43): 33883-89, 2000.
124. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde (MS/SVS).
< disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22151 >.
Acesso em nov, 2007.
125. MITCHELL, G.F.; CURTES, J.M.; HADMAN, E. Cutaneous leishmaniasis in mice: Disease patterns in reconstituted nude mice of several genotypes infected with *Leishmania tropica*. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, **58**: 521-32, 1980.
126. MODOLELL, M.; CORRALIZA, I. M.; LINK, F.; SOLER, G.; EICHMANN, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. **Eur J Immunol.**, **25** (4): 1101-04, 1995.
127. MOSSER, D.M. & ROSSENTHAL, L.A. Divergent strategies used by the promastigote and amastigote forms of *Leishmania* to invade mammalian cells. 1994 Baillière's. **Clin. Infect. Dis.**, **1**: 191-212, 1994.
128. MOSSMANN, T.R., & COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol.**, **7**:145-73, 1989.
129. 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.**, **73**(9): 5827-34, 2005.

130. MURRAY, H. W. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **J. Immunol.**, **129** (1): 351-7, 1982.
131. MURRAY, H. W.; CARTELLI, D. M. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. **J. Clin. Invest.**, **72** (1): 32-44, 1983.
132. MURRAY, H. W.; MOREIRA, A. L.; LU, C.M.; DEVECCHIO, J. L.; MATSUHASHI, M.; MA, X.; HEINZEL, F. P. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **188**(3): 458-64, 2003.
133. MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **J. Exp. Med.**, **189**(4):741-46, 1999.
134. MÜLLER, I.; FREITH, U.; LOUIS, J.A. Immunobiology of experimental leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, **181**: 1-12 1992.
135. MÜLLER, I.; PEDRAZZINI, T.; FARREL, J. P.; LOUIS, J.A. T-cell response and immunity to experimental infection with *Leishmania major*. **Annu. Rev. Immunol.**, **7**: 561-578, 1989.
136. MURPHY, M. L.; COTTERELL, S. E. J.; GORAK, P. M. A.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, *Leishmania donovani*. **J. Immunol.**, **161**: 4153-60, 1998.
137. MURPHY, P. M.; The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, **12**: 593-633, 1994.
138. 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.**, **142**: 573-576, 1991.
139. NACY, C. A.; JAMES, S. L.; BENJAMIN, W. R.; FARRAR, J. J.; HOCKMEYER, W. T.; MELTZER, M. S. Activation of macrophages for microbicidal and tumoricidal effector functions by soluble factors from EL-4, a continuous T cell line. **Infect. Immun.**, **40** (2): 820-4, 1983.
140. NATHAN, C.; MURRAY, H. W.; WIBE, M. E.; RUBIN, B. Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, **158**:670-89, 1983.
141. 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**, **87** (Pt 1): 7-13, 1983.
142. NELSON, B. J.; RALPH, P.; GREEN, S. J.; NACY, C. A. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor-beta 1. **J. Immunol.**, **146** (6): 1849-57, 1991.
143. NEOTE, K.; DARBONNE, W.; OGEZ, J.; HORUK, R.; SCHALL, T. J.; Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. **J. Biol. Chem.**, **268**:12247-49, 1993.
144. OBERLIN, E.; AMARA, A.; BACHELERIE, F.; BESSICA, C.; VIRELIZIER, J. L.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; SCHWARTZ, O.; HEARD, J. M.; CLARCK-LEWIS, I.; LEGLER, D. F.; LOETSHER, M.; MOSER, B. The chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line adapted-HIV-1. **Nature**, **382**:833-35, 1996.
145. 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.**, **7** (2): 213-23, 2005.
146. 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.**, **171** (7): 3705-10, 2003.
147. PEARSON, R. D.; HARCUS, J. L.; ROBERTS, D.; DONOWITZ, G. R. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. **J. Immunol.**, **131** (4): 1994-99, 1983.
148. PEREZ, H.; ARREDONDO, B.; GONZALEZ, M. Comparative study of American cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis in two strains of inbred mice. **Infect. Immun.** **22**:301-07, 1978.
149. PIEDRAFITA, D.; PROUDFOOT, L.; NIKOLAEV, A. V.; XU, D.; SANDS, W.; FENG, G. J.; THOMAS, E.; BREWER, J.; FERGUSON, M. A.; ALEXANDER, J.; LIEW, F. Y. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans. **Eur. J. Immunol.**, **29** (1): 235-44, 1999.
- PREMACK, B. A. & SCHALL, T. J. Chemokine receptor: Gateways to Inflammation and infection. **Nature Med.**, **2**: 1174-1178, 1996.
150. RACOOSIN, E. & BEVERLEY, S.M. *Leishmania major*. Promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. **Exp. Parasitol.**, **85**: 283-95, 1997.
151. RANSOHOFF, R. M.; TANI, M.; GLABINSKI, A. R.; CHERNOSKY, A.; KRIVACIC, K.; PETERSON, J. W.; CHIEN, H.; TRAPP, B. D. Chemokines and chemokine receptors in model neurological pathologies: Molecular and Immunocytochemical approaches. **Methods Enz.**, **287**:319-48, 1997.
152. RAPORT, C. SCHWEICKART, V. L.; CHANTRY, D.; J-EDDY, R. L.; SHOWS, T. B.; GODISKA, R. GRAY, P. New members of the chemokine receptor gene family. **J. Leukoc. Biol.**, **59**:18-23, 1996.

153. REINER, S. L.; ZHENG, S.; WANG, Z. E.; STOWRING, L.; LOCKSLEY, R. M. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4⁺ T cells during initiation of infection. **J. Exp. Med.**, **179** (2): 447-56, 1994.
154. REIS, M. G.; ROTERS, B.; BARRAL-NETTO, M. Immune serum from both susceptible and resistant strains of mice increases phagocytosis of *Leishmania mexicana amazonensis* by macrophages. **Acta Tropica**, **44**: 339-42, 1987.
155. RITTER U.; MOLL, H.; LASKAY, T.; BRÖCKER, E. B.; VELAZCO, O.; BECKER, I.; GILLITZER, R. Differential expression of chemokines in patients localized and diffuse cutaneous american leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **173**: 699-09, 1996.
156. ROBERTS, S. C.; TANCER, M. J.; POLINSKY, M. R.; GIBSON, K. M.; HEBY, O.; ULLMAN, B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. **J. Biol. Chem.**, **279**(22): 23668-78, 2004.
157. ROCHA, F. J. S.; SCHLEICHER, U.; MATTNER, J.; GOTTFRIED, A.; BOGDAN, C. Cytokines, Signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (viannia) braziliensis* in mice. **Infect. Immun.**, **75** (8): 3823-32, 2007.
158. ROLLINS, B. Chemokines. **Blood**, **90**: 909-28, 1997.
159. SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.**, **2** (11): 845-58, 2002.
160. SADICK, M.D.; HEINZEL, F.; HOLADAY, B.J.; PU, R.T.; DAWKINS, R.S.; LOCKSLEY, R.M. Cure of murine leishmaniasis with a anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-

- independent mechanism. **J. Exp. Med.**, **171**: 115-27, 1990.
161. SAEFTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.**, **69**(4):2252-9, 2001.
162. SALLUSTO, F.; MACKAY, C. R.; LANZAVECCHIA, A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. **Science**, **277**: 2005-7, 1997.
163. 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.**, **173**(1): 49-54, 1991.
164. SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, C. F.; SANTIAGO, L.; FERRAZ, F. O.; DE SOUZA, D. G.; DE-FREITAS, L. A.; AFONSO, L. C.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q. Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, **72** (8): 4918-23, 2004.
165. SARAFI, M. N.; GARCIA-ZEPEDA, E. A.; MACLEAN, J. A.; CHARO, I. F.; LUSTER, A. D. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. **J. Exp. Med.**, **185**:99-109, 1997.
166. SATO, N.; AHUJA, S. K.; QUINONES, M.; KOSTECKI, V.; REDDICK, R. L.; MELBY, P. C.; KUZIEL, W. A.; AHUJA, S. S. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. **J Exp. Med.**, **192** (2): 205-18, 2000.

167. SATO, N.; KUZIEL, W. A.; MELBY, P. C.; REDDICK, R. L.; KOSTECKI, V.; ZHAO, W.; MAEDA, N.; AHUJA, S. K.; AHUJA, S. S. Defects in the generation of IFN-gamma are overcome to control infection with *Leishmania donovani* in CC chemokine receptor (CCR) 5-, macrophage inflammatory protein-1 alpha-, or CCR2-deficient mice. **J. Immunol.**, **163** (10): 5519-25, 1999.
168. SCHALL, T. J. & BACON, K. B. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. **Curr. Op. Immunol.**, **6**: 865-73, 1994.
169. SCHARTON-KERSTEN, T.; SCOTT, P. The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. **J Leukoc. Biol.**, **57** (4): 515-22, 1995.
170. SCHRUM, S.; PROBST, P.; FLEISCHER, B.; ZIPFEL, P. F. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES is associated with a type 1 immune response. **J. Immunol.**, **157**: 3598-3604, 1996.
171. SCOTT, P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, **68**: 369-72, 1989.
172. SEGAL, A. W. Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease. **Nature**, **326**, (6108): 88-91, 1987.
173. SILVA, O.A.; SOUSA, M.E.C.; SANTOS, F.A.B.; MEIRELLES, A.C.F.; SILVA, J.I. Leishmaniose tegumentar americana na zona da mata de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 15., Salvador, 1997. p.TL-040
174. SILVA, T. M. C. **A resposta imuno-inflamatória na leishmaniose tegumentar humana**. Salvador: 1999. 116p. il. Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1999.
175. SOONG, L.; CHANG, C-H.; SUN, J.; LONGLEY, JUNIOR, B.; RUDDLE,

- N.H.; FLAVELL, R.A.; McMAHON-PRATT, D. Role of CD4⁺ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, **158**: 5374-83, 1997.
176. SOONG, L.; DUBOISE, M.; KIMA, P.; McMAHON-PRATT, D. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **63**: 3559-66, 1995.
177. 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.**, **99**(3): 289-94, 2004.
178. STAFFORD, J. L.; GALVEZ, F.; GOSS, G. G.; BELOSEVIC, M. Induction of nitric oxide and respiratory burst response in activated goldfish macrophages requires potassium channel activity. **Dev. Comp. Immunol.**, **26** (5): 445-59, 2002.
179. STENGER, S.; THÜRING, H.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **180**: 783-93, 1994.
180. STREIT, J. A.; DONELSON, J. E.; AGEY, M. W.; WILSON, M. E. Developmental changes in the expression of *Leishmania chagasi* gp63 and heat shock protein in a human macrophage cell line. **Infect. Immun.**, **64**: 1810-18, 1996.
181. STRIETER, R. M.; STANDIFORD, T. J.; HUFFNAGLE, G. B.; COLLETTI, L. M.; LUCAKS, N. W.; KUNKEL, S. L. "The good, the bad, and the ugly". The role of chemokines in models of human disease. **J. Immunol.**, **156**: 3583-3586, 1996.
182. SYPEK, J.P.; CHUNG, C.L.; MAYOR, S.E.H.; SUBRAMANYAN, J.M.; GOLDMAN, S.J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S.F.; SCHAUB, R.G.

- Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **J. Exp. Med.**, **177**: 1797-802, 1993.
183. 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.**, **90** (13): 5914-18, 1993.
184. TDR (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases). <disponível em: <http://www.who.int/tdr/>>. Acesso em nov, 2007.
185. TEIXEIRA, M. J.; FERNANDES, J. D.; TEIXEIRA, C. R.; ANDRADE, B. B.; POMPEU, M. L.; SANTANA DA SILVA, J.; BRODSKYN, C. I.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. **Infect. Immun.**, **73** (2): 1191-95, 2005.
186. TITUS, G. R.; THEODOS, C. M.; SHANKAR A.; HALL, L. R. Interactions between *Leishmania major* and macrophages. In: ZWILLING, T. & EISENSTEIN, T. (Eds.). *Macrophage-Pathogen Interactions*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. p.437-459.
187. TITUS, R.G.; CEREDIG, R.; CEROTTINI, J. C.; LOUIS, J.A. Therapeutic effect of anti-L3T4 monoclonal antibody gk 1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically susceptible BALB/c mice. **J. Immunol.**, **135**: 2108-14, 1985.
188. TITUS, R.G.; LIMA, G.C.; ENGERS, H.D.; LOUIS, J.A. Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite-specific helper T cell populations capable of mediating *Leishmania major*-specific delayed type hypersensitivity. **J. Immunol.**, **133**: 1594-600, 1984.
189. TITUS, R. G.; MARCHAND, M.; BOON, T.; LOUIS, J. A. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol.**, **7** (5): 545-55, 1985.

190. TITUS, R.G.; MILON, G.; MARCHAL, G.; VASSALLI, P.; CEROTTINI, J. C.; LOUIS, J.A. Involvement of specific Lyt-2⁺ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, **17**: 1429-33, 1987.
191. TITUS, R.G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, **170**: 2097-2104, 1989.
192. TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory adaptative immunity. **Ann. Rev. Immunol.**, **13**: 252-76, 1995.
193. TURCO, S. J. & DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, **46**: 65-94, 1992.
194. 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.**, **186** (12): 1829-34, 2002.
195. TURK, J. L. & BRYCESON, A. D. M. Immunological phenomena in leprosy and related diseases. **Adv. Immunol.**, **13**: 209-66, 1971.
196. VASQUEZ, R. E.; SOONG, L. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. **Infect Immun.**, **74** (12): 6769-77, 2006.
197. VESTER, B.; MÜLLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Early gene expression of NK-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, **67**: 3155-59, 1999.
198. 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. Med.**, **179** (4): 1367-71, 1994.
199. WELLS, T. N. C.; POWER, C. A.; PROUDFOOT, A. E. I. Definition, function and pathophysiological significance of chemokine receptors. **TiPS**, **19**: 376-80, 1998.
200. WEI, X. Q.; CHARLES, I. G.; SMITH, A.; URE, J.; FENG, G. J.; HUANG, F. P.; XU, D.; MULLER, W.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, **375** (6530): 408-11, 1995.
201. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). <disponível em: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leshdis1.html>>. Acesso em nov, 2007.
202. YU, X.; ANTONIADES, H. N.; GRAVES, D. T. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human inflamed gingival tissues. **Infect. Immun.**, **61**: 4622-8, 1993.
203. ZARLEY, J. H.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Hydrogen peroxide-mediated toxicity for *Leishmania donovani chagasi* promastigotes. Role of hydroxyl radical and protection by heat shock. **J. Clin. Invest.**, **88** (5): 1511-21, 1991.