



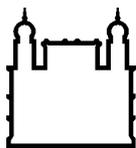
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

Infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos sensíveis e resistentes: alterações na matriz extracelular, perfil de citocinas e caracterização do infiltrado inflamatório

Flávia de Oliveira Cardoso

Rio de Janeiro
Agosto/2012



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Flávia de Oliveira Cardoso

Infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos sensíveis e resistentes: alterações na matriz extracelular, perfil de citocinas e caracterização do infiltrado inflamatório.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Parasitária.

Orientador: Dra. Kátia da Silva Calabrese

RIO DE JANEIRO

Agosto/2012

C268 Cardoso, Flávia de Oliveira.

Infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos sensíveis e resistentes: alterações na matriz extracelular, perfil de citocinas e caracterização do infiltrado inflamatório / Flávia de Oliveira Cardoso – Rio de Janeiro, 2012.

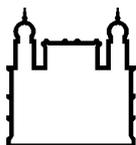
x, 135 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2012.

Bibliografia: f. 103-135

1. *L. amazonensis*. 2. Camundongos singênicos. 3. Matriz extracelular. 4. Citocinas. 5. Imunopatologia. I. Título.

CDD 616.936 4



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: Flávia de Oliveira Cardoso

**Infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos suscetíveis e resistentes:
alterações na matriz extracelular, perfil de citocinas e caracterização do infiltrado
inflamatório.**

ORIENTADOR: Dra. Kátia da Silva Calabrese

Aprovada em: 31/08/2012.

EXAMINADORES:

Dr. Sérgio Coutinho Furtado de Mendonça (Revisor)

Dra. Mirian Cláudia de Souza Pereira

Dra. Ana Lucia Abreu Silva

Rio de Janeiro, 31 de agosto de 2012.

Aos meus amados pais, pela dedicação, apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Após tantos anos de trabalho, muitas pessoas contribuíram para o cumprimento de mais esta etapa importante em minha vida. Muitas foram as dificuldades e desafios, mas quando se tem objetivo, força de vontade e principalmente pessoas especiais ao redor, todo o esforço vale a pena e tudo fica mais leve!

Agradeço a Deus por ter me proporcionado boas oportunidades, saúde, uma família maravilhosa, amigos verdadeiros e leais e até mesmo pelas dificuldades, que me fortaleceram e me fizeram amadurecer e aprender muitas coisas!!;

Agradeço a meus especiais e muito amados pais pelo amor incondicional, dedicação, exemplo de força, coragem, enfim...por tudo que sou hoje!!!! Sem vocês, seu carinho, apoio emocional e incentivo, o q seria de mim??!! Obrigada por construírem para mim uma família maravilhosa, feliz e que é tudo em minha vida!! Amo vocês demais!!!;

Ao meu irmão Fábio, pelo apoio, incentivo e carinho. Amo vc, mesmo que as vezes seja o mais irritante dos seres!! rs Coisas de irmão!!!;

À todos os tios, primos e padrinhos por todo apoio, carinho e pelos momentos de extrema felicidade que compartilhamos! Amo todos vocês!;

À Kátia Calabrese, que mais que uma orientadora, é uma amiga especial e por quem tenho muita admiração. Obrigada pela confiança depositada, pela palavras de incentivo e por me apoiar nas dificuldades. Espero sempre corresponder a suas expectativas!!!;

À Sylvio Celso por me dar a oportunidade, a doze anos atrás quando eu ainda era uma adolescente, de conhecer o mundo científico e iniciar essa jornada;

À minha eterna “pequena” grande amiga Ana Lúcia que, mesmo a tantos quilômetros de distância, se faz tão presente em minha vida! Obrigada pelo carinho, preocupação, confiança e apoio constante. Espero poder retribuir toda ajuda que tens me dado durante todos estes anos! Te amo amiga!!!;

À minha amiga querida, irmã de coração, Ana Cláudia que mesmo estando tão longe, estava sempre presente!! Obrigada pela ajuda preciosa nas dúvidas com a PCR e por me proporcionar sua amizade!;

Aos meus amigos queridos, irmãos de coração, companheiros de tantas horas: Caroline Almeida, Joanna, Josélio, Riany, Milena. Obrigada por me proporcionarem momentos de descontração, apoio constante, mesmo a distância, e amizade verdadeira. Amo vocês!;

À Celeste, por ter me ensinado muito do que sei e pela ajuda constante no laboratório e nas revisões da tese. Adoro vc pequenina!!;

À Tânia, pela delicadeza, calma, exemplo e valiosa ajuda nos qPCRs e análise dos dados;

Ao Fernando, meu fiel escudeiro e companheiro de bancada!! Obrigada pela valiosa ajuda nos intermináveis experimentos, amizade, doçura, carinho e exemplo de dedicação e determinação. Obrigada por tudo!!;

Aos colegas de laboratório, Daiana, Sandy, Carolina Sales, Caroline Magalhães, Henrique, Luiz Otávio, Luiz D'Escofier, Mariana, Celso, que tanto me ajudaram, formando uma verdadeira equipe. Obrigada pela harmoniosa convivência e pelos momentos de descontração;

À Luciana, nossa super secretária!! Pela paciência e excelente organização de nossa secretaria;

À equipe do LADEP/CSEGSF/ENSP, em especial a Riany e Selma pelo incentivo e apoio para realização deste trabalho;

À Dra. Miriam Pereira e equipe, em especial Tatiana Araújo, pela ajuda com os anticorpos, paciência, disponibilidade e preocupação. Espero que possamos trabalhar juntos mais vezes!!;

À toda equipe do CECAL, em especial a Belmira, Josilene e Luciana, por cuidarem de nosso principal objeto de trabalho, “os camundongos”, e estarem sempre prontas a ajudar e responder nossos questionamentos;

À plataforma de equipamentos da Biologia Parasitária, por permitir o uso do equipamento de PCR em tempo real;

Às meninas da limpeza, por manterem nosso ambiente de trabalho sempre limpo;

À todas as pessoas que passaram pelo laboratório de Imunomodulação e Protozoologia durante os últimos doze anos, pela experiência trocada e pelo carinho.

“Sabemos como é a vida: num dia dá tudo certo e no outro as coisas já não são tão perfeitas assim. Altos e baixos fazem parte da construção do nosso caráter. Afinal, cada momento, cada situação que enfrentamos em nossas trajetórias é um desafio, uma oportunidade única de aprender, de se tornar uma pessoa melhor. Só depende de nós, das nossas escolhas...

Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado. Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente. Já não caminho mais sozinho, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição. E, mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria, saber que já não sou a mesma de ontem me faz perceber que valeu a pena.

Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é só consequência.”

(Albert Einstein)

RESUMO

No presente trabalho a imunopatologia da infecção por *Leishmania amazonensis* foi estudada em quatro linhagens de camundongos singênicos. Diferentes parâmetros como análise da expressão/produção de citocinas em diferentes órgãos e no soro, quantificação da carga parasitária, caracterização das populações celulares presentes no infiltrado inflamatório, assim como alterações histopatológicas e na matriz extracelular foram avaliados a fim de verificar as diferenças existentes na resposta imunopatológica entre as linhagens de camundongos utilizadas. A partir destas análises observamos que na fase inicial da infecção, tanto na lesão primária como no linfonodo, as células predominantemente encontradas foram eosinófilos e mastócitos em todas as linhagens de camundongos. A maior presença de células como linfócitos T $\gamma\delta$, células B, plasmócitos, assim como altos níveis de anticorpos foi verificada nos camundongos sensíveis a infecção por *L. amazonensis* sugerindo o papel destes na suscetibilidade a doença. Quanto à carga parasitária, as linhagens mais sensíveis (C57BL/10 e CBA) apresentaram maior densidade de amastigotas e maior destruição tecidual com lesões grandes, além de metástase e visceralização do parasito, enquanto os camundongos resistentes (C3H.He) apresentaram poucos parasitos, sem formação de úlceras ou visceralização. De acordo com nossas observações, a resposta imunológica à *L. amazonensis* demonstra uma compartimentalização e conseqüente diferença na produção/expressão de citocinas nos diferentes órgãos estudados. As linhagens mais sensíveis apresentaram, na lesão primária, níveis mais elevados de expressão de citocinas próinflamatórias como IL-12, TNF- α e IFN- γ , assim como a indução de iNOS, estando tais níveis associados a maior destruição tecidual observada, enquanto níveis elevados de TGF- β estariam associados a desativação do macrófago e conseqüente estabelecimento do parasito no início da infecção. A expressão de IL-4 foi mais evidente nos linfonodos dos camundongos sensíveis. Já no baço de camundongos C57BL/10 uma expressão concomitante de TNF- α e IL-10, assim como IL-12, IFN- γ e iNOS estavam associadas a presença de parasitos. A expressão de citocinas próinflamatórias (INF- γ , TNF- α e IL-12) no fígado de camundongos C57BL/10 foi observada na fase inicial da infecção, enquanto citocinas regulatórias (TGF- β e IL-10) na fase tardia. Os camundongos resistentes à infecção por *L. amazonensis* apresentaram baixos níveis de expressão de citocinas em todos os órgãos analisados. Apesar de não haver uma correlação direta na produção/expressão destas citocinas nestes órgãos, a infecção induz uma produção mista de citocinas que é independente da constituição genética do hospedeiro. Na análise da expressão de proteínas da matriz observamos uma associação entre o aumento na expressão fibronectina, colágeno I e III com a expressão de TGF- β no fígado e linfonodo de C57BL/10 e C3H.He. Tal associação não foi observada na pata e no baço destes animais. A expressão de colágeno III na pata, na fase tardia da infecção, estava relacionada à presença maciça de histiócitos parasitados. Altos níveis de expressão de laminina foram observados na pata de camundongos C57BL/10, 30 dias após a infecção, assim como o aumento de colágeno IV e fibronectina.

Palavras-chave: *L. amazonensis*, camundongos singênicos, matriz extracelular, citocinas, imunopatologia.

ABSTRACT

In the present work *L. amazonensis* infection immunopathology was studied in four inbred mouse strains. With the aim of evaluate the differences in immunopathologic response between all strains, different parameters such as: cytokines analysis expression/production, in different organs and serum, parasite quantification, inflammatory infiltrate description, as well as histopathological and extracellular matrix alterations were evaluated. The association of these analyzes showed that in the early phase of infection, in both primary lesion and lymph nodes, the cells predominantly found in all mouse strains were eosinophils and mast cells. A highest presence of $T\gamma\delta$ lymphocytes, B cells, plasma cells, as well as high levels of antibodies were observed in *L. amazonensis* susceptible mice, suggesting a role of this parameters in disease susceptibility. In regard the parasite load, the more susceptible strains (C57BL/10 and CBA) showed a heavy parasite load, massive tissue destruction with large lesions and metastasis, and parasite visceralization. The resistant mice (C3H.He) showed few parasites and no scars or visceralization were observed. According to our observations, *L. amazonensis* immune response showed cytokines production/expression compartmentalization in different studied organs. The more susceptible strains showed an increase of proinflammatory (IL-12, TNF- α and IFN- γ) cytokines expression, as well as the iNOS induction, in the primary lesion. This enhancement of expression was associated with tissue destruction, while high levels of TGF- β were associated with macrophages deactivation and subsequent parasite establishment in the early infection. The expression of IL-4 was more evident in susceptible mice lymph nodes. In C57BL/10 mice spleen a concomitant expression of TNF- α and IL-10, as well as IL-12, IFN- γ and iNOS, were associated with parasites presence. Proinflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α and IL-12) expression in C57BL/10 mice liver was observed in the initial phase of infection, whereas regulatory (TGF- β and IL-10) cytokines were seen in the late phase. The resistant to *L. amazonensis* mice showed low levels of cytokine expression in all examined organs. Although there is not a direct association between cytokines production/expression in these organs, the *L. amazonensis* infection induces a mixed cytokines production that is independent of the host genetic background. The analysis of extracellular matrix proteins expression showed an association between FN, collagen I and III expression increase with the expression of TGF- β in the liver and lymph nodes of C57BL/10 and C3H.He mice. This association was not observed in the footpad and spleen of these animals. The footpad expression of collagen III in the late phase of infection was associated with the massive presence of parasitized histiocytes. A highest level of laminin, as well as the increase of collagen IV and fibronectin expression was observed in C57BL/10 mice footpad, 30 days after infection.

Key-words: *L. (L.) amazonensis*, inbred mice, extracellular matrix, cytokines, immunopathology.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.1. As leishmnanioses.....	12
1.1.1. A doença.....	12
1.2. O parasita.....	13
1.2.1. Classificação taxonômica.....	13
1.2.2. Morfologia.....	15
1.2.3. Transmissão.....	16
1.3. Resposta imunológica X <i>Leishmania</i>	18
1.3.1. Citocinas envolvidas na resposta imunitária.....	25
1.4. Matriz extracelular.....	30
1.4.1. Colágenos.....	31
1.4.2. Fibronectina.....	32
1.4.3. Laminina.....	33
1.5. Matriz extracelular X <i>Leishmania sp.</i>	33
1.6. Modelos experimentais.....	35
2. Objetivos.....	38
3. Artigos.....	40
3.1. Artigo 1.....	41
3.2. Artigo 2.....	50
3.3. Artigo 3.....	65
4. Discussão.....	86
5. Conclusão.....	100
6. Referências bibliográficas.....	102

1. INTRODUÇÃO

1.1. As leishmanioses

1.1.1. A doença

As leishmanioses constituem um complexo de enfermidades causadas por diferentes espécies de um protozoário, parasito intracelular obrigatório, pertencente ao gênero *Leishmania*. Sua distribuição geográfica é ampla, sendo endêmica em várias partes da África, Índia, Oriente Médio, Sudeste da Europa e Américas do Sul e Central (Handman, 2001). Estima-se que cerca de mais de 350 milhões de pessoas em todo o mundo vivam em áreas que apresentam risco iminente de infecção e destas, cerca de 12 milhões estejam acometidas pela doença (WHO, 2011).

Existem, até o presente momento, cerca de 40 espécies reconhecidas do parasito que estão divididas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Lainson & Shaw 1972, 1987, 1998). Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e das interações entre as genéticas do parasito e do hospedeiro, assim como seu estado imunológico e a infecções concomitantes, a doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas. Esse espectro vai desde infecções assintomáticas ou lesões cutâneas geralmente benignas e autorresolutivas, a lesões destrutivas e desfigurantes da forma mucosa e mesmo aos casos potencialmente fatais das formas viscerais (Turk & Belehu, 1974; Herwaldt, 1999).

A leishmaniose tegumentar divide-se em 3 formas clínicas principais: cutânea localizada (LCL), mucocutânea (LMC) e cutânea-difusa (LCD). A forma cutânea localizada é caracterizada por uma única lesão no local da picada, ou por lesões múltiplas (por disseminação do parasito por via hematogênica ou linfática, ou ainda, por múltiplas picadas do vetor); enquanto a forma mucocutânea caracteriza-se por lesões na mucosa oral, nasal e/ou faríngea e presença concomitante de lesões cutâneas ativas, sendo uma forma secundária que pode ocorrer até mesmo anos após a cura de uma lesão cutânea-localizada, representando o polo hiperérgico da leishmaniose tegumentar. A forma cutânea difusa representa o polo anérgico da doença, sendo muito resistente ao tratamento (WHO, 2000; Handman, 2001). É caracterizada pela presença de múltiplas lesões nodulares disseminadas por todo o corpo do indivíduo, com macrófagos cheios de amastigotas e infiltrado linfocítico limitado. Alguns autores admitem ainda a forma mucosa (LM), que se caracteriza por lesões de mucosa, sem presença de lesões cutâneas ativas, diferenciando-se assim da forma mucocutânea (Oliveira-Neto, 1998).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é a forma mais grave da doença. É considerada

uma doença espectral devido à variação na resposta imunológica do hospedeiro resultar em diferentes manifestações clínicas. Apresenta uma forma de baixa resistência caracterizada por lesão sistêmica visceral, na qual o teste cutâneo de Montenegro é negativo e vários aspectos clínicos são descritos. Se não for tratada, a LV pode evoluir para a morte, entretanto, após a quimioterapia há uma redução da carga parasitária que pode levar ao estabelecimento de imunidade mediada por células. Nesta fase, os títulos de anticorpos diminuem e o paciente desenvolve imunidade à reinfecção por premunição (Sergent e cols., 1924). A doença é caracterizada por picos irregulares de febre, emagrecimento progressivo, aumento do baço e fígado (hepatoesplenomegalia), anemia, trombocitopenia e ativação policlonal de células B com hipergamaglobulinemia. Esse quadro se desenvolve devido à multiplicação dos parasitos nos tecidos e órgãos ricos em células do sistema monocítico fagocitário (Handman, 2001). Cerca de 10% dos pacientes acometidos pela LV pode evoluir para uma forma clínica conhecida como leishmaniose dérmica pós-calazar, mesmo após aparente cura da infecção inicial. Tal manifestação caracteriza-se por aparecimento de nódulos na face ou na superfície extensora dos membros que podem perdurar por anos (Carvalho e cols., 1992).

1.2. O parasito

1.2.1. Classificação taxonômica

Reino: **PROTISTA** (Haeckel, 1866)

Sub-Reino: **PROTOZOA** (Goldfuss, 1817)

Filo: **SARCOMASTIGOPHORA** (Honigberg e cols, 1964)

Sub-Filo: **MASTIGOPHORA** (Deising, 1866)

Classe: **ZOOMASTIGOPHOREA** (Calkins, 1909)

Ordem: **KINETOPLASTIDA** (Honigberg, 1963, *emend.* Vickerman, 1976)

Sub-Ordem: **TRYPANOSOMATINA** (Kent, 1880)

Família: Trypanosomatidae (Doflein, 1901, *emend.* Grobben, 1905)

Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903)

Em 1982, no entanto, Safjanova propôs a divisão do gênero em dois subgêneros: *Sauroleishmania* para espécies isoladas de répteis, e *Leishmania* para as espécies de mamíferos. Cinco anos mais tarde Lainson e Shaw (1987) propuseram a criação de um novo subgênero *Viannia*, para as espécies que se desenvolvem na região pilórica do intestino posterior do flebotomíneo, ficando o subgênero *Leishmania* para as espécies que têm seu

desenvolvimento na válvula estomodeal, localizada na interseção entre os intestinos médio e anterior do inseto (Nieves e Pimenta, 2000). O subgênero *Sauroleishmania* foi elevado a gênero (Killick-Kendrick e cols., 1986), ficando o gênero *Leishmania* restrito aos parasitos de mamíferos (Lainson & Shaw, 1992). No entanto, a validade do atual sistema de classificação que reconhece 30 espécies, entre as quais 20 são responsáveis por doenças humanas, tem sido questionada por muitos autores (Bañuls e cols., 2007). Muito recentemente, Fraga e colaboradores (2010) utilizaram sequencias de uma proteína altamente conservada conhecida como proteína de choque térmico de 70kD (hsp70 gene) para analisar isolados e cepas de diferentes origens geográficas, demonstrando que apenas oito grupos monofiléticos foram detectáveis em 17 amostras analisadas. De acordo com esses autores, o gênero *Leishmania* é formado por um grupo monofilético com três subgêneros distintos: *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* e *L. (Sauroleishmania)*. Dentro do subgênero *Leishmania*, apenas 4 espécies foram reconhecidas: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) mexicana*, enquanto *L. (L.) donovani infantum* foi classificada como subespécie. Já no subgênero *Viannia*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* foram consideradas espécies e *L. (V.) guyanensis panamensis* e *L. (V.) braziliensis peruviana* consideradas subespécies. As espécies *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. garnhami* não puderam ser distinguidas como espécies separadas. Os resultados deste estudo ainda não foram validados devido às ressalvas resultantes da utilização de um único marcador genético do parasito (Schönian e cols., 2010).

Entre as espécies descritas, pelo menos treze delas foram encontradas em casos humanos no Novo Mundo e oito no Brasil:

Subgênero *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987)

- ◆ *Leishmania braziliensis* (Vianna, 1911) (*)
- ◆ *Leishmania peruviana* (Velez, 1913)
- ◆ *Leishmania guyanensis* (Floch, 1954) (*)
- ◆ *Leishmania panamensis* (Lainson & Shaw, 1972)
- ◆ *Leishmania lainsoni* (Silveira e cols., 1987) (*)
- ◆ *Leishmania naiffi* (Lainson & Shaw, 1989) (*)
- ◆ *Leishmania shawi* (Lainson e cols., 1989) (*)
- ◆ *Leishmania colombiensis* (Kreutzer e cols., 1991)
- ◆ *Leishmania lindenbergi* (Silveira e cols., 2002) (*)

Subgênero *Leishmania* (Saf'janova, 1982)

- ♦ *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937- sinonímia *Leishmania infantum* Nicoli, 1908 (*)
- ♦ *Leishmania mexicana* Biagi, 1953 *emend.* Garnham, 1962
- ♦ *Leishmania amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 (*)
- ♦ *Leishmania venezuelensis* Bonfante-Garrido, 1980
- ♦ *Leishmania pifanoi*

(*) Já descritas no Brasil

Outras espécies como *Leishmania enrietti* (Muniz & Medina, 1948), *Leishmania hertigi* (Herrer, 1971), *Leishmania deanei* (Lainson & Shaw, 1977) e *Leishmania aristidesi* (Lainson & Shaw, 1979 *emend.* Lainson & Shaw, 1987) são espécies parasitas de mamíferos no Novo Mundo, porém nunca foram encontradas parasitando o homem.

1.2.2. Morfologia

As leishmânias possuem dois principais estágios de desenvolvimento: as formas promastigota e amastigota (Adler, 1963; Hommel, 1978), embora no interior do intestino do inseto vetor as formas promastigotas sofram algumas modificações morfológicas passageiras (Bates & Rogers, 2004). A diferenciação entre essas formas é feita com base nas características morfológicas, na taxa de crescimento, nas exigências nutricionais e na regulação da expressão de proteínas de superfície que medeiam a interação parasito-hospedeiro (Waller & McConville, 2002). A forma promastigota é encontrada no tubo digestório de insetos flebotomíneos e se caracteriza morfológicamente por apresentar forma alongada e delgada, com corpo celular medindo 5-20 x 1-4 µm, provida de um longo flagelo livre no polo anterior da célula e cinetoplasto anterior ao núcleo. Já as formas amastigotas são arredondadas ou ovais, medem cerca de 3 x 5 µm, apresentam um curto flagelo restrito à bolsa flagelar, sendo apenas visualizado por microscopia eletrônica, e são encontradas no hospedeiro vertebrado, infectando principalmente macrófagos (revisto em Ueda-Nakamura e cols., 2001; Vannier-Santos e cols., 2002), entretanto, células como fibroblastos (Schwartzman & Pearson, 1985, Hespanhol e cols., 2005), neutrófilos (Pearson & Steibrgel, 1981), mastócitos (Bidri e cols., 1997) e células dendríticas (DC) (von Stebut e cols., 1998) entre outras, podem ser parasitadas. As amastigotas do complexo *Leishmania mexicana*

apresentam ainda uma organela análoga ao lisossomo, denominada megassomo. Tal organela é rica em cisteína proteinase e está associada ao acúmulo e possível degradação de macromoléculas endocitadas (revisto em Vannier-Santos, 2002).

Assim como outros tripanossomatídeos, as leishmânias apresentam outras organelas tais como: acidocalcisomas, que são compartimentos de estoque de Ca^{++} e ricos em pirofosfato, Mg^{++} , Na^+ e em alguns casos Zn^{++} , e imagina-se estarem envolvidos na homeostase do pH e osmorregulação do parasito (revisado em Docampo e Moreno, 1999). Outra organela única presente em *Leishmania* e outros tripanossomatídeos é o glicossomo, uma organela altamente especializada envolvida na geração glicolítica de ATP (revisto em Vannier-Santos, 2002).

Leishmânias, assim como outros integrantes da ordem Kinetoplastida, apresentam apenas uma mitocôndria, que se estende por todo o corpo celular do organismo. Esta mitocôndria única se comunica com o cinetoplasto, e, por ser rica em DNA, se cora facilmente com corantes básicos, sendo facilmente visível em microscopia de luz. O corpo celular do parasito é rodeado por microtúbulos subpeliculares que terminam próximos à bolsa flagelar (revisto em Vannier-Santos, 2002; de Souza, 2002).

1.2.3. Transmissão

A transmissão do parasito entre uma diversidade de hospedeiros mamíferos (homem, cão doméstico, roedores silvestres, entre outros) é realizada por insetos hematófagos da família Psychodidae, gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo), sendo comumente chamados de flebotomíneos e popularmente conhecidos como mosquito palha, biriqui, cangalhinha ou mosca da areia (Killick-Kendrick, 1987; Lainson & Shaw 1992; Lainson e cols. 1994, SVS, 2003). Os insetos são pequenos, pilosos e de coloração clara (cor de palha ou castanho claro), criam-se no solo, em locais ricos em matéria orgânica, escuros e úmidos. Apenas as fêmeas são hematófagas, com ciclos de atividade crepuscular e pós-crepuscular, sendo facilmente reconhecidas pela atitude que adotam quando pousam, pois suas asas permanecem eretas e entreabertas (Killick-Kendrick, 1987; 1999, Rey, 2001a). Embora os flebotomíneos não sejam insetos essencialmente hematófagos, podendo alimentar-se de seiva vegetal, as fêmeas necessitam de sangue para a maturação de seus ovos e, desta forma, alimentam-se de sangue de animais. O aparelho bucal picador-sugador possui, diferentemente do dos mosquitos, um cibário que consiste em estruturas quitinizadas providas de dentes e dentículos quitinosos presente no assoalho da cavidade bucal (Rey, 2001b). Desta forma, ao picarem o animal, produzem uma escarificação na epiderme, rompendo capilares e formando uma espécie de poça de onde sugam o sangue (Ribeiro, 1987). Neste processo,

algumas células podem ser rompidas ou desprendidas do tecido, sendo sugadas junto com o sangue. Se o animal estiver infectado, formas amastigotas liberadas de células lisadas ou no interior de macrófagos íntegros podem ser ingeridas (Awasthi e cols., 2004).

Uma vez ingeridas, as amastigotas passam para o intestino médio do inseto e transformam-se em promastigotas, conhecidas como procíclicas, que podem ser encontradas em diferentes morfotipos. As promastigotas nectomonadas, são formas mais largas que se proliferam dentro da matriz peritrófica. Com o rompimento da parte anterior desta matriz por enzimas quitinolíticas das promastigotas (Schlein e cols., 1992), os parasitos migram e se aderem às microvilosidades das células do intestino médio, onde se proliferam e podem dar origem a promastigotas metacíclicas ou a pequenas e largas formas haptomonadas, que por sua vez, podem migrar para o esôfago e faringe e se transformar em paramastigotas (revisado em Schlein, 1993). As promastigotas metacíclicas migram para a região da cárdia e válvula do estomodeu, até que ocorra acúmulo massivo nesta válvula. As formas não metacíclicas se ligam à camada cuticular do estomodeu, degenerando a válvula. Devido à lesão valvular, o flebotomíneo regurgita as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* (formas infectivas) que, juntamente com a saliva, passam da probóscide para o tecido cutâneo subjacente do hospedeiro vertebrado (revisado por Killick-Kendrick, 1990; Bates, 2008).

Uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, a leishmânia utiliza receptores da célula hospedeira para ser internalizada via fagocitose mediada por receptores (Roberts e cols., 2000; revisado por Handman & Bullen, 2002). Múltiplos receptores de macrófago têm sido implicados no processo de invasão, incluindo receptores de complemento 1 (CR1), 3 (CR3), 4 (CR4), receptor de manose, receptor Fc para imunoglobulina G e receptor de fibronectina (Handman & Bullen, 2002; Peters e cols., 1995; Handman, 2001). Dois glicoconjugados predominantes na superfície celular de *Leishmania*, a glicoprotease 63 (gp63) e o LPG estão envolvidos no processo. A gp63 é uma zinco metaloprotease que está presente em grandes quantidades na superfície de promastigotas, e LPG é um glicolípido complexo que está implicado na sobrevivência durante a fase inicial da infecção e estabelecimento nos macrófagos (Salvatore e cols., 2001). O LPG, presente na membrana das promastigotas metacíclicas, formam uma espécie de capa, protegendo-as contra a lise pelo sistema complemento, uma vez que o complexo de ataque à membrana é rapidamente descartado pela presença destas moléculas (Puentes e cols., 1990).

A interação *Leishmania*/receptores de macrófagos é seguida pela fagocitose do parasito e formação do vacúolo parasitóforo, que se funde com os lisossomos. Aproximadamente após 30 minutos, o vacúolo torna-se acidificado com um pH 4,5-5,0. Dentro do fagolisossomo do macrófago, as promastigotas sofrem significantes alterações

bioquímicas e metabólicas, transformando-se em amastigotas que se protegem deste meio extremamente ácido, graças a uma ATPase transportadora de próton que mantém o ambiente intracelular do parasito em um pH 6,5 (Chang e cols., 1990; Glase e cols., 1992). Essas formas sofrem sucessivos ciclos de divisão binária até que rompem o macrófago, sendo liberadas no meio extracelular, podendo ser fagocitadas por células dendríticas, macrófagos ou outras células (de Souza, 2002). Durante esse estágio biológico, o parasito produz alterações nas células infectadas afim de sobreviver e se multiplicar. Paralelamente, o hospedeiro desenvolve suas respostas à infecção. Assim, a infecção leishmaniótica produz uma série de reações complexas no hospedeiro, todas mais ou menos interrelacionadas com as respostas do seu sistema imunológico (Grimaldi, 1982).

1.3. Resposta imunológica X *Leishmania*

Ao penetrar no organismo do hospedeiro vertebrado, a leishmânia precisa enfrentar seu sistema imunológico, para poder sobreviver e se multiplicar. Inicialmente, ela precisa enfrentar os mecanismos inatos de defesa, como o sistema complemento e células como os macrófagos, células “Natural Killer” (NK) e células de Langerhans, e posteriormente os mecanismos específicos da resposta adaptativa. Para evadir deste complexo sistema, que tem como principal objetivo eliminar a infecção, o parasito dispõe de uma série de mecanismos que permitem seu sucesso na colonização do hospedeiro.

Estudos demonstram que alguns componentes da saliva do flebotomíneo, que são injetados no momento do repasto sanguíneo, podem favorecer o parasito nos primeiros estágios da infecção. A saliva possui diversos componentes vasodilatadores, anticoagulantes e imunossupressores, que facilitam a sucção sanguínea na poça formada pela picada do inseto e impedem que o hospedeiro se torne sensível a sua picada (de Almeida e cols., 2003; Morris e cols., 2001). Experimentos mostram que quando a *L. (L.) major* é injetada junto com a saliva de flebotomíneos em camundongos, a infecção é dramaticamente exacerbada (Titus & Ribeiro, 1988). Entre os componentes injetados com a saliva está a prostaglandina E2 que, além de ser um vasodilatador, possui ação imunossupressora (Lonardoní e cols., 2000). Outro importante componente é a maxadila, potente vasodilatador presente na saliva do gênero *Lutzomyia* (Lerner e cols., 1991), que parece ser a grande responsável pela exacerbção observada (Morris e cols., 2001).

Além dos componentes da saliva ajudarem a leishmânia a se estabelecer no organismo do hospedeiro, as moléculas gp63 e LPG, presentes na sua superfície, a protegem da lise pelo sistema complemento, além de servirem como ligantes para os receptores da superfície de células da imunidade inata, sem, no entanto, ativar o metabolismo oxidativo do macrófago

(Alexander e cols., 1999).

Embora a resposta imunológica inata não necessite de um reconhecimento específico, é capaz de reconhecer antígenos não próprios que expressam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os quais são conservados e estão presentes em grupos específicos de patógenos (Stafford e cols., 2002). Moléculas com estes padrões são reconhecidas através de receptores para reconhecimento de padrões (PRRs) presentes na superfície das células da imunidade inata, que se constituem na primeira frente de combate a patógenos. Estas células têm, portanto, o papel de limitar a disseminação e crescimento inicial dos parasitos, assim como modular e garantir as reações posteriores do sistema imunológico (Stafford e cols., 2002). Dentre estas células, o macrófago é o principal responsável pela eliminação do parasito, já que se apresenta como sua principal célula hospedeira. Para que cumpram esta tarefa com maior eficiência, os macrófagos precisam ser ativados, tornando-se capazes de produzir uma grande quantidade de metabólitos tóxicos de oxigênio, tais como ânions superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (Assreuy e cols., 1994). Para que sejam ativados, os macrófagos necessitam reconhecer os PAMPs e serem estimulados por citocinas específicas.

Os principais PRRs envolvidos no reconhecimento de *Leishmania*, são os receptores do tipo TOLL (TLR) que além de reconhecerem PAMPs, têm papel na transdução de sinais intracelulares que ativam o macrófago, induzindo seus mecanismos imunológicos inatos (Hunter & Sher, 2001). Isto é, atuam na ativação do fator nuclear κB (NF- κB), resultando na produção de reativos oxigenados, intermediários nitrogenados, secreção de citocinas e quimiocinas, além de diferenciação celular (Hunter & Sher, 2001).

Quando os PRRs de macrófagos reconhecem âncoras glicosil-fosfatidil inositol (GPI) na superfície da *Leishmania* dois sinais são ativados. Um deles induz a produção de TNF- α e IL-12 e o outro induz a síntese de óxido nítrico (NO) (Stafford e cols., 2002), que atua como um importante mediador citotóxico e citostático, agindo na infecção por patógenos intracelulares (Liew e cols., 1990), tendo uma grande participação no combate a estes parasitos (Liew e cols., 1999). O NO parece ser um pré-requisito para o funcionamento de células NK e para a produção de citocinas durante a resposta imunológica inata (Bogdan e cols., 2000).

O conjunto de citocinas e mediadores lipídicos liberados pela ativação de macrófagos residentes irão induzir a expressão de moléculas de adesão, que por sua vez, medeiam a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o local de infecção. A presença de PMNs nas primeiras horas de infecção por *Leishmania* tem sido descrita principalmente nas lesões agudas, embora também estejam presentes nas lesões crônicas (Grimaldi e cols., 1980; Grimaldi e cols., 1984; Andrade e cols., 1984; de Magalhães e cols., 1986; Pompeu e cols.

1991).

Os neutrófilos são o tipo celular dominante nos primeiros 3 dias após a infecção, e têm sido relacionados com a destruição dos parasitos através de enzimas proteolíticas armazenadas em grânulos especiais e pela produção de reativos de oxigênio (Lima e cols. 1998) ou, em outros casos, podem funcionar como reservatórios do parasito nas fases iniciais da infecção (Beil e cols., 1992; van Zandbergen e cols. 2002). Experimentos mostram que camundongos suscetíveis e resistentes depletados de neutrófilos exibem uma alta carga parasitária quando comparados com os grupos controle (Lima e cols. 1998).

O tempo de vida de um neutrófilo é relativamente curto, sofrendo apoptose após aproximadamente 6 horas (Squier, 1995). Tem sido demonstrado que a leishmânia pode retardar a apoptose dos neutrófilos por até 3 dias (Aga e cols., 2002), de modo que monócitos/macrófagos possam ser recrutados pela indução de quimiocinas (MIP-1 α e MIP-1 β) (Scapini e cols., 2000). Estes por sua vez, fagocitam os neutrófilos apoptóticos infectados, (Savill e cols. 1989) que entram silenciosamente em suas principais células hospedeiras (Laskay e cols., 2003), sem ativarem seus mecanismos microbicidas (Meagher e cols., 1992).

Os eosinófilos são outro tipo de PMN que também estão presentes em quantidades variáveis nas lesões provocadas por *Leishmania*, sendo mais evidentes em infecções produzidas por *L. amazonensis* (Grimaldi e cols., 1984; Pompeu e cols. 1991; Beil e cols., 1992). O recrutamento de eosinófilos para os locais de infecção está relacionado a fatores quimiotáticos inerentes ao parasito (Saito e cols., 1996) e derivados de mastócitos, assim como a ativação do complemento e de linfócitos ativados (Yoshimura, 1989). Embora não tenham um papel importante na destruição de *Leishmania*, como os neutrófilos, os eosinófilos possuem importantes mecanismos de regulação da resposta inflamatória, como a estimulação da degranulação de mastócitos, além da liberação de várias citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, tais como IL-12, IL-4, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e “*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*” (RANTES), assim como podem expressar moléculas de MHC classe II e apresentar antígenos para as células T (Del Pozo e cols., 1992; Weller e cols., 1993).

Além dos macrófagos, os mastócitos também liberam mediadores importantes, como o TNF- α , para a migração de PMNs para os locais de infecção (Malaviya e cols., 1996). Os mastócitos são elementos residentes do tecido, derivados de progenitores da medula óssea (Kitamura e cols., 1981, Kirschenbaum e cols., 1999) e representam um crucial e abundante constituinte da pele (Eady e cols., 1979). Estas células estão envolvidas na inflamação crônica de várias doenças, participando no início das reações alérgicas e na manutenção da inflamação alérgica, devido à liberação de uma variedade de moléculas como a histamina,

leucotrienos e várias citocinas tais como TNF- α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β e GM-CSF em resposta à ligação de IgE ao antígeno específico (Wodnar-Filipowicz e cols., 1989; Galli e cols., 1991; Okayama e cols., 1995; Williams & Coleman, 1995). Os mastócitos também podem ser ativados independentemente de anticorpos, ligando-se diretamente à superfície de bactérias como *Klebsiella pneumoniae* e protozoários como *Leishmania* (Echtenacher e cols., 1996; Malaviya e cols., 1996; Bidri e cols., 1997). Ao interagirem com promastigotas de *L. major* ou *L. infantum*, os mastócitos rapidamente degranulam, liberando citocinas que podem influenciar no direcionamento da resposta imunológica adquirida. Citocinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, liberadas pelos mastócitos após sua ligação a antígenos complexados a IgE, podem ser importantes para o início de uma resposta T helper 2 (Th2). Por outro lado, os mastócitos respondem a IL-12 produzindo IFN- γ (Gupta e cols., 1996). Estes resultados sugerem que estas células podem ser capazes de induzir tanto uma resposta do tipo T helper 1 (Th1), quanto Th2.

Assim como os mastócitos, as células *natural killer* (NK) respondem ao estímulo de IL-12 através da produção de altos níveis de IFN- γ , sendo implicadas no desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 (Scharton & Scott, 1993).

As células NK são capazes de induzir a lise celular através de um processo de citotoxicidade semelhante ao utilizado pelos linfócitos T CD8⁺ e também através de citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC) (Becker e cols., 2003), constituindo-se em um componente celular adicional da resposta imunológica inata.

Diversos trabalhos têm relacionado o envolvimento das células NK na resistência e suscetibilidade à infecção por *Leishmania*. Tem sido demonstrado que estas células induzem resposta protetora mediada por IFN- γ em camundongos C3H.HeN infectados com *L. major*, quando comparados com a diminuída atividade destas células em camundongos BALB/c, sugerindo seu possível papel na resistência ou suscetibilidade do hospedeiro. A interação entre *Leishmania* e células NK parece levar à ativação destas células com produção de IFN- γ e aumento de sua atividade citotóxica (Nylen e cols., 2003). Há também evidências de que as células NK possam lisar células infectadas por *L. major* apesar de as moléculas envolvidas neste processo ainda não terem sido elucidadas (Wright e cols., 1983). Finalmente, foi demonstrado que células NK são capazes de ligar LPG da membrana de promastigotas de *L. major* através de um TLR na sua superfície. Esta ligação levaria a ativação da via do fator nuclear κ B (NF- κ B), aumentando, assim, a produção de IFN- γ e TNF- α , além da própria expressão do TLR-2 (Becker e cols., 2003).

Além dos macrófagos e células NK, as células dendríticas (DC) também atuam como células efectoras da imunidade inata contra a *Leishmania*. As DCs são células especializadas

na captura, transporte e apresentação de antígenos às células T virgens (Banchereau & Steinman, 1998; Lanzavecchia & Sallusto, 2001; Shortman & Liu, 2002).

Tem sido relatado que as células dendríticas encontradas na epiderme (células de Langerhans), ao se ligarem a antígenos estranhos através de seus PRRs, tornam-se ativadas e transportam antígenos parasitários da pele para os linfonodos drenantes, onde irão ativar as células T virgens (Moll, 2000; Banchereau e cols., 2000), sendo assim responsáveis pela transição para uma resposta imunológica adaptativa.

Foi visto que o LPG da *Leishmania* pode inibir a migração das células de Langerhans, dificultando sua chegada ao linfonodo (Ponte-Sucre e cols., 2001). A internalização tanto de amastigotas como de promastigotas de *L. major* está relacionada ao aumento da expressão de MHC classe I e classe II, bem como de moléculas coestimulatórias como o CD40 e B7 e ao aumento da produção de IL-12 (Moll e cols. 1993), sendo, portanto a principal responsável pelo direcionamento a uma resposta do tipo Th1. Estudos *in vitro* demonstraram que existem populações distintas de DCs e que nem todos os subtipos são igualmente suscetíveis à infecção por amastigotas de *L. major* (Henri e cols., 2002).

Células dendríticas (Moll e cols., 1995), assim como fibroblastos (Bogdan e cols., 2000), têm sido relacionados à persistência da *Leishmania* após a cura clínica de camundongos resistentes (Aebischer e cols., 1993), permitindo a manutenção da imunidade. Tais células podem apresentar continuamente antígenos de *Leishmania* às células T de memória, mantendo a imunidade. Na realidade, as DCs são consideradas as células apresentadoras de antígenos (APCs) mais poderosas, sendo as primeiras a produzirem IL-12 (Gorak e cols., 1998) e as únicas capazes de induzir uma resposta imunológica adaptativa primária, permitindo, assim, o estabelecimento de uma resposta imunológica específica (Hart, 1997). Essas células parecem ser também capazes de modificar diretamente a diferenciação de células T em Th1 ou Th2 (Boonstra e cols., 2003). DCs produzem IL-12 após infecção por *L. major* (McDowell e cols., 2002) ou *L. amazonensis* (Bennett e cols., 2001) em conjunto com estímulo através de CD40L, uma importante molécula coestimulatória. O mesmo, porém, não ocorre em infecções por *L. tropica* (McDowell e cols., 2002) ou *L. mexicana* (Qi e cols., 2001). Após o reconhecimento e processamento do antígeno estranho pelas APCs, estes são apresentados às células T virgens nos linfonodos, principalmente por DCs. O reconhecimento dos antígenos se dá no contexto das moléculas do MHC, onde antígenos conjugados ao MHC classe I são apresentados aos linfócitos T CD8⁺ e antígenos conjugados ao MHC classe II são apresentados aos linfócitos T CD4⁺. Para que os linfócitos que reconheceram os antígenos sejam ativados, eles necessitam de um segundo sinal de ativação, que é dado pela ligação de moléculas coestimulatórias, presentes na superfície das APCs, aos seus respectivos receptores

nos linfócitos T. Estas incluem o CD40 e a molécula B7-1 (CD80) (presentes nas APCs), que ligam-se ao CD40L ou ao CD28 (na superfície dos linfócitos). Por outro lado, a ligação de B7-2 (CD86) da APC com CTLA-4 na célula T fornece um sinal negativo que vai limitar a expansão desta célula (Rogers e cols., 2002).

Tem sido demonstrado que a ligação de CD40 com CD40 ligante (CD40L) induz a resistência à infecção por *L. major*, já que camundongos deficientes em CD40L são altamente suscetíveis à infecção (Campbel e cols., 1996; Kamanaka e cols., 1996). Embora o papel das moléculas B7 ainda não esteja claro, sua expressão em DCs influencia a imunidade contra *L. major*. Quando culturas de células epidérmicas enriquecidas por células de Langerhans foram infectadas com *L. major*, a expressão de B7-1 encontrava-se reduzida em culturas provenientes de camundongos BALB/c, enquanto que nas culturas com células provenientes de C3H, a molécula que se encontrava reduzida era B7-2 (Mbow e cols., 2001).

O tipo de célula T estimulada pelas APCs, assim como o padrão de citocinas liberadas no meio, influenciará o curso da infecção por *Leishmania* que é dependente de uma resposta celular, já que é um parasito intracelular.

A relevância do balanço/equilíbrio das subpopulações de linfócitos Th1/Th2, na regulação do curso da doença *in vivo*, provém de estudos no modelo murino com *L. major*. Esses estudos demonstram que a resistência à infecção por *L. major* está associada à diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em Th1, mas não em Th2. Neste modelo, a resposta do tipo Th1 leva à cura de lesões de leishmaniose cutânea experimental, enquanto a progressão da doença está associada a uma resposta do tipo Th2 (Liew & Millott, 1990; Heinzl e cols., 1991; Hondowicz & Scott, 2002).

Desta forma, nos animais suscetíveis à infecção por *L. major*, a produção de IL-4 é maior, direcionando a diferenciação dos linfócitos para subpopulações Th2. Estas produzem mais IL-4, inibindo a síntese de NO por macrófagos ativados, permitindo consequentemente a sobrevivência e multiplicação dos parasitos (Liew e cols., 1999). Por outro lado, em indivíduos naturalmente resistentes à leishmaniose cutânea ocorre uma grande produção de IL-12, direcionando a resposta para o padrão Th1. As células Th1 produzem IFN- γ , os quais ativam macrófagos que produzem NO e, consequentemente matam os parasitos intracelulares.

Tem sido relatado que a diferenciação da resposta imunológica em Th1 ou Th2 depende marcadamente das interações iniciais sofridas pelos linfócitos, como o tipo de antígeno reconhecido e o estímulo de citocinas (Paul & Seder, 1994; Scott e cols., 1988). Células T com TCR V β 4/V α 8 interagem com o antígeno LACK (Homólogo de *Leishmania* do receptor para *kinase C* ativada) de *Leishmania*, produzindo grandes quantidades de IL-4, polarizando a resposta para o tipo Th2 em camundongos BALB/c infectados por *L. major* (Launois e cols.,

1997). Embora a presença de IL-4 esteja relacionada com a indução de uma resposta do tipo Th2, enquanto que a de IL-12 esteja relacionada com uma resposta do tipo Th1, durante a fase inicial da infecção por *L. major*, tanto os camundongos suscetíveis quanto resistentes, demonstram uma resposta mista dos linfócitos T CD4⁺ com a produção de IL-12, IL-4 e IL-13. Estes dados indicam que a resposta pode ser redirecionada nas fases posteriores da infecção (revisado por Sacks & Noben-Trauth, 2002).

Do mesmo modo que os linfócitos T CD4⁺ podem diferenciar-se Th1 e Th2, as células T citotóxicas (Tc) CD8⁺ também podem diferenciar-se em linfócitos Tc1 e Tc2 (Ferrick e cols., 1995). Desta forma, Tc1 produz IFN- γ e TNF- α enquanto Tc2 secreta IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, sendo as duas últimas também secretadas por Tc1, porém em menor quantidade (Mosmann e cols., 1997). Também de modo semelhante aos padrões Th1 e Th2, a diferenciação em Tc1 parece ser estimulada por IFN- γ e IL-12, enquanto a diferenciação em Tc2 requer grandes quantidades de IL-4 em ausência de IFN- γ (Mosmann e cols., 1997). Ambas as populações têm ação citotóxica por via de perforina, uma vez que células provenientes de animais deficientes em perforina não demonstram atividade citotóxica por Tc1 nem por Tc2 (Mosmann e cols., 1997). Da mesma forma, ambas também são capazes de lisar células expressando moléculas Fas (Sad e cols., 1997).

Embora os linfócitos T CD4⁺ sejam considerados como os mais importantes na infecção por *Leishmania*, o papel dos linfócitos T CD8⁺ tem sido considerado no curso da infecção. Linfócitos T CD8⁺ têm sido associados ao fenótipo protetor em camundongos BALB/c reinfectados com *Leishmania*, devido à produção de IFN- γ (Müller e cols., 1993; Stefani e cols., 1994). Seu papel na infecção primária com altas doses de *L. major* por via subcutânea em camundongos C57BL/6 deficientes em CD8⁺ (Huber e cols., 1998) ou tratados por anticorpos anti-CD8⁺ (Titus e cols., 1987) não foi importante, pois os animais mantinham a habilidade de curar a lesão. No entanto, estudos com doses mais baixas e inoculação intradérmica mostraram que, além das células CD4⁺, as CD8⁺ também são necessárias para o controle da infecção na pele (Belkaid e cols., 2002a). A importância destas células na eliminação das amastigotas de células fagocitadas também foi demonstrada em camundongos BALB/c infectados por *L. donovani* que foram incapazes de controlar o parasitismo tecidual quando suas células CD8⁺ foram depletadas (Stern e cols., 1988).

A ação citotóxica mediada por perforina, assim como a indução de apoptose de macrófagos parasitados parecem ser os mecanismos candidatos pelos quais as células CD8⁺ tentam conter a multiplicação do parasito (Tsagozis e cols., 2003). Dados sugerem que a ação leishmanicida dos linfócitos CD8⁺ é modulada por IL-2 e envolve secreção de IFN- γ (Murray e cols., 1993; Lehmann e cols., 2000). Na realidade, alguns autores sugerem que o papel mais

importante dos linfócitos T CD8⁺, mas especificamente os Tc1, durante a infecção por *Leishmania* seja a produção de IFN- γ (Reiner & Locksley, 1995). Estas células poderiam, inclusive, ser responsáveis por regular a expressão desta citocina pelas células T CD4⁺ (Herath e cols., 2003). A produção de IFN- γ e TNF- α seriam importantes, via ativação de macrófagos, para a eliminação das amastigotas liberadas após a lise da célula hospedeira pelo linfócito citotóxico, uma vez que foi evidenciado que as amastigotas liberadas mantêm a sua infectividade e podem infectar os macrófagos vizinhos (Smith e cols., 1991). A liberação destas amastigotas, que estavam em células incapazes de combatê-las, e sua disponibilização para células mais aptas, como, por exemplo, macrófagos ativados, parece ser um importante papel das células T CD8⁺ (Sacks & Noben-Trauth, 2002).

Enquanto as células T estão associadas à resolução das lesões por *Leishmania*, as células B e anticorpos têm sido implicadas na suscetibilidade à infecção. Camundongos que carregam uma mutação na molécula Btk (Xid), a qual está relacionada com a alteração da sinalização mediada por receptor nas células B convencionais e com a ausência de células B1, apresentam uma resistência aumentada à leishmaniose experimental (Hoerauf e cols, 1994). Entretanto, a ausência total desta população de linfócitos pode levar a uma patologia exacerbada nos camundongos deficientes em linfócitos B (camundongo *knockout* (KO) para a região transmembranar da molécula de imunoglobulina) infectados com *L. donovani*, que pode ser revertida pela transferência de imunoglobulinas (Smelt e cols, 2000). Outro estudo, utilizando camundongos tratados com anti-IgM e infectados com *L. tropica*, demonstrou que as células B são necessárias para a geração de células T supressoras, as quais estão implicadas na supressão da hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania* e consequente suscetibilidade observada em camundongos BALB/c. Apesar disso, nos camundongos resistentes depletados de células B a diminuição da resistência era transitória, já que esta linhagem era capaz de resolver as lesões (Sacks e cols., 1984).

1.3.1. Citocinas envolvidas na resposta imunitária

O processo inflamatório causado pela infecção por *Leishmania* é modulado por várias citocinas, as quais podem ser determinantes na resolução ou na progressão das lesões.

O IFN- γ é considerado a principal citocina que participa da resposta imunológica do hospedeiro contra a *Leishmania*. Os linfócitos T e as células NK são as principais fontes de produção do IFN- γ (Charley & Bonnardiere, 1993) apesar de já ter sido provado que também pode ser produzida por macrófagos e células dendríticas (Frucht e cols., 2001). Dentre as principais atividades do IFN- γ estão a estimulação da resposta inata através das células NK, estímulo da atividade citotóxica específica, baseada no reconhecimento de antígenos

associados a moléculas de MHC e, principalmente, ativação de macrófagos (Boehm e cols., 1997). O IFN- γ aumenta a expressão de IL-12 por macrófagos e monócitos (Trinchieri, 1995) e, em camundongos, atua na troca de classe de anticorpos de IgM para IgG2a e IgG3 (Snapper e cols., 1992; Collins & Dunnick, 1993). Finalmente, ela ainda atua no aumento da expressão de MHC I e II (Revel & Chebath, 1986), sendo este último estimulado em quase todas as células, com exceção para os linfócitos B, nos quais ele na realidade antagoniza o aumento de expressão provocado por IL-4 (Mond e cols., 1986). Entre os mecanismos de evasão da *Leishmania* foi demonstrado que *L. donovani* (Nandan & Reiner, 1995), *L. major* e *L. mexicana* (Bhardwaj e cols., 2005) inibem a ação do IFN- γ , atuando diretamente em sua via de sinalização intracelular. Em camundongos que conseguem controlar a infecção observam-se quantidades significativas dessa citocina, indicando assim que ela participa de forma significativa na proteção do hospedeiro (Sadick e cols., 1986).

O IFN- γ e o TNF- α contribuem para o aumento da ação microbicida dos macrófagos (Titus e cols., 1989; Scott, 1991) por aumentar a produção de NO pela indução da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Deng e cols., 1993). Este, por sua vez, possui uma ampla gama de atividades biológicas (Pfeffer, 2003), tais como indução de choque, potente ação pró-inflamatória e ainda mediador capaz de estimular monócitos, eosinófilos, neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos (Beutler & Cerami, 1988). O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos ativados, mas também por células T e B, células NK, fibroblastos e células endoteliais (Derouich-Guergour e cols., 2001). Em doenças infecciosas o TNF- α tem sido descrito como mediador de resistência, controlando o parasitismo intracelular e limitando a duração do processo inflamatório (Derouich-Guergour e cols., 2001).

A comprovação da importância do TNF- α no controle da leishmaniose foi feita administrando-se anticorpos anti-TNF- α em camundongos CBA. Esses camundongos, que são geneticamente resistentes à infecção por *L. major*, desenvolveram lesões cutâneas relativamente maiores que os animais do grupo controle, ao passo que a injeção de TNF- α no sítio primário reduziu significativamente o tamanho da lesão (Liew e cols. 1990). Em outro estudo, foi visto que camundongos C3H, resistentes à infecção por *L. major*, produzem quantidades significativas de TNF- α , enquanto que camundongos BALB/c, suscetíveis, não produzem níveis detectáveis desta citocina (Titus e cols., 1989), confirmando a capacidade protetora do TNF- α na inibição da multiplicação da *Leishmania* (Titus e cols., 1989).

Por outro lado, no homem, títulos altos de TNF- α não parecem estar associados à proteção contra *Leishmania* (Pisa e cols., 1990). Pacientes com formas mais graves da doença,

especialmente com lesões mucosas ativas (da-Cruz e cols., 1996), forma visceral ativa (Barral-Netto e cols., 1991) e forma difusa (Pisa e cols., 1990) estavam associadas a altos níveis desta citocina. Como a forma mucocutânea tem sido associada a uma resposta imunológica exacerbada, pode ser que os altos níveis de TNF- α neste caso estivessem associados ao agravamento da lesão (Da-Cruz e cols., 1996), o que não explicaria os resultados encontrados na forma visceral e difusa, uma vez que, nestas doenças, a resposta imunológica é tida como reduzida.

Ao mesmo tempo em que atua em sinergia com TNF- α , o IFN- γ antagoniza IL-4. Esta citocina tem sido descrita principalmente por induzir diferenciação e proliferação em células Th2 (Paul, 1997), auxiliando linfócitos B e, em camundongos, influenciando na troca de classe de anticorpos de IgM para IgG1 e IgE (Choi & Reiser, 1998). Ela ainda aumenta a expressão de MHC II em linfócitos B (Noelle e cols., 1984), assim como a expressão do seu próprio receptor (Ohara & Paul, 1988). Ela é produzida principalmente por células Th2, basófilos e mastócitos (Nelms e cols., 1999), podendo ainda ser expressa em linfócitos $\gamma\delta$ (Ferrick e cols., 1995) e eosinófilos (Dubucquoi e cols., 1994). A IL-4 atua também modulando a expressão de moléculas de adesão em células vasculares, tendo assim um importante papel na inflamação. Desta forma, a IL-4 favorece o recrutamento de células T e eosinófilos, ao invés de granulócitos para o sítio da inflamação (Nelms e cols., 1999).

Kopf e cols., em 1996, mostraram que camundongos BALB/c, normalmente suscetíveis à *L. major* tornavam-se resistentes quando tinham o seu gene para IL-4 deletado. Estes animais, porém não tinham alterada a secreção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-12 e mantinham a atividade de iNOS (Kopf e cols., 1996). No mesmo ano, porém, Noben-Trauth e cols. (1996) não viram qualquer alteração na suscetibilidade de camundongos BALB/c que haviam tido o gene da IL-4 deletado em suas células tronco embrionárias. Mais tarde também mostraram que animais depletados do receptor para IL-4 tampouco se tornavam mais resistentes à infecção por *L. major* (Noben-Trauth e cols., 1999). Kopf e cols. (2003) sugerem que as diferenças observadas possam ser devidas a variações nas cepas de parasitos utilizadas, assim como na idade dos animais no momento da infecção. Outra observação contraditória quanto ao papel da IL-4 foi demonstrada por Louis e cols. (2003). Eles viram que quando a IL-4 é administrada nas primeiras horas de infecção, antes do desenvolvimento de uma resposta T dependente, ela atua induzindo a produção de IL-12 por DCs, o que favorece a resolução da infecção. Quando, no entanto, ela é administrada mais tardiamente, induz o desenvolvimento de uma resposta Th2, associada à suscetibilidade.

A IL-12 é um heterodímero formado pelas subunidades p40 e p35 e produzida, principalmente, por células fagocíticas profissionais, células apresentadoras de antígenos, por

células T, particularmente pelas subpopulações Th0 e subpopulações Th1. As células T CD8⁺ também podem produzi-la, mas em pequena quantidade. Essa citocina em conjunto com o TNF- α e IFN- γ contribui para o aumento da resolução da infecção por *L. major*, ou seja, induz a uma resposta do tipo Th1 (Belosevic e cols., 1990a; Belosevic e cols., 1990b). Uma das principais funções biológicas da IL-12 é estimular a produção de IFN- γ pelas células NK e pelos linfócitos T, que por sua vez vai atuar sobre células fagocíticas, aumentando sua capacidade parasiticida e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a própria IL-12 (Trinchieri, 1998). Além disso, aumenta a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ e das células NK (Abbas e cols., 2000) e promove a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ para respostas celulares do tipo Th1 (Park & Scott, 2001), inibindo sua diferenciação em Th2, atuando, assim, não somente como uma citocina pró-inflamatória, mas também como um potente imunorregulador da resposta celular (Trinchieri, 1998).

O papel da IL-12 no início da infecção por *Leishmania* é incontestável e diversos autores defendem que, uma vez que uma resposta Th1 foi estabelecida sua função efetora *in vivo* é independente de IL-12 (Constantinescu e cols., 1998). No entanto, trabalhos mais recentes defendem o papel desta citocina na manutenção de uma resposta Th1. Isso porque camundongos KO para IL-12 reconstituídos com células Th1 obtidas de camundongos singênicos, que haviam curado uma infecção primária por *L. major*, não foram capazes de resistir a uma infecção pelo mesmo parasito (Park & Scott, 2001). A leishmânia pode inibir a produção de IL-12 (Carrera e cols., 1996) interferindo na síntese de IFN- γ , o que consequentemente contribui para a diminuição dos efeitos microbicidas dos macrófagos. O tratamento de camundongos com IL-12 recombinante confere a estes animais resistência à infecção por *L. major*. Ficou demonstrado que após esse tratamento, os animais produzem IFN- γ e, portanto, há um predomínio da resposta do tipo Th1 (Heinzel e cols., 1993; Heinzel e cols., 1995a; Heinzel e cols., 1995b).

Enquanto IFN- γ e TNF- α estão associadas à ativação de macrófagos (Stafford e cols., 2002), o TGF- β foi caracterizado por inativar os processos fisiológicos dos macrófagos, mediando à imunossupressão da produção de IFN- γ e favorecendo a replicação e sobrevivência do parasito dentro da célula (Belkaid e cols. 2002b, Gorelik e cols. 2002).

O TGF- β é uma proteína homodimérica produzida por uma ampla gama de células, incluindo macrófagos, células NK, T e B (Omer e cols., 2000). Tem ação na diferenciação celular, adesão e migração, estando envolvido em diferentes processos tais como: inflamação, reparo de tecido, fibrose, entre outros (Omer e cols., 2000). Esta citocina pode ter um papel pró ou antiinflamatório dependendo da sua concentração (Wahl, 1994).

Desta forma, o TGF- β recruta monócitos, células T e neutrófilos para o sítio da inflamação no início da infecção, através da modulação das moléculas de adesão na superfície de células endoteliais (Omer e cols., 2000). No entanto, em altas concentrações suprime a produção de TNF- α e NO por macrófagos (Espevik e cols., 1987) e IFN- γ e TNF- α por células NK (Bellone e cols., 1995), tendo ainda sido visto como inibidor da expressão e atividade de IL-12 (Bogdan & Rollinghoff, 1998).

Na infecção de camundongos BALB/c por *L.amazonensis*, ocorre uma grande liberação de TGF- β nas primeiras 24 horas de infecção (Reed, 1999) e o tratamento com anticorpo neutralizante anti-TGF- β , em camundongos com 4 semanas de infecção, leva a uma diminuição da carga parasitária e aumento dos níveis de NO na lesão (Reed, 1999), mostrando a influência desta citocina na desativação do macrófago. De modo semelhante, a produção de TGF- β ativo pode estar envolvida na falta de resposta antigênica associada à leishmaniose visceral (Carvalho e cols., 1985; 1994). Wilson e cols. (1998) mostraram que o TGF- β produzido em granulomas do fígado foi, em parte, responsável pela inibição da liberação de IFN- γ pelas células T CD4⁺. Barral e cols. (1995) mostraram que o TGF- β está presente na lesão de pacientes com leishmaniose cutânea. Em pacientes com lesão que evolui para cura espontânea, sua presença se dá de modo passageiro no início da infecção, porém em pacientes com lesões mucocutâneas ou disseminadas, o TGF- β aparece de forma persistente, estando, provavelmente, relacionado à falta de capacidade do organismo em eliminar o parasito.

Outro potente desativador de macrófagos é a IL-10. Esta citocina foi primeiramente descrita como fator inibidor de síntese, uma vez que atua na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-12, e quimiocinas pelo macrófago (Conti e cols., 2003). IL-10 recombinante foi capaz de suprimir a liberação de TNF- α e reativos oxigenados por macrófagos peritoneais de camundongos de maneira independente de TGF- β (Bogdan e cols., 1991). A IL-10 é produzida por macrófagos, células T e B, além de mastócitos, queratinócitos, entre outras células (Conti e cols., 2003) e influencia nas atividades de diferentes tipos celulares, incluindo células T, B e NK, mastócitos, DCs e granulócitos (Moore e cols., 2001). Acredita-se que sua ação na supressão da produção de citocinas e quimiocinas se dê pela inibição da via do NF- κ B (McInnes e cols., 2001). A IL-10 ainda inibe a produção de IFN- γ por células T e diminui a expressão de moléculas MHC II por monócitos, diminuindo, assim a expansão de células T (Hashimoto e cols., 2001).

O papel da IL-10 nas infecções por *Leishmania* foi estudado por muitos autores uma vez que a severidade da leishmaniose visceral e a progressão da lesão em pacientes com leishmaniose cutânea têm sido associadas a altos níveis de IL-10 (Ghalib e cols., 1993; Louzir

e cols., 1998). Camundongos deficientes para IL-10 foram capazes de controlar a infecção, mesmo após a infecção com altas doses de *L. major* (Kane & Moseer, 2001). Da mesma forma, animais tratados com anticorpos neutralizantes anti-IL-10 após a infecção por este parasito, mostraram forte redução da lesão (Chatelain e cols., 1999). Células CD4⁺ de camundongos suscetíveis à infecção por *L. major* apresentam uma maior expressão de IL-10 que células provenientes de camundongos resistentes (Chatelain e cols., 1999). Camundongos BALB/c KO para IL-10 também se mostraram resistentes à infecção por *L. (L.) donovani*, com aumento na produção de IFN- γ (Murphy e cols., 2001). Por outro lado, a utilização de anticorpos neutralizantes anti-IL-10 só foram capazes de reduzir parcialmente a infecção por *L. mexicana* e *L. amazonensis* (Padigel e cols., 2003). A resolução da infecção foi, porém, mais significativa quando os animais foram neutralizados tanto para IL-10, quanto para IL-4 (Padigel e cols., 2003).

1.4. Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma complexa rede de macromoléculas relativamente estáveis e de diferentes naturezas que são produzidas, exportadas e complexadas pelas células, modulando a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos, mantendo sua integridade e também oferecendo base para aderência de células. A MEC é especialmente abundante nos tecidos conjuntivos, mas apresenta papel fundamental também nos demais tecidos. No tecido conjuntivo denso assegura a resistência e elasticidade pela sua riqueza em colágeno e elastina. No tecido conjuntivo frouxo os agregados de proteoglicanas asseguram a manutenção de um ambiente hidratado que permite a difusão de nutrientes e catabólitos. A MEC pode ter uma função especializada como membrana basal, sendo composta por isoformas de colágeno tipo IV, proteoglicanos (perlecan) e glicoproteínas (laminina e entactina).

A MEC é dividida em dois componentes principais:

- Matriz fibrilar:
 - Fibras colágenas;
 - Fibras elásticas.
- Matriz não-fibrilar:
 - Glicosaminoglicanos (sulfato de condroitina, ácido hialurônico);
 - Proteoglicanos (GAGs + proteínas);
 - Glicoproteínas (fibronectina, laminina, condronectina);
 - Enzimas (Metaloproteinases).

Estes componentes interagem fortemente entre si e entre as células a fim de manter a integridade estrutural de diversos tecidos. Essas interações também sustentam importantes eventos celulares como migração, proliferação, diferenciação e apoptose (Huxley-Jones e cols., 2007, Aumailley & Gayraud, 1998). É uma estrutura bastante dinâmica que realiza importante papel no processo de desenvolvimento normal bem como em várias patologias.

1.4.1. Colágenos

O colágeno é a proteína mais abundante no organismo, perfazendo entre 25 e 30% das proteínas corporais e participam de diferentes formas da MEC (Myllyharju & Kivirikko, 2004). Pertence a uma grande família de proteínas compostas por 29 membros que estão divididos em diferentes subfamílias (Myllyharju & Kivirikko, 2004). Os colágenos fibrilares (colágenos I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII) têm a habilidade de formar grandes fibrilas que são responsáveis pela força tensil dos tecidos. Os colágenos também podem formar filamentos finos (colágeno IV), fibrilas de ancoramento (colágeno VII) e grandes redes (colágenos IV, VIII e X). Além destes, a família colágeno também contém membros que ancoram a membrana basal ao estroma, chamados de multiplexinas (colágenos XV e XVIII). Outro subgrupo de colágenos (colágenos XIII, XVII, XXIII e XXV) é capaz de formar proteínas transmembrana devido a suas subunidades α possuírem domínios transmembrana (Franzke e cols., 2005).

Todos os colágenos são formados pela mesma estrutura básica, uma tripla hélice composta por cadeias α . A estrutura primária dessas cadeias consiste de uma repetição de Gly-X-Y, onde a glicina é essencial na formação da tripla hélice. X e Y podem representar qualquer aminoácido, mas geralmente correspondem a prolina e hidroxiprolina respectivamente.

Em humanos, vários receptores na superfície celular podem reconhecer e se ligar ao colágeno. Dependendo do motivo que os receptores reconhecem no colágeno, eles podem ser divididos em quatro grupos (Heino, 2007):

- ◆ Grupo 1 - receptores tais como glicoproteínas VI (Smethurst e cols., 2007), *platelet collagen receptor*, e LAIR-1 (*leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1*) (Lebbink e cols., 2006), um receptor que suprime a função dos linfócitos;
- ◆ Grupo 2 – membros da família das integrinas e dois receptores do domínio discoidina (DDR1 e DDR2) (Vogel e cols., 1997; Shrivastava e cols., 1997);
- ◆ Grupo 3 – receptores que se ligam a motivos críticos nos colágenos desnaturados (Gullberg e cols., 1992);

- ♦ Grupo 4 – receptores que se ligam a domínios não-colágenos.

O colágeno tipo I é o mais abundante e o mais estudado, sendo produzido por fibroblastos e seu grau de polimerização máxima confere maior capacidade de resistir a tensões, formando mais de 90% da massa orgânica dos ossos e é o principal colágeno de tendões, pele, ligamentos, córnea e de vários interstícios (Lochner e cols., 2006; Gelse e cols., 2003; Aumailley & Gayraud, 1998). A tripla hélice do colágeno tipo I está usualmente na forma de um heterotrímero com duas cadeias $\alpha 1(I)$ idênticas e uma cadeia $\alpha 2(I)$. *In vivo*, as fibras em tripla hélice estão na maioria das vezes associadas ao colágeno tipo III ou tipo V. O colágeno tipo III é um homotrímero de três cadeias $\alpha 1(III)$ e amplamente distribuído nos tecidos que contêm colágeno tipo I e fibras do sistema elástico (oxitalânicas, elaunínicas e elásticas). Esse tipo de colágeno é produzido pelas células do músculo liso e células reticulares, conferindo ao músculo liso, tecido hematopoético e nervos as suas propriedades devido a média polimerização de suas fibrilas (Junqueira & Carneiro, 2000). Os membros da família colágeno IV (Kühn, 1995) compõe aproximadamente 50% de todas as membranas basais (LeBleu e cols., 2007), e são caracterizados por sua habilidade de formar complexos e se integrar a laminina, ao nidogênio e a outros componentes, participando do processo de montagem da membrana basal (Timpl e cols., 1981; Yurchenco & Furthmayr, 1984). Seis cadeias individuais foram identificadas: $\alpha 1(IV)$ - $\alpha 6(IV)$, que se liga a 3 promotores distintos, $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(IV)$, $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(IV)$ e $\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6(IV)$ (Boutaud e cols., 2000; Hudson e cols., 2003).

1.4.2. Fibronectina

A Fibronectina está envolvida em vários processos celulares, ajudando a organizar a interação celular, além de participar na embriogênese, reparo tecidual e na formação do coágulo sanguíneo. Além disso, serve como uma molécula de adesão, ancorando células e patógenos. Pode ser encontrada no plasma sanguíneo e em outros fluidos corporais na forma solúvel, enquanto na MEC apresenta-se como uma forma multimérica insolúvel. (Henderson, 2011). Estruturalmente, esta proteína é composta por duas cadeias não idênticas de 230-270 kDa ligadas covalentemente por suas regiões C-terminais por pontes dissulfeto. Cada cadeia é composta de uma série de módulos ou domínios repetitivos: 12 módulos tipo I, 2 tipo II, 15 a 18 (dependendo do *splicing*) tipo III e uma região variável ou IIIICS. Todos esses módulos são resultantes do *splicing* alternativo de um único gene (Patel e cols., 1997). O arranjo diferencial destes módulos proporciona uma variedade de formas, gerando em torno de 20 variantes da fibronectina humana e duas formas principais: celular e plasmática (Ffrench-Constant, 1995; Kosmehl e cols., 1996).

A fibronectina ancora-se a superfície celular através da ligação direta dos módulos

III8-III10, mais precisamente na região da sequência Arg-Gly-Asp (RGD) (Liao e cols., 1992), a $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha IIb\beta 3$ integrinas, podendo também se ligar através de outras substâncias como fibrina, heparina, colágeno, e integrinas $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 4\beta 7$ (Lobb & Hemler, 1994).

A fibronectina está envolvida na patogênese de múltiplas doenças, tanto infecciosas quanto não infecciosas. Ela funciona como um alvo para moléculas adesivas presentes na superfície de células e patógenos, atuando como um substrato para diferentes células que possuem ligantes específicos para ela.

1.4.3. Laminina

As lamininas são uma família de glicoproteínas heterotriméricas que tem um papel significativo na montagem e arquitetura da membrana basal, além de regular a diferenciação, adesão e migração celular (Julia Tzu & Peter Marinkovich, 2008).

Estruturalmente, são formadas por três subunidades: α , β e γ , existindo 5 tipos de cadeias α , quatro β e três γ (Miner & Yurchenco, 2004), que, diferente da fibronectina, são codificadas por 3 genes distintos. Estas cadeias podem ser arranjadas em diferentes combinações, formando um trímero de arranjo cruciforme, com tamanho que varia entre 400–900 kDa. Além das diferentes combinações, um *splicing* alternativo das cadeias também pode ocorrer, criando um enorme número de possibilidades, mas apesar disso, somente 15 tipos de lamininas diferentes foram identificadas em mamíferos (Aumailley e cols., 2005). As cadeias α estão envolvidas com interações com receptores celulares como integrinas (Patarroyo e cols. 2002). Já as cadeias β e γ estão envolvidas nas interações com moléculas da MEC (Gerl e cols., 1991; Chen e cols., 1999 Gersdorff e cols., 2005).

São as proteínas estruturais não colágenas mais abundantes da membrana basal (Timpl e cols., 1979), sendo produzidas por células mesenquimais e epiteliais que as depositam dentro desta membrana (Patarroyo e cols. 2002), sendo incorporadas a ME por interações com outras moléculas como colágeno IV, nidogenio, fibulina e outras lamininas.

1.5. Matrix extracelular x *Leishmania sp.*

Uma vez no interior do hospedeiro vertebrado, as leishmânias estão expostas a um novo microambiente na pele composto principalmente da frouxa matriz do tecido conjuntivo, formado por proteínas fibrosas envolvidas por glicosaminoglicanas e proteoglicanas (McGwire e cols, 2003, Lira e cols., 1997). A capacidade de alguns patógenos de invadir tecidos de hospedeiros depende do reconhecimento mútuo de moléculas de superfície da célula hospedeira e do parasito durante o processo de adesão. Estudos indicam que parasitos do gênero *Leishmania* possuem moléculas de adesão em sua superfície e que, pelo menos na

espécie *Leishmania mexicana*, devem ser responsáveis pela interação com moléculas da MEC durante os estágios iniciais da infecção (Lira e cols., 1997). Vários ligantes têm sido demonstrados na interação entre a *Leishmania* e a célula hospedeira. A presença de moléculas de adesão pode estar envolvida na patogenia da leishmaniose e pode explicar a preferência de certas espécies pela pele, onde há abundância de componentes da MEC (Lira e cols., 1997). Os componentes da MEC interagem entre si e demonstram grande interdependência. A modificação de um deles seja por um fator intrínseco (sistêmico, genético ou relacionado à idade) ou extrínseco (ambiental), poderá acarretar consequências para todo o tecido. Tais alterações, apesar de raramente seguirem um padrão para determinadas enfermidades, podem servir para confirmação de diagnósticos (Holbrook & Byers, 1989). Chang e McGwire (2002) demonstram que formas promastigotas quando inoculadas na pele, ligam-se preferencialmente ao colágeno do tipo I, e que esta interação é específica e saturável.

As leishmânias possuem em sua superfície uma proteína conhecida como leishmanolisina, presente tanto nas formas amastigota, quanto promastigota. Esta proteína degrada a fibronectina do hospedeiro, liberando múltiplos fragmentos que tem a capacidade de regular a produção de intermediários reativos de oxigênio em macrófagos infectados. Kulcani e colaboradores (2008) sugerem que *Leishmania* spp. interagem com a fibronectina através de um receptor específico e que os parasitos a degradam utilizando dois sistemas de proteases. Esta degradação promove a invasão local da MEC e os produtos resultantes desta degradação podem influenciar o estado de ativação dos macrófagos do hospedeiro. A ligação de macrófagos a fragmentos de peptídeos contendo o domínio ICS (segmento de ligação a fibronectina) podem diminuir a expressão de algumas citocinas como IFN- γ , IL-12, MCP-1 e TGF- β (Korom e cols., 1998). Por outro lado, a interação entre o macrófago e a fibronectina I intacta leva a um aumento da secreção de TNF- α (Beezhold & Personius, 1992). Além de modular a atividade dos macrófagos, a habilidade para degradar componentes da MEC aumenta as chances de acesso do parasito às circulações linfática e sanguínea e facilitando a migração de macrófagos infectados (McGwire e cols., 2003). Outro papel desta proteína na infecção por *Leishmania* spp. é de interagir com receptores para fibronectina facilitando a infecção dos macrófagos pelos parasitos, além de estabilizar a adesão complemento dependente entre parasitos e macrófagos, permitindo rápida e eficiente fagocitose (Brittingham e cols., 1999). A fibronectina também tem sido considerada como um importante participante da interação do parasito com os fagócitos mononucleares, uma vez que macrófagos humanos e de camundongos sintetizam e secretam esta proteína (Vannier-Santos e cols., 1992, Wyler e cols., 1985). Ela agiria influenciando consideravelmente a fagocitose em vários sistemas celulares e modulando a resposta imunológica, assim como

vários outros componentes da MEC, tais como: laminina, colágenos, trombospondina, entre outros, os quais podem regular as funções dos macrófagos levando a um aumento da invasão (revisado por Vannier-Santos *e cols.*, 1992; Brittingham *e cols.*, 1999).

Trabalhos de nosso grupo demonstraram que a infecção por *L. amazonensis* causa alterações na MEC e que essas alterações estão relacionadas a carga parasitária. Camundongos BALB/c, C57BL/6 e DBA/2 apresentaram diferentes graus de suscetibilidade a infecção cutânea por *L. amazonensis*. Estas alterações foram mais evidentes nos camundongos BALB/c, sensíveis à *Leishmania*, os quais apresentaram maior destruição tecidual e uma importante diminuição da expressão de fibronectina ocorria nos locais onde havia uma maior carga parasitária. Um discreto decréscimo na expressão de fibronectina foi observado nas áreas onde havia a presença de amastigotas nos camundongos DBA/2, os quais apresentam em geral menor carga parasitária quando comparados com os camundongos BALB/c ou C57BL/6 (Abreu-Silva *e cols.*, 2004). Estes resultados sugerem que formas amastigotas podem estar diretamente envolvidas na degradação dos componentes da matriz extracelular como sugerido por McGwire *e cols.*, (2003). Além das alterações na fibronectina, também foi demonstrado que, na fase inicial da infecção, há uma predominância de colágeno I na lesão primária, que na fase tardia é substituído gradualmente pelo colágeno III (Abreu-Silva *e cols.*, 2004).

A expressão de fibronectina também foi estudada em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* (= *L. infantum*), demonstrando um maior aumento na expressão dessa proteína no fígado de cães sintomáticos do que nos assintomáticos (Melo *e cols.*, 2009).

A fibronectina também pode se ligar a promastigotas de *Leishmania*, *in vitro*, e atuar favorecendo sua associação a fagócitos mononucleares (Wyler *e cols.*, 1985). Estudos utilizando culturas de células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19) infectadas por *L. amazonensis* demonstraram que a produção de fibronectina é modulada pelo parasito. Após 24 horas de infecção, quando a quantidade de parasitos aderidos e internalizados era elevada, havia um aumento na expressão de fibronectina. No entanto, uma diminuição na expressão foi observada 72 horas após a infecção, quando a carga parasitária era reduzida.

1.6. Modelos experimentais

Muitos modelos experimentais têm sido utilizados para o estudo das leishmanioses com o intuito de estudar a patogênese destas doenças e o desenvolvimento de vacinas.

A infecção de cobaias com *L. enriettii* foi o primeiro modelo a ser bem caracterizado. O mais interessante deste modelo animal é o fato de que a infecção é bastante similar a observada na leishmaniose cutânea que ocorre em humanos infectados com *L. major* (Mauel *e*

cols., 1981). Devido a esta característica, o cobaio foi utilizado em estudos de hipersensibilidade retardada (DTH), em infecções experimentais com outras espécies de *Leishmania* (Gorczynski, 1983) e em testes cutâneos para diagnóstico. Além do cobaio, o hamster também tem sido utilizado em estudos histopatológicos, de eficiência de drogas, e testes de vacinas, por serem hospedeiros suscetíveis (Lupasco e cols., 1961; Robledo e cols., 2012; Kushawaha e cols., 2012).

Devido ao desenvolvimento em larga escala de estudos imunológicos e avanço sobre o conhecimento das características genéticas do hospedeiro na evolução da infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, o camundongo tornou-se o modelo central no estudo da imunopatologia da doença, reproduzindo uma patologia similar à encontrada no homem, tanto nas formas tegumentares, quanto visceral da doença, dependendo da linhagem utilizada.

Estudos utilizando diferentes linhagens de camundongos infectados com *L. major* evidenciaram uma diferença importante na capacidade de controlar a infecção por *Leishmania*. Camundongos BALB/c são extremamente suscetíveis à infecção, desenvolvendo grandes úlceras que podem se espalhar por todo o corpo do animal, levando a morte; por outro lado, camundongos C57BL/6 e CBA/N são resistentes, desenvolvendo pequenas lesões autorresolutivas, e tornando-se resistentes à reinfecção (Preston & Dumonde, 1976); enquanto a maioria das outras linhagens exibe um comportamento intermediário de suscetibilidade/resistência. Resultados obtidos recentemente em nosso laboratório mostraram que uma cepa de *L. amazonensis*, isolada de um caso humano da região Centro-Oeste do Brasil, se comporta de maneira semelhante quando inoculada por via subcutânea em diferentes linhagens de camundongos singênicos (Souza, 2002).

A resistência/suscetibilidade do camundongo a leishmânia está, em grande parte, relacionada ao *background* genético das diferentes linhagens de camundongos empregadas nestes estudos. *Loci* murinos, tais como *Nramp 1 (Lsh)* e *H-2*, têm sido descritos como determinantes no controle da leishmaniose visceral, com *Lsh* atuando na resposta imune inata (Barton e cols., 1995) e o *locus* H-2 sendo crítico na resposta imunológica adquirida desenvolvida contra *L. infantum* no fígado (Leclercq e cols., 1996). Enquanto o crescimento do parasito pode ser controlado em camundongos com *Nramp 1 (Lsh)* selvagem (CBA), camundongos mutantes para este gene (BALB/c e C57BL/6) não são capazes de controlar o crescimento do parasito, apresentando 50 a 100 vezes mais amastigotas em seus fígados que os selvagens (Blackwell, 1989; Crocker e cols., 1984). A expressão desta resistência natural é independente de células T e outros aspectos da imunidade adquirida. Embora a maioria dos camundongos mutantes para *Nramp 1 (Lsh)* eventualmente controlem a infecção hepática, a taxa e a efetividade neste controle é determinada em grande parte por genes do MHC (Kaye e

cols., 2004).

Outros parâmetros como dose, via de inoculação, espécie/isolado e estágio evolutivo do parasito, assim como idade, sexo, condições nutricionais e genéticas do hospedeiro, estão relacionados a este padrão de resistência/suscetibilidade, e podem explicar os dados contraditórios que se observam na literatura com relação a essa diferença em linhagens isogênicas de camundongos infectados por *Leishmania* (Bradley & Kirkley, 1977).

Desta forma, o estudo da imunidade celular e humoral na leishmaniose experimental no modelo murino se faz importante para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência e suscetibilidade a esta infecção.

2. OBJETIVOS

Objetivos

Geral: Estudar diferentes parâmetros imunopatológicos em linhagens de camundongos isogênicos infectados por *Leishmania amazonensis*, avaliando os padrões de resposta relacionados ao grau de resistência ou suscetibilidade à infecção.

Específicos:

- comparar a cinética das lesões primárias entre as linhagens de camundongos utilizadas;
- caracterizar o infiltrado inflamatório da lesão primária e de órgãos como linfonodo, fígado e baço;
- determinar por imunohistoquímica as populações celulares presentes no infiltrado inflamatório da lesão primária e linfonodo;
- avaliar a produção de anticorpos anti-*Leishmania* nas diferentes linhagens de camundongos;
- determinar o perfil de citocinas produzido/expresso no soro, lesão primária, linfonodo, fígado, baço e no sobrenadante de cultura de linfócitos das linhagens estudadas;
- quantificar a carga parasitária das lesões cutâneas, linfonodos de drenagem, fígado e baço e verificar as diferenças na capacidade de visceralização da *Leishmania amazonensis* em diferentes pontos da infecção;
- analisar as alterações dos componentes da matriz extracelular na infecção;
- analisar a interrelação entre a produção de citocinas e sua influência nas alterações dos componentes da matriz extracelular.

3. ARTIGOS

3.1. ARTIGO 1

Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice

Immunopathological Studies of *Leishmania amazonensis* Infection in Resistant and in Susceptible Mice

Flávia de Oliveira Cardoso,^{1,2} Celeste da Silva Freitas de Souza,¹ Verônica Gonçalves Mendes,³ Ana Lúcia Abreu-Silva,⁴ Sylvio Celso Gonçalves da Costa,¹ and Kátia da Silva Calabrese¹

¹Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, ²Laboratório de Diagnóstico, Ensino e Pesquisa, Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria/ENSP/FIOCRUZ, ³Experimentação animal/IOC/FIOCRUZ, and ⁴Departamento de Patologia, Universidade Estadual do Maranhão, Rio de Janeiro, Brazil.

Leishmania amazonensis infection was studied in mice to evaluate the evolution of leishmaniasis. The association of different methods, such as lesion kinetics, limiting dilution analysis, and immunohistochemistry, established different levels of susceptibility and resistance. Mice were arranged in 3 groups: susceptible (C57BL/10 and CBA), relatively resistant (DBA/2), and resistant (C3H.He). The histopathological analysis of primary lesions and draining lymph nodes showed a predominance of eosinophils and mast cells in the initial phase of infection in all mice. However, the most susceptible mice presented a greater number of amastigotes and higher tissue damage. The immunoglobulin analysis showed that susceptible mice produced high levels of antibodies, whereas resistant and relatively resistant mice exhibited low production of antibodies. Resistant mice showed parasite persistency in the skin and lymph nodes, suggesting that the infection in these mice can be sustained through the infection of cells such as dendritic cells, fibroblasts, and other cells present in these organs.

Leishmaniasis is a spectral disease that ranges from spontaneously healing skin lesions to destructive and disfiguring lesions of the mucosal form, to fatal visceral leishmaniasis [1]. The clinical manifestations of leishmaniasis depend on the species initiating the infection, the interaction between parasite and host genetics, concomitant infections, and the immunological status of the host [2–4]. A broad spectrum of host responses to *Leishmania amazonensis* has been observed in humans—cutaneous, mucocutaneous, diffuse, and visceral forms [5]—and in

the inbred mouse strains infected with *L. amazonensis* the H21 MHOM/BR/76/MA-76 strain, as was previously published by our group [6, 7]. The visceralization of *L. amazonensis* has been observed for several organs, such as brain [8], liver, spleen [9, 10], and bone marrow [5, 11].

Compared with infection by *Leishmania major*, *L. amazonensis* and *Leishmania mexicana* are associated with different patterns of disease following infection in mice. For example, C57BL/6 or C3H mice, which heal from *L. major* infection, develop chronic disease when infected with either *L. amazonensis* or *L. mexicana* [12, 13], whereas BALB/c and C57BL/10 mice produce metastatic lesions [6]. There are differences in the virulence factors for *L. mexicana* complex organisms compared with *L. major*, which affect the consequent pathology associated with the disease, as well as the immune mechanisms that mediate susceptibility and resistance to infection. The aim of the present study was to determine the spectrum of lesions produced by *L. amazonensis* in several mouse strains and to study the cellular subpopulation at the inoculation site and the

Received 14 October 2009; accepted 7 January 2010; electronically published 12 May 2010.

Potential conflicts of interest: none reported.

Financial support: CNPq (grants 370291/2003-4 and 132019/2004-3) and IOC/FIOCRUZ.

Reprints or correspondence: Dr Kátia Calabrese, Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1480 Pav. 108 Mangueiras, 21041-110 Rio de Janeiro, Brazil (calabrese@ioc.fiocruz.br).

The Journal of Infectious Diseases 2010;201(12):1933–1940

© 2010 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1899/2010/20112-0020\$15.00

DOI: 10.1093/infdis/jiq2870

draining lymph nodes by using confocal scanning microscopy.

MATERIALS AND METHODS:

Animals. Four- to six-week-old female C57BL/10, DBA/2, CBA, and C3H.He mice were obtained from the animal facilities of the Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil. These strains were eligible on the basis of their resistance or susceptibility pattern previously determined by experiments in our laboratory.

All experiments with animal were conducted in accordance with the guidelines for experimental procedures of Oswaldo Cruz Foundation (process number L.001/07).

Parasites. *L. amazonensis*, MHOM/BR/2000/MS501 strain, was isolated from the bone marrow aspirate of a patient with visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state and maintained by serial passages in mice in our laboratory.

Experimental design. Mice were divided into 8 groups with 40 animals each: G1: infected C57BL/10 mice; G2: normal C57BL/10 mice; G3: infected DBA/2 mice; G4: normal DBA/2 mice; G5: infected CBA mice; G6: normal CBA mice; G7: infected C3H.He mice; and G8: normal C3H.He mice. Animals in groups G1, G3, G5, and G7 were subcutaneously infected by injecting 10^6 *L. amazonensis* promastigotes in the right hind footpad, and animals in groups G2, G4, G6, and G8 were subcutaneously injected with 50 μ L of phosphate buffered saline (PBS) in the same location. Infective-stage metacyclic promastigotes were isolated from stationary phase cultures (6 days old) and quantified in a Neubauer hemocytometer [14] using Erythrosine B stain, as described elsewhere [15].

Kinetic of the lesion. Lesion size of the 6 animals of each group was measured using a Schnellaster dial gauge caliper (Kröplin GRBH), as described elsewhere [16]. At different times after infection (30, 60, 90, and 120 days after infection) the footpad swelling was measured and expressed as the difference thicknesses in millimeters between the inoculated footpads and the median of the 6 normal footpads of the control group.

Histopathological evaluation. Four animals from each group were killed in a CO₂ chamber prior to the removal of the footpad lesions, the draining lymph nodes, the spleen, and the liver. The remaining mice were killed 3, 24, 48, and 72 h, and 30, 60, 90, and 120 days after infection. Fragments were fixed in 10% buffered formalin and routinely processed for paraffin embedding. Tissue sections (5 μ m thick) were stained with hematoxylin-eosin and Lennert's Giemsa.

Antibody assay. Immunoglobulin G (IgG) antibody response was evaluated by indirect immunofluorescent reaction by using specific anti-mouse isotype antibodies in accordance with Camargo et al [17]. Serum samples were obtained from the blood of 3 animals in each group at 15, 60, 90, and 120 days after infection. The antigen was obtained from *L. amazonensis* promastigote forms (strain MHOM/BR/2000/MS501),

fixed in 1% formalin in PBS and distributed in the slides. The fluorescent sets (goat anti-mouse IgG), conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma) was diluted 1:100 in PBS-Evans blue dye. Slides were analyzed with a microscope (Carl Zeiss) with epiluminescence illumination by mercury-vapor lamp (HBO-200). Positive serum was obtained from BALB/c mice infected with *L. amazonensis*, and negative serum was obtained from noninfected mice.

Confocal analysis. Fragments of primary lesions and lymph nodes were removed, embedded in tissue-freezing medium (OCT compound-embedding medium for frozen specimens, Tissue-Tek, Miles Inc) and immediately frozen. Tissue sections (5 μ m thick) were placed in a cryostat and fixed in cold acetone for 20 min. For double-labeling procedures, sections were blocked in PBS containing 0.2% gelatin, 0.1% Na₃N, incubated with human polyclonal anti-*Leishmania* serum diluted to 1:500; washed 3 times with PBS for 5 min; and then incubated with secondary antibody conjugated with Cy3 (Sigma). After this, the material was washed again. The tissue sections were subsequently incubated with monoclonal antibodies against rat CD4, CD8, CD205, CD45R, TCR $\gamma\delta$, and CD11b cells. Secondary goat anti-rat FITC-conjugated antibodies were used. All incubations were performed for 40 min with antibodies diluted in peptidoglycan-saponin. The nuclei were stained with 4, 6-di-amino-2-phenylindole fluorescent DNA-binding probe (DAPI; Molecular Probes). After the washes in PBS, the slides were mounted in glycerol containing 0.1% ρ -phenylenediamine (Sigma). The slides were examined by using a BioRad 1024 (ultraviolet) confocal scanning system coupled with a Zeiss Axiovert 100 microscope, using a 40 \times 1.2 N.A. PlanAchromatic water immersion objective.

Limiting dilution assay. Three mice from each infected group were killed in a CO₂ chamber prior to the removal of the footpad lesions, the draining lymph nodes, the spleen, and the liver at 10, 30, 90, and 120 days after infection. The organs were then weighed. The tissue was disrupted in a Potter homogenizer containing 5 mL of LIBHIT media with antibiotics. Ten-fold serial dilutions of the organ homogenate were made in LIBHIT media, and 100 μ L of each dilution was distributed in groups of 16 replicate microcultures in round-bottomed microplate wells, each group with a different dilution. All plates were cultured in humid atmosphere at 37°C and 5% CO₂. After 6 days, the culture growth of the parasite was evaluated with an inverted microscope. The number of parasites was estimated by correlating the tissue weight with the percentage of negative cultures, following the method described by Taswell [18, 19].

RESULTS

Kinetics of the lesion. Primary lesion kinetics show differences in the thickness of lesions owing to *L. amazonensis* promastigote infection in the different mice strains used in our

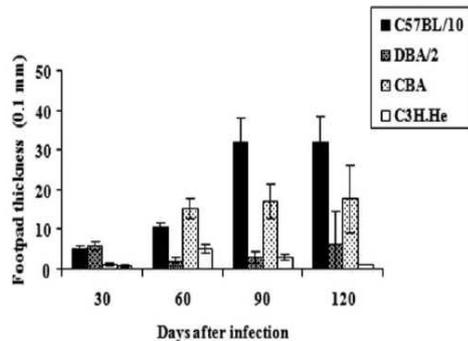


Figure 1. Primary lesion kinetics in C57BL/10, DBA/2, CBA, and C3H.He mice subcutaneously infected by injecting 10^6 *Leishmania amazonensis* promastigotes (MHOM/BR/2000/MS501) in the right hind footpad.

study. Both C57BL/10 and CBA mice developed ulcerative progressive lesions, whereas DBA/2 mice presented discrete lesions, which did not heal after 120 days but did not ulcerate. The C3H.He mice initially presented discrete footpad swelling; however, they did not develop lesions even at 120 days after infection (Figure 1).

Histopathological findings. The histopathological analysis showed a predominance of eosinophils and mast cells in the initial phase of infection (3 and 24 h) in both the primary lesion and draining lymph nodes of all mice strains (data not shown). However, 48 h after infection, amastigotes were seen in vacuolated macrophages, surrounding footpad nerve bundles of C57BL/10 mice (Figure 2A). Parasites were not observed in CBA and DBA/2 mice, although vacuolated macrophages had been noted in CBA mice and conjunctive fiber dissociation in DBA/2 mice. The follow-up of infection showed, on the 60th day after infection, that C57BL/10 and CBA mice developed footpad ulcerative lesions filled with parasitized macrophages and eosinophil association (Figures 2B and 2D). Necrosis, as well as parasitized fibroblasts, were observed in CBA mice (Figure 2E and 2F). The lymph nodes of C57BL/10 mice were filled with plasma cells, eosinophils, and macrophages that contained amastigotes (Figure 2C). DBA/2 mice also presented ulcerative lesions, but parasitized macrophages were rarely observed.

The histological analysis of the C3H.He mouse footpad revealed that, 3 h after infection, this mouse strain presented quantitatively more eosinophils around blood vessels and nerves than the other strains. The lesions did not ulcerate, and few parasites were seen within macrophages, even 120 days after infection. No alterations were observed in other organs.

Antibody assay. After 120 days of infection, susceptible (C57BL/10 and CBA) and intermediary (DBA/2) mouse strains produced higher levels of antibodies (1/160) than did resistant mice (1/40).

Confocal analysis. The confocal analyses at 120 days after

infection showed that C57BL/10 mice presented larger amounts and a greater intensity of T γ δ lymphocyte surface markers in draining lymph nodes than did the other strains (Figure 3). However, C57BL/10 and CBA strains showed a higher quantity of dendritic cells when compared with the other strains (Figure 4E–4H). As was expected, macrophages were present in all mouse strains (Figure 5A–5D). The analysis of CD4⁺ T cells showed a predominance of these cells in lymph nodes of DBA/2 mice, followed by C57BL/10 and C3H.He mice (Figure 5E–5H). The CD8⁺ subset was observed in all mouse strains, although less than the CD4⁺ subset (Figure 6A–6D). Susceptible mouse strains showed significantly higher proportion of B cells than resistant mouse strains (Figure 6E–6H). The largest number of labeled amastigotes was observed in the C57BL/10 strain, followed by CBA, DBA/2, and C3H.He strains with the least.

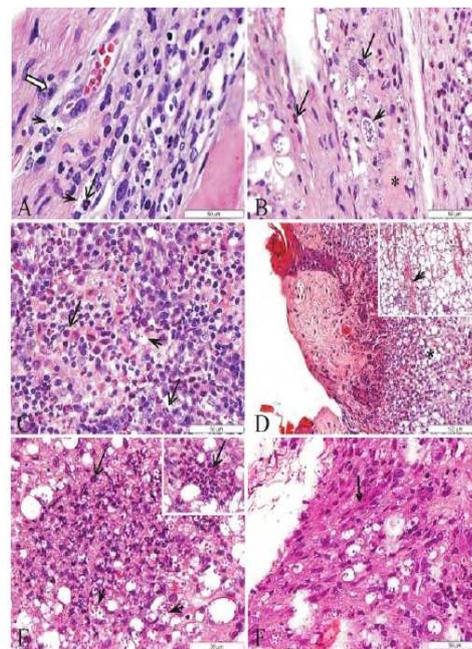


Figure 2. Histopathological analysis of primary lesion of C57BL/10 and CBA mice strains subcutaneously infected by injecting 10^6 *Leishmania amazonensis* promastigotes in the right hind footpad. A, Intense inflammatory infiltrate surrounding footpad nerve bundles with amastigotes inside vacuolated macrophages (arrowhead), mast cells (white arrow), and eosinophils (thin arrow) (48 h after infection); B–D, 60 days after infection. B, eosinophilic infiltrate (thin arrows) and amastigotes (arrowhead) surrounding footpad nerve bundles (asterisk). C, Lymph node filled with plasma cells (white arrowhead), eosinophils (thin arrow), and parasitized macrophages (arrowhead). D, Footpad ulcerative lesion with intense destruction of muscular fibers (window, arrow), filled with parasitized macrophages (asterisk) and eosinophil association (60 days after infection). E, Primary lesion with necrosis and parasitized macrophages (arrowhead) and eosinophil association (thin arrow) (window). F, Fibroblast-like cells infected with *Leishmania* (arrow).

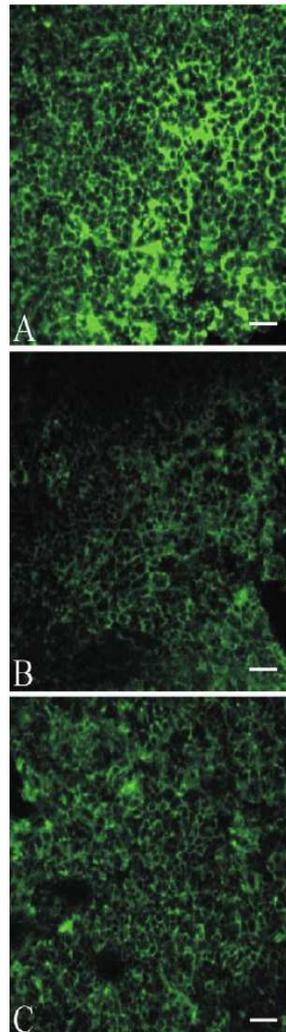


Figure 3. Immunocytochemical analyses of draining lymph nodes in different mice strains subcutaneously infected by injecting 10^6 *Leishmania amazonensis* promastigotes in the right hind footpad, 120 days after infection. T $\delta\gamma$ lymphocytes labeled with secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate. A, C57BL/10 mice. B, CBA mice. C, C3H.He mice. Bar, 50 μ m.

The last strain presented small quantities of parasites, which showed that it was more resistant than the other mice strains (Figure 4A–4D)

Limiting dilution assay. Limited dilution analysis of footpad and lymph nodes showed a progressive enhancement of parasite load from the 10th day of infection in susceptible and intermediary mice. In resistant mice, however, the presence of parasites in the footpad was observed only 30 days after infection, whereas these parasites persisted until 120 days after

infection in lymph nodes, but in small quantities. When the spleen and liver were analyzed, the C57BL/10 and DBA/2 strains tested positive for spleen only from 30 days after infection, whereas the liver tested negative throughout the experiment.

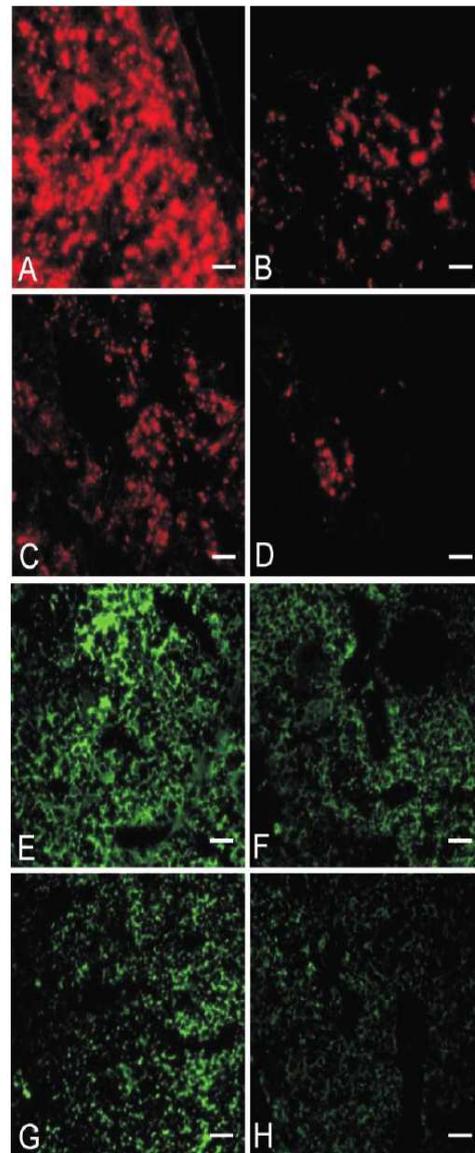


Figure 4. Immunocytochemical analyses of primary lesions and draining lymph nodes in different mice strains subcutaneously infected by injecting 10^6 *Leishmania amazonensis* promastigotes in the right hind footpad, 120 days after infection. Amastigotes labeled with secondary antibody conjugated with Cy3 (A–D); dendritic cells labeled with secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (E–H). A and E, C57BL/10 mice. B and F, DBA/2 mice. C and G, CBA mice. D and H, C3H.He mice. Bar, 50 μ m.

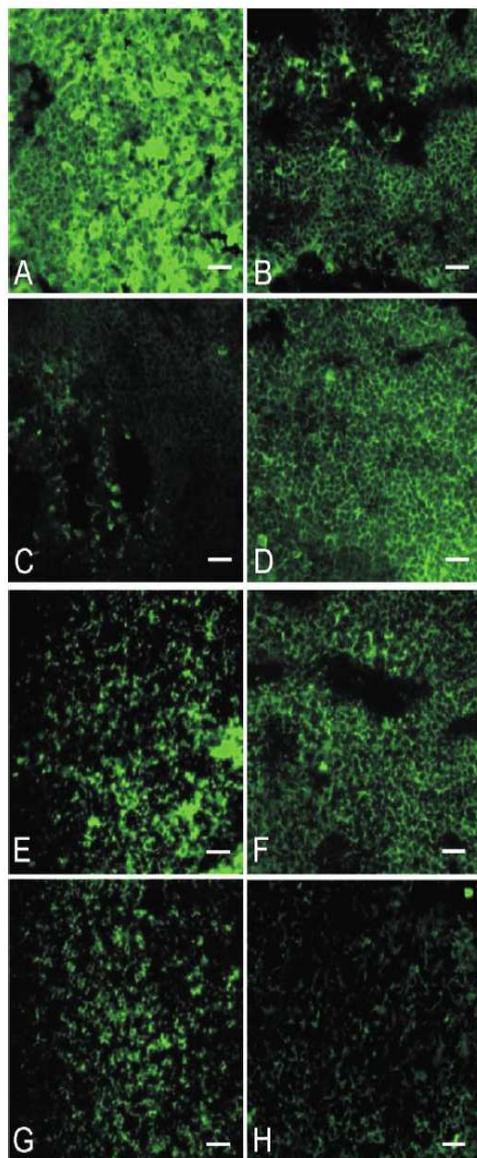


Figure 5. Immunocytochemical analyses of draining lymph nodes in different mice strains subcutaneously infected by injecting 10^6 *Leishmania amazonensis* promastigotes in the right hind footpad, 120 days after infection. Macrophages labeled with secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (A–D); T CD4⁺ lymphocytes labeled with secondary antibody conjugated with FITC (E–H). A and E, C57BL/10 mice. B and F, DBA/2 mice. C and G, CBA mice. D and H, C3H.He mice. Bar, 50 μ m.

These organs tested positive in the CBA strain only 120 days after infection, and in the C3H.He strain they tested negative throughout the experiment (Table 1).

DISCUSSION

Several works have demonstrated that *L. amazonensis* is able to produce a large spectrum of lesions in mice, which include lesions in the liver, spleen, bone marrow, bone, and brain [8, 10, 20, 21]. Susceptibility to disease caused by different species of *Leishmania* appears to be regulated by multiple, distinct genetic loci; therefore, it is not surprising that the immune regulation of disease and healing (roles of the cytokines and costimulatory molecules) of each species and parasite virulence factors also differ [22].

Studying the influence of H2 haplotype in C3H, BALB, and B10 mice infected by *L. amazonensis*, Terabe et al [23] showed that this complex controls the growth of *L. amazonensis* in cutaneous lesions. When we compared the H2 gene haplotype in C57BL/10, CBA, C3H.HeN, and DBA/2 mice, it was observed that this haplotype did not influence the resistance or susceptibility of the *L. amazonensis* infection since the CBA and C3H.He strains, which are susceptible and resistant to this infection, respectively, have the same haplotype. This result indicates that other genes can influence the resistance or susceptibility of these mice to *L. amazonensis* infection. It is important to emphasize that genetic mechanisms that determine susceptibility and/or resistance to *Leishmania* infection are dependent on at least 2 components: one associated with the ability of the host macrophages to support or inhibit the multiplication of the parasite and the other to control the magnitude, quality, and reaction of the immune system against the parasite antigen [24].

The analysis of the cells present at the site of infection showed that in all mouse strains, eosinophils were the cells that appeared to be the first line of defense, and they persisted throughout the course of infection, even in the chronic phase when they were observed in close association with parasitized macrophages. These findings were previously noted in mice infected by *L. mexicana* [24] and infected by *L. amazonensis* [25–29], suggesting that the associated action of eosinophils and macrophages favors parasite destruction. In addition, mast cells were found frequently at the initial phase of infection. Activated T cells have been reported to stimulate mast cells, and these cells can exert a role as sentinels of innate immunity against intracellular pathogens [30, 31]. The role of mast cells during the course of the *Leishmania* infection is not clear. According to Wershil et al [32], mast cells contribute to augmentation of the size of cutaneous lesions during *L. major* infection in mice. However, Maurer et al [31] reported that Kit^W/Kit^{W-v} mice, which are genetically deficient in mast cells, developed larger skin lesions even when a low-dose infection (2×10^3 metacyclic promastigotes) was used. Interestingly, when cutaneous reconstitution with mast cells was carried out, the animals displayed a normal development of the lesion. Previous studies revealed

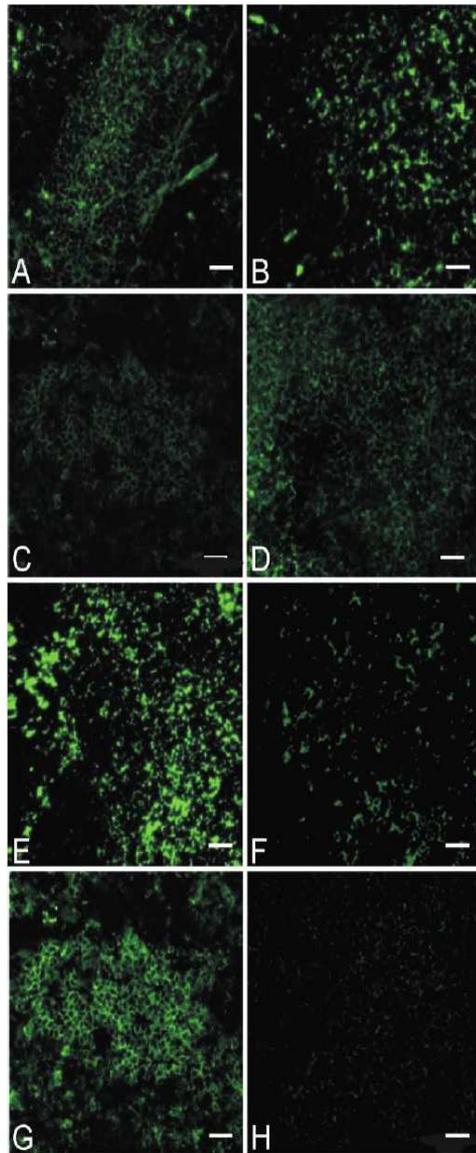


Figure 6. Immunocytochemical analyses of draining lymph nodes in different mice strains subcutaneously infected by injecting 10^6 *Leishmania amazonensis* promastigotes in the right hind footpad, 120 days after infection. T CD8⁺ lymphocytes labeled with secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (A–D). B lymphocytes labeled with secondary antibody conjugated with FITC (E–H). A and E, C57BL/10 mice. B and F, DBA/2 mice. C and G, CBA mice. D and H, C3H.He mice. Bar, 50 μ m.

that mast cells exert a proparasitic role in a susceptible host and an antiparasitic role in a resistant host [33]. In the present study, there was no difference between susceptible and resistant mouse strains, because all of them presented a great quantity

of mast cells, mainly at the initial phase of the infection. It is possible that mast cells did not help to destroy the parasite, but they can help polymorphonuclear cell influx in the primary lesion, because of their capacity to release cytokines responsible for polymorphonuclear cell chemotaxis trying to control the infection.

Plasma cells were detected in primary lesions and draining lymph nodes, inside inflammatory infiltrate, mainly on the 90th and 120th days after infection, and they were more evident in susceptible mice, which suggests that the presence of plasma cells indicates a worse prognosis for leishmaniasis. On the basis of histopathological findings described by Ridley et al [35], Azadeh et al [34] called attention to the presence of plasma cells in tissue and consequent antibody production. This microambient induces an antigen-antibody reaction adequate for tissue necrosis and inhibition of an epithelioid response, evolved in lupoid forms of leishmaniasis, caused by *Leishmania tropica*. Abranches et al [36] and Lanotte et al [37] observed, in canine leishmaniasis, that an infected animal reacts with a large production of antibodies and depression of cellular immunity. Antibodies are not protective, and resistance is related to active cellular immunity. Our data showed the same results in the mice model, in which susceptible animals presented a greater quantity of plasma cells, B cells, and antibody production.

Scanning confocal analysis showed a predominance of CD4⁺

Table 1. Quantity of Parasites in Different Organs of 4 Mice Strains Subcutaneously Infected by Injecting 10^6 *Leishmania amazonensis* Promastigotes in the Right Hind Footpad

Mice strain, days after infection	Footpad	Lymph nodes	Spleen	Liver
C57BL/10				
10	1.0×10^3	2.0×10^2	0	0
30	1.5×10^5	4.9×10^4	3.0×10^2	0
90	9.9×10^7	2.0×10^6	2.4×10^5	0
120	1.2×10^{13}	2.4×10^7	5.0×10^5	0
DBA/2				
10	2.0×10^2	1.0×10^2	0	0
30	1.4×10^4	4.0×10^2	4.0×10^2	0
90	8.7×10^7	1.0×10^2	4.3×10^3	0
120	1.5×10^5	1.4×10^3	1.3×10^5	0
CBA				
10	4.0×10^2	1.0×10^2	0	0
30	1.4×10^3	1.5×10^3	0	0
90	2.0×10^{10}	2.4×10^6	0	0
120	2.9×10^{15}	8.5×10^4	8.3×10^3	4.2×10^5
C3H.HE				
10	0	0	0	0
30	1.0×10^2	1.0×10^5	0	0
90	0	6.6	0	0
120	0	3.2	0	0

T cells in draining lymph node in all mice studied 120 days after infection. The same results were observed in humans by other researchers, independently of the clinical form of leishmaniasis [38, 39].

When dendritic and macrophage cells were analyzed, we observed that both cells were found in all strains of mice studied. This indicates that, despite susceptible and resistant mice having antigen-presenting cells, susceptible mice fail to present antigens or mechanisms for macrophage destruction, because the *Leishmania* is capable of reducing oxygen and nitrogen radical production of these cells [40, 41], which also interferes in MHC II expression and costimulatory molecules induced by interferon γ [42, 43].

In addition, $\gamma\delta$ T cells were found in our model. Susceptible C57BL/10 mice presented more quantities of these cells in lymph nodes, which suggests a role of $\gamma\delta$ T cells in *L. amazonensis* susceptibility. The same results were obtained not only in patients affected by the visceral form of the disease [44] and in patients infected with *L. amazonensis*, but also in the skin lesions of patients infected with cutaneous leishmaniasis [45]. Similar results were also demonstrated by several researchers using a murine model. A significant increase of $\gamma\delta$ T cells was also observed in lymphoid organs and skin lesions of mice infected with *L. major* [46]. CBA/J mice, which are resistant to *L. major* when depleted with anti-TCR $\gamma\delta$ monoclonal antibody, developed large lesions containing a large number of parasites [47]; this shows that $\gamma\delta$ T cells are involved in the first line of defense against this parasite. Our results showed that mice considered more susceptible to *L. amazonensis* infection (C57BL/10) presented an expansion of these cells in draining lymph nodes, suggesting the role played by $\gamma\delta$ T cell in the susceptibility of these animals to *L. amazonensis*.

Our results also demonstrated the presence of parasitized macrophages in the epidermis, which probably migrated from the dermis. This demonstration is consistent with what occurs in human cases of a diffuse form of *Leishmaniasis*, where the occurrence of parasitized cells in the epidermis is common [48]. Thus, the energy of the immune system in this model involves a defect in the immune response of the epidermis.

We concluded that there are differences in *L. amazonensis* infection, especially in terms of immunological mechanisms involved in healing or infection progression. Thus, the study of cellular and humoral immunity of leishmaniasis in the murine model is important to improve the understanding of the mechanisms involved in resistance and susceptibility to different species of *Leishmania*. This study has given some insights into a better understanding of the factors responsible for the different forms of the disease and its broad spectrum of immune responses, thus helping in the possible development of a vaccine and more effective treatment against leishmaniasis.

Acknowledgments

The authors thank Dr Sonia Maria Neumann Cupolilo for histological assistance, Platform of Confocal Microscopy LSM 510-META of Fundação Oswaldo Cruz, and Camila Zaverucha do Valle for confocal assistance.

References

1. Turk JL, Belehu A. Immunological spectra in infectious diseases. In: Parasites in the immunized host: mechanisms of survival. New York, NY: Associated Scientific Publishers, 1974, 1001–1022.
2. Constance AMF, Conrad IW, Kevin CK. Severe malaria and host response: time for a paradigm shift in therapeutic strategies to improve clinical outcome. *Drug Discov Today Dis Models* 2007; 4(4):207–214.
3. Matos DS, Azeredo-Coutinho RB, Schubach A, et al. Differential interferon- γ production characterizes the cytokine responses to *Leishmania* and *Mycobacterium leprae* antigens in concomitant mucocutaneous leishmaniasis and lepromatous leprosy. *Clin Infect Dis* 2005; 40(2):e5–e12. doi:10.1086.427069. Published 22 December 2004.
4. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:229–243.
5. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi G Jr, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44:536–546.
6. Calabrese KS, da Costa SC. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87(suppl 1):49–56.
7. Cupolilo SM, Souza CS, Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC. Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. *Histol Histopathol* 2003; 18(4):1059–1065.
8. Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Tedesco RC, Mortara RA, Gonçalves da Costa SC. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68(6):661–665.
9. Almeida RP, Barral-Netto M, De Jesus AM, De Freitas LA, Carvalho EM, Barral A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54(2):178–184.
10. Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SM, Cardoso FO, Souza CS, Gonçalves da Costa SC. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 2004; 121(3):179–187.
11. Barral A, Badaró R, Barral-Netto M, Grimaldi G Jr, Momem H, Carvalho EM. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35(4):732–734.
12. Alexander J, Russell DG. Parasite antigens, their role in protection, diagnosis and escape: the leishmaniasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1985; 120:43–67.
13. Jiayang J, Jiaren S, Lynn S. Infection and immunity impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 2003; 71(8):4278–4288.
14. Hoff R. A method for counting and concentrating living *Trypanosoma cruzi* in blood lysed with ammonium chloride. *J Parasitol* 1974; 60:527–528.
15. Hodgkinson VH, Herman R, Semprevivo L. *Leishmania donovani*: correlation among assays of amastigote viability. *Exp Parasitol* 1980; 50: 397–408.
16. Gonçalves da Costa S, Santos EB, Lagrange PH. Vaccination of mice against *Leishmania mexicana amazonensis* with microsomal fraction associated with BCG. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1988; 139(2):143–156.
17. Camargo ME, Leser PG, Leser WSP. Diagnostic information from se-

- rological tests in human toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1976; 18:215–226.
18. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis. *J Immunol* 1981; 126: 1614–1619.
 19. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. III. Validity tests for the single-hit Poisson model. *J Immunol Methods* 1984; 72(1):29–40.
 20. Costa AA, Abreu AL, Gomes CM, et al. Experimental model of chronic osteomyelitis caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. *Acta Trop* 2006; 98(2):125–129.
 21. Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of New World: current concepts and implication for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6:230–250.
 22. McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev* 2004; 201:206–224.
 23. Terabe M, Wakana S, Katakura K, Onodera T, Matsumoto Y, Ito M. Influence of H2 complex and non-H2 genes on progression of cutaneous lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Int* 2004; 53(3):217–221.
 24. Matiel J, Behin R. Immunity: clinical and experimental. In: Peters W, Killick-Kendrics K, eds. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London, England: Academic Press, 1987:731–791.
 25. Grimaldi Jr G, Soares M, Moriearty P. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1984; 6:397–408.
 26. Pompeu ML, Freitas LA, Santos MLV, Khouri M, Barral-Neto M. Granulocytes in inflammatory process of Balb/c mice infected by *Leishmania amazonensis*: a quantitative approach. *Acta Trop* 1991; 48:185–193.
 27. Pompeu ML, Freitas LA, Santos MLV, Barral A, Barral-Neto M. *Leishmania amazonensis* infection: a comparison of in vivo leishmanicidal mechanisms between immunized and naive infected Balb/c mice. *Exp Parasitol* 1992; 74:169–176.
 28. Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1999; 17:297–304.
 29. Cupolilo E. *Reinfecção por Leishmania (Leishmania) amazonensis no modelo murino: um estudo histopatológico e imunohistoquímico [doutorado em biologia parasitária]*. Rio de Janeiro, Brazil: Instituto Oswaldo Cruz, 2002.
 30. Askenase PW, Van Loveren H. Delayed-type hypersensitivity: activation of mast cells by antigen-specific T-cell factors initiates the cascade of cellular interactions. *Immunol Today* 1983; 4:259–264.
 31. Maurer M, Lopez Kostka S, Siebenhaar F, et al. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *FASEB J* 2006; 20(14): 2460–2467.
 32. Wershil B, Theodos C, Galli S, Titus R. Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* in the mouse. *J Immunol* 1994; 152:4563–4571.
 33. Saha B, Tonkal AMDJ, Croft S, Roy S. Mast cells at the host-pathogen interface: host-protection versus Immune evasion. *Clin Exp Immunol* 2004; 137:19–23.
 34. Azadeh B, Samad A, Ardehali S. Histological spectrum of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79:631–636.
 35. Ridley DS, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980; 74:508–514.
 36. Abranches P, Campino L, Santos-Gomes G. *Leishmaniose canina*, novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. *Acta Med Port* 1998; 11:871–875.
 37. Lanotte G, Rioux JA, Perieres J, Vollhardt Y. Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10: les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine; élaboration d'une typologie bioclinique à finalité épidémiologique. *Ann Parasitol Hum Comp* 1979; 54:277–295.
 38. Barral A, Jesus AM, Almeida RP, et al. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1987; 9:487–497.
 39. Ritter U, Moll H, Laskay T, et al. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis* 1996; 173(3):699–709.
 40. Olivier M, Tanner CE. Susceptibilities of macrophage populations to infection in vitro by *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 1987; 55(2): 467–471.
 41. Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(20):10984–10989.
 42. Reiner NE, Ng W, McMaster WR. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol* 1987; 138(6):1926–1932.
 43. Kaye PM, Rogers NJ, Curry AJ. Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *Eur J Immunol* 1994; 24:2850–2854.
 44. Russo DM, Armitage RJ, Barral-Neto M, et al. Antigen-reactive $\gamma\delta$ T cells in human leishmaniasis. *J Immunol* 1993; 151:3712–3718.
 45. Uyemura K, Klotz J, Pirmez C, et al. Microanatomic clonality of $\gamma\delta$ cells in human leishmaniasis lesions. *J Immunol* 1992; 148:1205–1211.
 46. Rosat JP, Conceição-Silva F, Waanders GA, et al. Expansion of $\gamma\delta$ T cells in BALB/c mice infected with *Leishmania major* is dependent upon Th2-type CD4 T cells. *Infect Immun* 1995; 63:3000–3004.
 47. Rosat JP, MacDonald HR, Louis JA. A role for $\gamma\delta$ T cells during experimental infection of mice with *Leishmania major*. *J Immunol* 1993; 150:550–555.
 48. Mehta V, Balachandran C, Rao R, Dil SK, Indusri L. Diffuse cutaneous leishmaniasis in HIV. *Dermatol Online J* 2009; 15(4):9.

3.2. ARTIGO 2

Cytokine production during *Leishmania amazonensis* infection in mice with different genetic backgrounds

(Submetido a *Infection and Immunity*)

1 **Cytokine production during *Leishmania amazonensis* infection in mice with different**
2 **genetic backgrounds**

3 Cytokine response in *Leishmania amazonensis* infected mice

4
5 Flávia O. **Cardoso***†; Sylvio Celso **Gonçalves da Costa***, Ana Lúcia **Abreu Silva**** and
6 **Kátia S. Calabrese*** “No conflict”

7
8 * Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ;

9 ** Departamento de Patologia, Universidade Estadual do Maranhão

10 † Laboratório de Diagnóstico, Ensino e Pesquisa, Centro de Saúde Escola Germano Sival
11 Faria/ENSP/FIOCRUZ;

20 **ABSTRACT**

21 This work studied the infection caused by *Leishmania amazonensis* in four mouse
22 strains in order to evaluate the cytokine production in terms of disease progression, and the
23 patterns of resistance and susceptibility. The analysis of TGF- β , TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10
24 and IL-12 production showed that, independent of the mouse strains studied, there was no
25 predominance in the pattern of expressed cytokines having a mixed pattern of Th1 and Th2
26 cytokines. These data allowed us to infer that the host genetic background does not influence
27 the cytokine pattern expressed in *L. amazonensis* infection. These results may contribute to a
28 clearer understanding of the immune response in mice infected with *L. amazonensis* since the
29 immunopathological aspects of this infection, in the murine model, are different from those
30 observed in *L. major* infection, where the susceptible and resistant mice show a polarized
31 immune response.

32 **Key-words:** *L. amazonensis*, inbred mice, immunopathology, cytokines.

33

34 **INTRODUCTION**

35 In South America *Leishmania amazonensis* is known as an etiologic agent of cutaneous
36 and cutaneous diffuse leishmaniasis (6). The latter clinical form is related to the failure of the
37 host immune response to control the *Leishmania* infection (5).

38 The inflammation caused by *Leishmania* infection is modulated by various cytokines,
39 which may determine the resolution of the lesions or their progression. Cytokines are the key
40 elements of the host immune response against this pathogen and for decades many authors
41 have described the cytokine profile in murine leishmaniasis, but the results concerning the
42 mouse strain and the specie of *Leishmania* used are controversial (27). According to the
43 literature, the resistance and elimination of the parasites are due to the presence of interferon-
44 gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) from the Th1 profile, while the Th2
45 cytokines, like interleukin (IL-) 4 and IL-10 are linked to the susceptibility of infections by
46 *Leishmania* (11, 30). The balance between inflammatory and regulatory cytokines creates a
47 controlled immune response that promotes parasite killing but not tissue destruction during
48 CL (cutaneous leishmaniasis) infection (4, 8).

49 The Th1 x Th2 paradigm has been established in *Leishmania* infection by comparing *L.*
50 *major* susceptible mice with resistant mice. BALB/c mice have been used to study
51 mechanisms of susceptibility to *L. major*, whereas C57BL/6 mice have been used for
52 resistance studies. Nevertheless, the mechanisms underlying resistance and susceptibility may
53 be different from those described for BALB/c and C57BL/6 mice infected with *L. major* if
54 different strains of mice and different species of parasite are used (15, 21, 14). In *L.*
55 *amazonensis* infection a low and mixed Th1/Th2 response is observed both in mice model and
56 in humans. Even though *L. amazonensis* promastigotes can, transiently, activate dendritic cells
57 and macrophages, the cell activation intensity and cytokine production are sometimes lower
58 than the activation observed by *L. major* and *L. braziliensis* promastigotes (31, 29).

59 Thus, in this study we determined the cytokine production in mice serum and
60 lymphocyte culture supernatant during *L. amazonensis* *in vivo* and *in vitro* infections.

61

62 **MATERIAL AND METHODS**63 **Animals**

64 Four to six week old C57BL/10, DBA/2, CBA and C3H.He female mice were obtained
65 from the animal facilities of the Oswaldo Cruz Institute. These strains were eligible on the

66 basis of their resistance or susceptibility pattern previously determined via experiments in our
67 laboratory (9). All experiments with animals were conducted in accordance with the
68 guidelines for experimental procedures of Oswaldo Cruz Institute (License n° L.001/07).

69 **Parasites**

70 The *L. amazonensis* MHOM/BR/2000/MS501 strain was isolated from the bone marrow
71 aspirate of a patient with visceral leishmaniasis (VL) from Mato Grosso do Sul state and was
72 maintained by serial passages in mice in our laboratory.

73 **Experimental design**

74 Mice were divided into eight groups with 40 animals each: G1- infected C57BL/10, G2-
75 normal C57BL/10, G3- infected DBA/2, G4- normal DBA/2, G5- infected CBA, G6- normal
76 CBA, G7- infected C3H.He and G8- normal C3H.He. The groups 1, 3, 5 and 7 were
77 subcutaneously infected by injecting 10^6 *L. amazonensis* promastigotes in the right hind
78 footpad and the groups 2, 4, 6 and 8 were subcutaneously injected with 50 µl of phosphate
79 buffered saline (PBS) also in the right hind footpad. The infective-stage metacyclic
80 promastigotes were isolated from the stationary phase cultures (6 days old) and quantified in a
81 Neubauer hemocytometer (17) using Erythrosine B stain, as described elsewhere (16).

82 **Serum samples**

83 Four animals of each group were euthanized and had blood collected by cardiac
84 puncture 3h, 24h, 48h, 72h, 96h, 15, 30, 60, 90 and 120 days after infection. The blood
85 samples were pooled into a single tube. The serum was stored at -20 °C for later
86 determination of cytokines by ELISA.

87 **Cell culture and in vitro stimulation**

88 Popliteal and inguinal lymph nodes were aseptically removed 1, 15, 90 and 120 days
89 after infection and cell suspensions were pooled for each time point. The lymphocytes were
90 plated in flat bottom 96-well plates, at a concentration of 1×10^6 cells/well, totaling 15 wells.
91 The lymphocytes in five of these wells were stimulated with viable promastigotes of *L.*
92 *amazonensis* (1×10^7 cells/well), five with concanavalin A (ConA) (100 ng/well) (positive
93 control) and five wells were not stimulated (negative control). The plates were incubated in a
94 humid atmosphere at 37 °C and 5% CO₂. After 96h of incubation, the plates were centrifuged
95 at 500 rpm for 15 minutes and the supernatants were collected and stored at -20 °C for later
96 determination of cytokine levels by ELISA.

97 **Detection of cytokines in serum and cell culture supernatants**

98 ELISA with pairs of specific Abs was used according to the manufacturer's instructions
99 to quantify the amounts of TGF- β , IL-4, IL-12, IFN- γ , TNF- α and IL-10. The ELISA kits for
100 TGF- β , IL-4, IL-12 detection were purchased from BD Biosciences and IFN- γ , TNF- α and
101 IL-10 from R&D Biosciences. Relative concentrations of cytokines were determined using a
102 spectrophotometer (BioRad - Benchmark microplate Reader). The colorimetric reaction was
103 read at 450 nm with correction at 540 nm. The mean absorbance was calculated for each set
104 of duplicate standards, controls and samples and the mean zero standard absorbance was
105 subtracted.

106 **Statistical analysis**

107 The serum was pooled for each time point as it would not be possible to obtain a
108 sufficient quantity of serum from each animal separately. The same pooling procedure was
109 performed with the cell supernatant. The results of the cytokine in the infected mice serum are
110 shown individually while results of the control groups represent the mean values of all time
111 points analyzed. The results of the cytokines in the culture supernatants of lymphocytes were
112 expressed in an index form, i.e. the result of dividing the concentration of cytokines in the
113 wells stimulated with *Leishmania* by the concentration found in the non-stimulated wells. The
114 results were considered statistically significant when they had values or ratios greater than or
115 equal to twice or less than or equal to half the control value.

116

117 **RESULTS AND DISCUSSION**

118 **Serum cytokine dosage**

119 In susceptible mouse strains (C57BL/10 and CBA) the TGF- β production occurred
120 mainly in the earlier phases of the infection (Figure 1A and 1C) whereas in relative resistant
121 and resistant mouse strains (DBA/2 and C3H.He, respectively) this cytokine was produced in
122 the late phase (Figure 1B and 1D).

123 CBA mice showed the highest levels of IL-4 (peak of \cong 1200 pg/mL) 24 hours after
124 infection (Figure 1G). C57BL/10 mice presented similar levels of IL-4 when compared to the
125 non-infected control group (Figure 1E). DBA/2 and C3H.He mice presented the lowest levels
126 (\leq 60pg/mL) of IL-4 with a peak 48 hours and 30 days after infection respectively (Figures 1F
127 and 1H).

128 Significant levels of IL-10 were observed in DBA/2 and C3H.He mice mainly in later

129 phases of the infection (Figures 1J and 1L) whereas no difference was observed for the
130 C57BL/10 and CBA mice when compared to the control group. Also both strains presented a
131 decrease of IL-10, 15 days post infection (Figures 1I and 1K).

132 Differently from the other cytokines, IL-12 production was only detect on DBA/2 mice,
133 starting 60 days after infection with a 40pg/mL peak, which dropped slowly after that (data
134 not shown).

135 No difference was observed in levels of IFN- γ , produced by infected and non-infected
136 C57BL/10 mice during the course of the infection (Figure 2A). In regard to DBA/2 mice the
137 level of this cytokine was the highest until 48h, which decreased significantly for the
138 following time points, increasing at 120 days (Figure 2B). CBA mice had lower levels of this
139 cytokine when compared to the control group (Figure 2C). C3H.He mice showed the highest
140 IFN- γ levels with peaks at 48 and 72h after infection (Figure 2D).

141 When TNF- α was evaluated, it was observed that all mouse strains presented elevated
142 production of this cytokines at different times after infection (Figures 2E - 2H).

143 **Cytokine detection in lymphocyte culture supernatants**

144 No mouse strains presented any significant level of TGF- β (≤ 1 pg/mL) in the
145 lymphocyte cultures. The dosage of IL-4 in the supernatant of the culture showed that
146 C57BL/10 was the mouse strain that presented the highest levels on the 15th day post infection
147 of this cytokine followed by C3H.He (Figures 3A and 3D).

148 The C57BL/10 strain presented the highest level of IL-12 on 15th day post infection,
149 while CBA mice showed the lowest level of this cytokine, ≈ 50 pg/mL, at 90 and 120 days
150 after infection (Figures 3B and 3D).

151 C3H.He mice demonstrated the highest levels of TNF- α , followed by C57BL/10 and
152 DBA/2 mice that also presented a peak of this cytokine 15 days post infection (Figures 3A,
153 3B and 3D).

154 Only C57BL/10 and DBA/2 mice presented detectable levels of IFN- γ . Both mice
155 strains presented levels of this cytokine 15, 90 and 120 days after infection (Figures 3C and
156 3D).

157 The C57BL/10 mice showed the same levels of IL-10 production on 15, 90 and 120
158 days after infection while in DBA/2 mice this cytokine was only observed 15 and 90 days
159 after infection (Figures 3C and 3D). In C3H.He and CBA mice this cytokine was not
160 detectable (Figure 3A and 3B).

161 **DISCUSSION**

162 The activation of specific T cells occurs in the lymph nodes and thymus. These sites
163 provide a microenvironment and the anatomic costimulatory signals necessary to activate
164 naive cells. The mechanisms of antigen transportation of peripheral sites to lymph nodes or
165 thymus are extremely important for the induction and maintenance of the immune response.
166 In mice the resistance and susceptibility to *L. major* infection are related to the ability of the
167 host to produce Th1 or Th2 profile cytokines (23, 10, 26, 1). Here we observed that resistant
168 and relatively resistant mice (C3H.He and DBA) displayed lower levels of IL4 in the serum.
169 On the other hand, we observed that even susceptible mice did not reproduce the same pattern
170 since CBA mice presented high levels of IL-4, 24 hours after infection while C57BL/10 mice
171 did not present significant levels when compared to non-infected control mice. Although IL4
172 is well established as a signatory cytokine in the Th2 responses, studies have shown that it can
173 be induced independently of IL4/IL13 (reviewed by 2). This phenomenon was also
174 demonstrated by Noben-Trauth et al. (1996) and Heinzel & Maier (1999) (24, 13) which
175 showed that IL4^{-/-} BALB/c mice was not able to control the infection, showing clearly that
176 other factors are involved in healing or non healing of the infection.

177 Analyzing the IL-10 role in our model we observed that an unremitting production of
178 this cytokine was maintained along the infection in DBA/2 and C3H.He resistant mice, which
179 was not observed in susceptible mice. A similar pattern was observed for IFN γ . IL-10 can be
180 produced by macrophages and T cells, in particular T regulatory cells, which can decrease
181 antigen presentation (7, 20). In previous studies our group demonstrated the persistence of the
182 parasite in the popliteal draining lymph node in resistant C3H.He mice (9).

183 The *L. major* experimental murine infection has been widely used to study the immune
184 response of leishmaniasis. Such studies have provided information about how the Th1 and
185 Th2 cells develop after infection, what regulates their development and how they can be
186 stored (25, 27). It is widely accepted in literature that the high susceptibility of BALB/c mice
187 to infection by *L. major* is associated with Th2 T cells, which produce IL-4 and IL-10, while
188 the resistance of other mouse strains is associated with the differentiation of T cells to Th1,
189 which produce IFN γ (27). However, this dichotomy does not occur in a murine model of *L.*
190 *amazonensis* infection (28).

191 Parasites of the mexicana complex, which includes *L. amazonensis*, produce chronic
192 infections in most mouse strains, differently from *L. major* (12, 8). C3H and C57BL/6 mouse
193 strains, which are normally resistant to *L. major*, develop a non-healing form when infected
194 with *L. amazonensis* (3), while BALB/c and C57BL/10 produce metastatic lesions and they
195 lose the limb corresponding to the inoculation site (12). Thus, early treatment with IL-12 can

196 lead to the resolution of an infection by *L. major* or *L. donovani*, but not for *L. amazonensis*
197 (22). Similarly, IL-10 is linked to a phenotype of non-healing infections in *L. major*, but
198 seems to have a much smaller role during infection by parasites of the mexicana complex
199 (22). Increased susceptibility has been associated to CD4⁺ T cells which produced IFN- γ and
200 express IL-12R β 2 (19, 1). In contrast to what occurs with *L. major*, Vanloubbeeck et al.
201 (2004) (28) demonstrated that the induction of a Th1 phenotype by immunotherapy with
202 dendritic cells in mice infected with *L. amazonensis* does not promote healing, and they
203 showed that the increase of Th1 cytokines alone is not sufficient to promote resistance against
204 this species of *Leishmania*. Thus, it is possible that the concurrent activation of factors that
205 counteract the protective effect of Th1 response may be more relevant than Th1 cytokines to
206 *L. amazonensis* infection.

207 The serum cytokine dosage showed that *L. amazonensis* stimulates cytokine
208 production of both Th1 and Th2 patterns in all strains of mice used in our study, which differs
209 from the results observed in *L. major* infections. These findings reinforce the idea that each
210 *Leishmania* specie has a unique response and in infections produced by *L. amazonensis* there
211 is not a predominance of Th1/Th2 cells having a cytokine mix.

212 In the present study *L. amazonensis* infected mice draining lymph node did not trigger
213 the production of cytokines 24 hours after infection. This result could be explained because at
214 the beginning of the *L. amazonensis* infection there was a delay in the production of cytokines
215 and proinflammatory chemokines (18). An analysis of the same cytokines in the serum
216 showed the presence of IL-4 and IFN- γ in the initial phase of infection. Based on these results,
217 we can conclude that cytokine production is different for each organ, and the cytokines
218 present in serum may be the result of the cytokine production from different organs.

219 A mixed pattern of cytokines was observed in both serum and in lymph node
220 supernatant leading us to conclude that the immunology of *L. amazonensis* infection is
221 different from that produced by *L. major* in susceptible and resistant mice which exhibit a
222 polarized immune response.

223 224 **ACKNOWLEDGEMENTS**

225 This work was supported by a grant from Instituto Oswaldo Cruz. Kátia da Silva
226 Calabrese (CNPq n^o 308630/2008-4) and Ana Lucia Abreu-Silva (CNPq n^o 306218/2010-0)
227 are senior researchers. The authors thank Verônica Gonçalves Mendes, Joanna Gardel
228 Valverde and Caroline Carvalho de Almeida for technical assistance.

230 **REFERENCES**

- 231 1. Afonso LCC, Scott P. 1993. Immune responses associated with susceptibility of
232 C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. Infect. Immun. 61:2952-2959.
- 233 2. Alexander J, Brombacher F. 2012. T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility
234 to *Leishmania infection*: is this paradigm still relevant? Front. Immunol. 3:80.
- 235 3. Alexander J, Russell DG. 1985. Parasite antigens, their role in protection, diagnosis and
236 escape - the leishmaniasis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 120:43-67.
- 237 4. Bacellar O, et al. 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis
238 patients. Infect. Immun. 70:6734-6740.
- 239 5. Barral A, Costa JML, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. 1995. Polar and
240 subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil - clinical and immunopathologic aspects.
241 Int. J. Dermatol. 34:474-479.
- 242 6. Barral A, et al. 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania-*
243 *amazonensis* produces a wide spectrum of clinical-disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 44:536-
244 546.
- 245 7. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. 2002. CD4(+) CD25(+)
246 regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. Nature 420:502-507.
- 247 8. Belkaid Y, et al. 2002. CD8(+) T cells are required for primary immunity in C57BL/6
248 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. J. Immunol.
249 168:3992-4000.
- 250 9. Cardoso FO, et al. 2010. Immunopathological Studies of *Leishmania amazonensis*
251 Infection in Resistant and in Susceptible Mice. J. Infect. Dis. 201:1933-1940.
- 252 10. Coffman RL, Varkila K, Scott P, Chatelain R. 1991. Role of cytokines in the
253 differentiation of CD4+ t-cell subsets in vivo. Immunol. Rev. 123:189-207.
- 254 11. Coutinho SG, et al. 1996. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis
255 patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis*
256 promastigote antigens: Immunologic patterns associated with cure. Exp. Parasitol. 84:144-
257 155.
- 258 12. Gonçalves da Costa SC, Calabrese KS. 1992. Schizotrypanids - The occurrence of
259 dermatitis in immunodeficient animals infected with *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo
260 Cruz 87:81-85.
- 261 13. Heinzl FP, Maier RA. 1999. Interleukin-4-independent acceleration of cutaneous
262 leishmaniasis in susceptible BALB/c mice following treatment with anti-CTLA4 antibody.
263 Infect. Immun. 67:6454-6460.

- 264 14. Heinzl FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. 1989. Reciprocal
265 expression of interferon-gamma or interleukin-4 during the resolution or progression of
266 murine leishmaniasis: Evidence for expansion of distinct helper T-cell subsets. J. Exp. Med.
267 169:59-72.
- 268 15. Heinzl FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM. 1991. Production of interferon-
269 gamma, interleukin-2, interleukin-4, and interleukin-10 by CD4+ lymphocytes in vivo during
270 healing and progressive murine leishmaniasis. Proc Nat Acad Sci USA 88:7011-7015.
- 271 16. Hodgkinson VH, Herman R, Semprevivo L. 1980. *Leishmania donovani*: correlation
272 among assays of amastigote viability. Exp. Parasitol. 50:397-408.
- 273 17. Hoff R. 1974. A method for counting and concentrating living *Trypanosoma cruzi* in
274 blood lysed with ammonium chloride. J. Parasitol. 60:527-528.
- 275 18. Ji HX, Sun HR, Soong L. 2003. Impaired expression of inflammatory cytokines and
276 chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. Infect. Immun.
277 71:4278-4288.
- 278 19. Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. 2000. IL-4-independent inhibition of IL-12
279 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. J. Immunol. 165:364-372.
- 280 20. Kane MM, Mosser DM. 2001. The role of IL-10 in promoting disease progression in
281 leishmaniasis. J. Immunol. 166:1141-1147.
- 282 21. Locksley RM, Heinzl FP, Sadick MD, Holaday BJ, Gardner KD. 1987. Murine
283 cutaneous leishmaniasis - susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell
284 subsets. Ann. Institut. Pasteur Immunol. 138:744-749.
- 285 22. McMahon-Pratt D, Alexander J. 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of
286 pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral
287 disease? Immunol. Rev. 201:206-224.
- 288 23. Moll H, Rollinghoff M. 1990. Resistance to murine cutaneous leishmaniasis is mediated
289 by TH1 cells, but disease-promoting CD4+ cells are different from TH2 cells. Eur. J.
290 Immunol. 20:2067-2074.
- 291 24. Noben-Trauth, N, Kropf P, Muller, I. 1996. Susceptibility to *Leishmania major*
292 infection in interleukin-4-deficient mice. Science 271:987-990.
- 293 25. Reiner SL, Locksley RM. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania-major*. Ann.
294 Rev. Immunol. 13:151-177.
- 295 26. Rossi-Bergmann B, Muller I, Godinho EB. 1993. TH1 and TH2 T-cell subsets are
296 differentially activated by macrophages and B-cells in murine leishmaniasis. Infect. Immun.
297 61:2266-2269.
- 298 27. Sacks D, Noben-Trauth N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to
Cardoso, FO

- 299 *Leishmania major* in mice. Nat. Rev. Immunol. 2:845-858.
- 300 28. Vanloubbeeck YF, Ramer AE, Jie F, Jones DE. 2004. CD4(+) Th1 cells induced by
301 dendritic cell-based immunotherapy in mice chronically infected with *Leishmania*
302 *amazonensis* do not promote healing. Infect. Immun. 72:4455-4463.
- 303 29. Vargas-Inchaustegui DA, Xin L, Soong L. 2008. *Leishmania braziliensis* infection
304 induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective
305 immune responses. J. Immunol. 180:7537-45.
- 306 30. Von Stebut E. 2007. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research
307 and experimental therapy. Exp. Dermatol. 16:340-346.
- 308 31. Xin L, Li Y, Soong L. 2007. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high)
309 CD45RB- dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4+ T cells
310 in vitro and in vivo. Infect Immun. 75:5018-26.

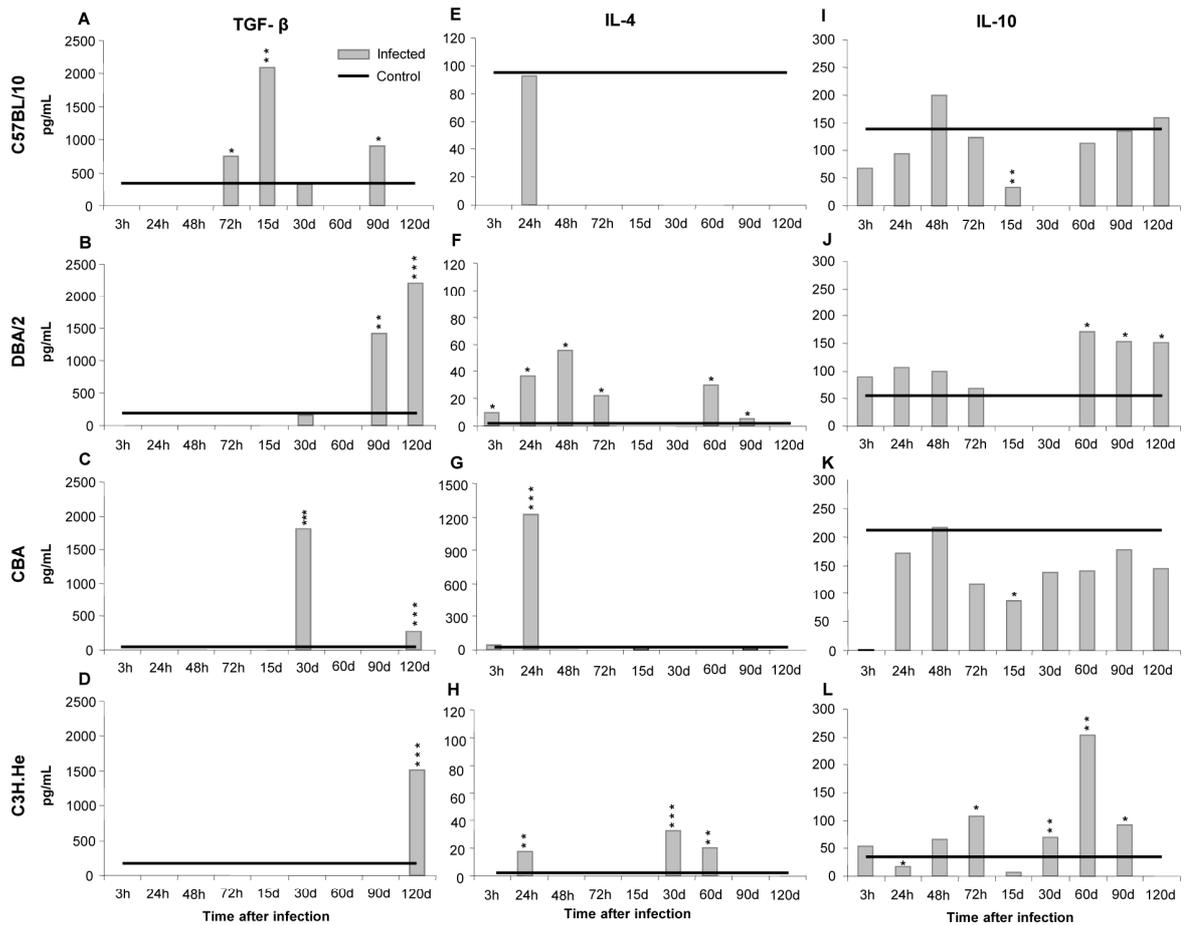


Figure 1: ELISA IL-4, TGF- β and IL-10 quantification in serum of C57BL/10, DBA/2, CBA and C3H.He mice infected with 10^6 *L. amazonensis* promastigote forms in the right hind footpad.

*Values higher than 2 times or less than 0,5 times the normal mice control value; **values higher than 4 times or less than 0,25 times the normal mice control value; ***values higher than 8 times or less than 0,125 times the normal mice control value.

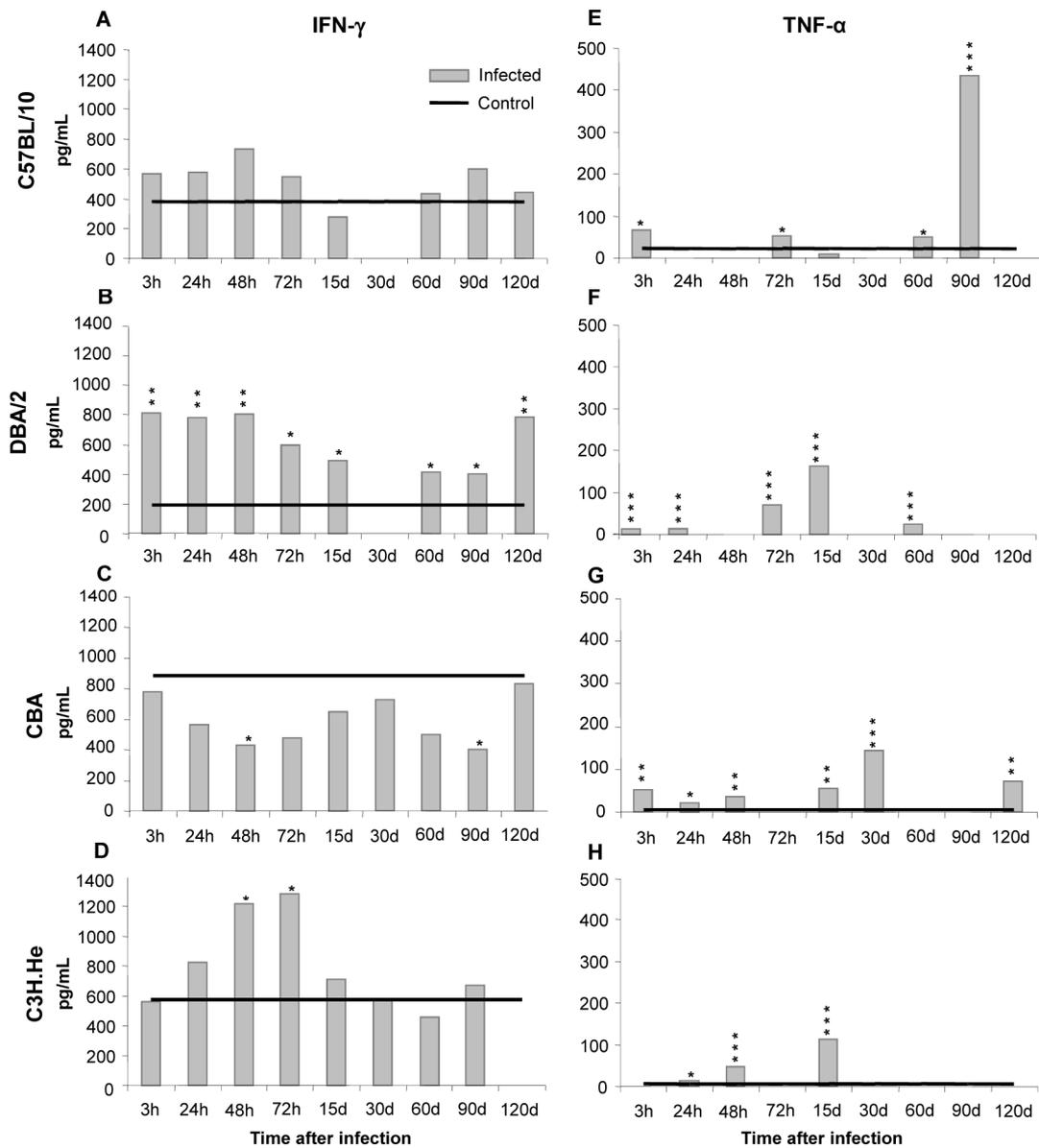


Figure 2: ELISA IFN- γ and TNF- α quantification in serum of C57BL/10, DBA/2, CBA and C3H.He mice infected with 10^6 *L. amazonensis* promastigote forms in the right hind footpad. *Values higher than 2 times or less than 0,5 times the normal mice control value; **values higher than 4 times or less than 0,25 times the normal mice control value; ***values higher than 8 times or less than 0,125 times the normal mice control value.

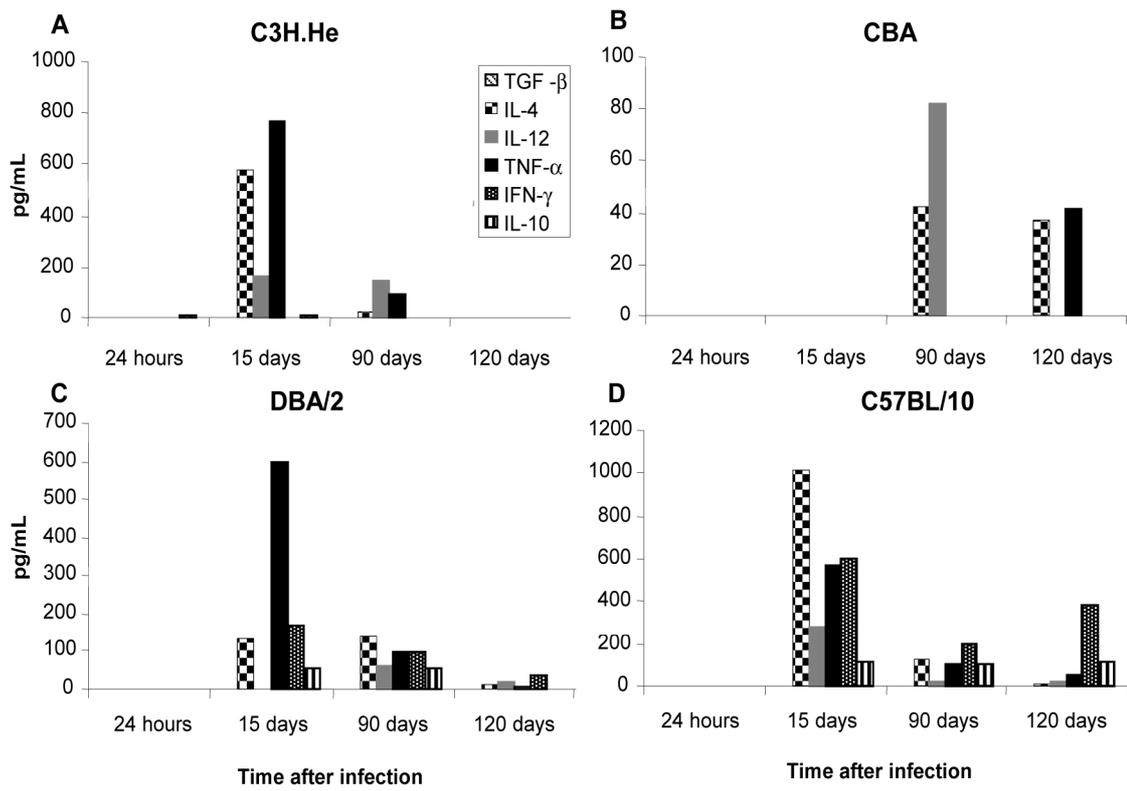


Figure 3: ELISA cytokines quantification in lymphocytes culture supernatants of C57BL/10, DBA/2, CBA and C3H.He mice infected with 10^6 *L. amazonensis*

3.3. ARTIGO 3

***Leishmania amazonensis* Infection in Susceptible and Resistant Mice: Expression Profiles of Cytokines and Extracellular Matrix Proteins**

(Submetido a *Plos Neglected Tropical Diseases*)

***Leishmania amazonensis* Infection in Susceptible and Resistant Mice: Expression Profiles of Cytokines and Extracellular Matrix Proteins**

1 Leishmaniasis in Susceptible and Resistant Mice

2 Flávia de Oliveira Cardoso^{1,3}, Tânia Zaverucha do Valle¹, Fernando Almeida-Souza¹, Ana
3 Lúcia Abreu-Silva² and Kátia da Silva Calabrese^{1,*}.

4 1- Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Rio
5 de Janeiro – RJ, Brazil.

6 2- Departamento de Patologia, Universidade Estadual do Maranhão. Cidade Universitária
7 Paulo VI. São Luís, Maranhão, Brazil.

8 3- Laboratório de Diagnóstico, Ensino e Pesquisa, Centro de Saúde Escola Germano Sinal
9 Faria/ENSP/FIOCRUZ. Rio de Janeiro – RJ, Brazil.

10

11

12 * Corresponding author: Kátia da Silva Calabrese

13 calabrese@ioc.fiocruz.br

14

15 **ABSTRACT**

16 *Background:* Leishmaniasis is a complex of diseases caused by *Leishmania spp.* In the *L.*
17 *major* model susceptibility is associated with the Th2 pattern while resistance is associated
18 with Th1 cells. *Methodology/Principal Findings:* In this work C57BL/10 and C3H.He mice
19 were infected with *L. amazonensis* and the cytokines, iNOS and extracellular matrix proteins
20 expression were measured by qRT-PCR. Cytokine response was found to be different in each
21 of the analyzed organs. C57BL/10 mice showed an increase of proinflammatory cytokines
22 expression (IL-12, TNF- α and IFN- γ) as well as iNOS induction, in the primary lesion. This
23 enhancement was associated with tissue destruction, while high levels of TGF- β were
24 associated with macrophage deactivation and parasite establishment early in infection. In the
25 C57BL/10 mouse spleens, a concomitant expression of TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ and iNOS
26 was associated with parasite presence. A proinflammatory cytokine expression was observed
27 in C57BL/10 mouse livers in the initial phase of infection, whereas regulatory ones (TGF- β
28 and IL-10) were noted in the late phase. The *L. amazonensis* resistant mice showed low levels
29 of cytokine expression in all organs examined. Analysis of matrix proteins expression showed
30 an association between increased expression of IFN- γ , collagen I and III with the expression
31 of TGF- β in the liver and lymph nodes of both mouse strains. The footpad expression of
32 collagen III in the late phase of infection was associated with the massive presence of
33 parasitized histiocytes. A high level of laminin and fibronectin expressions was observed in
34 C57BL/10, but not in C3H.He mouse footpads. *Conclusions/Significance:* Although there is
35 not a direct association between cytokine expressions in all organs studied, the *L.*
36 *amazonensis* infection induces a mixed production of cytokines. Extracellular matrix proteins
37 are important for pathogen invasion and tissue reconstitution in experimental leishmaniasis.
38 Our work adds knowledge and contributes to a better understanding of leishmaniasis
39 immunopathology.

40

41 **AUTHOR SUMMARY**

42 This paper studies the association of cells and antibody responses with the spread of
43 the parasites in the host, as well as changes in the extracellular matrix using mice with
44 different genetic backgrounds infected with *Leishmania amazonensis*. The resistance to
45 infection in humans and mice infected with *Leishmania major* is associated with a Th1-type
46 immune response with production of the cytokines IL-12, IFN- γ and TNF- α , while
47 susceptibility is due to regulatory responses with the production of IL-4, IL-10 and TGF- β . In
48 our model using *L. amazonensis*, the analysis of the footpad lesions, draining lymph nodes,
49 spleen and liver showed that the balance between T-helper (Th)-1 or Th2 response in *L. major*
50 infection was not observed. Each of the organs analyzed presented a compartmentalized
51 cytokine response with a different cytokine profile. Our results associated with others in the
52 literature will contribute to the knowledge of *Leishmania* infection and will help to develop
53 vaccine strategies.

54

55 **INTRODUCTION**

56 *Leishmania amazonensis* is commonly related to the cutaneous manifestations of the
57 disease. However a broad spectrum of clinical manifestations in humans (1) and mice (2; 3)
58 can be found. The visceralization of *L. amazonensis* has been observed for several organs,
59 such as brain (4), liver, spleen (5; 6) and bone marrow (7; 1). Development of different
60 clinical manifestations, as well as disease severity, has been credited to, not only the parasite
61 species, but also to the host genetics and immune responses.

62 Susceptibility to *Leishmania major* infection has been associated with the
63 differentiation of T cells to the Th2 pattern, in which IL-4 and IL-10 are produced. On the
64 other hand, resistance is associated with Th1 cells, which produce IFN- γ (8). However, when
65 different inbred mouse strains are infected with *L. amazonensis* this dichotomy does not
66 occur. Vanloubbeeck et al. (9) demonstrated that induction of the Th1 phenotype by
67 immunotherapy with dendritic cells in *L. amazonensis* infected mice does not promote cure,
68 revealing that the increase of Th1 cytokines alone does not promote resistance against this
69 *Leishmania* species. It is possible that the activation of factors which neutralize the Th1
70 response can interfere with protection during *L. amazonensis* infection.

71 The presence of adhesion molecules may be involved in leishmaniasis pathogenesis and
72 may explain the preference of certain species to skin, which is rich in extracellular matrix
73 (ECM) components. Parasites of the *L. mexicana* complex present adhesion molecules on
74 their surface which interact with the ECM during the early stages of infection. Promastigotes
75 preferentially bind to type I collagen when they are inoculated into the skin, and that this
76 interaction is specific and saturable (10). The gp63, a surface protein of *Leishmania*, enhances
77 the *ex vivo* ability of this parasite to migrate through the ECM, degrading components of this
78 matrix, which increases the chances of the parasite to access the lymphatic system and blood
79 circulation and facilitates the activation and migration of macrophages (11). In a previous
80 study our group using mice with different patterns of resistance to *L. amazonensis* observed
81 changes in the ECM at the infection site and draining lymph nodes, confirming the
82 involvement of ECM in the host cell-parasite relationship (6). These results suggested that
83 amastigotes may be directly involved in the degradation of extracellular matrix components as
84 suggested by McGwire et al. (11).

85 So, the study of leishmaniasis cellular and humoral immunity, the mechanisms
86 responsible for parasite dissemination in the murine model, as well as the involvement and
87 influence of the ECM in parasite-host relationship are important to evaluate the mechanisms
88 involved in resistance and susceptibility to different species of *Leishmania*. Therefore, the aim

89 of this work was to study the expression of cytokines and ECM components in *L.*
90 *amazonensis*-infected mice from resistant and susceptible genetic backgrounds. The study
91 provides a better understanding of the factors responsible for the different clinical forms of
92 the disease and its broad spectrum of immune responses.

93

94 **METHODS**

95 **Animals**

96 Four to six weeks old female C57BL/10 and C3H.He mice were obtained from the
97 animal facilities of the Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil. These strains were
98 elected on the basis of their resistance or susceptibility pattern previously determined in our
99 laboratory (12). All experiments with animals were conducted in accordance with the
100 guidelines for experimental procedures of Oswaldo Cruz Foundation (process number
101 L001/07).

102 **Parasites**

103 The *L. amazonensis*, MHOM/BR/2000/MS501 strain, was isolated from the bone
104 marrow aspirate of a patient that developed visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul
105 state, Brazil, and was maintained by serial passages in BALB/c mice in our laboratory.
106 Periodically, amastigote forms were isolated from mouse footpads and cultivated in LIBHIT
107 medium (13) to obtain promastigotes for subsequent mouse infection.

108 **Experimental design**

109 Mice were divided into 4 groups with 25 animals each: G1: infected C57BL/10 mice;
110 G2: control C57BL/10 mice; G3: infected C3H.He mice; G4: control C3H.He mice. Animals
111 of G1 and G3 were subcutaneously infected by injecting 10^6 *L. amazonensis* promastigotes in
112 the right hind footpad (RHF) and animals of G2 and G4 were subcutaneously injected with 50
113 μ L of phosphate buffered saline (PBS) also in the RHF. Infective-stage metacyclic
114 promastigotes were obtained from stationary phase cultures (6 days old) and quantified prior
115 to infection in a Neubauer hemocytometer (14) using Erythrosine B stain, as described
116 elsewhere (15). Animals from each group were euthanized in CO₂ chamber prior to the
117 removal of footpad lesions, draining lymph nodes, spleen, and liver 24h, 30, 120 and 180 days
118 after infection. Fragments were removed, immediately frozen and stored at -70 °C.

119

120 qPCR primers design

121 Primers targeting the genes IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , iNOS, Laminin,
122 Fibronectin and Collagens I, III and IV were designed using the Primer Express software
123 version 3.0 (Applied Biosystems, 2004), and manufactured by Invitrogen (Table 1 displays
124 forward and reverse primer sequences). The Real Time PCR assays were performed by SYBR
125 Green detection and the relative quantification used the mouse gene RPLP0 (large ribosomal
126 protein) as the endogenous control for calibration of the mRNA levels.

127 mRNA extraction

128 Total RNA from tissues was extracted using the reagent TRIZOL (Invitrogen,
129 Karlsruhe, Germany) following the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was
130 performed with 1 μ g of total RNA using iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad Laboratories,
131 Hercules, CA) according to the manufacturer's recommendations.

132 qPCR assay conditions

133 All reactions were conducted using Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR
134 Systems. The reaction was performed using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied
135 Biosystems) with 5 μ L of 1:18 diluted cDNA for all targets, except IL-4 and Collagen IV for
136 which 10 μ L were used; 100nM of each - forward and reverse - primers was used in each
137 reaction. The temperature parameters consisted of a hold at 95 °C for 10 min followed by 40
138 temperature cycles of 95 °C for 15s and 58 °C for 1 min. A melt curve analysis was
139 performed on all reactions. The results were analyzed with the 7500 software v2.0.6 (Applied
140 Biosystems).

141

142 RESULTS**143 Cytokine expression analysis**

144 The mRNA expressions of IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TGF- β , TNF- α and iNOS were
145 assessed by qRT-PCR in the footpad, draining lymph node, liver and spleen of C57BL/10 and
146 C3H.He mice.

147 Analyses of the lesion sites of C57BL/10 mice showed an enhancement of
148 proinflammatory cytokines – IFN- γ , TNF- α and IL-12 - in the late phase, especially 180 days
149 after infection (Figures 1A, 1D and 1G, respectively), coinciding with an increase of the IL-10
150 expression (Figure 1M). In parallel, C3H.He mice presented a more discreet enhancement
151 only in the late phase (Figures 1A, 1D, 1G and 1M). The TGF- β expression showed an early

152 enhancement in both mouse strains, declining at later times (Figure 1J). In the early phase, the
153 iNOS expression increased in the C57BL/10 mice 24 hours after infection, whereas in the late
154 phase, both mouse strains presented increased iNOS expression (Figure 2A). The IL-4
155 cytokine was not detected in any mouse footpad (data not shown).

156 The cytokine evaluation in the draining lymph node showed very low cytokine
157 expression except for IFN- γ and IL-4 that showed an enhanced expression in the susceptible
158 C57BL/10 mice 30 days after infection. In resistant C3H.He mice none of the studied
159 cytokines presented significant levels of expression in this organ (data not shown).

160 In the liver, an enhancement of IFN- γ , TNF- α , IL-12 and IL-10 expressions was noted
161 in susceptible C57BL/10 mice, 30 days after infection (Figures 1B, 1E, 1H and 1N,
162 respectively). C3H.He mice presented a later increase of TNF- α 120 days after infection
163 (Figure 1E). The highest expressions of TGF- β and IL-10 were seen at 120 days after
164 infection in both mouse strains, although at higher levels in C57BL/10 mice (Figures 1K).
165 The expression of all cytokines studied after six months of infection, except TGF- β , was
166 lower in comparison to that of mock-infected mice (Figures 1B, 1E, 1H, 1K and 1N). The
167 iNOS expression decreased in the initial phase of infection for both mouse strains;
168 nevertheless the expression was higher, especially in C3H.He mice, 120 days after infection
169 (data not shown).

170 The spleen of both mouse strains presented an elevation of all cytokines expressions,
171 except TGF- β , thirty days after infection. At the late phase of infection, however, cytokines
172 expression was in low levels (Figures 1C, 1F, 1I and 1O). TGF- β was expressed at basal level
173 in the early phase of infection in both strains with a discreet increase 120 days after infection
174 (Figure 1L). The iNOS expression in C57BL/10 mice was higher 30 days after infection but
175 presented basal levels in the late phase. On the other hand, the iNOS expression in C3H.He
176 mice was low after 24 hours as well as in the late phase of infection (Figure 2B).

177 **Extracellular matrix component analysis**

178 Footpad qRT-PCR analyses showed an enhancement of fibronectin (FN) and laminin
179 (LM) expressions in *L. amazonensis*-infected C57BL/10 mice, 30 days after infection.
180 However, the level of mRNA was reduced to basal levels in the late phase of infection. On the
181 other hand, C3H.He mice showed only a transient increase of LM 30 days post-infection
182 (Figures 3A and 3D). The C3H.He mice maintained basal levels of collagen I expression
183 throughout the experiment while C57BL/10 mice presented a discreet increase in the early
184 phase and then a decrease in the late phase of the infection (180 days after infection) (Figure
185 3G). When collagen III was evaluated, expression levels were low in both mouse strains, with
Cardoso, FO

186 an enhancement 180 days after infection in the C57BL/10 mice (Figure 3J). Collagen IV
187 mRNA expression was evident only 30 days after infection in both mouse strains, but in the
188 C57BL/10 mice the levels were twice those of the C3H.He mice (Figure 3M).

189 The lymph node evaluation showed low levels of mRNA from ECM proteins at all
190 times after infection in both mouse strains. The exception was a higher expression of FN, and
191 collagens I, III and IV in C57BL/10 mice 30 days after infection (data not shown).

192 Liver evaluation of ECM protein expressions showed that FN, collagens I and III
193 presented the same pattern of expression with an enhancement of mRNA production 120 days
194 after infection in both mouse strains, although the increase was more pronounced in the
195 C57BL/10 mice (Figures 3B, 3H and 3K). LN presented reduced expression levels in both
196 mouse strains in comparison to mock-infected mice throughout the experiment (Figure 3E).
197 Collagen IV expression was at low levels in C3H.He mice throughout the infection, while
198 C57BL/10 showed a discreet increase 30 and 180 days after infection (Figure 3N).

199 The FN expression in the spleen was more evident 24h after infection in both mouse
200 strains. In the late phase, all mice present reduced levels of this mRNA (Figure 3C). On the
201 other hand, LN presented basal level of expression throughout the experiment in both mouse
202 strains (Figure 3F). Collagen I expression was also at basal levels throughout the experiment,
203 except 30 days after infection, when C57BL/10 mice presented an increased expression
204 (Figure 3I). Collagen III expression was more evident in the initial phase of infection,
205 showing a reduction in the late phase (Figure 3L). The highest collagen IV expression was
206 seen 30 days after infection in both mouse strains (Figure 3O).

207

208 **DISCUSSION**

209 In the present study cytokine mRNA expression profiles and extracellular matrix
210 mRNA expressions were evaluated in the lesion site (footpad), draining lymph node, spleen
211 and liver of C57BL/10 and C3H.He mice infected with *L. amazonensis*.

212 Immunological mechanisms of leishmaniasis are complex and the outcome of infection
213 depends on the balance between T-helper (Th)-1 and Th2 response for effective infection
214 control. Reiner (16) suggested that the same *L. major* epitope can induce, in mice, either a
215 Th1-resolving infection, or a Th2-disease progression response. Subsequently, another study,
216 also in the murine model infected with *L. major*, demonstrated that Th1 and NK cells produce
217 IFN- γ mediating resistance, while Th2-produced IL-4, inducing susceptibility (17). Host
218 genetics associated with *Leishmania* species inevitably influences the type of immune
219 response promoting disease progression or healing.

Cardoso, FO

220 Although Th1 are required to induce a good prognosis in leishmaniasis, excessive
221 proinflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF- α and IL-12 can contribute to lesion severity
222 by cellular recruitment in *L. braziliensis* infection (18). Our results showed, in *L. amazonensis*
223 susceptible C57BL/10 mice, an enhancement of these cytokines in the late phase of infection,
224 associated with footpad swelling, high parasite load and metastasis, as described previously
225 by Cardoso *et al.*, (12). In this mouse strain, TGF- β was enhanced in the beginning of the
226 infection which probably acts to deactivate macrophage cells (19; 20).

227 IL-10 was noted in the footpad in the late phase of the infection associated with an
228 augment of IL-12, TNF- α and IFN- γ . Although with another *Leishmania* species, these results
229 agrees with Follador *et al.* (21) who described that patients with localized cutaneous
230 leishmaniasis and mucocutaneous leishmaniasis have a solid type 1 immune response to *L.*
231 *braziliensis* antigen, with a high production of IFN- γ and TNF- α and a reduced efficiency of
232 IL-10 in down-modulating IFN- γ production. The iNOS evaluation showed an enhancement
233 in the beginning of infection in C57BL/10 mice, probably due to the augment of IFN type 1.

234 Overall, resistant C3H.He mice presented lower levels of cytokines when compared to
235 C57BL/10 mice, probably because the adaptive response in resistant mice is less prominent.
236 Therefore, we can speculate that parasite control may be dependent on innate immune
237 responses, with the participation of neutrophils as described by Follador *et al.* (21) in
238 subclinical patients infected with *L. braziliensis*.

239 Lymph nodes are broadly accepted to be the first important lymphoid tissues affected
240 after dissemination of the parasite from skin macrophages Nevertheless, in *Leishmania*
241 *infantum* infection, cytokine response in lymph nodes is scarce (22). The relation between
242 parasite burden and the balance of IFN- γ , TNF- α , TGF- β and IL-10 expression was evaluated
243 in dogs by Alves *et al.* (23) They described a higher expression of pro-inflammatory IFN- γ
244 and TNF- α cytokines and a lower number of parasites in asymptomatic dogs naturally
245 infected with *L. infantum*; showing that these cytokines play a role in protection against
246 *Leishmania* infection. In symptomatic dogs, lymph node results demonstrated high anti-
247 inflammatory cytokine production, indicating a role for IL-10 and TGF- β in disease
248 progression.

249 The spleen is responsible for the major immune response in visceral leishmaniasis. In
250 dogs infected with *L. chagasi*, the level of splenic TNF- α showed correlation with parasite
251 load and, together with IL-10, may represent an important marker for the evolution of the
252 infection process (24). In the present study using the *L. amazonensis*-infected C57BL/10
253 mouse model, the concomitant presence of TNF- α and IL-10 was also associated with parasite
254 presence in this organ. Other pro-inflammatory cytokines such as IL-12 and IFN- γ were also
Cardoso, FO

255 present, as well as iNOS 30 days after infection when the parasites arrived at the spleen. The
256 same cytokine profile was noted in C3H.He mice. Whilst no parasite was noted in the
257 C3H.He spleen, the presence of *Leishmania* antigen cannot be discarded.

258 The liver is continuously exposed to a large antigenic load because of its location and
259 function. It has an "epithelial constitution" and contains large numbers of phagocytic cells,
260 antigen-presenting cells and lymphocytes and it is a site for the production of cytokines,
261 complement components and acute phase proteins. In the liver, cytokines such as IFN- γ and
262 TNF- α are involved in the activation of immunocompetent cells and account for the final
263 microbicidal response (25; 26). Our results demonstrated a pro-inflammatory cytokine
264 expression (IFN- γ , TNF- α and IL-12) in susceptible C57BL/10 mice livers at the beginning of
265 the infection and regulatory cytokines (TGF- β and IL-10) in the late phase. Although viable
266 parasites could not be demonstrated in the liver (12), we hypothesized that the parasite
267 antigens might be found in this organ.

268 An organ-compartmentalization of the cytokine response against *L. amazonensis*
269 antigens was observed in our model, in the same way as described by Lamb *et al.* (27) in *L.*
270 *major*. A direct association between cytokine expressions in different organs was not
271 observed. However we noted a mix of different cytokines produced in all organs studied, both
272 in C57BL/10 and C3H.He mice, corroborating the observation of mixed immune responses by
273 other authors in *L. infantum* (28; 29) and in *L. amazonensis* (30) murine models.

274 Besides the immunological factors, the ECM can play a pivotal role during tissue
275 invasion with *Leishmania* infection, since it presents bioactive macromolecules which
276 modulate cellular events such as adhesion, migration, proliferation, differentiation, and
277 survival (31). Thus, it is presumptive that *Leishmania* uses certain mechanisms which are
278 capable of altering the organization of the matrix, favoring its entrance into macrophages.
279 Studies suggest that *Trypanosoma cruzi* also causes changes in the ECM. It affects the
280 balance of cytokine and chemokines (32) in order to modulate and escape from the
281 inflammatory and immune responses (33; 34).

282 In the present study an exacerbated expression of LM was noted in the C57BL/10
283 mice footpads, 30 days post infection. Increased levels of collagen type IV following FN
284 enhancement was also noted. Probably, the increase in mRNA expression of these proteins
285 occurs in an attempt to recover the damaged tissue caused by parasite proliferation. These
286 results corroborate with Calabrese *et al.* (35) who demonstrated - *in vitro* using retinal
287 pigmented epithelial (RPE) cells - a relationship between FN and LM production and *L.*
288 *amazonensis* internalization of promastigotes. The increased expression of these proteins was
289 directly associated with a high number of promastigotes adhered and internalized in RPE
Cardoso, FO

290 cells. However, in the late phase of infection these levels decreased dramatically, especially
291 LM. At this stage, according to previous observations from our group (12), these mice have a
292 high parasite load and the tissue at this stage is constituted almost exclusively of parasitized
293 macrophages and rare fibroblasts, which may explain the decreased expression of matrix
294 proteins. In C3H.He mice, the lack of matrix protein expressions was probably not due to the
295 absence of fibroblasts, but due to tissue preservation, which corroborates the histological
296 description by Almeida *et al.* (36).

297 The synthesis of collagen and FN is stimulated by TGF- β in different cell types (37;
298 38). In our study both FN, collagen I and collagen III were enhanced in the liver and lymph
299 nodes, overlapping to high TGF- β expression in both C57BL/10 and C3H.He mice, 30 days
300 after infection. This was not observed in the footpad or spleen. C57BL/10 mice also exhibited
301 an enhancement of type III collagen in the footpad, in the late phase of infection, when a great
302 number of parasitized macrophages were observed.

303 The presence of type III collagen appeared to offer support to the inflammatory cells,
304 mainly vacuolated and parasitized macrophages as described by our group in a previous study
305 (6). Thus, the present results indicate that collagen may be important for assessing the
306 pathogenesis of experimental leishmaniasis.

307

308 **ACKNOWLEDGEMENTS**

309 The authors wish to thank the Real time PCR platform from the Post graduation
310 Program of Parasitological Biology, IOC/FIOCRUZ and the Immunopharmacology Laboratory,
311 IOC/FIOCRUZ for the use of their real time PCR machines. The authors also wish to thank
312 the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTISFIOCRUZ for the use
313 of the nanodrop machine.

314

315 **FINANCIAL DISCLOSURE**

316 This work was supported by a grant from Instituto Oswaldo Cruz and Fundação de Amparo à
317 Pesquisa do Rio de Janeiro (E-26/110.331/2011 - APQ-1). Kátia da Silva Calabrese (CNPq n°
318 308630/2008-4) and Ana Lucia Abreu-Silva (CNPq n° 306218/2010-0) are senior researchers.
319 The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or
320 preparation of the manuscript.

321

322 **COMPETING INTERESTS**

323 The authors declare no conflict of interest

Cardoso, FO

324 **REFERENCES**

- 325 1 Barral A, Pedral Sampaio D, Grimaldi G, Momen H, McMahon Pratt D et al. (1991)
326 Leishmaniasis in Bahia, Brazil - evidence that *Leishmania amazonensis* produces a
327 wide spectrum of clinical-disease. American Journal of Tropical Medicine and
328 Hygiene 44(5): 536-546.
- 329 2 Calabrese KD, Gonçalves da Costa SC (1992) Enhancement of *Leishmania*
330 *amazonensis* infection in BCG nonresponder mice by BCG-antigen specific vaccine.
331 Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 87: 49-56.
- 332 3 Cupolilo SMN, Souza CSF, Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC
333 (2003) Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human
334 diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. Histology and
335 Histopathology 18(4): 1059-1065.
- 336 4 Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Tedesco RC, Mortara RA, Gonçalves da Costa SC
337 (2003) Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania*
338 (*Leishmania*) *amazonensis*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
339 68(6): 661-665.
- 340 5 Almeida RP, Barral-Netto M, de Jesus AMR, de Freitas LAR, Carvalho EM et al.
341 (1996) Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with
342 cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/c mice. The American Journal
343 of Tropical Medicine and Hygiene 54(2): 178-184.
- 344 6 Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SMN, Cardoso FO, Souza CSF et al. (2004)
345 Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in
346 mice experimentally infected. Veterinary Parasitology 121(3-4): 179-187.
- 347 7 Barral A, Badaró R, Barral-Netto M, Grimaldi G, Momen H et al. (1986) Isolation of
348 *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American
349 visceral leishmaniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
350 35(4): 732-734.
- 351 8 Sacks D, Noben-Trauth N (2002) The immunology of susceptibility and resistance to
352 *Leishmania major* in mice. Nature Reviews Immunology 2(11): 845-858.
- 353 9 Vanloubbeeck YF, Ramer AE, Jie F, Jones DE (2004) CD4(+) Th1 cells induced by
354 dendritic cell-based immunotherapy in mice chronically infected with *Leishmania*
355 *amazonensis* do not promote healing. Infection and Immunity 72(8): 4455-4463.
- 356 10 Lira R, Rosales Encina JL, Arguello C (1997) *Leishmania mexicana*: binding of
357 promastigotes to type I collagen. Experimental Parasitology 85(2): 149-157.

- 358 11 McGwire BS, Chang KP, Engman DM (2003) Migration through the extracellular
359 matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease
360 gp63. *Infection and Immunity* 71(2): 1008-1010.
- 361 12 Cardoso FO, de Souza CSF, Mendes VG, Abreu-Silva AL, Gonçalves da Costa SC et
362 al. (2010) Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in
363 resistant and in susceptible mice. *Journal of Infectious Diseases* 201(12): 1933-1940.
- 364 13 Gonçalves da Costa SC, Lagrange PH (1981) Development of cell mediated immunity
365 to flagellar antigens and acquired resistance to infection by *Trypanosoma cruzi* in
366 mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 76(4): 367-381.
- 367 14 Hoff R (1974) Method for counting and concentrating living *Trypanosoma cruzi* in
368 blood lysed with ammonium-chloride. *Journal of Parasitology* 60(3): 527-528.
- 369 15 Hodgkinson VH, Herman R, Sempreviso L (1980) *Leishmania donovani* - correlation
370 among assays of amastigote viability. *Experimental Parasitology* 50(3): 397-408.
- 371 16 Reiner SL, Wang ZE, Hatam F, Scott P, Locksley RM (1993) T(H)1 and T(H)2 cell
372 antigen receptors in experimental Leishmaniasis. *Science* 259(5100): 1457-1460.
- 373 17 Reed SG, Scott P (1993) T-cell and cytokine responses in Leishmaniasis. *Current*
374 *Opinion in Immunology* 5(4): 524-531.
- 375 18 Vargas-Inchaustegui DA, Hogg AE, Tulliano G, Llanos-Cuentas A, Arevalo J et al.
376 (2010) CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania*
377 *braziliensis* infection. *Infection and Immunity* 78(1): 301-308.
- 378 19 Barral A, Barralnetto M, Almeida R, Dejesus AR, Grimaldi G et al. (1992)
379 Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection.
380 *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47(5): 587-592.
- 381 20 Soong L (2012) Subversion and utilization of host innate defense by *Leishmania*
382 *amazonensis*. *Frontiers in Immunology* 3: doi: 10.3389/fimmu.2012.00058.
- 383 21 Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP et al. (2002) Epidemiologic
384 and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis*
385 infection. *Clinical Infectious Diseases* 34(11): E54-E58.
- 386 22 Maia C, Campino L (2012) Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania*
387 *infantum* infection in the dog. *Journal of Tropical Medicine* 2012: doi:
388 10.1155/2012/541571.
- 389 23 Alves CF, de Amorim IFG, Moura EP, Ribeiro RR, Michalick MS et al. (2009)
390 Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes
391 associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected
392 with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and*

- 393 Immunopathology 128(4): 349-358.
- 394 24 Michelin AD, Perri SHV, De Lima VMF (2011) Evaluation of TNF-alpha, IL-4, and
 395 IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected
 396 dogs. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 105(5): 373-383.
- 397 25 Murray HW, Nathan CF (1999) Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*:
 398 Reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral
 399 *Leishmania donovani*. Journal of Experimental Medicine 189(4): 741-746.
- 400 26 Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis.
 401 Lancet 366(9496): 1561-1577.
- 402 27 Lamb TJ, Graham AL, Le Goff L, Allen JE (2005) Co-infected C57BL/6 mice mount
 403 appropriately polarized and compartmentalized cytokine responses to *Litomosoides*
 404 *sigmodontis* and *Leishmania major* but disease progression is altered. Parasite
 405 Immunology 27(9): 317-324.
- 406 28 Rolao N, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L (2007) *Leishmania infantum*: Mixed
 407 T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice.
 408 Experimental Parasitology 115(3): 270-276.
- 409 29 Maia C, Ramada J, Cristovao JM, Goncalves L, Campino L (2009) Diagnosis of
 410 canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues.
 411 Veterinary Journal 179(1): 142-144.
- 412 30 Xin LJ, Li YG, Soong L (2007) Role of interleukin-1 beta in activating the
 413 CD11c(high) CD45RBD(-) dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*
 414 specific CD4(+) T cells *in vitro* and *in vivo*. Infection and Immunity 75(10): 5018-
 415 5026.
- 416 31 Daley WP, Peters SB, Larsen M (2008) Extracellular matrix dynamics in development
 417 and regenerative medicine. Journal of Cell Science 121(3): 255-264.
- 418 32 Duaso J, Yanez E, Castillo C, Galanti N, Cabrera G et al. (2012) Reorganization of
 419 extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic Chagas disease:
 420 mechanism of parasite invasion or local placental defense? Journal of Tropical
 421 Medicine 2012: 1-8.
- 422 33 Marino A, Silva AA, Pinho RT, Lannes-Vieira J (2003) *Trypanosoma cruzi* infection:
 423 a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and
 424 adhesion and chemoattractant molecules. Brazilian Journal of Medical and Biological
 425 Research 36(8): 1121-1133.
- 426 34 Duaso J, Rojo G, Cabrera G, Galanti N, Bosco C et al. (2010) *Trypanosoma cruzi*
 427 induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an *ex vivo* infection

- 428 model of human placenta. *Placenta* 31(8): 705-711.
- 429 35 Calabrese KD, Silva LD, Carvalho LOP, Hardoim DD, da Silva-Almeida M et al.
430 (2011) Infection of retinal epithelial cells with *L. amazonensis* impacts in extracellular
431 matrix proteins. *Parasitology Research* 109(3): 727-736.
- 432 36 Silva-Almeida M, Carvalho LOP, Abreu-Silva AL, Souza CSF, Hardoim DJ et al.
433 (2012) Extracellular matrix alterations in experimental *Leishmania amazonensis*
434 infection in susceptible and resistant mice. *Veterinary Research* 43.
- 435 37 Igotz RA, Massague J (1986) Transforming growth-factor-beta stimulates the
436 expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular-
437 matrix. *Journal of Biological Chemistry* 261(9): 4337-4345.
- 438 38 Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA (1987) Transforming growth-factor-beta (TGF-
439 beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type-I and type-III
440 collagen and fibronectin messenger-RNAs in normal human dermal fibroblasts.
441 *Biochemical Journal* 247(3): 597-604.

442 **Figure 1. Cytokine expression profile.**

443 Cytokine expression in the lesion site, liver and spleen of *L. amazonensis*-infected C57BL/10
444 (grey columns) and C3H.He (black columns) mice. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-12, TGF-
445 β and IL-10 was measured by quantitative RT-PCR using the $\Delta\Delta$ CT method in comparison to
446 normal mice from the same genetic background. All dosages above 1 (plain line) mean
447 enhanced expression, whereas dosages below 1 represent suppressed expression in the
448 infected mice.

449

450 **Figure2. iNOS expression.**

451 iNOS expression in the lesion site and spleen of *L. amazonensis*-infected C57BL/10 (grey
452 columns) and C3H.He (black columns) mice. Expression of iNOS was measured by
453 quantitative RT-PCR using the $\Delta\Delta$ CT method in comparison to normal mice from the same
454 genetic background. All dosages above 1 (plain line) mean enhanced expression, whereas
455 dosages below 1 represent suppressed expression in the infected mice.

456

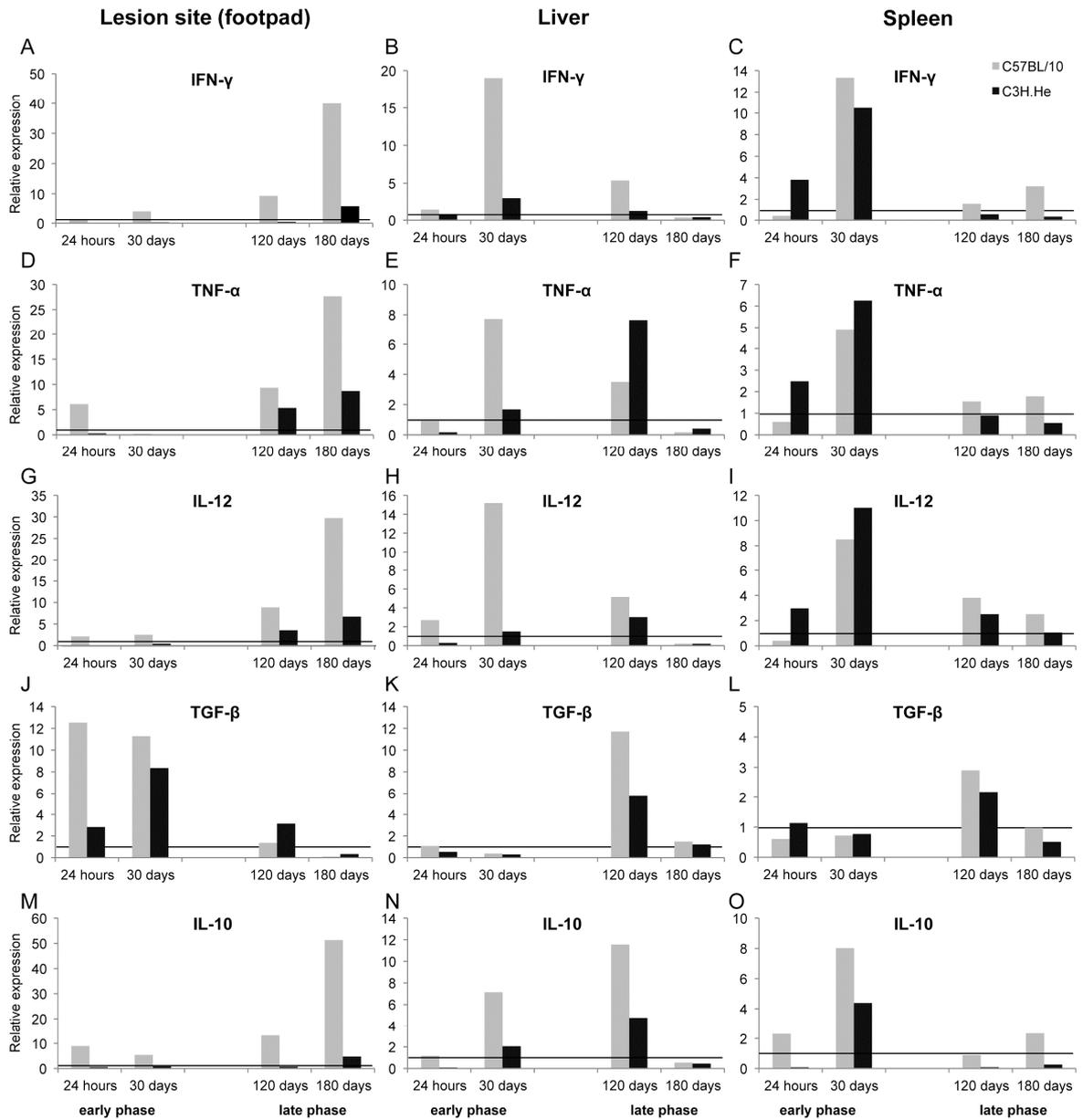
457 **Figure 3. Extracellular matrix protein expression.**

458 Expression profile of extracellular matrix proteins from the lesion site, liver and spleen of *L.*
459 *amazonensis*-infected C57BL/10 (grey columns) and C3H.He (black columns) mice.
460 Expression of fibronectin, laminin and collagens I, III and IV was measured by quantitative
461 RT-PCR using the $\Delta\Delta$ CT method in comparison to normal mice from the same genetic
462 background. All dosages above 1 (plain line) mean enhanced expression, whereas dosages
463 below 1 represent suppressed expression in the infected mice.

464 **Table 1 - Primers used for Real Time PCR**

Target	Primer sequence (5' – 3')		Sequence source
	Forward	Reverse	
IL-4	TTGAACGAGGTCACAGGAGAAG	AGGACGTTTGGCACATCCA	M29854.1
IL-10	GATGCCCCAGGCAGAGAA	CACCCAGGGAATTCAAATGC	NM_010548.2
IL-12	ACAGGGTGATGGGCTATCTGA	ACAGGGTGATGGGCTATCTGA	NM_001159424.1
TNF-α	CACAAGATGCTGGGACAGTGA	CACAAGATGCTGGGACAGTGA	NM_013693.2
IFN-γ	TTGGCTTTGCAGCTCTTCCT	TGACTGTGCCGTGGCAGTA	NM_008337.3
TGF-β	GCAGTGGCTGAACCAAGGA	GCAGTGGCTGAACCAAGGA	NM_011577.1
iNOS	TTGTCTGCGGCGATGTCA	TTGTCTGCGGCGATGTCA	NM_008713.4
Laminin	GCAGGACGACGACGTCATCT	GCAGGACGACGACGTCATCT	NM_001081171.2
Fibronectin	GTGTAGCACAACTTCCAATTACGAA	GTGTAGCACAACTTCCAATTACGAA	NM_010233.1
Collagen I	CTTCACCTACAGCACCCCTTGTG	CTTCACCTACAGCACCCCTTGTG	NM_007742.3
Collagen III	AAGGCGAATTCAAGGCTGAA	AAGGCGAATTCAAGGCTGAA	NM_009930.2
Collagen IV	ACGGGCCAACGCTTCTTC	ACGGGCCAACGCTTCTTC	NM_009932.3
RPLP0	GCCAGCTCAGAACACTGGTCTA	GCCAGCTCAGAACACTGGTCTA	NM_007475.5

Figure 1



466

Figure 2

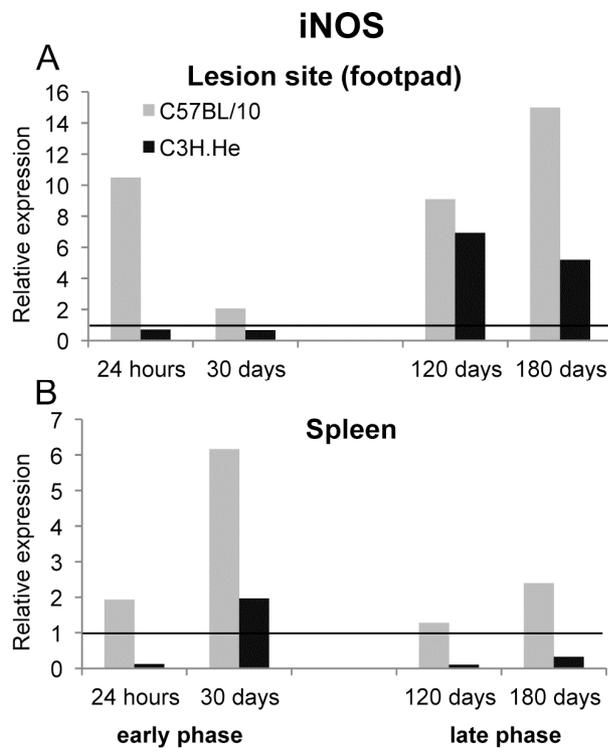
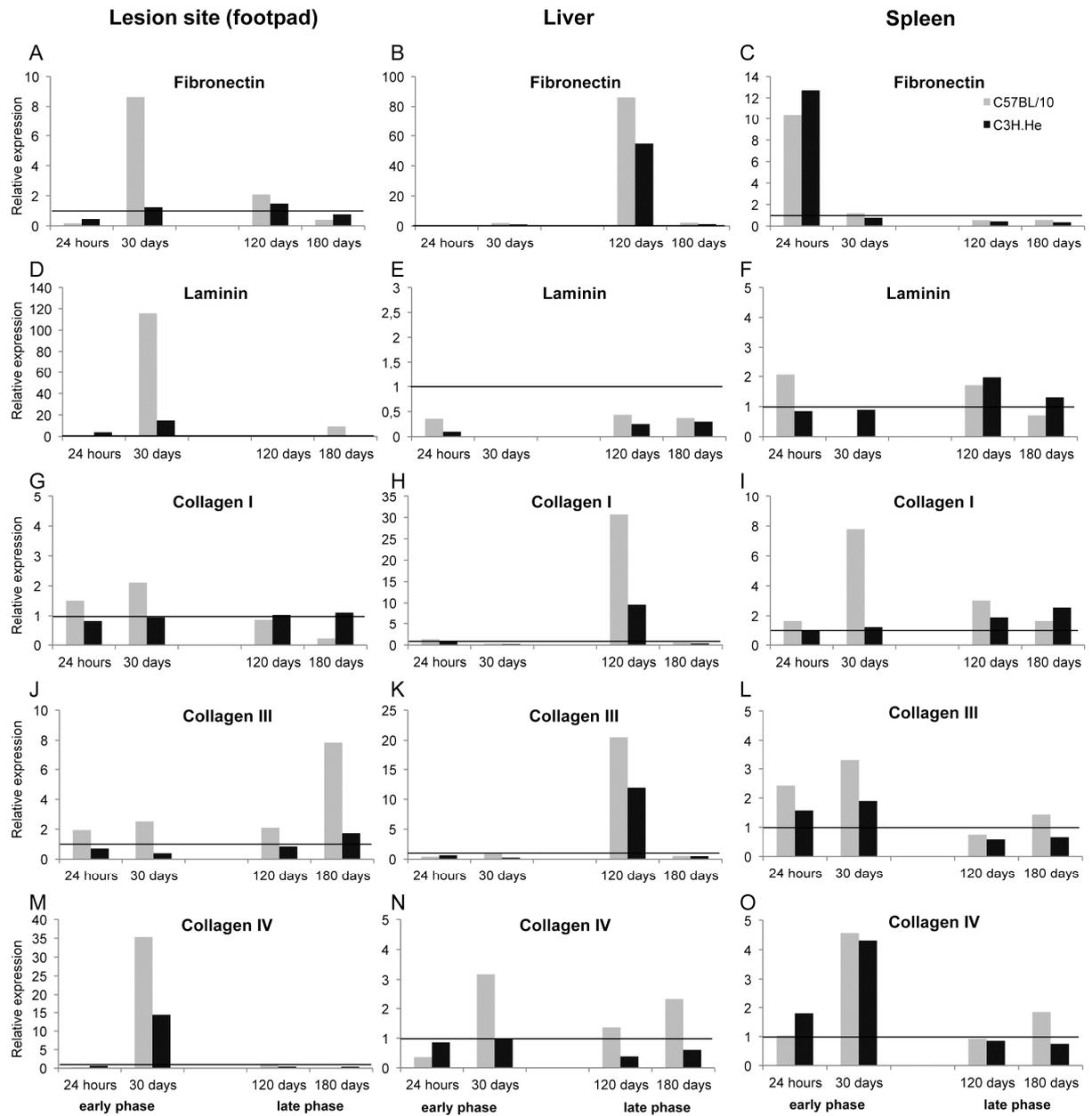


Figure 3



5. DISCUSSÃO

Dentre as espécies de *Leishmania* relacionadas à patogênese das leishmanioses, está claro que uma mesma espécie/isolado pode estar relacionada a mais de uma forma clínica da doença, como por exemplo, *L. amazonensis*, que faz parte do complexo fenotípico *L. mexicana* (Rioux e cols., 1990) e pode ser responsável pelas formas cutânea, mucocutânea, difusa ou visceral da doença (Grimaldi & Tesh, 1993; Barral e cols., 1991; Souza, 2002). Essa espécie de *Leishmania* foi utilizada em nosso estudo, primeiramente, por ter sido implicada em todo o espectro clínico das leishmanioses (Barral e cols., 1991) e também devido às diferenças observadas em relação às características imunopatológicas descritas nas infecções por *L. major* no modelo murino (Rossi-Bergman e cols., 1993; Afonso & Scott, 1993; Soong, 2012), protótipo da dicotomia Th1/Th2 (Coffman e cols., 1991).

Parasitas pertencentes ao complexo *L. mexicana*, diferentemente de *L. major*, produzem infecções crônicas na maioria das linhagens murinas (Calabrese & Gonçalves da Costa, 1992; Belkaid e cols., 2002a). Camundongos das linhagens C3H e C57BL/6, normalmente resistentes à *L. major*, desenvolvem lesões persistentes quando infectados com *L. amazonensis* (Alexander & Russell, 1985), enquanto os camundongos BALB/c e C57BL/10 produzem lesões metastáticas e chegam a perder a pata infectada (Calabrese & Gonçalves da Costa, 1992). Um estudo preliminar realizado em nosso laboratório permitiu a determinação dos graus de suscetibilidade e resistência à infecção subcutânea por *L. amazonensis* em seis diferentes linhagens de camundongos singênicos (Souza, 2002). A partir deste estudo, escolhemos quatro linhagens de camundongos para estudar as diferenças imunopatológicas apresentadas de acordo com os níveis de suscetibilidade e resistência a infecção por *L. amazonensis* (Cardoso e cols., 2010).

É importante frisar que os mecanismos genéticos que determinam a suscetibilidade e/ou resistência à infecção por *Leishmania* dependem de, pelo menos, dois componentes: um ligado à capacidade do macrófago do hospedeiro em suportar ou inibir a multiplicação do parasito e o outro de controlar a magnitude, qualidade e a forma de como a resposta imune adaptativa se comporta frente ao parasito (Mauel & Behin, 1987). De um modo geral, o desenvolvimento ou não da infecção depende da interação entre o parasito e o hospedeiro. A eliminação da *Leishmania* está relacionada com o desenvolvimento de uma imunidade celular capaz de proteger o hospedeiro contra o parasito (Pessôa, 1961; Gonçalves da Costa e cols., 1988). Em camundongos, foi demonstrado que a infecção por *Leishmania* depende da ativação de linfócitos T CD4⁺, das subpopulações Th1 e Th2 (Scott e cols., 1988).

Infecções experimentais no modelo murino com *L. major* têm sido amplamente utilizadas em estudos sobre a resposta imunológica nas leishmanioses. Tais estudos têm provido informações sobre como as células Th1 e Th2 se desenvolvem após a infecção; o que

regula seu desenvolvimento e como elas podem ser mantidas (Reiner & Locksley, 1995; Sacks & Noben-Trauth, 2002). É amplamente aceito na literatura que a suscetibilidade dos camundongos BALB/c à infecção por *L. major* está associada a células T do tipo Th2, as quais produzem IL-4 e IL-10, enquanto a resistência de outras linhagens de camundongos está associada a diferenciação das células T para o padrão Th1, as quais produzem IL-12 e IFN- γ (Sacks & Noben-Trauth, 2002).

Embora a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-12, IFN- γ e TNF- α esteja relacionada à cura das lesões na infecção por *L. major* em humanos e, particularmente, em camundongos (Barral e cols., 1993; Kane & Mosser, 2001; Murray e cols., 2002; Trinchieri, 2003), na infecção por *L. braziliensis* a alta produção destas citocinas, principalmente IFN- γ e TNF- α , é observada em pacientes que apresentam a forma mucosa da doença (Follador e cols., 2002). O aumento destas citocinas nestes indivíduos está relacionado tanto ao controle da multiplicação do parasito na fase inicial da infecção, quanto aos danos teciduais observados (Ribeiro-de-Jesus e cols., 1998). Além disso, esses múltiplos mediadores inflamatórios produzidos podem contribuir para a severidade da doença por aumentar o recrutamento celular como visto por Vargas-Inchaustegui e colaboradores (2010). No entanto, a produção de citocinas regulatórias, principalmente IL-10, está relacionada ao controle da resposta inflamatória exacerbada, característica da leishmaniose tegumentar causada por espécies do subgênero *Viannia*, em especial *L. braziliensis*. Antonelli e colaboradores (2004) utilizando culturas de PBMC de pacientes com a forma cutânea localizada, estimulados com antígenos solúveis de *Leishmania* demonstraram uma forte correlação positiva entre IL-10 e TNF- α , sugerindo um mecanismo ativo de autorregulação intrínseca do macrófago nestes pacientes. Por outro lado, em pacientes que apresentam a forma mucosa da doença, observa-se a perda desta correlação (Gaze e cols., 2006), juntamente com a diminuição da expressão de receptores para IL-10 (Faria e cols., 2005), o que pode levar a uma resposta inflamatória pobremente controlada. Tais observações corroboram os dados obtidos em nosso estudo na lesão primária, onde os camundongos mais sensíveis (C57BL/10) apresentaram, na fase tardia da infecção, uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- γ e TNF- α e também IL-10. A alta produção de citocinas pró-inflamatórias estaria relacionada ao grande dano tecidual observado e a presença de intenso infiltrado inflamatório nesta linhagem. A IL-10, apesar de ter um papel regulatório, no nosso modelo estaria sendo ineficaz em conter os efeitos nocivos provocados pelo IFN- γ e TNF- α , provavelmente pela redução dos seus receptores na superfície das células, tornando-as não responsivas a sua ação como observado em pacientes infectados por *L. braziliensis* que apresentam as formas mucosa e cutânea localizada da doença (Follador e cols., 2002).

Na leishmaniose tegumentar (LT) por *L. major*, a resolução clínica está relacionada tanto com a produção de óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) (Diefenbach e cols., 1998; Liew e cols., 1990), quanto pela manutenção do controle dos parasitos persistentes após a cura clínica (Stenger e cols., 1996). A produção de NO por iNOS tem um papel chave na defesa imunológica, sendo implicado tanto na morte dos parasitos internalizados pelos macrófagos, quanto na patogênese de doenças inflamatórias e autoimunes (Nathan, 1997; revisado por Samuel, 2001). A ativação dos macrófagos e consequente produção de NO é mediada principalmente por IFN- γ , embora IFN- α/β também possa exercer este papel (revisado por Samuel, 2001). Um aumento da expressão de iNOS na pata de camundongos C57BL/10 infectados por *L. amazonensis* após 24 horas de infecção e na fase tardia foi observado em nosso estudo. Este aumento estava associado com a produção concomitante de IFN- γ na fase tardia de infecção. O aumento da expressão de iNOS na fase inicial (24 horas) poderia estar relacionado com a produção de IFN do tipo I e associada também ao dano tecidual observado.

Na fase inicial da infecção, observamos a predominância da expressão de TGF- β , principalmente nos camundongos sensíveis (C57BL/10). Esta citocina, dentre outros efeitos, regula negativamente certas funções do macrófago e é produzida por estas células nas lesões de camundongos infectados com *L. amazonensis* (Barral-Neto e cols., 1992), assim como por macrófagos humanos infectados por *Leishmania chagasi* (Gantt e cols., 2003) e *L. braziliensis* (Barral e cols., 1995). Além disso, amastigotas de *L. amazonensis* podem apresentar em sua superfície fosfatidilserina, levando ao aumento da carga parasitária e supressão da resposta imunológica do hospedeiro através da produção de IL-10 e TGF- β (Wanderley e cols., 2006). Desta forma, em nosso estudo a expressão de TGF- β nos camundongos C57BL/10 estaria favorecendo o estabelecimento da infecção e proliferação dos parasitos nesta fase da infecção.

Pacientes com infecção subclínica por *L. braziliensis* apresentam baixos níveis de produção de citocinas como IFN- γ e TNF- α em comparação com pacientes que apresentam a forma ativa da doença (Bittar e cols., 2007). Em nosso modelo, também observamos uma menor expressão de citocinas na pata de camundongos C3H.He infectados com *L. amazonensis*, os quais são resistentes a infecção e apresentam uma baixíssima carga parasitária em comparação com os camundongos C57BL/10, os quais produzem altos níveis de expressão de citocinas e doença ativa e progressiva. Provavelmente, o controle da infecção nos camundongos resistentes está relacionado com a resposta inata, com a participação de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e particularmente células NK.

Os linfonodos são os primeiros órgãos linfóides a serem afetados pelo parasito após sua disseminação a partir da pele, portanto, a resposta imunológica ocorrida neste local tem

importância crucial na determinação do curso da infecção por *Leishmania*. No entanto, em infecções por *Leishmania infantum* a resposta imunológica nestes órgãos é escassa (Maia & Campino, 2012). Já em infecções por *L. amazonensis* é observado um retardo na expressão de mRNA de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias nos linfonodos de camundongos infectados (Ji e cols., 2003). Resultado semelhante foi observado em nosso estudo quando analisamos a expressão de mRNA nos linfonodos de camundongos C57BL/10 e C3H.He após 24 horas de infecção. Além disso, a dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de linfócitos após 24 horas de estimulação por *L. amazonensis* demonstrou a ausência de produção de citocinas por estas células nas quatro linhagens de camundongos utilizadas (C57BL/10, CBA, DBA/2 e C3H.He). Em contrapartida, quando as mesmas citocinas foram dosadas no soro desses camundongos, observamos que o mesmo não ocorre nas primeiras horas de infecção, havendo a produção, muitas vezes elevada, de citocinas tais como: IFN- γ e IL-4 em algumas linhagens de camundongos.

Alves e colaboradores (2009) demonstraram uma alta expressão de citocinas proinflamatórias (INF- γ e TNF- α) e carga parasitária baixa em linfonodos de cães assintomáticos naturalmente infectados por *L. chagasi*, demonstrando que estas citocinas têm um papel na proteção contra a infecção por *Leishmania*. Por outro lado, em linfonodos de cães sintomáticos havia uma maior produção de citocinas antiinflamatórias como IL-10 e TGF- β e esta produção estaria relacionada à progressão da doença. Nossos resultados demonstraram uma alta expressão de IL-4 nos linfonodos de camundongos C57BL/10 infectados por *L. amazonensis*, associada à alta carga parasitária observada 30 dias após infecção (dados não mostrados). Esta associação indica um fenótipo de suscetibilidade à doença, com a indução de um perfil de resposta do tipo Th2 neste local. Estas observações corroboram os resultados obtidos por Quinnell e colaboradores (2001), onde cães naturalmente infectados mostraram uma correlação positiva entre a severidade da doença e a presença de IL-4 na medula óssea destes cães.

Embora o baço seja o principal órgão responsável pela resposta imunológica na leishmaniose visceral, pouco se sabe sobre o mecanismo de resposta neste órgão. Trabalhos utilizando cães infectados por *L. chagasi* mostraram uma correlação entre o nível de produção de TNF- α e a carga parasitária, com a participação de IL-10, sugerindo-se a utilização destes parâmetros como marcadores para progressão da infecção (Michelin e cols., 2011). Uma correlação positiva entre expressão de IL-10, carga parasitária e progressão da doença também foi encontrada no baço de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* (Lage e cols., 2007). Em nosso estudo os camundongos C57BL/10 infectados por *L. amazonensis* também apresentaram uma expressão concomitante de TNF- α e IL-10, associadas com a presença de

parasitos no baço. Outras citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ também estavam expressas, assim como iNOS, 30 dias após a infecção, momento em que o parasito foi detectado neste órgão. O mesmo perfil de expressão foi observado nos camundongos resistentes (C3H.He) entretanto, a presença do parasito não foi observada, embora não se possa descartar a presença de antígenos parasitários neste local.

O fígado exerce diversas funções no organismo, não só participando no metabolismo de diversas substâncias, como também exerce um importante papel tanto na imunidade local, quanto sistêmica (O'Farrelly, 2004). Devido à sua localização é continuamente exposto a grande carga antigênica. Tem uma "constituição epitelial" e contém grandes quantidades de células fagocíticas, células apresentadoras de antígeno e linfócitos, além de ser um local importante na produção de citocinas, componentes do complemento e proteínas de fase aguda. No fígado, citocinas como IFN- γ e TNF- α estão envolvidas na ativação de células imunocompetentes e contribuem para a resposta microbicida final (Murray & Nathan, 1999; Murray e cols., 2005). Nossos resultados demonstram a expressão de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , TNF- α e IL-12) no fígado dos camundongos C57BL/10 na fase inicial da infecção e de citocinas regulatórias (TGF- β e IL-10) na fase tardia. Embora a presença do parasito não seja observada, a presença de antígenos parasitários não pode ser descartada. Este fato explicaria a expressão destas citocinas.

De acordo com nossas observações, a resposta imunológica a *L. amazonensis* demonstra uma compartimentalização e conseqüente diferença na produção/expressão de citocinas nos diferentes órgãos estudados, assim como descrito por Lamb e colaboradores (2005) na infecção por *L. major*. Apesar de não haver uma associação direta entre a produção/expressão de citocinas nos órgãos analisados no presente estudo, todas as linhagens de camundongos analisadas exibiram uma produção mista de citocinas nestes órgãos, como observado em outros estudos no modelo murino com *L. infantum* (Rolão e cols., 2007; Maia e cols., 2009) e *L. amazonensis* (Xin e cols., 2007). Tais achados, diferentemente do observado em infecções por *L. major* onde camundongos suscetíveis e resistentes exibem uma resposta imunológica polarizada, reforçam ainda mais a ideia que respostas diferentes são induzidas por diferentes espécies de *Leishmania* e que em infecções produzidas por *L. amazonensis* não há predominância de células Th1/Th2 e há uma produção concomitante de citocinas de ambas as subpopulações (Silveira, 2009; McMahon-Pratt e Alexander, 2004).

Adicionalmente aos fatores imunológicos, a matriz extracelular (MEC) exerce um importante papel durante o processo de invasão e estabelecimento da infecção por *Leishmania*. A MEC é constituída por macromoléculas bioativas que modulam eventos celulares como adesão, migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência (Daley e cols.,

2008). Deste modo, parasitos do gênero *Leishmania* dispõem de certos mecanismos capazes de alterar a constituição dessa matriz facilitando e permitindo que sua entrada nos macrófagos, assim como sua disseminação pelo organismo hospedeiro ocorra. Estudos sugerem que outros tripanosomatídeos, como *Trypanosoma cruzi*, além de provocarem alterações na MEC, modulam a produção de citocinas e quimiocinas (Duaso e cols., 2012) para escapar da resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro (Marino e cols., 2003; Duaso e cols., 2010).

Calabrese e colaboradores (2011), utilizando células do epitélio pigmentado da retina (RPR) infectadas por *L. amazonensis*, demonstraram a relação entre a produção de fibronectina e laminina e a internalização das promastigotas. O aumento dessas proteínas neste modelo está diretamente associado a um alto número de promastigotas aderidas e internalizadas. Nossos estudos reforçam esse dados, demonstrando que altos níveis de expressão de laminina na pata de camundongos C57BL/10, 30 dias após a infecção, estavam correlacionados ao aumento de colágeno IV e fibronectina. Provavelmente, o aumento destas proteínas esteja associado à tentativa de recuperação do dano tecidual causado pela proliferação do parasito. No entanto, na fase tardia da infecção, os níveis de expressão destas proteínas decaem significativamente. A diminuição nos níveis destas proteínas, neste estágio, pode ser explicada pela destruição tecidual, provocada pela alta carga parasitária com presença, quase que exclusiva, de macrófagos parasitados e raros fibroblastos no tecido cutâneo destes animais. Já nos camundongos resistentes (C3H.He), cuja linhagem não apresentou desestruturação tecidual importante, não foi observado um aumento significativo na expressão de proteínas da MEC, exceto de colágeno IV, assim como observado por Almeida e colaboradores (2011).

A síntese de colágeno e fibronectina é estimulada por TGF- β em diferentes tipos celulares (Ignatz & Massague, 1986; Vargas e cols., 1987). Em nosso estudo, 30 dias após a infecção, observamos uma associação entre o aumento na expressão de proteínas da matriz (FN, colágeno I e III) com a expressão de TGF- β no fígado e linfonodo de C57BL/10 e C3H.He. Essa associação não foi observada na pata e baço destes animais. Na pata na fase tardia da infecção, momento em que havia uma presença maciça de histiócitos parasitados, os camundongos C57BL/10 apresentaram um aumento na expressão de mRNA de colágeno III. A presença de colágeno III está associada à sustentação de células inflamatórias, assim como macrófagos parasitados, como descrito por Abreu-Silva e colaboradores (2004).

Embora *L. amazonensis* seja mais comumente relacionada com manifestações cutâneas da leishmaniose, vários trabalhos têm demonstrado a visceralização desta espécie para órgãos como cérebro (Abreu-Silva e cols., 2003), fígado, baço (Almeida e cols., 1996; Abreu-Silva e

cols., 2004) e medula óssea (Barral e cols., 1991; Barral e cols., 1986). Em nosso estudo, através da análise de diluição limitante, objetivamos detectar e quantificar a presença de parasitos no local de infecção (pata), linfonodo drenante, fígado e baço dos animais utilizados. A carga parasitária nos diferentes órgãos variou conforme a linhagem de camundongos estudada, apresentando-se mais elevada nos animais considerados sensíveis (C57BL/10 e CBA) e relativamente resistentes (DBA/2), com visceralização do parasito; e extremamente reduzida na linhagem resistente (C3H.He) onde a visceralização não ocorreu, mantendo-se o parasito restrito ao linfonodo drenante na fase tardia da infecção.

A persistência de parasitos após a cura clínica é uma importante característica da infecção por *Leishmania*, o que torna a doença recorrente, sendo considerada uma importante infecção oportunista em diversos países (Badaró e cols., 1986; Albrecht, 1998). Amastigotas e/ou antígenos parasitários podem ser detectados em cicatrizes ou linfonodos de pacientes tratados há vários anos, confirmando que a cura clínica nem sempre é necessariamente acompanhada de cura parasitológica (Oliveira-Neto e cols., 1998; Schubach e cols., 1998; Schubach e cols., 2001, Amato e cols., 2003; Dereure e cols., 2003; Mendonça e cols., 2004). Como a infecção por *Leishmania* induz uma forte resposta imunológica celular, não está claro por que os parasitos não são completamente eliminados. É possível que a proteção a novas infecções, característica em indivíduos curados, esteja relacionada com essa persistência dos parasitos, levando assim, a uma constante re-estimulação do sistema imunológico. Mendonça e cols. (2004) discutem que a persistência do parasito poderia ser benéfica para pacientes que vivem em áreas endêmicas, uma vez que esses mantêm a memória T imunológica. Os autores acreditam que a eliminação completa do parasito poderia tornar o paciente mais vulnerável à reinfeção. Estudos indicam que um dos fatores que contribui para que isto ocorra seja a geração de células T regulatórias durante a infecção, as quais limitam a resposta imunológica suficientemente para manter a persistência dos parasitos (Belkaid e cols., 2002). A função destas células T regulatórias se deve em parte pela produção de IL-10. Provavelmente estes parasitos seriam mantidos por longos períodos, a muitos baixos níveis, dentro de células como fibroblastos (Bogdan e cols., 2001) e células dendríticas (Baldwin e cols., 2004) devido à ação da resposta imunológica do hospedeiro. Caso o hospedeiro sofra algum tipo de imunossupressão, seja por subnutrição (Cref e cols., 1987), doenças autoimunes (Fernandez-Guerrero e cols., 1987), terapia contra rejeição de transplantes (Hernandez-Perez e cols., 1999; Morales e cols., 2003) ou por associação a outras doenças, especialmente a síndrome da imunodeficiência adquirida (Desjeux, 2004), o parasito volta a se multiplicar e ocorre uma recidiva da doença, muitas vezes mais grave. No presente estudo, também foi possível observar a infecção de fibroblastos e a persistência dos parasitos nos linfonodos de

camundongos da linhagem C3H.He após 120 dias de infecção. Deste modo, a infecção nestes camundongos poderia estar sendo mantida pela infecção de células dendríticas e fibroblastos, que deste modo, estariam contribuindo para a manutenção de uma memória imunológica duradoura, assim como sugerido por Moll e colaboradores (1995).

Estudos sobre a natureza do infiltrado celular na leishmaniose cutânea humana têm sido realizados principalmente através de análises de fragmentos de biópsias de lesão. Embora seja mais evidente a predominância de macrófagos, a presença de outras células como linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, plasmócitos, eosinófilos, mastócitos e poucas células B, tem sido relatada (Lima e cols., 1994). As análises histopatológicas realizadas neste estudo demonstraram que na fase inicial da infecção, independentemente da linhagem de camundongo estudada, as primeiras células a serem recrutadas para o ponto de inoculação do parasito foram os eosinófilos, os quais persistiram ao longo da infecção e encontravam-se intimamente associadas a macrófagos. Situação semelhante foi observada por Grimaldi e colaboradores (1984) ao estudarem a infecção de camundongos albinos infectados subcutaneamente com *L. mexicana*; e posteriormente por Cupolilo (2002) em estudos de reinfecção com *L. amazonensis*, sugerindo que a ação conjunta dessas células estaria favorecendo a destruição dos parasitos. Além desses autores, Pompeu e cols. (1991, 1992) e Mehregan e cols. (1999) também evidenciaram a presença de eosinófilos no infiltrado das lesões de leishmaniose cutâneo difusa (LCD) por *L. amazonensis*.

Além dos eosinófilos, outras células encontradas em grande quantidade em nosso estudo, principalmente nas fases iniciais da infecção, foram os mastócitos. Mastócitos são células constantemente observadas nos tecidos conjuntivos, e, segundo alguns autores, linfócitos T ativados estimulariam essas células a liberarem aminas vasoativas, que atuariam sobre o endotélio vascular, permitindo a passagem de linfócitos T efetores em resposta às linfocinas sintetizadas no local de infecção (Askenase & Van Lovern, 1983). Apesar da presença efetiva durante a infecção por *Leishmania*, o papel dos mastócitos durante a infecção é bastante discutido. Estudos mostram que os mastócitos, eosinófilos e células NK (Paul e cols., 1993, Laskay e cols., 1997) produzem IL-4 na fase inicial da infecção. Por este motivo, tais células foram relacionadas primeiramente ao agravamento da infecção por *Leishmania* de modo que sua persistência no processo inflamatório pode contribuir para o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2. Wershil e cols. (1994) demonstraram que em camundongos infectados por *L. major*, os mastócitos agravam as lesões e favorecem a persistência do parasito. Sendo assim, estas células estariam contribuindo para a suscetibilidade dos animais a infecção. No entanto, alguns autores mostram que o papel dos mastócitos pode variar conforme a linhagem de camundongo estudada. Estas células inibem a produção de IFN- γ em

BALB/c, mas não em C57BL/6 (Saha e cols., 2004) infectados com *L. donovani*. Além disso, liberam grande quantidade de TNF- α , contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória mais acentuada (Bidri e cols., 1997; Wershil e cols., 1994). Em nosso modelo, é possível que os mastócitos não estejam auxiliando na destruição do parasito diretamente, já que estão presentes igualmente em todas as linhagens de camundongos estudadas. Por outro lado, podem estar auxiliando, principalmente nas primeiras horas de infecção, no influxo de polimorfonucleares para o sítio de inoculação do parasito, devido à sua capacidade de liberar uma gama de citocinas responsáveis pela quimiotaxia destas células na tentativa de conter a infecção.

No presente trabalho, outra célula observada em meio ao infiltrado inflamatório foi o plasmócito. A presença dessas células tem sido relatada nas lesões de LCD (Azadeh e cols., 1985; Ridley, 1987; Nilsen & Mshana, 1987; Mehregan e cols. 1999) embora com significado pouco esclarecedor e em menor número que o observado na leishmaniose cutânea localizada (LCL) (Nilsen & Mshana, 1987). De acordo com Azadeh e cols. (1985), baseados nas observações sobre os padrões histopatológicos de resposta à leishmaniose descritos por Ridley e colaboradores (1980), o surgimento de plasmócitos resulta na produção de anticorpos e conseqüentemente preparam as lesões para uma reação antígeno-anticorpo. Esse quadro culminaria em necrose tecidual com inibição da resposta epitelióide, conforme observado nas formas “lupóides” da leishmaniose cutânea por *L. tropica*, e, portanto, um pior prognóstico. A presença de plasmócitos foi detectada nas lesões primárias e linfonodo drenante, mais significativamente após 90 e 120 dias de infecção, sendo mais evidente nas linhagens consideradas sensíveis (C57BL/10 e CBA), o que corrobora o fato de estes camundongos apresentarem maiores títulos de anticorpos anti-*Leishmania* que os camundongos mais resistentes (DBA/2 e C3H.He) e maior número de células B nos linfonodos, como observado pela técnica de imunohistoquímica. A presença destas células em nosso modelo pode estar relacionada à maior sensibilidade à doença verificada nestes animais. Situação semelhante foi observada por Abranches e cols. (1998) e Lanotte e cols. (1979) na doença humana e canina, tanto em condições naturais quanto experimentais.

Muitos estudos *in situ* sobre a composição do infiltrado inflamatório têm sido realizados com o intuito de caracterizar as células ali presentes. Em nosso estudo, através da análise confocal da marcação imunofenotípica de linfócitos, foi evidenciada uma predominância da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ sobre a subpopulação CD8⁺ no linfonodo poplíteo das linhagens de camundongos estudadas, após 120 dias de infecção.

O papel das células T CD4⁺ e células T CD8⁺ na imunopatologia da leishmaniose cutânea tem sido investigado no modelo murinho e na leishmaniose humana. Nesta última,

alguns autores mostram que independente da forma clínica apresentada pelo paciente há sempre um predomínio das células T CD4⁺ em relação às células T CD8⁺ (Barral e cols., 1987; Ritter e cols., 1996). Estudos mostram que os pacientes apresentam uma porcentagem mais elevada de células T CD4⁺ na fase ativa da doença, tanto na leishmaniose cutânea (LC) como na leishmaniose mucosa (LM) (Da-Cruz e cols., 2002). Entretanto, durante o processo de cura observa-se um aumento de células T CD8⁺ e diminuição de células T CD4⁺ foram observados em pacientes com LC, quando linfócitos sanguíneos foram estimulados com antígenos de *Leishmania*, reforçando ainda mais a hipótese de que as células T CD8⁺ estariam associadas com o processo de cura nesta forma de leishmaniose (Da-Cruz e cols., 1994). De forma semelhante a que ocorre em humanos, trabalhos têm mostrado que na leishmaniose tegumentar murina, as células T CD8⁺ também estariam envolvidas no processo de cura e resistência à infecção (Müller e cols., 1993, Chang e cols., 1993). A análise fenotípica das subpopulações de linfócitos T no linfonodo e lesão primária de camundongos infectados com *L. major*, revelaram que camundongos resistentes (CBA) apresentaram uma população de células T CD8⁺ três vezes maior que os animais sensíveis (BALB/c) quinze dias após a infecção (Milon e cols., 1986). A comprovação do papel destas células no controle da infecção também foi feita através da administração de anticorpos anti-CD8, ficando constatado que tanto os camundongos sensíveis como os resistentes desenvolveram lesões mais graves (Titus e cols., 1987). Embora esses experimentos mostrem a importância dessas células na imunopatologia da leishmaniose, o mecanismo pelo qual induzem uma resposta protetora ainda não está bem esclarecido. Presume-se que as células T CD8⁺ atuem em associação com as células T CD4⁺ para destruir os macrófagos parasitados através da produção de IFN- γ e ativação de macrófagos (Fong & Mosman, 1990). Outro mecanismo provável seria a ação citolítica do linfócito T CD8⁺ sobre os macrófagos parasitados (Conceição-Silva e cols., 1994). Dados da literatura mostram que no modelo murino as células T CD4⁺ estão relacionadas com o agravamento da lesão (Titus e cols., 1984; Liew e cols., 1984). O emprego de anticorpos monoclonais anti-CD4, induziu uma resposta imunológica eficaz em camundongos BALB/c infectados por *L. major*, o que comprova o papel das células T CD4⁺ nos mecanismos de progressão das lesões em camundongos sensíveis (Silva e cols., 1994). Também foi demonstrado que as células T CD4⁺ medeiam à resposta inflamatória e também são responsáveis pela suscetibilidade dos camundongos infectados por *L. amazonensis* (Soong e cols., 1997).

A marcação imunofenotípica de células dendríticas (CD) e macrófagos no linfonodo drenante demonstrou que todas as linhagens de camundongos estudadas apresentavam ambas as populações celulares. Embora os camundongos C57BL/10 e CBA exibissem uma marcação

de CD mais evidente em algumas células, os camundongos C57BL/10 apresentaram uma maior intensidade de marcação de macrófagos. A maior intensidade de marcação pode ser devido à maior expressão de receptores de superfície nessas células. Sendo assim, não houve diferenças quanto à presença destas células entre os camundongos sensíveis e resistentes no presente trabalho, de modo que a presença de células apresentadoras de antígenos (CAA) pôde ser observada em quantidades semelhantes. Desta forma, a capacidade de apresentar antígenos às células T é a mesma em todas as linhagens de camundongos estudadas. Provavelmente, a diferença no padrão de suscetibilidade e resistência observado poderia estar relacionada a uma falha na apresentação deste antígeno ou nos mecanismos de destruição dos macrófagos, visto que parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de diminuir a produção de radicais oxigenados e nitrogenados pelos macrófagos (Olivier & Tanner, 1987; Proudfoot e cols., 1996), interferindo ainda na expressão de MHC do tipo II e moléculas co-estimulatórias induzidas por IFN- γ (Reiner e cols., 1987; Kaye e cols., 1994).

Outro tipo celular encontrado no infiltrado inflamatório das lesões em marcações *in situ* foram os linfócitos T $\gamma\delta$. Embora pouco se saiba sobre a função imunológica destas células, elas são conhecidas por secretarem citocinas tais como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , IFN- γ e GM-CSF (Has e cols., 1993). A presença de linfócitos T $\gamma\delta$ em certas lesões tem sugerido seu papel em infecções bacterianas (Has e cols., 1993; Fu e cols., 1994), bem como em infecções parasitárias (Roberts e cols., 1996). Em infecções por leishmânia, seu papel é controverso. Darabi e colaboradores (2002) demonstraram que pacientes com LCD, sem tratamento com glucantime, apresentavam uma expansão de linfócitos T $\gamma\delta$ no sangue periférico, enquanto em pacientes tratados estas células encontravam-se dentro dos níveis de normalidade. Os mesmos resultados foram obtidos, também em pacientes acometidos pela forma visceral da doença (Russo e cols., 1993) e em pacientes infectados com *L. amazonensis* (Uyemura e cols., 1992). No modelo murino, entretanto, a presença destas células tem sido relacionada a resistência. Camundongos CBA/J resistentes à *L. major* quando submetidos à depleção com anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ tiveram a cura de suas lesões significativamente retardadas, resultando no desenvolvimento de lesões extensas com carga parasitária elevada (Rosat e cols., 1993), demonstrando que os linfócitos T $\gamma\delta$ estão envolvidos na primeira linha de defesa contra esta espécie do parasito. A expansão de células T $\gamma\delta$ tem sido observada em camundongos geneticamente resistentes à infecção por *L. major*, indicando que podem estar envolvidas na defesa do hospedeiro contra o parasito (Rosat e cols., 1993). Resultados similares também foram demonstrados por diversos pesquisadores no modelo murino. Significante aumento de linfócitos T $\gamma\delta$ ativados foi também observado nos órgãos

linfóides e lesões de pele de camundongos infectados por *L. major* (Rosat e cols., 1995).

Nossos resultados de imunomarcção deste tipo celular demonstraram que os camundongos considerados mais suscetíveis à infecção (C57BL/10) apresentaram uma expansão destas células no linfonodo drenante à lesão, sugerindo seu papel na suscetibilidade destes animais a infecção por *L. amazonensis*. A imunomarcção de células no sítio de lesão primária (pata) não evidenciou nenhum tipo celular. Somente foi possível observar a marcação de parasitos nestes tecidos. O que pode ser explicado pelo fato de que, conforme visto na histopatologia aos 120 dias de infecção, o tecido das patas dos animais sensíveis apresentava completamente destruído pela infecção onde, praticamente, só observamos macrófagos parasitados. Sendo assim, a não marcação de células pela técnica de imunohistoquímica pode ser devido a essa destruição tecidual e predominância de macrófagos, que provavelmente sofreram algum tipo de modificação em seus receptores de superfície induzida pelo parasito e provavelmente por isso não foram marcados pelo anticorpo específico.

Estudos mostram que o estabelecimento ou não de uma infecção pode ser determinada primariamente por fatores imunorregulatórios do sistema imunológico cutâneo, pois a pele participa ativamente dos processos imunológicos (Bos & Kapsenberg, 1995). Tem sido demonstrado que os queratinócitos e as células de Langerhans são produtoras de vários tipos de citocinas que podem ser decisivas no controle ou na progressão da infecção (Gröne, 2002).

Técnicas de imunohistoquímica mostraram que camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* que desenvolveram cura espontânea, tinham um aumento da expressão de antígeno de MHC classe II (Ia) pelos queratinócitos e uma maior quantidade de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T citotóxicos na derme. Todavia, na linhagem de camundongos BALB/c, a progressão da lesão estava associada com pequena quantidade de linfócitos T e ausência de queratinócitos expressando Ia (McElrath e cols., 1987). Em relação à leishmaniose tegumentar humana, dados da literatura sugerem que a evolução da doença depende da capacidade da pele em produzir adequadamente os fatores que medeiam à reação imunológica no sítio de inoculação do parasito (Tapia e cols., 1994b). A anergia observada na LCD provavelmente advém de uma falha na produção de citocinas pelos queratinócitos, o que conseqüentemente afeta a função das células apresentadoras de antígenos (Modlin e cols., 1985). A epiderme dos pacientes com LCD além de possuir poucas células dendríticas, apresentam deficiência na produção de citocinas pró-inflamatórias (Castés & Tapia, 1998). Também foi detectado que os queratinócitos desses pacientes não expressam moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e HLA-DR (Tapia e cols., 1994a), evidenciando desta forma que a pele pode exercer um papel importante na patogênese da leishmaniose. Nossos

resultados demonstram a presença de macrófagos parasitados na epiderme, provavelmente originários de uma migração da derme. Tal demonstração é compatível com o que ocorre em casos humanos (Gonçalves da Costa – comunicação pessoal) da LCD, assim como no modelo experimental, onde a ocorrência de células parasitadas na epiderme é frequente. Deste modo, a anergia do sistema imunológico neste modelo envolve uma deficiência na resposta imunológica da epiderme.

Diante dos resultados obtidos em nosso estudo, podemos concluir que existem diferenças marcantes na infecção por *L. amazonensis*, principalmente no que concerne aos mecanismos imunológicos envolvidos na cura ou progressão da infecção; mecanismos estes que diferem do modelo aceito na literatura em experimentos com *L. major*, onde uma polarização da resposta Th1/Th2 é evidenciada. Desta forma, o estudo da imunidade celular e humoral da leishmaniose no modelo murino se faz importante para uma melhor avaliação dos mecanismos envolvidos na resistência e suscetibilidade a diferentes espécies de *Leishmania*. Este estudo permite melhor compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos nas diferentes formas clínicas da doença e seu amplo espectro de respostas imunológicas. A aquisição destes conhecimentos pode auxiliar no desenvolvimento de estudos de quimioterapia e imunoterapia, além de ensaios de vacinação eficientes contra as diferentes formas clínicas das leishmanioses.

6. CONCLUSÕES

Conclusão

1. Na fase inicial da infecção por *Leishmania amazonensis* as células predominantemente encontradas em todas as linhagens de camundongos eram eosinófilos e mastócitos;
2. Camundongos sensíveis à infecção por *L. amazonensis* apresentam altos níveis de anticorpos, assim como grande quantidade de linfócitos $T\gamma\delta$, células B, plasmócitos sugerindo um papel destes na suscetibilidade a doença;
3. Há uma predominância de linfócitos T CD4+ sobre os T CD8+ em todas as linhagens de camundongos;
4. A resposta imunológica a *L. amazonensis* demonstra uma compartimentalização e consequente diferença na produção/expressão de citocinas nos diferentes locais estudados;
5. Não há uma predominância no padrão de citocinas expreso/produzido nas linhagens de camundongo utilizadas, havendo uma produção mista de citocinas Th1/Th2;
6. A persistência dos parasitos em fibroblastos e no linfonodo dos camundongos resistentes à infecção por *L. amazonensis* pode estar contribuindo para a manutenção da memória imunológica;
7. Os camundongos C3H.He exibem uma baixa produção de citocinas, o que sugere que o controle da infecção seja devido a uma rápida e forte resposta imunológica inata;
8. Há uma associação entre o aumento da expressão de FN, colágeno I e III com a expressão de TGF- β no fígado e linfonodo de C57BL/10 e C3H.He, uma vez que esta citocina induz a produção destas proteínas;
9. O aumento da expressão de colágeno III e a diminuição da expressão do colágeno tipo I na pata, na fase tardia da infecção, estão relacionados à presença massiva de histiócitos parasitados, uma vez que a presença do colágeno tipo III está relacionado com a sustentação destas células.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000.

Abranches P, Campino L, Santos-Gomes G. Leishmaniose canina. Novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. Acta Med Port 1998;11:871-875.

Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Mortara RA, Tedesco RC, Cardoso FO, Carvalho LOP, Gonçalves da Costa SC. Extracellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection. Paraitology 2004; 128: 385-390.

Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Tedesco RC, Mortara RA, da Costa SC. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Am J Trop Med Hyg. 2003 Jun;68(6):661-5.

Aebischer T, Moody SF, Handman E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. Infect Immun 1993;61:220-6.

Afonso C, Scott F. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. Infect Immun 1993;61:2952-2959.

Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W, Laskay T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. J Immunol 2002;169:898-905.

Albrecht H. Leishmaniosis--new perspectives on an underappreciated opportunistic infection. Aids 1998; Nov 12; 12 (16): 2225-6.

Alexander J, Russell DG. Parasite antigens, their role in protection, diagnosis and escape: the leishmaniases. Curr Top Microbiol Immunol. 1985;120:43-67.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. J Cell Biol 1999;112:2993-3002.

Almeida RP, Barral-Netto M, De Jesus AM, De Freitas LA, Carvalho EM, Barral A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. Am J Trop Med Hyg. 1996;54(2):178-84.

Referências Bibliográficas

Amato V, Andrade Jr H, Duarte M. Mucosal leishmaniasis in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta trop* 2003;85:39-49.

Andrade ZA, dos Reis MG. Role of eosinophils in the destruction of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vivo (preliminary report). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984;79:371-3.

Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol*. 2004 May;136(2):341-8.

Askenase PW, Loveren V. Delayed-type hypersensitivity: activation of mast cells by antigen-specific T-cell factors initiates the cascade of cellular interactions. *Immunol Today* 1983;4:259-264.

Assrey J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 1994;24:672-6.

Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, et al. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 2005;24:326-332.

Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 2004;119:238-258.

Azadeh B, Samad A, Ardehali S. Histological spectrum of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985;79:631-636.

Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1986;154(6):1003-11.

Baldwin T, Henri S, Curtis J, O'Keeffe M, Vremec D, Shortman K, Handman E. Dendritic cell populations in *Leishmania major*-infected skin and draining lymph nodes. *Infect Immun*. 2004 Apr;72(4):1991-2001.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.

Cardoso, FO

Referências Bibliográficas

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 2007; 64:1–109.

Barral A, Badaro R, Barral-Netto M, Grimaldi G Jr, Momem H, Carvalho EM. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1986 Jul;35(4):732-4.

Barral A, Barral-Neto M, Yong EC, Brownell CE Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor B as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; 90: 3442-46.

Barral A, Jesus AM, Almeida RP, Carvalho EM, Barral-Neto M, Costa JML, Badaró R, Rocha H, Jonhson Jr WD. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1987; 9:487-497.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momen H, McMahon-Pratt D, Jesus AM, Almeida R, Badaró R, Barral-Neto M, Carvalho EM, Jonhson Jr WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *J Trop Med Hyg* 1991;44:536-546.

Barral A, Teixeira M, Reis P, Vinhas V, Costa J, Lessa H, Bittencourt AL, Reed S, Carvalho EM, Barral-Netto M. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol* 1995;147:947-54.

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

Barton CH, Whitehead SH, Blackwell JM. Nramp transfection transfers *Ity/Lsh/Bcg*-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. *Mol med* 1995;1:267-79.

Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med* 2004;4:601-9.

Bates PA. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(4):340-4.

Referências Bibliográficas

Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003;130:65-74.

Beezhold DH, Personius C. Fibronectin Fragments Stimulate Tumor-Necrosis-Factor Secretion by Human Monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 1992;51(1):59-64.

Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol* 1992;52:135-42.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002b;420:502-07.

Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, Sacks D. CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 2002a;168:3992-4000.

Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeck U. Regulation of NK cell functions by TGF-beta1. *J Immunol* 1995;155:1066-73.

Belosevic M, Finbloom DS, Meltzer MS, Nacy CA. IL-2. A cofactor for induction of activated macrophage resistance to infection. *J Immunol* 1990a;145:831-9.

Belosevic M, Nacy CA. Interleukin-2, anti-interleukin-2 receptor antibody, and activation of macrophages. *Cell Immunol* 1990b;128:635-40.

Bennett CL, Misslitz A, Colledge L, Aebischer T, Blackburn CC. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Immunol* 2001;31:876-883.

Biagi FF. Algunos comentarios sobre las leishmaniasis y sus agentes etiológicos, *Leishmania tropica mexicana*, nueva subespecie. *Medna Mexico* 1953;33:401-06.

Bidri M, Vouldoukis I, Mossalayi M, Debré P, Guillosson J, Mazier D, Arock M. Evidence for direct interaction between mast cells and *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* 1997;19:475-83.

Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania*
Cardoso, FO

Referências Bibliográficas

infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(5):625-30.

Bogdan C, Donhause N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A, Rittig M. Fibroblast as host cells in latent leishmaniosis. J Exp Med 2001;191:2121-2138.

Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. J Exp Med 2000;191:2121-30.

Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. Int J Parasitol 1998;28:121-134.

Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. J Exp Med 1991;174:1549-55.

Bonfante-Garrido R. New sub-species of leishmaniasis isolated in Venezuela. In: Proceedings of the 10th International Congress of Tropical Medicine and Malaria; 1980; Manila; 1980. p. 203.

Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu Y-J, O'Garra A. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. J Exp Med 2003;197:101-109.

Bos JD, Kapsenberg ML. The immune system of the skin. Ned Tijdschr Geneesk. 1995 Aug 5;139(31):1587-91.

Boutaud, A, Borza DB, Bondar O, Gunwar S, Netzer KO, Singh N, Ninomiya Y, Sado Y, Noelken ME and Hudson BG. Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. J. Biol. Chem. 2000;275: 30716-24.

Bradley DJ, Kirkley J. Regulation of *Leishmania* populations with the host 1. The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. Clin Exp Immunol 1977;30:119-120.

Brittingham A, Chen G, McGwire BS, Chang K-P, Mosser DM. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. Infect Immun. 1999;67:4477-84.

Referências Bibliográficas

Calabrese K S, Gonçalves da Costa SC. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87(1):49-56.

Calabrese KS, Silva LS, Carvalho LO, Hardoim DJ, Silva-Almeida M, Mortara RA, Souza CS. Infection of retinal epithelial cells with *L. amazonensis* impacts in extracellular matrix proteins. Parasitol Res. 2011;109(3):727-36.

Campbell KA, Owendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski CR. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. Immunity 1996;4:283-289.

Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks DL. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. The J Exp Med 1996;183:515-26.

Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. J Immunol 1994;152:5949-56.

Carvalho EM, Badaro R, Reed SG, et al. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. J Clin Invest 1985;76:2066-69.

Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Netto M, Badaró R, Rocha H, Johnson WD Jr. J. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. Infect Dis 1992; 165: 535-540.

Castés M, Tapia FJ. Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis. Acta Cient Venez. 1998;49(1):42-56.

Chang KP, Chaudhuri D, Fong D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. Ann Rev Microbiol 1990; 44: 499-459.

Chang KP, McGwire BS. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. Kinetoplastid Biol Dis 2002;1:1.

Chang MM. T cell response in murine *Leishmania mexicana amazonensis* infection: production of interferon-gamma by CD8+ cells. Eur J Immunol. 1993 May;23(5):1181-4.

Referências Bibliográficas

Chatelain R, Mauze S, Coffman RL. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. *Parasite Immunol* 1999;21:211-218.

Chen M, Marinkovich MP, Jones JC, O'Toole EA, Li YY, Woodley DT. NC1 domain of type VII collagen binds to the beta3 chain of laminin 5 via a unique subdomain within the fibronectin-like repeats. *J Invest Dermatol* 1999;112:177-183.

Choi P, Reiser H. IL-4: role in disease and regulation of production. *Clin Exp Immunol* 1998;113:317-319.

Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 1989; 245.

Coffman RL, Varkila K, Scott P, Chantelain R. Role of cytokines in the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets "in vivo". *Immunolog Rev* 1991;123:189-207.

Conceição-Silva F, Perzala BL, Louis JA, Romero P. *Leishmania major* infection in mice primers for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺ cytotoxic T cell response. *Eur J Immunol* 1994;24.

Constantinescu CS, Hondowicz BD, Elloso MM, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. The role of IL-12 in the maintenance of an established Th1 immune response in experimental leishmaniasis. *Eur J Immunol* 1998;28:2227-2233.

Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Gioacchino MD, Barbacane RC, Castellani ML, Felaco M, Boucher W, Letourneau R, Theoharides TC. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett* 2003;86:123-129.

Cref BJ, Jones TC, Badar R, Sampaio D, Teixeira R, Johnson WDJ. Malnutrition as a risk for severe visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1987;157:1030-1033.

Crocker P, Blackwell JM, Bradley DJ. Expression of the natural resistance gene Lsh in resident liver macrophages. *Infect Immun* 1984;43:1033-40.

Cunha AM, Chagas E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi*, n. sp. Nota prévia. *Hospital* 1937;11:3-9.

Cupolilo SM, Souza CS, Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Goncalves da Costa SC. Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. *Histol Histopathol.* 2003 Oct;18(4):1059-65.

Cardoso, FO

Referências Bibliográficas

Cupolilo SMN. Reinfecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no modelo murino: um estudo histopatológico e imunohistoquímico [Doutorado em Biologia Parasitária]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2002.

Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Mar;9(2):251-6.

Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. *Leishmania*-reactive CD4⁺ and CD8⁺ cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 1994;62:2614-2618.

Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 3):255-64.

Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A and Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*. 1993; 259: 1739-42.

de Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. *Leishmania* infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:861-870.

de Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, Marsden PD. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1986;28:253-62.

de Souza W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res* 2002;88:1013-25.

Del Pozo V, De Andres B, Martin E, Cardaba B, Fernandez JC, Gallardo S, Tramon P, Leyva-Cobian F, Palomino P, Lahoz C. Eosinophil as antigen-presenting cell: activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing. *Eur J Immunol* 1992;22:1919-25.

Dereure J, Duong Thanh H, Lavabre-Bertrand T, Cartron G, Bastides F, Richard-Lenoble D, Dedet JP. Visceral leishmaniasis. Persistence of parasites in lymph nodes after clinical cure. *J Infect*. 2003 Jul;47(1):77-81.

Referências Bibliográficas

Desjeux P. *Leishmaniasis*: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27:305-318.

Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, Röllinghoff M, Gresser I, Bogdan C. Type I interferon (IFN- α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 1998; 8: 77-87.

Docampo R, Moreno SN. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol Today* 1999;15:443-8.

Duaso J, Rojo G, Cabrera G, Galanti N, Bosco C, Maya JD, Morello A, Kemmerling U. *Trypanosoma cruzi* induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection model of human placenta. *Placenta*. 2010;31(8):705-11.

Duaso J, Yanez E, Castillo C, Galanti N, Cabrera G, Corral G, Maya JD, Zulantay I, Apt W, Kemmerling U. Reorganization of extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic chagas disease: mechanism of parasite invasion or local placental defense? *J Trop Med*. 2012;2012:758357.

Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldman M, Tavernier J, Capron A, Capron M. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med* 1994;179:703-708.

Eady RA, Cowen T, Marshall TF, Plummer V, Greaves MW. Mast cell population density, blood vessel density and histamine content in normal human skin. *Brit J dermatol* 1979;100:623-33.

Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 1996;381:75-7.

Espevik T, Figari I, Shalaby M, Lackides G, Lewis G, Shepard H, Palladino M, Jr. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1987;166:571-576.

Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun*. 2005;73(12):7853-9.

Referências Bibliográficas

Fernandez-Guerrero ML, Aguado JM, Buzon L, Barros C, Montalban C, Marin T. Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. *Am J Med* 1987;83:1098-1102.

Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* 1995;373:255-257.

Ffrench-Constant C. Alternative Splicing of Fibronectin - Many Different Proteins but Few Different Functions. *Experimental Cell Research* 1995;221(2):261-271.

Floch H. *Leishmania tropica guyanensis* n.ssp., agent de leishmaniose tégumentaire edes Guyanas et de l'Amérique Centrale. *Archives de Institut Pasteur de la Guyane Française* 1954;15:1-4.

Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, and Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34: E54–E58.

Fong TAT, Mosmann TR. Alloreactive murine CD8⁺ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J Immunol* 1990;144:1744-1752.

Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van derAuwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol* 2010;10:238–245.

Franzke CW, Bruckner P, Bruckner-Tuderman L. Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology. *J Biol Chem* 2005;280(6):4005–8.

Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK. Cytokine production by mast cells and basophils. *Curr Op Immunol* 1991;3:865-72.

Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N, Jeronimo SM, Nascimento ET, Goldman TL, Recker TJ, Miller MA, Wilson ME. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol.* 2003 Mar 1;170(5):2613-20.

Garnham PCC. Cutaneous leishmaniasis in the New World with special reference to *Leishmania mexicana*. *Sci Rep Ist Super Sanita* 1962;2:76-82.

Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimarães LH, Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory
Cardoso, FO

Referências Bibliográficas

T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol.* 2006;63(1):70-8.

Gerl M, Mann K, Aumailley M, Timpl R. Localization of a major nidogen-binding site to domain III of laminin B2 chain. *Eur J Biochem* 1991;202:167–174.

Gersdorff N, Kohfeldt E, Sasaki T, Timpl R, Miosge N. Laminin gamma3 chain binds to nidogen and is located in murine basement membranes. *J Biol Chem* 2005;280:22146–22153.

Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el-Hassan AM, Russo DM, Reed SG. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest* 1993;92:324-329.

Glaser TA, Utz GL, Mukkada AJ. The plasma membrane electrical gradient (membrane potential) in *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;51(1):9-15.

Goncalves da Costa S, Santos EB, Lagrange PH. Vaccination of mice against *Leishmania mexicana amazonensis* with microsomal fraction associated with BCG. *Ann Inst Pasteur Immunol.* 1988 Mar-Apr;139(2):143-56.

Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 1998;28:687-695.

Gorczyński R. In vitro analysis of immune responses of inbred guinea pigs infected in vivo with *Leishmania enriettii* and investigation of active immunization of susceptible animals. *Cell Immunol* 1983;75:255-270.

Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *The J Exp Med* 2002;195:1499-1505.

Grimaldi GJ, Moriearty PL, Hoff R. *Leishmania mexicana*: immunology and histopathology in C3H mice. *Exp Parasitol* 1980;50:45-56.

Grimaldi GJ. Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1982;77:195-215.

Grimaldi Jr G, Soares M, Moriearty P. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1984;6:397-408.

Cardoso, FO

Referências Bibliográficas

Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of New World: Current concepts and implication for future research. Clin Microb Rev 1993;6:230-250.

Grone A. Keratinocytes and cytokines. Vet Immunol Immunopathol. 2002 Sep 6;88(1-2):1-12.

Gullberg D, Gehlsen KR, Turner DC, Ahlen K, Zijenah LS, Barnes MJ, et al. Analysis of alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 integrins in cell-collagen interactions: identification of conformation dependent alpha 1 beta 1 binding sites in collagen type I. EMBO J 1992;11(11):3865-73.

Gupta AA, Leal-Berumen I, Croitoru K, Marshall JS. Rat peritoneal mast cells produce IFN-gamma following IL-12 treatment but not in response to IgE-mediated activation. J Immunol 1996;157:2123-8.

Handman E, Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. Trends Parasitol 2002;18:332-334.

Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin Microb Rev 2001;14:229-243.

Hart DNJ. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. Blood 1997;90:3245-3287.

Has W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. Ann Rev Immunol 1993; 11: 637-85.

Hashimoto SI, Komuro I, Yamada M, Akagawa KS. IL-10 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent human monocyte survival at the early stage of the culture and inhibits the generation of macrophages. J Immunol 2001;167:3619-3625.

Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins. Bioessays 2007;29(10):1001-10.

Heinzel FP, Ahmed F, Hujer AM, Rerko RM. Immunoregulation of murine leishmaniasis by interleukin-12. Res Immunol 1995a;146:575-581.

Heinzel FP, Rerko RM, Ahmed F, Pearlman E. Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. J Immunol. 1995b;155(2):730-9.

Referências Bibliográficas

Heinzel FP, Sadick M, Mutha SS, Locksley RM. 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 U S A* 1991;88:7011-5.

Heinzel FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *The J Exp Med* 1993;177:1505-1509.

Henderson B, Nair S, Pallas J, Williams MA. Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. *Fems Microbiology Reviews* 2011;35(1):147-200.

Henri S, Curtis J, Hochrein H, Vremec D, Shortman K, Handman E. Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production. *Infect Immun* 2002;70:3874-80.

Hernandez-Perez J, Yebra-Brango M, Jimenez-Martinez E, Sanz-Moreno C, Cuervas-Mons V, Alonso Pulpon L, Ramos-Martinez A, Fernandez-Fernandez J. Visceral leishmaniasis (kala-azar) in solid organ transplantation: report of five cases and review. *Clin Infect Dis* 1999;29:18-21.

Herrer A. *Leishmania hertigi* sp. n., from the tropical porcupine, *Coendou rothschildi*. *J Parasitol* 1971;57:626-629.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999; 354(9185):1191-9.

Holbrook K, Byers P. Skin is a window on heritable disorders of connective tissue. *Am J Med Genet* 1989;34:105-21.

Hommel M, Peters W, Ranque J, Quilici M, Lanotte G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral *leishmaniasis*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1978;72(3):213-18.

Hondowicz B, Scott P. Influence of parasite load on the ability of type 1 T cells to control *Leishmania major* infection. *Infect Immun* 2002;70:498-503.

Honigberg BM, Balamuth W, Bovee EC, Corliss JO, Gojdics M, Hall RP, Kudo RR, Levine ND, Loeblich AR Jr, Weiser J, Wenrich DH. A revised classification of the phylum Protozoa. *J Protozool*. 1964;11:7-20.

Honigberg BM. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *J Protozool* 1963;10:20-63.

Cardoso, FO

Referências Bibliográficas

Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM and Aguet M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. 1993; Science; 259: 1742-45.

Hudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M. and Neilson, E. G. (2003). Alport's Syndrome, Goodpasture's Syndrome and Type IV Collagen. New Engl. J. Med. 348, 2543-2556.

Hunter C, Sher A. In: Kaufman S, Sher A, Ahmed R, editors. Immunology of Infectious Diseases. Washington DC: ASM Press; 2001. p. 111-126.

Ignatz RA, Massagué J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J Biol Chem. 1986;261(9):4337-45.

Ji J, Sun J, Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. Infect Immun 2003;71:4278-4288.

Julia Tzu, MD and M. Peter Marinkovich, MD Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins Int J Biochem Cell Biol. 2008; 40(2): 199–214.

Kamanaka M, Yu P, Yasui T, Yoshida K, Kawabe T, Horii T, Kishimoto T, Kikutani H. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. Immunity 1996;4:275-81.

Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. J Immunol 2001;166:1141-1147.

Kaye PM, Rogers NJ, Curry AJ. Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. Eur J Immunol 1994;24:2850-2854.

Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, Zubairi S, Engwerda CR. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. Immunolog Rev 2004;201:239-53.

Kellina OI. Differences in the sensitivity of inbred mice of different lines to *Leishmania tropica major*. Med Parazitol (Mosk)1973;42:279-285.

Killick-Kendrick R, Laison R, Rioux J-A, Saf'janova VM. The taxonomy of *Leishmania*-like parasites of reptiles. In: Rioux J-A, editor. *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. **Cardoso, FO**

Referências Bibliográficas

Applications éco-épidémiologiques. Colloque International. Montpellier: IMEEE; 1986. p. 143-148.

Killick-Kendrick R. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: Peters W K-K, editor. The leishmaniasis and biology and medicine. London: Academic Press; 1987. p. 395-460.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol 1990;4:1-24.

Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin Dermatol 1999;17:279-289.

Kitamura Y, Yokoyama M, Matsuda H, Ohno T, Mori KJ. Spleen colony-forming cell as common precursor for tissue mast cells and granulocytes. Nature. 1981;291(5811):159-60.

Kopf M, Brombacher F, Kohler G, Kienzle G, Widmann K, Lefrang K, Humborg C, Ledermann B, Solbach W. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. J Exp Med 1996;184:1127-1136.

Korom S, Hancock WW, Coito AJ, Kupiec-Weglinski JW. Blockade of very late antigen-4 integrin binding to fibronectin in allograft recipients - II. Treatment with connecting segment-1 peptides prevents chronic rejection by attenuating arteriosclerotic development and suppressing intragraft T cell and macrophage activation. Transplantation 1998;65(6):854-859.

Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. Molecular variants of fibronectin and laminin: Structure, physiological occurrence and histopathological aspects. Virchows Archiv-an International Journal of Pathology 1996;429(6):311-322.

Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi G, Grol M, Rowton ED, Young DG, Morales A, McMahon-Pratt D, Guzman H, Tesh RB. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals and phlebotomine sandflies in Colombia and Panama. Trans R Soc Trop Med Hyg 1991;44:662-675.

Kropf P, Herath S, Weber V, Modolell M, Muller I. Factors influencing *Leishmania major* infection in IL-4-deficient BALB/c mice. Parasite Immunol 2003;25:439-47.

Kühn, K. (1995). Basement membrane (type IV) collagen. Matrix Biol. 14, 439-445.

Referências Bibliográficas

Kulkarni MM, Jones EA, McMaster WR, McGwire BS. Fibronectin binding and proteolytic degradation by *Leishmania* and effects on macrophage activation. *Infection and Immunity* 2008;76(4):1738-1747.

Kushawaha PK, Gupta R, Tripathi CD, Sundar S, Dube A. Evaluation of *Leishmania donovani* protein disulfide isomerase as a potential immunogenic protein/vaccine candidate against visceral Leishmaniasis. *PLoS One*. 2012;7(4):35670.

Lage R, Oliveira G, Busek S et al. Analysis of the cytokine profile 2007.

Lainson R, Braga RR, De Souza AA, Povia MM, Ishikawa EA, Silveira FT. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp* 1989a;64:200-7.

Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1, Academic Press, London, p. 1-120.

Lainson R, Shaw JJ 1998. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* Species. In FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed., Vol. 5, Parasitology, Arnold, London, p. 242-266.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga R, Ishikawa EAI. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 435-443.

Lainson R, Shaw JJ. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. *Ciência e Cultura* 1992;44:94-106.

Lainson R, Shaw JJ. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasybus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1989b;64(1):3-9.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana*, *L. m. amazonenses*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. b. guyanensis* and *L. b. panamensis*. *J Trop Med Hyg* 1977;80:29-35.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Br Med Bull* 1972; 28: 44-48.

Referências Bibliográficas

Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR, A ED, editors. *Biology of the kinetoplastida*. London, New York & San Francisco: Academic Press; 1979. p. 1-116.

Lamb TJ, Graham AL, Le Goff L, Allen JE. Co-infected C57BL/6 mice mount appropriately polarized and compartmentalized cytokine responses to *Leishmanosoides sigmodontis* and *Leishmania major* but disease progression is altered. *Parasite Immunol*. 2005;27(9):317-24.

Lanotte G, Rioux JA, Perieres J, Vollhardt Y. Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann Parasitol Hum Comp* 1979;54:277-295.

Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001;106:263-266.

Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* 2003;11:210-4.

Laskay T, Wittmann I, Diefenbach A, Rollinghoff M, Solbach W. In vivo blocking of L-selectin rescues BALB/c mice from fatal *Leishmania major* infection. *Immunol Letters* 1997;57:89-91.

Launois P, Maillard I, Pingel S, Swihart K, Xenarios I, Acha-Orbea H, Diggelmann H, Locksley R, MacDonald H, Louis J. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* 1997;6:541-549.

Lebbink RJ, de Ruiter T, Adelmeijer J, Brenkman AB, van Helvoort JM, Koch M, et al. Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *J Exp Med* 2006;203(6):1419-25.

Leclercq V, Lebastard M, Belkaid Y, Louis J, Milon G. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *J Immunol* 1996;157:4537-45.

Lerner E, Ribeiro J, Nelson R, Lerner M. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 1991;266:11234-11236.

Referências Bibliográficas

Liao YF, Gotwals PJ, Koteliansky VE, Sheppard D, Van de Water L. The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins alpha(9)beta(1) and alpha(4)beta(1) providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277(17):14467-14474.

Liew FY, Howard JG, Hale C. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. III. Protection against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes involves Lyt-1 T cells that do not mediate cutaneous DTH. *J Immunol.* 1984 Jan;132(1):456-61.

Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 1990;145:4306-4310.

Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 1990; 144:4794-97.

Liew FY, Xu D, Chan WL. Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunol Lett* 1999;65:101-104.

Lima GM, Vallochi AL, Silva UR, Bevilacqua EM, Kiffer MM, Abrahamsohn IA. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett* 1998;64:145-51.

Lima HC, Vasconcelos AW, David JR, Lerner EA. American cutaneous leishmaniasis: in situ characterization of the cellular immune response with time. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Jun;50(6):743-7.

Lira R, Rosales-Encina JL, Arguello C. *Leishmania mexicana*: binding of promastigotes to type I collagen. *Exp Parasitol* 1997;85:149-57.

Lobb RR, Hemler ME. The Pathophysiologic Role of Alpha-4 Integrins in-Vivo. *Journal of Clinical Investigation* 1994;94(5):1722-1728.

Lonardoni MVC, Russo M, Jancar S. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun* 2000;68:6355-6361.

Louis JA, Gumy A, Voigt H, Launois P, Rocken M. The use of the murine model of infection with *Leishmania major* to reveal the antagonistic effects that IL-4 can exert on T helper cell

Referências Bibliográficas

development and demonstrate that these opposite effects depend upon the nature of the cells targeted for IL-4 signaling. *Pathol Biol* 2003;51:71-73.

Louzir H, Melby PC, Ben Salah A, Marrakchi H, Aoun K, Ben Ismail R, Dellagi K. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J Infect Dis* 1998;177:1687-1695.

Lupasco G, Agavriloaiei A, Ciplea AG. Contribution to the study of the pathogenesis and histopathology of *Leishmania donovani* infection in the golden hamster (*Cricetus auratus*). *Arch Roum Pathol Exp Microbiol* 1961;20:565-578.

Maia C and Campino L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. *J Trop. Med.* 2012. 1-7.

Maia C, Rolão M, Nunes M and Campino L. Infectivity of *Leishmania infantum* treated with amphotericin B plus *Phlebotomus salivar* gland in BALB/c mice. *Intern J Integ Biol.* 2009;6(3): 105-111.

Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 1996;381:77-80.

Marino AP, Silva AA, Pinho RT, Lannes-Vieira J. *Trypanosoma cruzi* infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(8):1121-33.

Maüel J, Behin R, Louis M. *Leishmania enriettii* immune induction of macrophage activation in na experimental model of immunoprophylaxis in the mouse. *Exp Parasitol* 1981;148:393-407.

Maüel J, Behin R. Immunity: clinical and experimental. In: Peters W, Killick-Kendrics K, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press; 1987. p. 731-791.

Maüel J, Buchmuller Y, Behin R. Studies on the mechanisms of macrophage activation. I. Destruction of intracellular *Leishmania enriettii* in macrophages activated by cocultivation with stimulated lymphocytes. *J Exp Med* 1978;148:393-407.

Mbow ML, DeKrey GK, Titus RG. *Leishmania major* induces differential expression of costimulatory molecules on mouse epidermal cells. *Eur J Immunol.* 2001 May;31(5):1400-9.

Referências Bibliográficas

McDowell MA, Marovich M, Lira R, Braun M, Sacks D. *Leishmania* priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. *Infect Immun* 2002;70:3994-4001.

McElrath MJ, Murray HW, Cohn ZA. The local cellular immune response in experimental leishmaniasis. *Ann Inst Pasteur Immunol.* 1987 Sep-Oct;138(5):787-90.

McGwire BS, Chang K-P, Engman DM. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect Immun* 2003;71:1008-10.

McInnes IB, Illei GC, Danning CL, Yarboro CH, Crane M, Kuroiwa, Schlimgen R, Lee E, Foster B, Flemming D, Prussin C, Fleisher TA, Boumpas DT. IL-10 improves skin disease and modulates endothelial activation and leukocyte effector function in patients with psoriatic arthritis. *J Immunol* 2001;167:4075-4082.

Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslett C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *J Leukoc Biol* 1992;52:269-73.

Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1999;17:297-304.

Melo FA, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Caliani MV, Tafuri WL, et al. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *International Journal of Experimental Pathology* 2009;90(5):538-548.

Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis.* 2004 Mar 15;189(6):1018-23.

Milon G, Titus RG, Cerottini JC, Marchal G, Louis JA. Higher frequency of *Leishmania major*-specific L3T4⁺ T cells in susceptible Balb/c as compared with resistant CBA mice. *J Immunol* 1986;136:1467-1471.

Miner JH, Yurchenco PD. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:255–284.

Referências Bibliográficas

Modlin RL, Tapia FJ, Bloom BR, Gallinoto ME, Castes M, Rondon AJ, Rea TH, Convit J. In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1985 May;60(2):241-8.

Moll H, Flohé S, Röllinghoff M. Dendritic cells in *Leishmania major* immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur J Immunol* 1995;25:693-699.

Moll H. Development of helper T cell subsets: a central role for interleukin 12. *Trends Biochem Sci* 1993;1:209-10.

Moll H. The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania* infection. *Adv Exp Med Biology* 2000;479:163-73.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman R, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.

Morales P, Torres JJ, Salavert M, Pemán J, Lacruz J, Solé A. Visceral leishmaniasis in lung transplantation. *Transpl Proc* 2003;35:2001-2003.

Moriearty PL, Grimaldi G Jr, Galvão-Castro B, de Oliveira Neto MP, Marzochi MC. Intralesional plasma cells and serological responses in human cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1982;47(1):59-64.

Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* 2001;167:5226-5230.

Müller I, Kropf P, Etges RJ, Louis JA. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8⁺ T cells. *Infect Immun* 1993;61:3730-3738.

Muniz J, Medina H. Leishmaniose tegumentar do cobaio (*Leishmania enrietti* n. sp.). *Hospital* 1948;33:7-25.

Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 2001;31:2848-2856.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366: 1561–1577.

Referências Bibliográficas

Murray HW, Lu CM, Mauze S, Freeman S, Moreira AL, Kaplan G, Coffman RT. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. 2002; 70: 6284-93.

Murray HW, Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. J Exp Med 1999; 189: 741–746.

Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. Trends Genet 2004;20(1):33–43.

Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?. J. Clin. Investig. 1997; 100: 2417-23.

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. THE IL-4 RECEPTOR: signaling mechanisms and biologic functions. Annu Rev Immunol 1999;17:701-738.

Nicolle CH. Culture du parasite du Bouton d'Orient. Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 1908b;146:842-843.

Nilsen R, Mshana RN. *In situ* characterization of the cutaneous immune response in Ethiopian cutaneous leishmaniasis. Scandinavian J Immunol 1987;26:503-512.

Noben-Trauth N, Kropf P, Muller I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. Science 1996;271:987-990.

Noben-Trauth N, Paul WE, Sacks DL. IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. J Immunol 1999;162:6132-6140.

Noelle R, Krammer PH, Ohara J, Uhr JW, Vitetta ES. Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 1984;81:6149–6153.

Nylen S, Maasho K, Soderstrom K, Ilg T, Akuffo H. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. Clin Exp Immunol 2003;131:457-467.

O'Farrelly C. Immunoregulation in the Liver and Its Extrahepatic Relevance. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2004; 39(3): S727-S728.

Cardoso, FO

Referências Bibliográficas

Ohara J, Paul WE. Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85:8221–8225.

Okayama Y, Petit-Frere C, Kassel O, Semper A, Quint D, Tunon-de-Lara MJ, Bradding P, Holgate ST, Church MK. IgE-dependent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 in human lung mast cells. J Immunol 1995;155:1796-808.

Oliveira-Neto MP. Leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro - Estudo de 648 casos observados no Hospital Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz [Mestrado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 1998.

Olivier M, Tanner CE. Susceptibilities of macrophage populations to infection in vitro by *Leishmania donovani*. Infect Immun. 1987 Feb;55(2):467-71

Omer FM, Kurtzhals JAL, Riley EM. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? Parasitol Today 2000;16:18-23.

Padigel UM, Alexander J, Farrell JP. The Role of Interleukin-10 in Susceptibility of BALB/c Mice to Infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. J Immunol 2003;171:3705-3710.

Park AY, Scott P. IL-12: keeping cell-mediated immunity alive. Scandinavian J Immunol 2001;53:529-532.

Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. Semin Cancer Biol 2002;12:197–207.

Patel RS, Odermatt E, Schwarzbauer JE, Hynes RO. Organization of the Fibronectin Gene Provides Evidence for Exon Shuffling During Evolution. Embo Journal 1987;6(9):2565-2572.

Paul W, Seder K, Plant M. Lymphokine production by FcγRL cells. Adv Immunology 1993;53:1-29.

Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. Cell 1994;76:241-51.

Paul WE. Interleukin 4: signalling mechanisms and control of T cell differentiation. Ciba Foundation Symposium 1997;204:208-216.

Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. J Immunol 1981;127:1438-43.

Referências Bibliográficas

Pessoa SB. Classificação das leishmanioses e das espécies do gênero *Leishmania*. Arq Hig Saúde Púb 1961;26:41-50.

Peters C, Aebischer T, Stierhof YD, Fuchs M, Overath P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. J Cell Science 1995;108:3715-3724.

Pompeu ML, Freitas LA, Santos MLV, Barral A, Barral-Neto M. *Leishmania amazonensis* infection: a comparison of *in vivo* leishmanicidal mechanisms between immunized and naive infected Balb/c mice. Exp Parasitol 1992;74:169-176.

Pompeu ML, Freitas LA, Santos MLV, Khouri M, Barral-Neto M. Granulocytes in inflammatory process of Balb/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. Acta trop 1991;48:185-193.

Ponte-Sucre A, Heise D, Moll H. *Leishmania major* lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. Immunology 2001;104:462-7.

Preston PM, Dumonde DC. Experimental cutaneous leishmaniasis. V. Protective immunity in subclinical and self-healing infection in the mouse. Clin Exp Immunol 1976;23:126-38.

Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei WQ, Ferguson MA, Brimacombe JS, Liew FY. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 1;93(20):10984-9.

Puentes SM, Da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. J Immunol 1990;145:4311-4316.

Qi H, Popov V, Soong L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions *in vitro* and the priming of parasite-specific CD4+ T cells *in vivo*. J Immunol 2001;167:4534-4542.

Quinnell R, Courtenay O, Shaw M et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. J. Inf. Dis. 2001; 183(9): 1421-1424.

Reed SG. TGF-beta in infections and infectious diseases. Microbes Infect 1999;1:1313-1325.

Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. Annu Rev Immunol 1995;13:151-177.

Cardoso, FO

Referências Bibliográficas

Rey L. Dípteros nematóceros em geral. Psicodídeos, simulídeos e ceratopogonídeos. In: Rey L, editor. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001b. p. 698-703.

Ribeiro JM. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Ann Rev Entomol* 1987;32:463-478.

Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O and Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998; 31: 143–148.

Ridley DS, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980;74:508-514.

Ridley DS. Pathology. In: *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press Inc; 1987. p. 665.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990;65:111-125.

Ritter U, Moll H, Laskay T, Brocker E, Velazco O, Becker I, Gillitzer R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1996 Mar;173(3):699-709.

Roberts LJ, Handman E, Foote SJ. Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *BMJ.* 2000 Sep 30;321(7264):801-4.

Robledo SM, Carrillo LM, Daza A, Restrepo AM, Muñoz DL, Tobón J, Murillo JD, López A, Ríos C, Mesa CV, Upegui YA, Valencia-Tobón A, Mondragón-Shem K, Rodríguez B, Vélez ID. Cutaneous leishmaniasis in the dorsal skin of hamsters: a useful model for the screening of antileishmanial drugs. *J Vis Exp.* 2012 Apr 21;(62). pii: 3533. doi: 10.3791/3533.

Rogers KA, DeKrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett* 2002;209:1-7.

Rolão N, Cortes S, Gomes-Pereira S and Campino L. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Exper Parasitol* 2007; 115(3): 270-276.

Referências Bibliográficas

- Rosat JP, Conceição-Silva F, Waanders GA, et al. Expansion of $\gamma\delta$ T cells in BALB/c mice infected with *Leishmania major* is dependent upon Th2-type CD4 T cells. *Infect Immun* 1995; 63: 3000-4.
- Rosat JP, MacDonald HR, Louis JÁ. A role for $\gamma\delta$ T cells during experimental infection of mice with *Leishmania major*. *J Immunol* 1993; 150: 550-5.
- Ross R. Further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J* 1903;11:1401.
- Rossi-Bergman B, Müller I, Godinho EB. Th1 and Th2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cell in murine leishmaniasis. *Infect Immun* 1993;61:2266-2269.
- Rothemberg M, Petersen J, Stevens R, Silberstein DS, McKenzie DT, Austen KF, Owen WFJr. IL-5-dependent conversion of normodense human eosinophils to the hypodense phenotype uses 3T3 fibroblasts for enhanced viability, accelerated hypodensity, and sustained antibody-dependent cytotoxicity. *J Immunol* 1989;143:2311-6.
- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev. Immunol* 2002;2:845-858.
- Sacks DL, Scott PA, Asofsky R, Sher FA. Cutaneous leishmaniasis in anti-IgM-treated mice: enhanced resistance due to functional depletion of a B cell-dependent T cell involved in the suppressor pathway. *J Immunol*. 1984 Apr;132(4):2072-7.
- Safjanova VM. Classification of the genus *Leishmania*, Ross. In: *The Leishmaniasis. Protozoology, Part 7*. Leningrad: Academy of Sciences; 1982. p. 95-101.
- Saha B, Tonkal AMDJ, Croft S, Roy S. Mast cells at the host-pathogen interface: Host-protection versus immune evasion. *Clin Exp Immunol* 2004;137:19-23.
- Saito S, Hamada A, Watanabe N, Obata T, Katakura K, Ohtomo H. Eosinophil chemotactic activity in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitol Res* 1996b;82:485-489.
- Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microb Rev* 2001; 14(4): 778-09.
- Sasaki T, Fassler R, Hohenester E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol*. 2004;164:959-963.

Referências Bibliográficas

Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *The J Clin Invest* 1989;83:865-75.

Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 2000;177:195-203.

Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* 1993;178:567-77.

Schlein Y, Jacobson RL, Messer G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:9944-8.

Schlein Y. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today* 1993;9:255-8.

Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol* 2010; 26:466–469.

Schubach A, Cruzy-Maya T, Oliveira A, Sartori A, Oliveira-Neto M, Matos M, Araújo M, Oliveira A, Souza W, Haddad F, Perez M, Pacheco R, Momen H, Coutinho S, Marzochi M, Marzochi K, SC GdC. *Leishmania* antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of american tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:897-996.

Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraeve W, Pirmez C, Grimaldi G Jr, Fernandes O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis.* 1998;178(3):911-4.

Schwartzman JD, Pearson RD. The interaction of *Leishmania donovani* promastigotes and human fibroblasts in vitro. *The American J Trop Med Hyg* 1985;34:850-5.

Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med.* 1988;168(5):1675-84.

Referências Bibliográficas

Sergent E, Parrot L, Donatien A. Une question de terminologie: immuniser et prémunir. Bull. Soc. Pathol. Exot. 1924;17:37-38.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nature reviews. Immunology 2002;2:151-161.

Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, et al. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. Mol Cell 1997;1(1):25–34.

Silva EM, Bertho AL, Mendonça SCF. Effect of in vivo depletion of CD4⁺ on experimental infection of susceptible Balb/c mice with *Leishmania amazonensis*. Acta trop 1994;6:111-120.

Silva-Almeida M, Carvalho LO, Abreu-Silva AL, Souza CS, Haroim DJ, Calabrese KS. Extracellular matrix alterations in experimental *Leishmania amazonensis* infection in susceptible and resistant mice. Vet Res. 2012;43(1):10.

Silveira FT, Ishikawa EA, de Souza AAA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará state, Brasil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new *Leishmania* parasite of man in the Amazon region. Parasite 2002;9:43-50.

Silveira FT, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EA. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp n., a new parasite from the state of Pará. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987;82:289-292.

Smethurst PA, Onley DJ, Jarvis GE, O'Connor MN, Knight CG, Herr AB, et al. Structural basis for the platelet-collagen interaction: the smallest motif within collagen that recognizes and activates platelet Glycoprotein VI contains two glycine-proline-hydroxyproline triplets. J Biol Chem 2007;282(2):1296–304.

Soong L, Chang C, Sun J, Longley J, Ruddle N, Flavell R, et al. Role of CD4⁺ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. J Immunol 1997;158:5374-5383.

Souza CSF. Um modelo murino para infecção subcutânea com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: aspectos clínico, parasitológico, histopatológico e imunológico [Doutorado em Biologia Parasitária]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2002.

Referências Bibliográficas

- Squier MK, Sehnert AJ, Cohen JJ. Apopt leukocytes. *J Leukoc Biol* 1995;57:2-10.
- Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol* 2002;28:187-248.
- Stenger S, Donhauser N, Thuring H, Röllinghoff M, Bogdan C. Reactivation of lateent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 1501-14.
- Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Sanchez MA, Fernandez CT, Rondon AJ, Convit J. Adhesion molecules in lesions of American cutaneous leishmaniasis. *Exp Dermatol.* 1994a;3(1):17-22.
- Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Sanchez MA. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today.* 1994b;15(4):160-5.
- Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H. and Kühn, K. (1981). A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur. J. Biochem.* 120, 203-211.
- Titus RG, Lima GC, Engers HD, Louis JA. Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite-specific helper T-cell populations capable of mediating *L. major* specific delayed type hypersensitivity. *J Immunol* 1984;133:1594-1600.
- Titus RG, Milon G, Marchal G, Vassalli P, Cerottini JC, Louis JA. Involvement of specific Lyt-2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 1987;17:1429-1433.
- Titus RG, Ribeiro JM. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 1988;239:1306-1308.
- Titus RG, Sherry B, Cerami A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1989;170:2097-2104.
- Trinchieri G, Pflanz S and Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003. 19, 641-644.
- Turco SJ, Späth GF, Beverley SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol.* 2001 May;17(5): 223-6.

Referências Bibliográficas

Turk JL, Belehu A. Immunological spectra in infectious diseases. In: Parasites in the immunized host: mechanisms of survival. Amsterdam: Elsevier; 1974. p. 101-122.

Ueda-Nakamura T, Attias M, de Souza W. Megosome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. Parasitol Res 2001;87:89-97.

Uyemura K, Klotz J, Pirmez C, et al. Microanatomic clonality of $\gamma\delta$ cells in human leishmaniasis lesions. J Immunol 1992; 148:1205-11

van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. Infect Immun 2002;70:4177-84.

Vannier-Santos M, Saraiva E, Martiny A, Neves A, de Souza W. Fibronectin shedding by *Leishmania* may influence the parasite-macrophage interaction. Eur J Cell Biol 1992;59:389-

Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. Curr Pharmac Des 2002;8:297-318.

Vargas-Inchaustegui DA, Hogg AE, Tulliano G, Llanos-Cuentas A, Arevalo J, Endsley JJ, Soong L. CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania braziliensis* infection. Infect Immun. 2010;78(1):301-8.

Velez LR. Uta e espundia. Bull Soc Pathol Exot 1913;6:545.

Vianna G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania*. Brazil Medico 1911;41:1.

VogelW, Gish GD, Alves F, Pawson T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. Mol Cell 1997;1(1):13–23.

von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. J Exp Med 1998;188:1547-52.

Wahl SM. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. J Exp Med 1994;180:1587-1590.

Referências Bibliográficas

Waller RF, McConville MJ. Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol* 2002;32:1435-45.

Wanderley JL, Moreira ME, Benjamin A, Bonomo AC, Barcinski MA. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol*. 2006;176(3):1834-9.

Weller PF, Rand TH, Barrett T, Elovic A, Wong DT, Finberg RW. Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen-presentation and IL-1 alpha expression. *J Immunol* 1993;150:2554-62.

Wershil B, Theodos C, Galli S, Titus R. Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* in the mouse. *J Immunol* 1994;152:4563-4571.

WHO. The leishmaniasis and *Leishmania*/HIV co-infections. Fact Sheet 2000;116.

Williams CM, Coleman JW. Induced expression of mRNA for IL-5, IL-6, TNF-alpha, MIP-2 and IFN-gamma in immunologically activated rat peritoneal mast cells: inhibition by dexamethasone and cyclosporin A. *Immunology* 1995;86: 244-9.

Wilson ME, Young BM, Davidson BL, Mente KA, McGowan SE. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1998;161:6148-6155.

Wodnar-Filipowicz A, Heusser CH, Moroni C. Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature* 1989;339:150-2.

Wright SD, Rao PE, Van Voorhis WC, Craigmyle LS, Iida K, Talle MA, Westberg EF, Goldstein G, Silverstein SC. Identification of the C3bi receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:5699-5703.

Wyler DJ, Sypek JP, McDonald JA. In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infect Immun* 1985;49(2):305-11.

Xin L, Li Y, Soong L. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD45RB-dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4+ T cells in vitro and in vivo. *Infect Immun*. 2007;75(10):5018-26.

Referências Bibliográficas

Yoshimura K, Ishida K, Ishigooka S, Sugaya H, Kumagai M. Protective immunity against *Angiostrongylus cantonensis* in rats following sensitizing infections. *Parasitol Res* 1989;76:26-31.

Yurchenco PD and Furthmayr H. Self-assembly of basement membrane collagen. *Biochemistry* 1984;23: 1839-50.

Yurchenco PD, Amenta PS, Patton BL. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol.* 2004;22:521–538.