



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

FIOCRUZ

Dissertação de Mestrado

**ESTUDO COMPARATIVO DA INFECÇÃO *IN VITRO* DE
MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS CBA POR
Leishmania major e *Leishmania amazonensis***

IVANA NUNES GOMES

**Salvador - Bahia
1999**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO COMPARATIVO DA INFECÇÃO *IN VITRO* DE
MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS CBA POR
Leishmania major e *Leishmania amazonensis***

Mestranda: Ivana Nunes Gomes

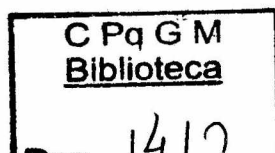
Orientadora: Patrícia Sampaio Tavares Veras

Co-Orientador: Luiz Antônio Rodrigues de Freitas

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

Salvador-Bahia

1999



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

Gomes, Ivana Nunes

G634e Estudo comparativo da infecção *in vitro* de macrófagos de Camundongos CBA por *Leishmania major* ou *Leishmania amazonensis* / Ivana Nunes Gomes. — Salvador: UFBA / CPqGM, 1999.

79p. : il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) –
Universidade Federal da Bahia, 1999.

1. Camundongo CBA. 2. Macrófagos peritoneais. 3.
Leishmania major. 4. *Leishmania amazonensis*. I. Título.

CDU 599.323.4:593.1

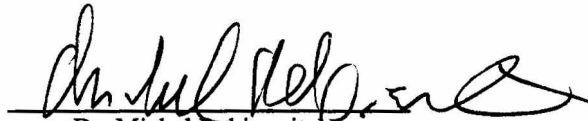
MFV 1712
001714

L.431
210001

599.323.4:593.1
G 634e

FOLHA DE APROVAÇÃO

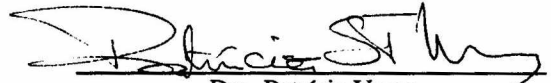
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Michel Rabinovitch
Pesquisador
UNIFESP



Dr. Lain Pontes de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM- FIOCRUZ



Dra. Patrícia Veras
Pesquisadora Adjunta
CPqGM- FIOCRUZ

***“O temor do Senhor é o princípio da Sabedoria;
revelam prudência todos que a praticam.”***

(Salmo 111: 10)

A meu pai e minha mãe pela força, carinho, dedicação e amor

Aos meus irmãos e cunhados pelo apoio e incentivo

Aos meus sobrinhos Laís, Caio e Victor pois eles encantam minha vida

A Júnior pelo amor, amizade e especial companhia

A minha tia Lia pela dedicação a tantos que sofrem de Leishmaniose

AGRADECIMENTOS

À Dra Patrícia Sampaio Tavares Veras, orientadora competente e dedicada que sempre me apoiou e incentivou durante todo o tempo de realização desse trabalho.

Ao Dr. Luiz Antônio R. de Freitas por sua orientação em todas as etapas desse trabalho e por seu incentivo .

A todos os amigos do LPBC especialmente, Rafael Tavares que participou com muita eficiência e dedicação em todas as etapas desse trabalho, também Paulo, Eduardo e Valderes pelo imprescindível auxílio e solidariedade.

A Cláudia Dias e Julie Patrício, as grandes amigas de qualquer hora, pelo apoio incondicional e companheirismo.

Ao Dr Manoel Barral-Netto, pelo seu grande apoio e atenção dispensados durante todo o curso.

Ao Dr. Washington Luís C. dos Santos por sua colaboração no estabelecimento do método e análise estatística desse trabalho.

À Dra Milena Soares por seu apoio e importantes sugestões nas fases iniciais desse trabalho.

A Rosália Oliveira pela sua dedicação a esse curso e a nós estudantes. Grande incentivadora, sempre solidária e presente nos momentos bons e naqueles mais difíceis.

Fontes de Financiamento:

PAPES – 0250.250.354

CNPq – 523005/96-2

CAPES – Bolsa de Mestrado

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
ABSTRACT.....	ix
RESUMO.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2 MORFOLOGIA E CICLO DE VIDA DA <i>LEISHMANIA</i>	2
1.2.1 Principais glicoconjugados do parasito.....	4
1.3 INTERAÇÃO MACRÓFAGO- <i>LEISHMANIA</i>	7
1.3.1 Adesão direta de promastigotas a macrófagos	8
1.3.2 Adesão indireta de promastigotas a macrófagos	9
1.3.3 Sobrevivência intracelular	11
1.4 MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	14
1.5 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR MURINA.....	16
1.5.1 Macrófagos e a indução das subpopulações <i>Th1</i> ou <i>Th2</i>	18
1.5.2 Interação células <i>T</i> – macrófagos.....	20
1.5.3 Mecanismo efetor na destruição de <i>Leishmania</i>	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. JUSTIFICATIVA.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 ANIMAIS	29
4.2 PARASITOS	29
4.3 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS	29
4.4 CULTURA DE MACRÓFAGOS	31
4.5 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	31
4.6 ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR IFN- γ	32
4.7 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO	32
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1 CINÉTICA DE INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS CBA POR <i>L. MAJOR</i> OU <i>L. AMAZONENSIS</i>	34
5.1.1 Cinética de curta duração.....	34
5.1.2 Cinética de longa duração.....	34
5.2 CINÉTICA DE INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 POR <i>L. MAJOR</i> OU <i>L. AMAZONENSIS</i>	40
5.3 EFEITO DO IFN- γ NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR <i>L. MAJOR</i> OU <i>L. AMAZONENSIS</i>	45
5.4 PRODUÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>L. MAJOR</i> OU <i>L. AMAZONENSIS</i>	45
6. DISCUSSÃO.....	49
6.1 A CINÉTICA DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR <i>L. MAJOR</i> OU <i>L. AMAZONENSIS</i>	49
6.2. POSSÍVEIS MECANISMOS RESPONSÁVEIS PELAS DIFERENÇAS ENTRE A INFECÇÃO POR <i>L. MAJOR</i> E <i>L. AMAZONENSIS</i>	53
6.3 A ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR IFN- γ	59
7. CONCLUSÕES	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC** : células apresentadoras de antígeno (antigen-present cells)
- DMEM** : meio de cultivo de células (Dulbecco's modified Eagle's medium)
- HEPES** : N-2hidroxiethylpiperazina:N'-2-etano ácido sulfônico
- IL**: interleucina (interleukin)
- IFN** : interferon
- iNOS** : óxido nítrico sintetase induzível (inducible nitric oxide synthase)
- LPS** : lipopolissacarídeo
- M ϕ** : macrófago
- MHC**: complexo de histocompatibilidade principal (major histocompatibility complex)
- NO** : óxido nítrico (nitric oxide)
- PIV** : estimulação primária *in vitro* (priming *in vitro* stimulation)
- PKC** : proteína quinase C
- SFB** : soro fetal bovino
- Th** : linfócito T auxiliador (T helper)
- TCR** : receptor de célula T (T cell receptor)
- PGE**: prostaglandina
- TGF** : fator de crescimento tumoral (transforming growth factor β)
- TNF** : fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor)

RESUMO

ESTUDO COMPARATIVO DA INFECÇÃO *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS CBA POR *L. major* e *L. amazonensis*. IVANA NUNES GOMES. Camundongos da linhagem CBA são resistentes à infecção por *L. major* (*Lm*) e susceptíveis à infecção por *L. amazonensis* (*La*), apresentando distintos padrões morfológicos da resposta tissular e da resposta imune. MΦ desempenham importante papel na infecção por *Leishmania* por serem as principais células hospedeiras do parasito e uma das células apresentadoras de antígenos a linfócitos T específicos. Além disso, MΦ uma vez ativadas são capazes de destruir parasitos internalizados por mecanismos dependentes da produção de NO. Nesse estudo o principal interesse foi investigar uma possível participação de MΦ de camundongos CBA no estabelecimento da resposta imune durante as fases iniciais da infecção. Através de estudos de cinética foi avaliado o percentual de células infectadas pretratadas ou não com IFN- γ . Para avaliar a sobrevivência e multiplicação do parasito no interior de MΦ, foi determinado o número de parasitos /MΦ em diferentes períodos de incubação. Através da mensuração dos níveis de NO foi avaliado a capacidade de MΦ ativadas em destruir parasitos internalizados. Os resultados demonstram que entre 90 minutos e 12 horas após a adição de promastigotas, a proporção de MΦ infectados e o número de parasitos/MΦ foi similar em ambos os grupos. Entretanto, após o período de caça de 24 h o percentual de células infectadas por *La* foi 2 x mais elevado quando comparado à infecção por *Lm*. Essas diferenças foram mantidas após 48 e 72 h de caça. Nesses mesmos períodos o número de parasitos /MΦ foi 2x maior em células infectadas por *La* que por *Lm*. Em células tratadas com IFN- γ , após 24 horas de pulso o perfil de infecção apresentado em células não tratadas se manteve. Nesse mesmo período, em células infectadas por *Lm* a produção de NO teve uma elevação discreta comparado à infecção por *La*. Entretanto essa diferença não foi estatisticamente significante. Assim os estudos de cinética mostraram que MΦ infectados por *Lm* apresentam maior capacidade de destruição desse parasito em relação a infecção por *La*. Esses dados sugerem que as diferenças encontradas na infecção de MΦ podem ser relacionadas com a determinação dos perfis de resistência ou susceptibilidade, reforçando a importância dos eventos que ocorrem nas fases iniciais no estabelecimento da infecção. 1. Camundongo CBA. 2. Macrófagos peritoneais. 3. *Leishmania major*. 4. *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

COMPARATIVE STUDY OF *IN VITRO* CBA MICE MΦ INFECTION WITH *L. major* AND *L. amazonensis*. **IVANA NUNES GOMES**. CBA mice are resistant to *Leishmania major* (*Lm*) infection but susceptible to *Leishmania amazonensis* (*La*). There is evidence that the events occurring in the early stages of infection are crucial to the course of the disease. Macrophages (MΦ) play a central role in *Leishmania* infection, for they are the cells that harbor parasites and are one of the antigen-presenting cells to specific T lymphocytes. MΦ phagocytizes *Leishmania* promastigotes and once activated can destroy parasites by a NO-dependent killing mechanism. We were interested to know how CBA mice can establish differential immune response when infected with *Lm* or *La*. In the present report we examined the differential capacity of CBA peritoneal MΦ to destroy *Lm* or *La in vitro*. In kinetic studies, we estimated the percentage of infected cells pretreated or not with rIFN-γ. In order to evaluate parasite survival and multiplication inside MΦ we enumerated parasites per infected MΦ after different periods of infection. Activation of mφ to kill parasites was determined by NO production in treated cells with IFN-γ as compared to control cells. Our results demonstrated that between 90 min and 12 hours after the promastigote addition, the proportion of infected MΦ and the number of parasites/ MΦ were similar. Interestingly, 24 hours after the pulse, the percentage of *La* infected MΦ was almost 2.0 times higher in comparison to *Lm* infected cells. These differences maintained during the next 48 to 72 hours after the pulse. At these time points, the number of parasites per cell was 2.0 times higher in *La* infected cells. In addition, between 12 and 24 hours, in both *Lm* or *La* infected cells, IFN-γ did not influence neither the percentage of infected MΦ, nor the number of parasites per cell. Twenty-four hours later, MΦ infected with *Lm* presented higher NO production in comparison with *La* infected MΦ. However, this increase was not statistically significant. In summary, until 12 to 18 hours after infection CBA MΦ displayed similar infection capacities by both leishmanias. The kinetic studies showed that the percentage of infected cells and parasite load were higher in MΦ infected with *La* as compared to *Lm* promastigotes. Production of NO and treatment with IFN-γ did not influence MΦ infected with *Lm* or *La*. These differences may be important to determine resistance or susceptibility *in vivo*. 1. CBA mice. 2. Peritoneal macrophages. 3. *Leishmania major*. 4. *Leishmania amazonensis*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A leishmaniose compreende um grupo diverso de doenças resultantes da infecção por parasitos do gênero *Leishmania* e está incluída entre as principais endemias do mundo, representando um sério problema de saúde pública. *Leishmania* spp. são protozoários pertencentes à família Tripanosomatidae, ordem Kinetoplastida. O gênero compreende muitas espécies que são epidemiologicamente diversas e complexas. Todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas por insetos vetores do gênero *Phlebotomus* (no Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (no Novo Mundo). As espécies patogênicas de *Leishmania* estão distribuídas em dois subgêneros: *Viannia*, aquelas que concluem o desenvolvimento da forma promastigota na região posterior do tubo digestivo (piloro/ou íleo) do vetor, correspondente ao complexo *L. braziliensis*, e o subgênero *Leishmania*, incluindo as espécies que se desenvolvem na porção suprapilórica (região anterior e médio) do vetor, representadas no complexo *L. donovani* e *L. mexicana* (LAISON & SHAW, 1987; GRIMALDI et al., 1989)

Uma vez inoculados no organismo vertebrado, promastigotas de *Leishmania* são internalizadas por células do sistema fagocítico mononuclear, onde iniciam seu estágio de desenvolvimento intracelular. As manifestações clínicas da infecção dependem da interação entre fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro e características de virulência da espécie de *Leishmania* envolvida (BARRAL et al., 1991; GRIMALDI et al., 1993; 1989)

No amplo espectro da leishmaniose tegumentar, encontram-se a leishmaniose cutânea (LC), que é caracterizada por lesões que regridem espontaneamente; a leishmaniose mucocutânea (LMC), que resulta da disseminação do parasito de lesões primárias para regiões de mucosa; e a leishmaniose cutânea difusa (LCD), que produz lesões difusas que não regridem espontaneamente. A leishmaniose visceral (LV) varia desde a forma assintomática até a fatal.

Os parasitos que causam LC e LCM no Novo Mundo são agrupados nos complexos *L. brazilienses* e *L. mexicana*. Parasitos do complexo *L. brazilienses* geralmente causam LC e LMC, e a infecção por parasitos do complexo *L. mexicana* geralmente não envolve a mucosa, causando lesões limitadas na pele que curam naturalmente. *L. amazonensis*, que causa principalmente lesões localizadas na pele, tem sido associada com alguns casos de LCM e LV (BARRAL et al., 1991). Parasitos do complexo *L. mexicana* também são responsáveis por alguns casos raros de LCD. *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. major* representam os agentes etiológicos de LC do Velho Mundo.

1.2 MORFOLOGIA E CICLO DE VIDA DA *Leishmania*

A *Leishmania* apresenta duas formas distintas em seu ciclo de vida, a promastigota e a amastigota. A forma promastigota é afilada, móvel, apresenta flagelo e através da picada do inseto vetor é transmitida ao hospedeiro vertebrado. Na pele do hospedeiro vertebrado promastigotas são internalizados por fagócitos mononucleares, perdem o flagelo e se diferenciam em amastigotas. Os amastigotas apresentam uma forma arredondada, móvel e com flagelo interno.

A progressão da infecção ocorre quando a ruptura de macrófagos ($M\Phi$) resulta na liberação de amastigotas no meio extracelular, havendo infecção subsequente de células adjacentes. O ciclo de vida da *Leishmania* continua quando um outro inseto se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado e ingere $M\Phi$ da pele contendo amastigotas.

No intestino do inseto, os amastigotas são liberados de $M\Phi$ infectados e se diferenciam em promastigotas, aproximadamente 12-18 horas depois da ingestão (LAWYER et al., 1990). A identificação de várias formas de desenvolvimento de *Leishmania* dentro do intestino do inseto evidencia uma diferenciação programada da forma amastigota intermediária para uma forma relativamente não infectante, promastigota procíclico, e depois para um estágio promastigota altamente infectante, metacíclico (LAWYER et al., 1990; SACKS & PERKINS, 1984; 1985). Promastigotas metacíclicas aparecem aproximadamente uma semana após a infecção do inseto, quando os parasitos migram do intestino para a probóscide do inseto (LAWYER et al., 1990; SACKS & PERKINS, 1984). Em estágio não infectante, promastigotas de *L. major* são capazes de aderir em células epiteliais do intestino do inseto, e esta habilidade é perdida quando parasitos se transformam na forma infectante (PIMENTA et al., 1992). Essas diferenças na adesão ao epitélio intestinal parecem ser reguladas por alterações específicas na expressão de oligossacarídeos de lipofosfoglicana (LPG) de *L. major*, o que resultariam em uma migração seletiva de promastigotas metacíclicos para a probóscide do inseto vetor (PIMENTA, 1992).

1.2.1 Principais glicoconjugados do parasito

Lipofosfoglicana (LPG)

O principal glicoconjugado da superfície de promastigotas de *Leishmania* é o LPG. Está localizado em toda a superfície do parasito incluindo o flagelo e está ligado à superfície do parasito através de âncora de fosfatidilinositol. A estrutura da LPG é composta por quatro domínios: uma âncora de lipídio fosfatidilinositol, um núcleo glicano, uma região repetitiva de fosfato-sacarídeo e uma cobertura de oligossacarídeo (TURCO & DESCOTEAUX, 1992). A âncora de lipídio e o núcleo glicano de LPG são conservados entre todas as espécies de *Leishmania* estudadas; entretanto, existe uma grande variabilidade no conteúdo de carboidratos da região repetitiva de fosfato-sacarídeo e na cobertura de oligossacarídeo (SACKS, 1992).

Durante a diferenciação de promastigotas da forma procíclica para a metacíclica, duas alterações ocorrem na estrutura do LPG. A primeira alteração é no comprimento da molécula LPG devido ao aumento no número de sacarídeos fosforilados. Em *L. major* esta alongação resulta em quase o dobro da extensão da molécula (SACKS et al, 1990). A segunda modificação é a mudança na porção carboidrato terminal encontrada na região repetitiva de sacarídeo fosfato. Em promastigotas procíclicos o principal açúcar terminal é a galactose e nos metacíclicos esse açúcar é substituído por arabinose (McCONVILLE et al, 1992) . A modificação estrutural explica a perda da aglutinação por aglutinina de amendoim (peanut agglutinin - PNA) dos promastigotas metacíclicos. Essas mudanças têm

sido demonstradas no cultivo de promastigotas *in vitro* e no desenvolvimento de promastigotas *in vivo* no inseto vetor (SARAIVA et al, 1995).

As modificações na estrutura de LPG têm sido correlacionadas com importantes alterações na biologia do parasito. Estudos sobre o papel de LPG durante o desenvolvimento de promastigotas demonstram que LPG de procíclicos pode atuar como um ligante para receptores nas células epiteliais do intestino do inseto. As modificações de LPG durante a metaciclogênese resultam na perda da ligação com as células epiteliais do intestino do inseto, sugerindo que essas alterações são necessárias para permitir a liberação e migração das formas infectantes do intestino para a probóscide (PIMENTA et al, 1992).

Há evidência de que promastigotas metacíclicos de *L. major* apresentam maior resistência à lise mediada por complemento do que promastigotas em fase logarítmica de crescimento (PUENTES et al, 1988). Outros estudos também sugerem que o aumento no comprimento da molécula LPG bloqueia efetivamente o acesso dos componentes líticos do sistema complemento à membrana do parasito (SACKS et al, 1990).

Depois da fagocitose, a LPG parece estar envolvida na sobrevivência intracelular de promastigota e sua diferenciação em amastigota (McNEELY & TURCO, 1987). Isso sugere que LPG desenvolve importante papel na resistência contra atividade microbicida da célula hospedeira. Estudos *in vitro* mostram que anticorpos monoclonais revelam epítomos de LPG localizados primeiramente na área de internalização da promastigota (TOLSON et al., 1990). A distribuição dos epítomos na superfície dos MΦ ocorre 30 minutos após à infecção. Embora a expressão de LPG seja regulada em amastigotas

(McCONVILLE & BLACKWELL, 1991; MURRAY, 1982) , epítomos de LPG estão presentes em toda a superfície de MΦ durante o primeiro dia após a infecção. Entretanto, 5 ou 6 dias após infecção, epítomos de LPG não são mais detectados. Esses dados sugerem, portanto, que as funções intracelulares de LPG devem ser exercidas durante as fases iniciais da infecção de MΦ.

gp63

A principal proteína de superfície de promastigotas de *Leishmania* é uma glicoproteína de 63 kDa conhecida como gp63 (LEPAY et al, 1983). Análises bioquímicas têm mostrado que gp63 é a mais abundante proteína da superfície de todas as espécies de *Leishmania* estudadas e a sua expressão aumenta quando a promastigota torna-se mais infectante durante a metaciclogênese (BRITTIGHAM et al, 1995; KWEIDER et al, 1987; RAMAMOORTHY et al, 1995).

A molécula gp63 parece interagir diretamente com receptores de MΦ, incluindo receptor tipo 3 do complemento, CR3 (Cd11b/CD18) (RUSSEL & WRIGHT, 1986) e o receptor para fibronectina (RIZVI et al, 1988). O domínio de gp63 semelhante à fibronectina está envolvido na interação com MΦ (SOTERIADOU et al, 1992). Devido à abundância, localização na superfície e atividade proteolítica de gp63, muitos trabalhos foram realizados mostrando o papel dessa molécula na virulência de *Leishmania*. Estes estudos incluem a ligação de promastigotas a MΦ (CHANG & CHANG, 1986; RUSSEL & WILHELM, 1986) bem como a sobrevivência intracelular de promastigotas fagocitadas (CHAUDHURI et al, 1989).

1.3 INTERAÇÃO MACRÓFAGO-*Leishmania*

Leishmania são parasitos intracelulares obrigatórios que, em mamíferos, sobrevivem e se multiplicam principalmente em células do sistema fagocítico mononuclear. Algumas horas após a inoculação do parasito na pele do hospedeiro vertebrado, ocorre um infiltrado celular composto predominantemente de MΦ que fagocitam *Leishmania* (ANDRADE et al, 1984) . Os MΦ desempenham papel central na leishmaniose (SOLBACH et al, 1991), pois são as principais células hospedeiras de *Leishmania*, apresentadoras de antígeno a linfócitos T específicos e também atuam como as células efectoras na destruição do parasito. A atividade de MΦ constitui um dos mecanismos primários do organismo contra a infecção por micróbios e é capaz de exercer uma variedade de funções microbicidas tais como a ativação de sistema imune do hospedeiro e a produção de radicais livres de oxigênio (ROI) e de enzimas lisossomais.

Promastigotas de *Leishmania* são internalizados por MΦ por um processo passivo por parte do parasito, o qual pode ser inibido pelo tratamento de MΦ por citocalasina B (CHANG, 1979), um inibidor da polimerização dos filamentos de actina. Promastigotas mortos pelo calor são eficientemente fagocitados por MΦ (CHANG, 1979). Estudos demonstraram que a ligação e fagocitose de promastigotas são eventos mediados por receptor (WYLER, 1982; ZENIAN, 1981). Múltiplos receptores de MΦ, ligantes do parasito, e opsoninas do hospedeiro estão envolvidos na ligação de promastigotas em MΦ (MOSSER & ROSENTHAL, 1993).

1.3.1 Adesão direta de promastigotas a macrófagos

O reconhecimento de carboidratos do parasito por receptores de MΦ constitui um importante componente da interação direta de parasitos com essas células. A ligação de promastigotas de *L. donovani* a MΦ murinos (BLACKWELL, 1985; CHANNON & BLACKWELL, 1985) ou MΦ humanos (WILSON & PEARSON, 1986) foi inibida por manana. A ligação direta de promastigotas de *L. major* a MΦ murinos não foi inibida por manana (MOSSER et al, 1992). Alguns estudos demonstram que LPG purificada de *L. major* liga-se especificamente a MΦ murinos (HANDMAN & GODING, 1985). A ligação de promastigotas também pode ser bloqueada pela incubação com fragmentos F(ab) de anticorpos contra LPG (HANDMAN & GODING, 1985).

Um grupo de receptores que parece estar envolvido no reconhecimento de LPG é o CD18 da família β2 das integrinas . Usando esferas de sílica cobertas por LPG e anticorpos monoclonais, foi evidenciado que LPG poderia ligar-se diretamente a CR3 e p150/95 (CD11c/CD18) (TALAMÁS-ROHANA et al, 1990). Esferas cobertas por LPG também têm afinidade por CR3 purificado (VAN STRIJP et al, 1993). Entretanto, usando promastigotas intactas viáveis, alguns estudos mostram a ligação indireta de promastigotas a CR3 (MOSSER et al, 1992; BRITTINGHAM et al, 1995; ROSENTHAL et al, 1996). No uso de CR3 purificado e fibroblastos transfectados com CR3, foi observada a necessidade absoluta de opsoninas do complemento na ligação de promastigotas a CR3 (BRITTINGHAM et al., 1995; MOSSER & HANDMAN, 1992; ROSENTHAL et al., 1996) sugerindo que a interação direta de LPG com CR3, previamente mostrada, não foi suficiente para mediar a ligação de promastigotas viáveis a CR3.

Proteínas purificadas, bem como anticorpos contra gp63, inibiram a adesão de promastigotas (CHANG & CHANG, 1986; RUSSELL & WILHELM, 1986). Partículas cobertas por gp63 ligaram-se a MΦ (RUSSELL & WILHELM, 1986). A restauração da expressão de gp63 em uma variante de *L. amazonensis* deficiente de gp63, leva à ligação a MΦ murinos (LIU & CHANG 1992). Os mecanismos da adesão de MΦ mediada por gp63, bem como os receptores de MΦ envolvidos nessa ligação, permanecem controversos.

1.3.2 Adesão indireta de promastigotas a macrófagos

Várias opsoninas do soro e receptores celulares estão envolvidos na ligação de promastigotas a MΦ (MOSSER & ROSENTHAL, 1993). Estudos demonstraram que a opsonização de promastigotas aumenta a adesão a MΦ (MOSSER & EDELSON, 1984). Esse aumento é dependente da espécie de *Leishmania* estudada, bem como do tipo de MΦ utilizado (MOSSER & ROSENTHAL, 1993). Além disso, foi demonstrado que a opsonização de promastigotas por componentes do soro não apenas afeta a ligação em MΦ, mas também seu destino intracelular depois da fagocitose (MOSSER & EDELSON, 1987; SACKS, 1992). A fixação do complemento por promastigotas de *L. major* resulta no aumento da sobrevivência intracelular dos parasitos em MΦ. Esse aumento da sobrevivência de promastigotas em MΦ pode ser devido, em parte, à estimulação reduzida da produção de metabólitos tóxicos do oxigênio (MOSSER & EDELSON, 1987).

Os receptores envolvidos na ligação e fagocitose de promastigotas opsonizadas pelo soro são receptores de MΦ para proteínas C3 do complemento (BLACKWELL et al, 1989; MOSSER & EDELSON, 1985; DA SILVA et al, 1989) . Os dois principais receptores para o complemento em fagócitos mononucleares são CR3, o receptor para C3bi, e CR1 (CD35), o receptor para C3b e C4b.

Foi identificado, em alguns estudos, o papel de CR1 na ligação de promastigotas metacíclicos de *L. major* a MΦ humanos (DA SILVA et al, 1989). Por causa da atividade de co-fator Fator 1 do CR1, C3b é rapidamente convertida para C3bi, o ligante para CR3. A grande deposição de C3 na superfície do parasito está associada à sua sobrevivência intracelular (MOSSER & EDELSON, 1987) , provavelmente por causa da interação com CR3, o que induz uma menor produção de ROI (WU et al, 1993). Estudos realizados com procíclicos e metacíclicos de *L. major* mostraram que existe ligação desses promastigotas com CR1 e CR3, mas CR3 parece que é o receptor primário envolvido na fagocitose desse parasito. A adesão estável de *Leishmania* opsonizada por complemento é mediada primariamente por CR3, e anticorpos contra CR3, mas não contra CR1, inibem a fagocitose de promastigotas metacíclicos de *L. major* opsonizados pelo soro (ROSENTHAL et al, 1996).

1.3.3 Sobrevivência intracelular

A expansão da infecção por *Leishmania* dependerá da sua capacidade de sobreviver e proliferar no interior de células do sistema fagocítico mononuclear. Alguns estudos têm demonstrado que promastigotas de *Leishmania* induzem a produção de ROI durante a fagocitose em MΦ de diferentes origens e localização (MURRAY & CARTELLI, 1983; PEARSON et al, 1982). Promastigotas de *Leishmania* são susceptíveis a ROI produzidos por MΦ e gerados em sistema livre de célula (MURRAY, 1981). Entretanto, foi mostrado que algumas espécies de *Leishmania* podem apresentar uma variedade de mecanismos que impedem a sua destruição pelos ROI. *L. donovani* contém uma enzima denominada fosfatase ácida que pode bloquear a produção de superóxido em neutrófilos (REMALEY et al, 1984). LPG de *Leishmania* pode consumir superperóxido (CHAN et al, 1989), ou pode indiretamente diminuir a produção de metabólitos tóxicos por MΦ, através da inibição da proteína cinase C (PKC) (McNEELY & TURCO, 1987).

MΦ imunologicamente ativados geram uma grande quantidade de ROI durante a fagocitose de promastigotas, e destroem os parasitos mais eficientemente do que MΦ residentes (MURRAY & CARTELLI, 1983). MΦ da derme permitem o crescimento de *Leishmania*, e essas células falham em produzir ROI durante a fagocitose de promastigotas (LOCKSLEY et al, 1988). Diferente da infecção por promastigotas, a infecção por amastigotas não parece ser controlada pela produção de ROI por MΦ. Amastigotas são mais resistentes à superóxido do que promastigotas (MURRAY, 1982) e eles tipicamente não induzem a produção desses radicais tóxicos durante a fagocitose (PEARSON et al, 1983; CHANNON et al, 1984). Amastigotas de *Leishmania* contém enzimas como

superóxido dismutase e catalase, que provavelmente favorece sua sobrevivência no interior de MΦ (CHANNON & BLACKWELL, 1985). Entretanto, apesar da resistência demonstrada a ROI, os amastigotas são susceptíveis a produtos tóxicos do nitrogênio produzidos por MΦ. O mecanismo predominante na destruição de amastigotas de *Leishmania* por MΦ murinos estimulados por IFN- γ envolve a produção de Óxido Nítrico (NO) (GREEN et al, 1990).

O maior percentual de parasitos que se liga a MΦ na ausência do complemento é morto (MOSSER & EDELSON, 1987). Entretanto, a dependência do complemento para a sobrevivência não é observada em todas as espécies de *Leishmania*. Promastigotas de *L. amazonensis* ligam-se a MΦ eficientemente na ausência do complemento, e um percentual significativo desse parasito sobrevive dentro de MΦ (MOSSER & EDELSON, 1987). Essa sobrevivência pode dever-se a uma resistência aos mecanismos de destruição mediados por MΦ ou à fixação de complemento endógeno.

Amastigotas de *Leishmania* residem e multiplicam-se no interior de MΦ em uma organela conhecida como vacúolo parasitóforo que exhibe características de compartimento da via endocítica (ALEXANDER & VICKERMAN, 1975; CHANG & DWYER, 1976). Estudos mostraram que fagossoma contendo *Leishmania* funde com lisossomo e/ou endossoma tardio de MΦ para a formação do vacúolo parasitóforo (ALEXANDER & RUSSELL, 1992).

Muitos estudos de microscopia imunoeletrônica e imunofluorescência realizados com *L. amazonensis* mostraram que proteínas de membrana características de lisossomo estão presentes na membrana do compartimento contendo o parasito e também uma variedade de hidrolases lisossomais no lúmem desse compartimento (ANTOINE, J. et al, 1991; 1987; 1990; PRINA et al, 1990). Foi demonstrado que ligantes endocitados via receptores de MΦ podem ser liberados em vacúolo parasitóforo de MΦ infectados por *L. amazonensis* (RABINOVITCH et al, 1985).

O vacúolo de *L. amazonensis* em MΦ murinos tem sido bem caracterizado. Alguns dados indicam que 24-72 horas após a infecção, esses vacúolos mantêm o pH de aproximadamente 5.0 (ANTOINE et al, 1990) e contém várias hidrolases lisossomais aparentemente ativas (ALEXANDER & RUSSELL, 1992; ANTOINE et al, 1990; LANG et al., 1994; PRINA et al, 1990; RUSSELL et al, 1992). A membrana do vacúolo apresenta proteínas de compartimento tardio da via endocítica. Proteínas de membrana como LAMP1 e LAMP2, que estão localizadas principalmente em lisossomo, são detectadas em vacúolo parasitóforo (RUSSELL et al, 1992 ; LANG, 1994), evidenciando que esses vacúolos parasitóforos adquirem aspectos característicos de lisossomo.

Moléculas de MHC classe II têm sido detectadas em vacúolo parasitóforo de MΦ de lesões ou infectados e estimulados por IFN- γ . Essas moléculas estão presentes em vacúolos de MΦ infectados por *L. amazonensis* in vitro depois da ativação por IFN- γ (ANTOINE, et al, 1991 ; LANG et al., 1994) e em vacúolos contendo *L.mexicana* na infecção in vivo (RUSSELL et al, 1992). Esses dados sugerem que vacúolo parasitóforo de *L.mexicana* ou

L. amazonensis são sítios hidrolíticos, onde o processamento, incluindo a desnaturação e proteólise de antígeno do parasito, podem ocorrer.

1.4 MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Linhagens isogênicas de camundongos têm sido amplamente estudadas na leishmaniose, por apresentarem distintos padrões de resistência e susceptibilidade à doença. A depender da espécie de parasito e da linhagem de camundongo envolvida, um considerável espectro de manifestações da doença pode ser produzido. A maior parte desses conhecimentos decorre de estudos experimentais feitos em camundongos isogênicos resistentes à infecção por *L. major*, como C57BL/6, C3H, CBA ou susceptíveis a este parasito, como BALB/c. Camundongos resistentes infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* apresentam infecções semelhantes a LC e LMC, e os susceptíveis, semelhante a LCD (BARRAL-NETTO et al, 1987).

Estudos experimentais indicam que os estágios iniciais da infecção são similares em ambos os animais resistentes ou susceptíveis, com uma predominância de neutrófilos, muitos contendo o parasito. Em linhagens susceptíveis, o padrão é gradativamente substituído por um aspecto monomórfico, consistindo predominantemente de MΦ vacuolizados contendo amastigotas, enquanto que em linhagens resistentes observa-se um infiltrado linfocitário e uma reação granulomatosa (ANDRADE et al, 1984; BARRAL-NETTO et al., 1987)

Camundongos BALB/c, que são altamente susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*, depois de injeção intravenosa com antígeno solúvel de promastigotas exibem uma reação

mista de células mononucleares com reação granulomatosa, deposição de colágeno e necrose fibrinóide no sítio da infecção. Em contraste, animais não imunizados desenvolvem um aspecto monomórfico composto por MΦ parasitados com vacúolos grandes e com áreas de necrose coagulativa (BARRAL-NETTO et al, 1987). Esses achados mostram que mudanças histológicas refletem a resposta imune do hospedeiro na leishmaniose cutânea, e que o perfil de susceptibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. amazonensis* pode ser artificialmente modificado (BARRAL-NETTO, et al, 1987).

Na infecção experimental por *L. major* aspectos distintos do espectro de manifestações clínicas visto em pacientes com leishmaniose cutânea pode ser reproduzido em diferentes linhagens de camundongos isogênicos (BEHIN et al, 1979; MITCHELL et al, 1980). Camundongos da maioria das linhagens isogênicas (C3H/He, CBA, C57Bl/6, 129Sv/Ev) desenvolvem lesões cutâneas locais que resolvem espontaneamente entre 4 a 8 semanas. Esses camundongos não desenvolvem lesões depois da segunda inoculação com *L. major*, mostrando um fenótipo de resistência. Camundongos de algumas linhagens (BALB/c, DBA/2) desenvolvem lesão grave e não controlada, sem tornarem-se imune à reinfeção, caracterizando um fenótipo de susceptibilidade (MITCHELL et al, 1980) .

Camundongos da linhagem CBA, quando infectados por *L. major*, desenvolvem perfil tecidual característico de resistência, com formação de granulomas, necrose fibrinóide e redução do número de parasitos na lesão (SOUZA, 1998). Esses mesmos animais infectados por *L. amazonensis* mostram na lesão achados semelhantes aos observados em

lesões de camundongos BALB/c altamente susceptíveis (ANDRADE et al, 1984), com extensas áreas de necrose de coagulação, infiltrado mononuclear macrofágico difuso e grande carga parasitária (SOUZA, 1998).

1.5 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR MURINA

Os mecanismos de resistência e susceptibilidade à infecção na leishmaniose tegumentar envolvem a resposta imune mediada por células, sobretudo a população de linfócitos T com fenótipo CD4⁺ (LIEW & O'DONNELL, 1993). Diversos estudos têm demonstrado que células T CD4⁺ se dividem em duas sub-populações que secretam diferentes padrões de citocinas, ativando distintos sistemas efetores. A sub-população CD4⁺ Th1 produz IFN- γ e IL-2, enquanto que células CD4⁺ Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10 (MOSMANN & COFFMAN, 1989).

A resistência ou susceptibilidade de linhagens de camundongos a *L. major* correlaciona-se com a indução da resposta Th1 ou Th2, respectivamente (HEINZEL et al, 1991; SCOTT et al, 1988; BOOM et al, 1990). Camundongos resistentes infectados por *L. major* apresentam um padrão de resposta imune mediada por células tipo Th1, enquanto que a susceptibilidade observada em BALB/c resulta da expansão preferencial de células Th2 (HEINZEL et al, 1989; LIEW & O'DONNELL, 1993). O perfil de citocinas produzidas por células Th1 envolvidas na ativação de M Φ predomina em camundongos resistentes, enquanto que as citocinas implicadas na produção de anticorpos e inibição de M Φ , produzidas por células Th2, estão associadas ao perfil de susceptibilidade (HEINZEL et al, 1989; LIEW & O'DONNELL, 1993; MOSMANN & COFFMAN, 1989).

O principal mediador da resistência à infecção por *L. major* em linhagens de camundongos resistentes é o IFN- γ , devido à sua capacidade de ativar macrófagos para destruição do parasito (TITUS et al, 1984; NACY et al, 1985). Em camundongos susceptíveis, a IL-4 pode bloquear a capacidade do IFN- γ em ativar macrófagos (LEHN et al, 1989; LIEW et al, 1989) . O IFN- γ e a IL-4 têm um papel decisivo na infecção por *L. major*, pois através da influência na determinação do tipo de resposta gerado contra o parasito, essas citocinas agem modulando a atividade efetora de M Φ .

O padrão morfológico de resposta tecidual, observado em camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*, correlaciona-se com aspectos da resposta imune. Na infecção por *L. major*, esses camundongos apresentam níveis elevados de IFN- γ , evidenciando uma resposta do tipo Th1 e, quando infectados por *L. amazonensis* produzem níveis elevados de IL-4, caracterizando uma resposta do tipo Th2 (SOUZA, 1998). Esses dados sugerem que, em camundongos CBA, fatores relacionados com o parasito podem ser determinantes do tipo de resposta imune-inflamatória.

Na leishmaniose cutânea murina experimental, portanto, já é bem conhecido que o resultado da doença em camundongos geneticamente resistentes ou susceptíveis é modulado pela expansão preferencial de células T protetoras ou não protetoras, respectivamente. Entretanto, não está evidenciado como se define a ativação preferencial dessas diferentes subpopulações de células T. Alguns estudos da leishmaniose murina, mostram que, juntamente com células T, diferenças na função de células apresentadoras de antígeno (APC), como M Φ (HANDMAN et al, 1979; NACY et al 1983) , podem

influenciar no resultado da doença. Isso sugere que o destino da infecção pode ser determinado por células T ou APC ou pela combinação dos tipos celulares.

1.5.1 Macrófagos e a indução das subpopulações Th1 ou Th2

Algumas evidências sugerem que os eventos que participam na determinação da susceptibilidade à infecção por *Leishmania* ocorrem no início da infecção e envolvem elementos da resposta imune inata que precedem o desenvolvimento de células Th1 e Th2 específicas (CHATELAIN et al, 1992; SYPEK et al, 1993). Assim, o tratamento com anti-IL-4 (SADICK et al, 1990) ou a administração de IL-12 (SYPEK et al, 1993) durante a primeira semana da infecção favorecem a cura em camundongos BALB/c. Resultados in vivo e in vitro sugerem que citocinas presentes no início da resposta imune têm um importante efeito na diferenciação de células T CD4+ (O'GARRA & MURPHY, 1994).

Os estudos sobre leishmaniose murina focalizam, principalmente, a resposta de células T específicas (LOCKSLEY et al, 1991; MÜLLER et al, 1989) e o IFN- γ é a principal citocina ativadora de M Φ na destruição efetiva de *L. major* (NATHAN et al, 1983). Entretanto, a existência de células específicas Th1 produtoras de IFN- γ em camundongos resistentes não explica completamente o fenômeno de resistência natural na leishmaniose experimental.

Foi demonstrado que linhagens de células T secretoras de IFN- γ podem exacerbar a doença (TITUS et al, 1991), e que IL-4 sinergiza com IFN- γ na ativação de M Φ ao invés de reduzir sua atividade (BOGDAN et al, 1991). Estudos de transplantes revelam que a

resistência e susceptibilidade na leishmaniose experimental são determinadas por descendentes de células hematopoiéticas do doador (HOWARD et al, 1980). Esses dados sugerem que diferenças na resposta de MΦ podem desempenhar importante papel no resultado da infecção por *L. major*.

Alguns dados mostram que, dois dias após a infecção por *L. major*, o percentual de MΦ maduros F4/80 positivos na lesão aumenta mais rapidamente em camundongos C57Bl/6 resistentes do que em camundongos BALB/c susceptíveis. Esse aspecto foi também demonstrado em linhagens de camundongos atímicos, excluindo assim o fenômeno controlado por células T (SUNDERKÖTTER et al, 1993).

As populações de células Th1 e Th2 são derivadas de um precursor comum Th0, o qual está presente nos estágios iniciais durante a cultura in vitro (STREET et al, 1990). A natureza do antígeno, o tipo de APC, a presença de moléculas coestimulatórias ligadas à membrana ou a presença de fatores solúveis parecem influenciar na diferenciação das subpopulações de células T.

Certos antígenos de *Leishmania* induzem preferencialmente Th1 ou Th2 depois da imunização de camundongos BALB/c (SCOTT et al, 1988). A imunização de camundongos BALB/c com peptídeos de gp63 indica que certas sequências tem a capacidade de direcionar a resposta para Th1 ou Th2 (SOARES et al 1994). A injeção de antígenos de *Leishmania* por via intravenosa ou intraperitoneal confere cura a BALB/c, enquanto a injeção subcutânea da mesma preparação exacerba a infecção (HOWARD et al

1982; LIEW et al, 1985). Estes resultados parecem resultar da apresentação do antígeno por diferentes APC. O mecanismo pelo qual APC pode influenciar a geração de populações de células T pode envolver interações específicas de moléculas de membrana entre célula T e APC ou pode derivar das atividades de produtos secretados por APC .

A coestimulação de células T via interações com APC durante a apresentação de antígeno pode determinar a polarização da resposta T CD4+. Algumas evidências sugerem que a interação entre B7-1 ou B7-2 de APC e células T durante a apresentação de antígeno pode selecionar a resposta para Th1 ou Th2, respectivamente (KUCHROO et al, 1995).

IL-12 é uma citocina que pode selecionar o crescimento de células Th1 e suprimir o desenvolvimento de células Th2 (HSIEH et al, 1993). A administração in vivo de IL-12 é suficiente para curar camundongos BALB/c infectados por *L. major* quando é realizada no início da infecção (SYPEK et al, 1993).

1.5.2 Interação células T – macrófagos

A fagocitose de organismos patogênicos por macrófagos induz a produção de vários mediadores solúveis, incluindo fatores quimiotáticos (IL-8, MCP-1, MIP-1, RANTES), fatores de ativação como TNF- α , IL-12, e IL-1, estimulantes de inflamação aguda como IL-6, fatores de modulação como IL-10 e fatores estimulantes da hematopoiese como M- e GM-CSF, que podem participar de vários aspectos da defesa do hospedeiro (revisto por REINER & LOCKSLEY, 1995).

Em MΦ infectados in vitro por *L. donovani* ocorre uma diminuição na expressão de moléculas de MHC classe II e secreção de IL-1 (REINER, 1987). Macrófagos de linhagens suscetíveis secretam altos níveis de IL-1 quando comparados a macrófagos de linhagens resistentes infectados com *L. major*. MΦ de camundongos BALB/c produzem grandes quantidades de IL-1 quando infectados in vitro por *L. major* (REINER et al 1990), enquanto que o IFN- γ aumenta a produção de IL-1 em MΦ infectados por *L. donovani* (CILLARI et al, 1989). Portanto, o efeito da infecção por *Leishmania* em MΦ sobre a produção de IL-1 parece depender da espécie de *Leishmania* envolvida e da origem dos MΦ. Adicionalmente, a IL-1 estimula a produção de outro mediador produzido por macrófagos, o TNF- α , importante na infecção por *Leishmania*. TNF- α está associado com a resistência à infecção, tanto in vivo quanto in vitro, devido a sua capacidade de induzir a atividade leishmanicida dos MΦ (LIEW et al, 1990).

A prostanglandina E₂ (PGE₂) é um importante mediador em reações inflamatórias e é capaz de favorecer a geração de respostas Th2, inibindo a produção de IFN- γ (PHIPPS et al, 1991). O papel exato de PGE₂ na leishmaniose não está claro. MΦ isolados de camundongos BALB/c e infectados por *L. donovani* produzem 2-5 vezes mais PGE₂ quando estimulado por fitohemaglutinina in vitro, do que MΦ de camundongos normais (REINER & MALEMUD, 1985). Entretanto, outros estudos revelam papel protetor de PGE₂. Em MΦ de camundongos CBA ou C57BL/6 infectados in vitro por *L. enrietti* e ativados por IFN- γ e TNF- α ocorre aumento na destruição do parasito e produção de NO quando PGE₂ está presente nas culturas (MAUËL et al, 1995).

IL-10 é uma citocina produzida por MΦ e células T (MOSMANN & MOORE, 1991). Pode atuar diretamente em MΦ inibindo sua ativação (CONVIT et al, 1989), ou através da inibição da produção de IFN- γ (FIORENTINO et al 1991 a b). O TGF- β é uma citocina que está relacionada com a susceptibilidade, pois em lesões de camundongos BALB/c detecta-se maior produção de TGF- β em relação ao observado em lesões em animais C57BL/6 (BARRAL et al, 1993; STENGER et al, 1994; Além disso, o tratamento de camundongos BALB/c com TGF- β recombinante leva a exacerbação da infecção por *L. brasiliensis* (BARRAL et al, 1993).

IL-12 é o principal fator produzido por MΦ capaz de induzir a produção de IFN- γ determinando o desenvolvimento de resposta Th1 (GERMANN et al, 1993). A produção de IFN- γ aumenta a expressão de moléculas coestimulatórias B7-1 e B7-2 (DING et al 1993) e citocinas como IL-12 podem agir sinergicamente com essas moléculas induzindo proliferação de células T (MURPHY et al 1994). IFN- γ e TNF- α induzem a produção de NO e essa ação pode ser inibida por IL-10 (WU et al 1993). IFN- γ e TNF- α são as principais citocinas envolvidas na ativação de MΦ para a destruição de *Leishmania*.

Portanto, o tipo de resposta de MΦ a qualquer estímulo depende da interação de vários fatores liberados durante sua ativação. IL-2, por exemplo, pode atuar sinergicamente com IL-12 e induzir proliferação de células T (GERMANN et al 1993). O efeito inibitório de TGF- β pode ser revertido pela liberação de IFN- γ e TNF- α (CORRADIN et al 1993) . Esses dados sugerem que várias citocinas podem estar envolvidas na regulação das funções de MΦ.

1.5.3 Mecanismo efetor na destruição de *Leishmania*

Óxido nítrico é um composto derivado de L-arginina e está envolvido na destruição de *Leishmania* por MΦ. É o principal mediador relacionado com a destruição de *Leishmania*, tanto in vitro quanto in vivo (LIEW et al 1990 a b). Este mediador é produzido por MΦ ativados por citocinas como o IFN- γ e o TNF- α (GREEN et al, 1990; LIEW et al 1990 a b). A produção de NO e a capacidade leishmanicida podem ser inibidas por L-NMMA, um análogo da arginina (LIEW et al, 1990 a). Além disso, MΦ de camundongos resistentes à infecção por *L. major* produzem uma maior quantidade de NO sintetase induzível (iNOS) e NO do que macrófagos de camundongos susceptíveis a esta *Leishmania* (STENGER et al 1994). O papel de NO foi também demonstrado in vivo. Camundongos injetados com L-NMMA desenvolvem grandes lesões e ocorre um aumento da carga parasitária em relação ao controle (LIEW et al, 1990 b).

A produção de NO pode ser regulada por citocinas. MΦ incubados com IFN- γ produzem altos níveis de NO (DING et al 1988). O IFN- γ pode atuar sinergicamente com TNF- α e TNF- β aumentando a produção de NO (DING et al 1988). Outras citocinas, tais como IL-3, IL-4, TGF- β e IL-10, entretanto, podem atuar inibindo a expressão de iNOS (LIEW & COX, 1991).

É provável que múltiplos fatores envolvidos nas etapas iniciais da infecção por *Leishmania* participem na geração da resposta imunológica. Os estudos in vivo não permitem observar de modo detalhado os elementos que participam destes eventos. Assim, devido a importância dos macrófagos na infecção por *Leishmania*, é importante delinear estudos in

vitro que visam investigar o possível papel dessas células na determinação dos perfis de resistência ou susceptibilidade durante os primeiros momentos após à infecção por *Leishmania*. Talvez diferentes espécies de *Leishmania* induzam distintos padrões de resposta em macrófagos murinos, tais como diferenças na apresentação de antígeno, na expressão de moléculas coestimulatórias, na produção de citocinas ou de outros fatores capazes de modular o sistema imune levando a uma resposta relacionada com proteção ou susceptibilidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar uma possível participação de MΦ de camundongos CBA na determinação dos perfis de resistência ou susceptibilidade na infecção por *L. major* ou *L. amazonensis*, respectivamente.

2.2 Objetivos Específicos

1. Comparar a cinética de infecção in vitro de MΦ de camundongos CBA por *L. major* ou *L. amazonensis*.
2. Averiguar o efeito do IFN- γ na infecção de macrófagos de camundongos CBA por *L. major* ou *L. amazonensis*.
3. Correlacionar a produção de NO com a atividade leishmanicida dos MΦ infectados por *L. major* ou *L. amazonensis* de camundongos CBA.

3. JUSTIFICATIVA

O padrão diverso de manifestações clínicas da leishmaniose pode ser reproduzido na infecção experimental de linhagens de camundongos isogênicos. Essas linhagens de camundongos são amplamente estudadas na leishmaniose por apresentarem distintos padrões de resistência ou susceptibilidade à doença. A resistência ou susceptibilidade à infecção está correlacionada com a indução da resposta Th1 ou Th2, respectivamente (SCOTT et al., 1988; HANDMAN et al., 1979; BOOM et al., 1990).

Camundongos da linhagem CBA apresentam perfil característico de resistência quando infectados por *L. major* e de susceptibilidade quando infectados por *L. amazonensis* (SOUZA, 1998). O estudo desse modelo de infecção experimental pode evidenciar vários fatores que estão associados a proteção ou susceptibilidade de uma mesma linhagem de camundongo infectado por *Leishmania*, permitindo assim a investigação dos mecanismos de resposta do hospedeiro, como também fatores de virulência do parasito.

O sítio natural da entrada de *Leishmania* no hospedeiro mamífero é a pele, e há evidências de que a resposta imune cutânea nos estágios iniciais da infecção é crucial para o curso da doença. Algumas horas após a inoculação do parasito, ocorre um infiltrado celular composto predominantemente de macrófagos que fagocitam a *Leishmania* (ANDRADE et al., 1984). Os macrófagos desempenham papel importante na leishmaniose (SOLBACH et al., 1991) pois são as principais células hospedeiras de *Leishmania* e podem funcionar como células apresentadoras de antígenos, estimulando células T específicas.

A atividade de MΦ constitui um dos mecanismos primários do organismo contra a invasão de parasitos e é capaz de preencher uma variedade de funções microbicidas tais como a produção de ROI, enzimas lisossomais e fatores solúveis de secreção, como também a capacidade de ativar o sistema imune. A interação entre parasito e célula hospedeira é crucial para o estabelecimento da infecção (ALEXANDER & RUSSELL, 1992)

Algumas evidências sugerem que os eventos que participam na determinação da susceptibilidade à infecção por *Leishmania* ocorrem no início da infecção e envolvem elementos da resposta imune inata que precedem o desenvolvimento de células Th1 e Th2 específicas (SYPEK et al., 1993). Além disso, foi observado que a diferenciação das subpopulações de linfócitos T ocorre a partir de um precursor comum e parece que é determinada nos momentos iniciais após a infecção (STREET et al., 1990). Investigar fatores que participam na indução da resposta imune parece importante, pois abre perspectivas para possíveis manipulações com objetivo de modular o padrão da resposta imune, como também para conhecer vários aspectos da interação entre parasito e célula hospedeira.

A hipótese levantada nesse trabalho foi que MΦ de camundongos CBA apresentariam um perfil de resistência quando infectados in vitro por *L. major* e de susceptibilidade quando infectados por *L. amazonensis*. É provável que múltiplos fatores envolvidos nas etapas iniciais da infecção por *Leishmania* participem na geração da resposta imunológica. Os estudos in vivo não permitem observar de modo detalhado os elementos que participam destes eventos. Assim, devido a importância dos macrófagos na infecção por *Leishmania*,

estudamos in vitro uma possível participação dessas células na determinação do curso da doença de camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazonensis*. Talvez estas duas espécies de *Leishmania* estejam induzindo diferentes respostas em macrófagos de CBA, e essas diferenças podem estar relacionadas com proteção ou susceptibilidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas ou machos, isogênicos, das linhagens CBA e C57BL/6 variando entre 6-12 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da FIOCRUZ/RJ. Esses animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), sendo alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

4.2 Parasitos

Os promastigotas em fase estacionária utilizadas nesse trabalho foram de cepas *L. major* MHOMRI-173 e *L. amazonensis* MHOM/Br88/Ba-125 doadas por Dra. Aldina Barral do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES UFBA/SSA). Os parasitos foram mantidos em cultura axênica em meio LIT total suplementado com 10% de soro bovino fetal (Hyclone laboratories), e reisolados de linfonodos de camundongos resistentes (C57Bl/6), para manutenção da infectividade.

4.3 Determinação do percentual de promastigotas metacíclicas

Para avaliar o percentual de promastigotas metacíclicos existentes nas culturas axênicas em fase estacionária de *L. major* ou *L. amazonensis*, utilizou-se soro fresco (ULRICH et al., 1968) de cão, observando a resistência desses parasitos à lise pelo complemento. O soro foi usado nas concentrações de 25, 50 e 100% e incubado com 2×10^6 parasitos a cada 200µl do soro, durante 30 minutos a 37 °C. Através do microscópio de fase, foi contado o número de parasitos vivos. Como controle positivo do experimento, utilizou-se *L. chagasi*

em fase logarítmica. A figura abaixo mostra que o percentual de metacíclicos em relação ao controle, incubado em meio sem soro, variou entre 50-60% em ambas as culturas de *L. major* ou *L. amazonensis*, e os promastigotas de *L. chagasi* foram totalmente lisados. Este resultado é representativo de 3 experimentos.

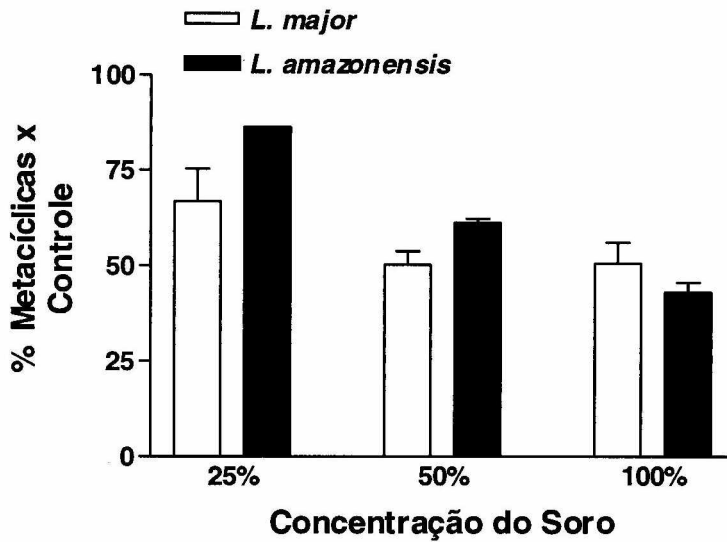


Figura 1 - Percentual de promastigotas metacíclicos de *L. major* ou *L. amazonensis*. Foi determinado o percentual de promastigotas metacíclicos de *L. major* ou de *L. amazonensis*, através do teste de resistência à lise pelo complemento. Os promastigotas foram incubadas com soro fresco de cão em diferentes diluições. O percentual de metacíclicos em relação ao controle, foi determinado através da contagem de parasitos vivos. Promastigotas de *L. chagasi* em fase logarítmica, utilizados como controle positivo, foram lisados em todas as diluições do soro. Esse resultado é representativo de 3 experimentos.

4.4 Cultura de macrófagos

MΦ peritoneais residentes foram obtidos através da lavagem da cavidade peritoneal dos camundongos, utilizando salina gelada com 20 UI/ml de heparina. As células foram recuperadas em tubo o polipropileno e centrifugadas a 1200 rpm a 20° C durante 10 minutos. Foram distribuídos 2×10^5 MΦ /poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro, em triplicata, em meio DMEM suplementado com Hapes pH 7.4 a 25mM, glutamina a 2mM, penicilina 100UI/ml, streptomicina a 100µg/ml, bicarbonato de sódio a 2,0 g/l e 10% de soro bovino fetal (DMEM completo). Após 24 horas de incubação a 37° C e 5% de CO₂, as culturas foram lavadas por meio RPMI para a remoção das células não aderentes e reincubadas nos períodos entre 90 minutos e 72 horas em meio DMEM completo.

4.5 Infecção de macrófagos

Os macrófagos foram infectados por promastigotas de *L. major* ou *L. amazonensis* em fase estacionária, em uma proporção de 10 parasitos/MΦ. Nos estudos de cinética curta, os parasitos foram adicionados, e após 90 min, 3, 6 e 12 horas, grupos de células foram fixadas, com metanol durante 10 minutos. Nesse período de pulso de 12 horas, as culturas foram lavadas por meio RPMI para a remoção de parasitos não internalizados. Nos estudos de cinética longa, grupos de células foram fixadas imediatamente após o período de pulso de 12 horas ou após períodos de caça de 24, 48 e 72 horas. As lamínulas foram retiradas e coradas por hematoxilina-eosina. Utilizando a microscopia optica foi determinado o índice de infecção através da contagem de macrófagos infectados e do número de *Leishmania* por MΦ .

4.6 Ativação de macrófagos por IFN- γ

Macrófagos infectados e não infectados foram tratados por IFN- γ recombinante (19301T Pharmingen#M0207056). Inicialmente, foram testadas diferentes concentrações de IFN- γ (50, 100 e 200 UI/poço) e optou-se por utilizar 100 UI/poço de cultura, pois com a concentração de 50 UI/poço detectou-se baixa produção de nitrito e com 200 UI/ml o nível detectado foi similar ao encontrado utilizando 100 UI/poço. Primeiramente as células foram pré-tratadas por IFN- γ por um período que variou entre 12-18 horas e, em seguida, foram infectadas por *L. major* ou *L. amazonensis*. Após 12 horas de pulso as culturas foram lavadas por RPMI para remoção dos parasitos não internalizados. Um grupo de células foi fixado imediatamente após o pulso e o outro grupo foi tratado por IFN- γ , reincubados por 24 horas adicionais e em seguida, fixado. Os sobrenadantes foram coletados em todos os pontos para a mensuração dos níveis de NO. As lamínulas após fixadas, foram retiradas e coradas para a determinação dos índices de infecção como descrito no item 4.5.

4.7 Determinação da produção de NO

A produção de NO foi determinada através do método de Griess (DING, 1988), a partir da quantificação de nitrito nos sobrenadantes das culturas. A curva padrão de leitura foi constituída por nitrito de sódio em DMEM, em diluições seriadas (1:2) a partir de 200 μ M, distribuídas em triplicatas, em placas de 96 poços. A revelação foi feita com a adição de volume igual do reagente à base de 1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 Naftiletlenodiamina (NEED).

4.8 Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Graph Pad Prima Versão 2.0. O teste Kolmogorov-Smirnov demonstrou que dados da média do % de MΦ infectados de 6 experimentos apresentaram uma distribuição normal. Assim, foi utilizado para a comparação das médias o teste ONE-WAY ANOVA, e caso houvesse diferenças estatisticamente significante foi aplicado o pós teste Newman-Keuls. O teste *t de Student* foi utilizado quando foram comparados apenas 2 grupos entre si.

5. RESULTADOS

5.1 Cinética de infecção de macrófagos de camundongos CBA por *L. major* ou *L. amazonensis*.

5.1.1 Cinética de curta duração

Para avaliar comparativamente o percentual de infecção de MΦ por *L. major* ou *L. amazonensis*, realizou-se uma cinética de infecção. A figura 2A mostra o percentual de MΦ infectados nas primeiras horas (1,5 a 12 horas) após a adição das promastigotas. Os dados mostram que nesse período o percentual de MΦ infectados foi similar em ambos os grupos ($p=0,3113$). Nesse mesmo período de incubação, observou-se que a quantificação do número de parasito por MΦ (Figura 2B) foi também similar em ambos os grupos de infecção. Entretanto, o teste estatístico (ONE-WAY ANOVA) mostrou que existia diferenças entre os grupos ($p=0,0397$), mas o pós-teste (Newman-Keuls) não detectou o sítio da diferença ($p>0,05$). Esses resultados representam a média de 4 experimentos. No ponto de 12 horas foram computados os dados de todos os experimentos de cinética da infecção curta ou longa de MΦ de camundongos CBA ($n=8$).

5.1.2 Cinética de longa duração

Foi realizada a cinética longa da infecção de MΦ infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*, para verificar se o padrão observado nas primeiras horas era mantido em momentos mais tardios após a infecção. A figura 3A mostra que 24 horas após o pulso de 12 horas, o percentual de MΦ infectados por *L. amazonensis* foi aproximadamente duas vezes maior do que aqueles infectados por *L. major* ($p<0,0001$). Estas diferenças foram mantidas 48 e 72 horas após à infecção. Em relação ao número de parasitos por MΦ nesse período, a figura 3B mostra que o número de amastigotas em células infectadas por *L.*

amazonensis foi duas vezes maior do que nas infectadas por *L. major* ($p < 0,0001$). Estes resultados correspondem à média de 6 experimentos. Como mencionado anteriormente, no ponto 0 (ponto de 12 horas após a infecção), foram computados os dados de todos experimentos de cinética da infecção de MΦ de camundongos CBA (n=8).

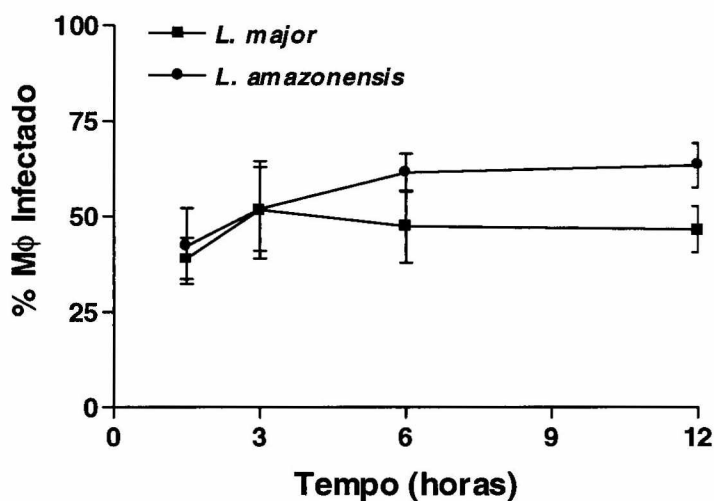


Figura 2A - Cinética curta da infecção de MΦ por *L. major* ou *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais residentes de camundongos CBA, foram infectados por promastigotas em fase estacionária de *L. major* ou *L. amazonensis* na proporção 10 parasitos/MΦ. Após 1,5; 3; 6 e 12 horas de infecção as células foram fixadas e o percentual de MΦ infectados foi determinado. Esses resultados representam a média de 4 experimentos \pm erro padrão (SE). ($p=0,3113$).

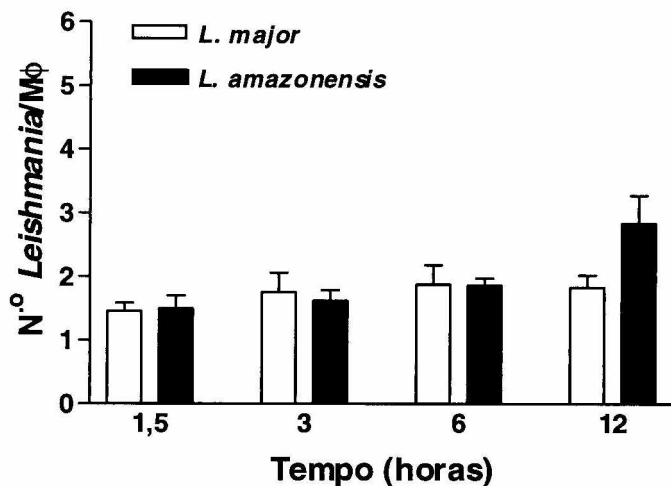


Figura 2B - Carga parasitária de MΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* na cinética de curta duração. MΦ peritoneais residentes de camundongos CBA foram cultivados conforme descrito na figura 1. A carga parasitária foi avaliada através da quantificação do número de parasitos por MΦ. Esses resultados correspondem à média de 4 experimentos \pm SE ($p=0,0397$)

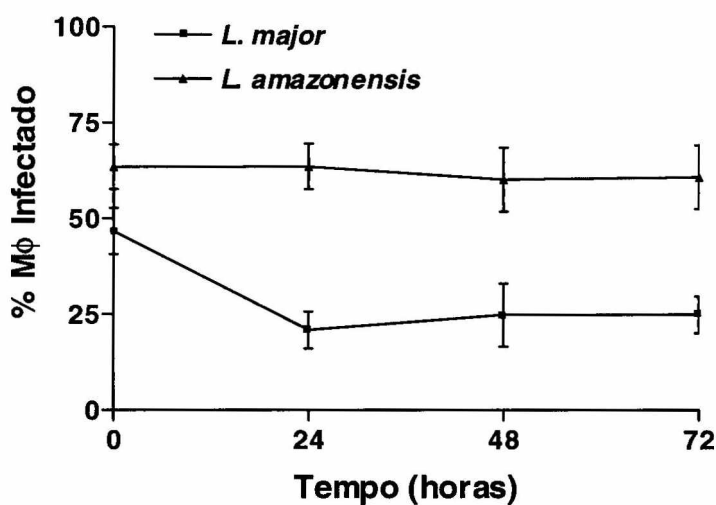


Figura 3A - Cinética longa da infecção de MΦ por *L. major* ou *L. amazonensis*. MΦ peritoneais residentes de camundongos CBA foram infectados por promastigotas em fase estacionária de *L. major* ou *L. amazonensis* na proporção de 10 parasitos/MΦ. Grupos de células foram fixadas após 12 horas de pulso (Tempo 0) ou nos períodos de caça de 24, 48 e 72 horas. Foi determinado o percentual de MΦ infectados. Esses resultados correspondem à média de 6 experimentos \pm SE. ($p < 0.0001$).

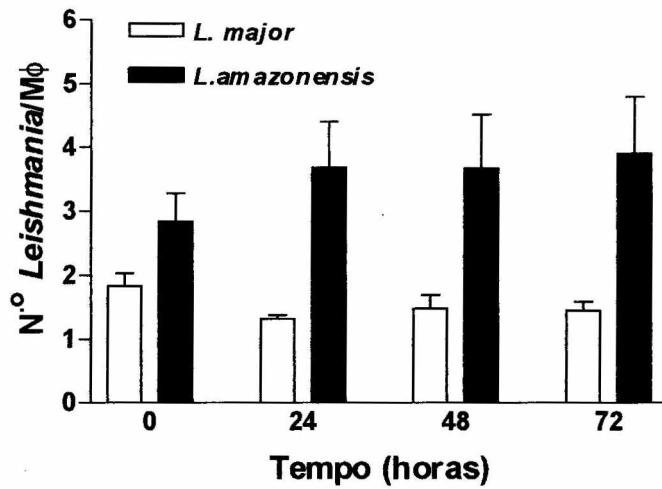


Figura 3B- Carga parasitária de MΦ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* na cinética de longa duração. MΦ peritoneais residentes de camundongos CBA foram cultivados com o descrito na figura 3 A. A carga parasitária foi avaliada através da quantificação do número de parasitos por MΦ. Esses resultados correspondem à média de 6 experimentos \pm SE ($p < 0.0001$).

5.2 Cinética de infecção de macrófagos de camundongos C57Bl/6 por *L. major* ou *L. amazonensis*.

Com o objetivo de determinar se o perfil de resposta à infecção por *L. major* ou *L. amazonensis* seria característico dos MΦ da linhagem de camundongos CBA, avaliou-se a resposta à infecção de células da linhagem de camundongo C57Bl/6. Essa linhagem é resistente a infecção por ambas as espécies de *Leishmania*. Desta forma, foi realizada a cinética de curta e longa duração da infecção de MΦ de camundongo C57Bl/6 por *L. major* ou *L. amazonensis*.

A figura 5A mostra que, desde as primeiras horas, o percentual de MΦ infectados por *L. amazonensis* é aproximadamente duas vezes maior em relação a infecção por *L. major*, e essa diferença é mantida nas fases mais tardias da infecção, (Fig. 6A). Em relação a carga parasitária, os dados mostram que o número de parasitos em células infectadas por *L. amazonensis* foi cerca de duas vezes mais elevado do que em células infectadas por *L. major*, tanto na cinética de curta duração (Fig. 5B), como na cinética de longa duração (Fig. 6B). Esse resultado é representativo de 3 experimentos.

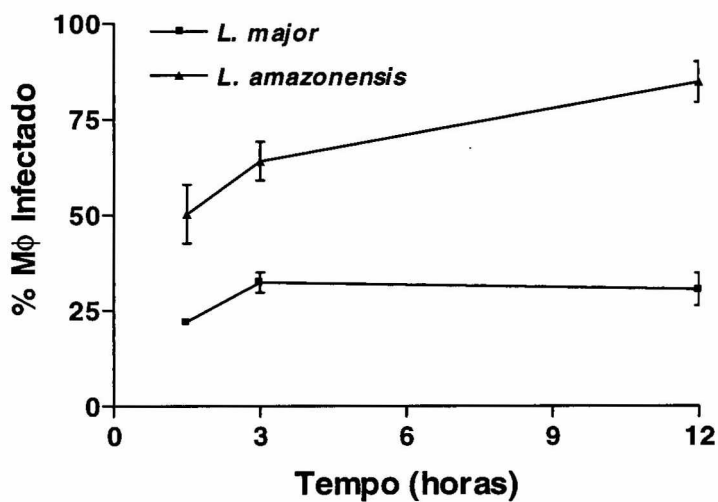


Figura 5 A - Cinética de curta duração da infecção de MΦ de camundongos C57BL/6 por *L. major* ou *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais residentes de camundongos C57BL/6 foram infectados por promastigotas de *L. major* ou *L. amazonensis* em fase estacionária na proporção de 10 parasitos/MΦ. Após 1,5; 3 e 12 horas de infecção as células foram fixadas e o percentual de MΦ infectados foi determinado. Esse resultado é representativo de 3 experimentos.

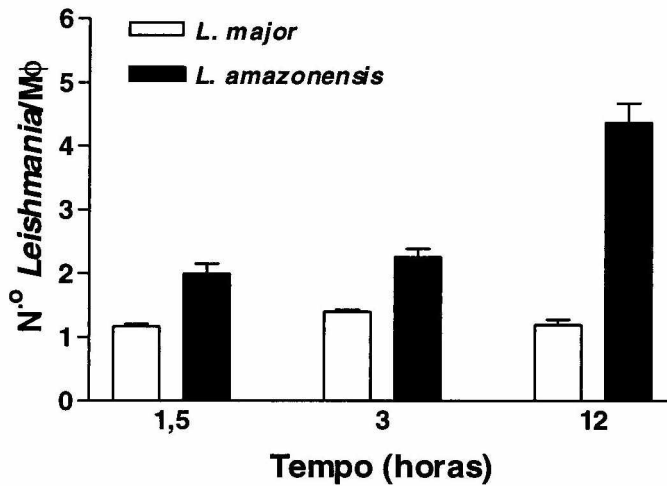


Figura 5B - Carga parasitária de MΦ de camundongos C57BL/6 infectados in vitro por *L. major* ou *L. amazonensis* na cinética curta. MΦ peritoneais residentes de camundongos C57BL/6 foram cultivados como descrito na figura 5A e a carga parasitária foi avaliada através da quantificação do número de parasitos por MΦ. Esse resultado é representativo de 3 experimentos.

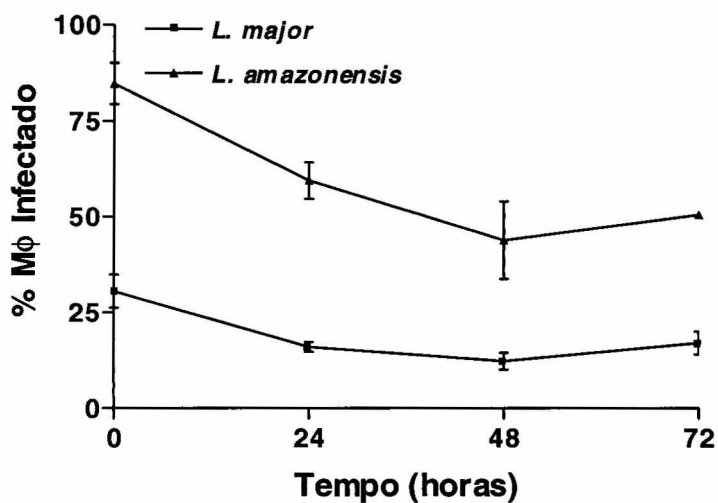


Figura 6A - Cinética de longa duração da infecção de MΦ de camundongos C57BL/6 por *L. major* ou *L. amazonensis* MΦ peritoneais residentes de camundongos C57BL/6 foram infectados por promastigotas de *L. major* ou *L. amazonensis* em fase estacionária na proporção 10 parasitos/MΦ. As células foram fixadas após um período de pulso de 12 horas e após 24, 48 e 72 horas de caça. Foi determinado o percentual de MΦ infectados. Esse resultado é representativo de 3 experimentos.

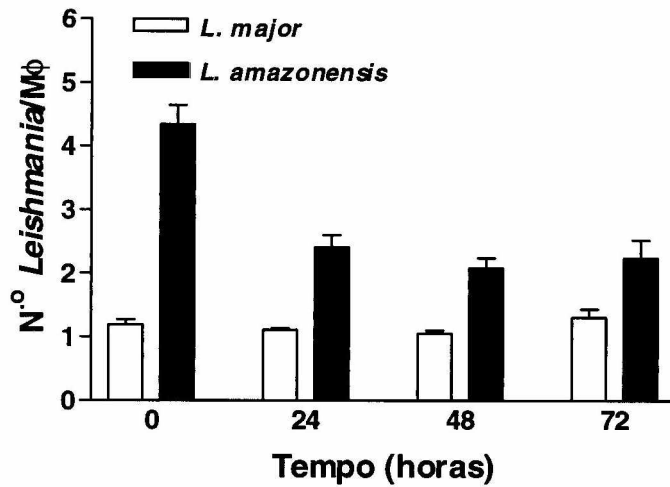


Figura 6B - Carga parasitária de MΦ de camundongos C57BL/6 infectados in vitro por *L. major* ou *L. amazonensis* na cinética longa. Macrófagos peritoneais residentes de camundongos C57BL/6 foram cultivados como descrito na figura 6 A e através da quantificação do número de parasitos por MΦ, a carga parasitária foi determinada nos momentos mais tardios da infecção. Esse resultado é representativo de 3 experimentos.

5.3 Efeito do IFN- γ na infecção de macrófagos por *L. major* ou *L. amazonensis*.

Para avaliar o efeito do IFN- γ na sobrevivência de *L. major* ou *L. amazonensis* no interior de M Φ de camundongos CBA, foi determinado o percentual de M Φ infectados após 24 h de caça na presença ou ausência de INF- γ . A figura 7 corresponde a média de quatro experimentos e mostra que o percentual de células infectadas por *L. amazonensis*, no período de 24 horas de caça, se manteve duas vezes maior que o percentual de células infectadas por *L. major* ($p < 0.0001$) tanto em células tratadas por IFN- γ como em células não tratadas. Esses dados sugerem que o tratamento por IFN- γ não modificou a infecção in vitro dos M Φ por *Leishmania*.

5.4 Produção de NO por macrófagos infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*.

Nesse trabalho foram avaliados os níveis de produção de NO em sobrenadantes de culturas de M Φ de camundongos CBA, tratadas ou não tratadas por IFN- γ , no período de 12h de pulso e 24 horas de caça. Nos grupos não tratados, não foi detectada produção de NO. Doze horas após a infecção, detectou-se baixos níveis de NO nos grupos tratados por IFN- γ , e infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*.

A figura 8 mostra a média de 5 experimentos onde determinou-se produção de NO em células pré-tratadas e tratadas por IFN- γ durante a caça de 24 horas. Os dados evidenciam que em M Φ infectados por *L. major*, houve uma produção de NO um pouco mais elevada em relação aos M Φ infectados por *L. amazonensis*. Vale ressaltar que em 3 de 5

experimentos houve produção de NO entre 1,5-2 vezes mais elevada em células infectadas por *L. major* que por *L. amazonensis*. Esses resultados indicam que, apesar do conjunto de dados não mostrar diferenças estatisticamente significante entre os grupos, existe uma tendência das células infectadas por *L. major* produzirem uma maior quantidade de NO. Entretanto, é necessário que esses dados sejam confirmados realizando-se um número maior de experimentos.

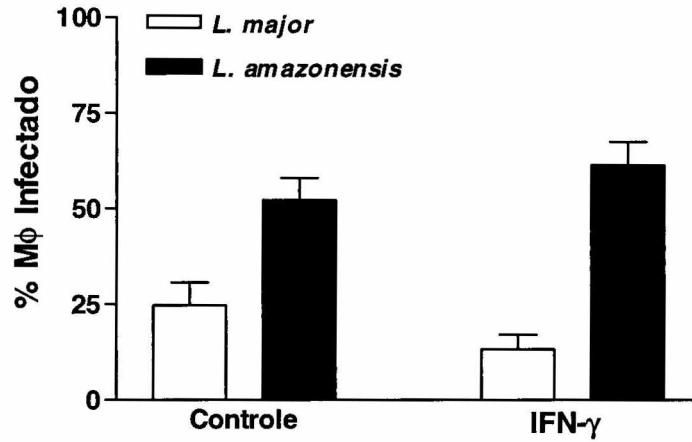


Figura 7 - Efeito do IFN- γ em M Φ infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*. M Φ de camundongos CBA infectados foram tratados por IFN- γ (100 UI/poço). Depois do pré-tratamento de um período que variou entre 12-18 horas, grupos de células foram infectadas e após 12 horas de pulso foram lavadas e fixadas após um período de caça de 24 horas. Foi avaliado o percentual de M Φ infectados. ($p < 0.0001$).

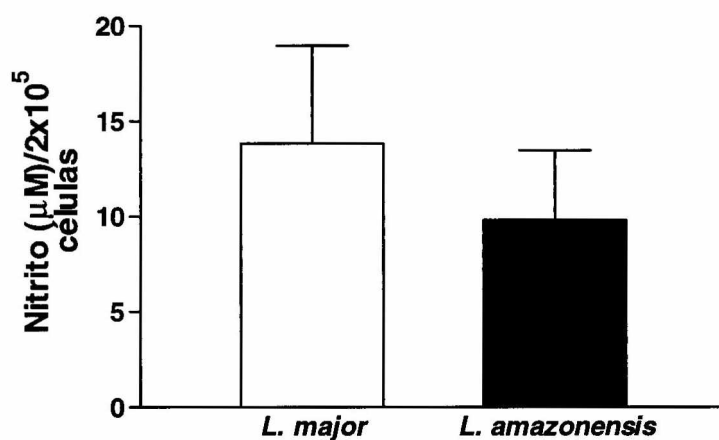


Figura 8 - Produção de óxido nítrico por MΦ infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*. Os MΦ de camundongos CBA foram cultivados como descrito na figura 7 e os sobrenadantes das culturas foram coletados após 24 h de caça. Os níveis de NO foram avaliados através do Método de Griess. Esses dados correspondem à média de 5 experimentos ($p > 0.05$)

6. DISCUSSÃO

6.1 A cinética da infecção de macrófagos por *L. major* ou *L. amazonensis*

Nesse estudo foi caracterizado o perfil de resposta de MΦ de camundongos CBA infectados in vitro por *L. major* ou *L. amazonensis*. O padrão de resposta foi avaliado quanto à cinética e produção de NO. Quanto à cinética, observa-se que nos primeiros momentos após a infecção o percentual de MΦ infectados e a carga parasitária são similares em ambos os grupos (Figuras 2A e 2B). Entretanto, a partir de 24 horas após o pulso, MΦ infectados por *L. major* apresentam maior capacidade leishmanicida do que aqueles infectados por *L. amazonensis*, e essas diferenças são mantidas após 72 horas de caça (Figuras 3A e 3B).

Nesse estudo os resultados indicam que MΦ de uma mesma linhagem de camundongo podem apresentar diferentes perfis de resposta quando infectados por diferentes espécies de *Leishmania*. Os dados aqui apresentados se correlacionam com estudos anteriores mostrando que o início da infecção de MΦ por *L. tropica* (30-40% de células infectadas) não foi influenciado pelo genótipo do camundongo. Entretanto, depois do segundo dia após a infecção o percentual de MΦ infectados variou de acordo com a origem dessas células, pois em linhagens de camundongos resistentes como C57BL/6 e NZB houve um decréscimo no percentual de células infectadas e em MΦ de camundongos susceptíveis como BALB/c houve aumento progressivo (60-70%) (HANDMAN et al., 1979)

MΦ de animais resistentes infectados por *L. major* são mais sensíveis à ativação por citocinas produzidas por células T do que MΦ de animais susceptíveis (NACY et al., 1985). A destruição de parasitos em MΦ, ocorre depois da ativação dessas células por citocinas produzidas por linfócitos T antígeno-específicos (BOGDAN et al, 1991;.NACY, 1983 et al., STENGER et al., 1991) Além disso, a resolução de lesões parece ser dependente da capacidade de MΦ de destruir parasitos intracelulares (HANDMAN et al., 1979; BEHIN et al., 1979; .NACY et al., 1983)

Camundongos da linhagem CBA quando infectados por *L. major* desenvolvem perfil tecidual característico de resistência, com formação de granulomas, necrose fibrinóide e redução do número de parasitos na lesão (SOUZA, 1998). Esses mesmos animais infectados por *L. amazonensis* apresentam perfil de susceptibilidade, com extensas áreas de necrose de coagulação, infiltrado mononuclear macrofágico difuso e grande carga parasitária (SOUZA, 1998). Esse padrão morfológico de resposta tecidual, correlaciona-se com aspectos da reposta imune avaliados. Na infecção por *L. major*, esses camundongos apresentam níveis elevados de IFN- γ , evidenciando uma resposta do tipo Th1 e, quando infectados por *L. amazonensis* produzem níveis elevados de IL-4, caracterizando uma resposta do tipo Th2 (SOUZA, 1998). Os resultados aqui apresentados mostram que há correlação in vitro do padrão de resistência e susceptibilidade com os observados in vivo em camundongos CBA infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*, respectivamente.

Nesse trabalho, a carga parasitária foi avaliada através da contagem do número de parasitos por MΦ. Um questionamento que pode ser feito é a respeito da viabilidade dos parasitos visualizados por microscopia óptica. O ideal seria avaliar a viabilidade utilizando ensaios como por exemplo a diluição limitante. Esse estudo deverá ser realizado em etapas posteriores. Entretanto, os amastigotas de ambos os grupos parecem muito bem preservados e além disso, a diferença encontrada nos períodos de caça a partir de 24 horas é muito evidente quando se compara a grande quantidade de MΦ infectados por *L. amazonensis* com poucos MΦ infectados por amastigotas de *L. major*.

Um aspecto cuidadosamente acompanhado foi a infectividade da *Leishmania* testada através do acompanhamento das lesões de camundongos CBA e BALB/c infectados. E para garantir a mesma quantidade de parasitos infectantes nos dois grupos, foi avaliado o percentual de promastigotas metacíclicos em fase estacionária adicionados às culturas, e os resultados mostraram que as culturas de *L. major* e *L. amazonensis* apresentava percentuais similares de promastigotas metacíclicos (Fig. 1).

Com o objetivo de determinar se o perfil de resposta à infecção por *L. major* ou *L. amazonensis* seria característico dos MΦ da linhagem de camundongos CBA, avaliou-se a resposta à infecção de células da linhagem de camundongo C57BL/6. Essa linhagem é resistente a infecção por ambas as espécies de *Leishmania*. Foi realizada a cinética de infecção de MΦ peritoneais residentes de camundongos C57BL/6. Observou-se que,

diferentemente de MΦ de camundongos CBA, os MΦ de C57BL/6 apresentam um maior percentual de infecção por *L. amazonensis* do que por *L. major*, desde os primeiros momentos após a infecção, e essas diferenças são mantidas nos períodos mais tardios. As diferenças observadas podem estar relacionadas ao reconhecimento e à fagocitose das espécies de *Leishmania* por essas duas linhagens de camundongos e não à capacidade dos MΦ de destruir *Leishmania*. Esses resultados relativamente inesperados podem ser atribuídos ao fato de que camundongos C57BL/6 apresentarem uma resistência parcial quando infectados por *Leishmania*.

A linhagem C57BL/6 tem sido utilizada como linhagem resistente à infecção por *L. major* ou *L. amazonensis*. Entretanto, várias evidências sugerem que esta linhagem pode ter uma resistência intermediária quando comparado às linhagens altamente resistentes como CBA e C3H. As lesões em C57BL/6 infectados por *L. major* apresentam alta carga parasitária próxima das lesões de BALB/c, enquanto que as observadas em CBA e C3H apresentam baixa carga parasitária (SCHARTON & SCOOT, 1993). Além disso, camundongos C57BL/6 desafiados com altas doses de *L. tropica* apresentam lesões crônicas e ulcerativas (BEHIN et al, 1979) A linhagem C57BL/6 pode apresentar padrão variado de lesões primárias que cicatrizam espontaneamente (CHILDS et al., 1984, ou lesões progressivas, ulceradas e/ou disseminadas (BARRAL et al., 1983).

Estudos recentes mostraram que camundongos C57BL/6 quando infectados por *L. amazonensis* desenvolvem lesões persistentes sem sinais de cura e em sobrenadantes de

culturas de esplenócitos desses animais, com oito semanas de infecção, não detectou-se IL-4, evidenciando que nem sempre o perfil de susceptibilidade está associado à resposta Th2 (SOONG et al., 1997). No sistema de estimulação primária in vitro (PIV) observou-se que, células de camundongos C57BL/6 infectadas por *L. major* produzem grandes quantidades de IL-4 e IL-5 e baixos níveis de IFN- γ quando comparadas às células de camundongos CBA (SOARES et al., 1997). Esses dados indicam que o comprometimento com o fenótipo Th1 é mais tardio em camundongos C57BL/6 do que em camundongos CBA.

6.2. Possíveis mecanismos responsáveis pelas diferenças entre a infecção por *L. major* e *L. amazonensis*

Já é bem evidenciado que as subpopulações de linfócitos Th1 ou Th2 são originados de um precursor comum que se diferencia nos momentos iniciais após a infecção (STREET et al., 1990). As manipulações feitas com o objetivo de reverter o tipo de resposta só são efetivas quando realizadas na primeira semana de infecção, sugerindo que os eventos iniciais são cruciais na definição do tipo de resposta imunológica.

Na leishmaniose cutânea murina experimental é bem evidente ocorrer ativação seletiva de células Th1 e Th2 (BOOM et al., 1990; HEINZEL et al., 1989; 1991; SCOTT et al., 1988). Entretanto, os mecanismos que participam dessa ativação seletiva são pouco conhecidos, especialmente o papel de APC no processo. No modelo aqui estudado, é possível que as diferenças encontradas no percentual da infecção de M Φ por diferentes espécies de

Leishmania e na carga parasitária, induziram diferentes mecanismos de ativação dos MΦ em resposta à infecção.

O presente estudo parece evidenciar que MΦ podem ter importante papel na indução da resposta imune em camundongos CBA, pois demonstramos que essas células sem nenhuma estimulação prévia apresentaram significativa diferença na capacidade de destruição de *Leishmania*. Esse distinto padrão de resposta observado pode estar induzindo diferenças na produção diferenciada de ROI, tipo de antígenos apresentado, indução da expressão de moléculas de MHC classe II, de moléculas coestimulatórias, liberação de citocinas e produção de NO.

Parece que existem múltiplos fatores envolvidos na ligação de promastigotas a MΦ que podem influenciar no destino intracelular do parasito por causa das diferenças na composição de membrana entre as espécies de *Leishmania* e consequente ligação a diferentes receptores dos MΦ. Uma vez no interior de MΦ, *Leishmania* pode regular mecanismos de destruição associados aos ROI, dependendo do receptor utilizado para entrada (BUCHMÜLLER-ROUILLER et al., 1992; WRIGHT & SILVERSTEIN, 1983)

Os eventos iniciais na formação do vacúolo parasitóforo parecem regulados pelo parasito. Por exemplo, LPG parece desempenhar papel importante na biogênese do vacúolo parasitóforo através da restrição da fusão de fagossomas contendo *Leishmania* com compartimentos endocíticos tardios. Esse bloqueio temporário da fusão permite que

promastigotas se transformem em amastigotas, os qual são melhores adaptados a vida intracelular (DESJARDINS & DESCOTEUAX, 1997). Além disso, foi mostrado que LPG pode atuar inibindo PKC que é uma importante enzima na geração de ROI (McNEELY, 1989). A inibição da PKC pode ser um fator crítico no estabelecimento e manutenção da infecção ao proporcionar condições adequadas para o crescimento intracelular de *Leishmania*. É razoável propor que a efetiva inibição da atividade de PKC através da LPG pode ser importante para o estabelecimento da infecção de promastigotas de *Leishmania* em fagócitos mononucleares (DESCOTEAUX et al., 1992). Em nosso modelo, promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major* podem estar sendo reconhecidos por diferentes receptores de MΦ de camundongos CBA. O reconhecimento diferenciado pode resultar na indução ou inibição de mecanismos de destruição por MΦ, através da ativação de diferentes vias de sinalização.

Embora os vacúolos de *Leishmania* estudados possuam muitas características comuns, eles não são idênticos morfológicamente ou funcionalmente. Por exemplo, em relação ao tamanho, os vacúolos de *L. amazonensis* e *L. mexicana* são grandes, enquanto que vacúolos de *L. major* ou *L. donovani* são bem menores. Isso sugere que o processo de fusão/fissão é diferente em MΦ infectados por diferentes espécies de *Leishmania*. Assim, diferentemente de vacúolos de *L. amazonensis* (VERAS et al., 1992), vacúolos de *L. donovani* não fusionam com pequenos fagossomas contendo partículas de zimosan (revisto POR ANTOINE et al., 1998).

Em trabalhos anteriores, foi isolado um gene de resistência a patógenos intracelulares chamado Nramp 1 (natural resistance-associated macrophage protein 1) (VIDAL et al., 1993) que codifica uma proteína integral de membrana com estrutura homóloga à uma proteína transportadora. Uma simples mudança em um aminoácido foi encontrada em linhagens de camundongos Bcg susceptíveis (Bcg^s) e não em linhagens Bcg resistentes (Bcg^r) (VIDAL et al., 1993). Alguns estudos têm demonstrado um efeito pleiotrópico do gene, pois está relacionado com maior produção de NO em Bcg^r do que em Bcg^s, depois da estimulação por IFN- γ (BARTON et al., 1995), como também maior produção de ROI (DENIS et al., 1988). Além disso, Nramp induz uma maior produção de IL-1 β , TNF- α (ROACH et al, 1994) e maior expressão de moléculas de MHC classe II (DENIS et al, 1988; BARRERA et al, 1997). A maioria dos estudos relacionados ao papel de Nramp são realizados com *Mycobacterium*, entretanto é possível que as diferenças na destruição de *L. major* e não de *L. amazonensis* estejam relacionadas com indução da expressão de Nramp.

Uma função primária de M Φ é processar e apresentar antígeno no contexto de moléculas de MHC classe II para células T, junto com moléculas coestimulatórias, levando a ativação dessas células. A capacidade de M Φ de processar e apresentar antígenos é um fator crítico na indução da resposta efetora. Tem sido postulado que dependendo da natureza das moléculas ou fragmentos que são apresentados por M Φ ocorre estimulação de diferentes subpopulações de células T (BARRAL et al, 1991). Algumas evidências sugerem que no contexto da apresentação de antígenos o vacúolo parasitóforo pode ser importante compartimento no processamento de antígenos.

A indução da redução do número de complexos moléculas de MHC-antígeno na superfície de MΦ infectados, parece uma boa estratégia de sobrevivência para patógenos intracelulares. Certas espécies de *Leishmania*, tais como *L. amazonensis* e *L. mexicana*, são capazes de sequestrar complexos antigênicos dentro de vacúolo parasitóforo (ANTOINE et al, 1998). Outra estratégia é a habilidade de amastigotas de *L. amazonensis* e *L. mexicana* em degradar moléculas de MHC classe II que chegam ao vacúolo parasitóforo (DE SOUZA LEAO et al., 1995). Pode ser que em MΦ de camundongos CBA infectados in vitro por *L. major* ou *L. amazonensis* existam diferenças cruciais no processamento de antígenos e associação desses com moléculas de MHC classe II.

Outro aspecto importante na infecção por *Leishmania* é a indução diferencial de moléculas coestimulatórias. Alguns estudos mostram que a interação das moléculas B7-1 ou B7-2 de APC e moléculas de superfície de células T durante a apresentação de antígeno pode selecionar a resposta para Th1 ou Th2, respectivamente (KUCHROO et al, 1995). É possível que as diferenças na infecção de MΦ de camundongos CBA por *L. amazonensis* ou *L. major* possam repercutir na expressão diferenciada de moléculas coestimulatórias.

A natureza do tipo de APC envolvida na resposta à infecção por *Leishmania* não é bem clara. Foi demonstrado que apesar de células dendríticas e células B serem as principais células na indução da proliferação de linfócitos T, os MΦ são as células efetivas na

indução da resposta por células T específicas para *L. major*, estimulando a maior produção de citocinas. Dado ao fato de MΦ serem as principais células hospedeiras na infecção por *Leishmania*, é possível que antígenos do parasito sejam processados e liberados por MΦ infectados e que esses antígenos sejam apresentados por células dendríticas e células B (SHANKAR & TITUS, 1997).

A fagocitose de organismos patogênicos induz MΦ a produzirem citocinas que coordenam vários aspectos da defesa do hospedeiro. Um importante fator no desenvolvimento do tipo de resposta desenvolvida por células T são as citocinas que podem estar presentes quando essas células são ativadas, principalmente aquelas produzidas no início da infecção. Sabe-se que na resposta imune associada à infecção por *L. major*, a produção inicial de IL-12 e IFN- γ é responsável pelo desenvolvimento de células Th1, enquanto que a produção inicial de IL-4 induz o desenvolvimento da resposta Th2 (CHATELAIN et al, 1992; HEINZEL et al, 1991)

Parece que a resposta inicial é crucial na determinação da natureza da resposta adaptativa. A resposta inicial pode ser influenciada pela produção de citocinas inibidoras da resposta Th1, tais como TGF- β e IL-10, visto em camundongos BALB/c (SCHARTON & SCOOT, 1993). Em camundongos C3H, IL-12 é produzida no início da infecção e sua neutralização bloqueia a produção de IFN- γ e a resposta de células NK. (SCHARTON & SCOOT, 1993)

Linfócitos são ativados por células acessórias que apresentam antígeno e fornecem múltiplos sinais que podem influenciar na ativação dessas células. Estudos realizados utilizando o sistema PIV, mostram que células de camundongos BALB/c susceptíveis produzem mais IL-1, PGE₂, IL-6 e TGF- β do que células da linhagem C57BL/6 resistente. Assim é possível que fatores sejam produzidos por APC e influenciem o comprometimento para o fenótipo Th2. Na ausência desses fatores, como ocorre na estimulação primária in vitro de células de CBA infectadas por *L. major*, a resposta é naturalmente direcionada para o fenótipo Th1 (SOARES et al., 1997). Esta hipótese é apoiada por experimentos que mostram que o ambiente no qual a resposta primária ocorre pode definir o tipo de resposta (SHANKAR et al., 1996). No nosso sistema, pretendemos avaliar, posteriormente, o perfil de citocinas produzidas. É possível que as diferenças encontradas entre a infecção por *L. major* e *L. amazonensis* leve a produção distinta de várias citocinas importantes na ativação de células T.

6.3 A ativação de macrófagos por IFN- γ

O principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra a leishmaniose é a imunidade mediada por células T, a qual é subsequente ao papel primário desempenhado por M Φ . Existe evidência de que M Φ são responsáveis pela resistência geneticamente determinada à infecção por *L. major* (NACY et al., 1983). Alguns estudos mostram que a atividade efetora de M Φ contra amastigota (GREEN et al, 1990) e promastigotas (LIEW et al., 1990b) é mediada por NO e o papel de NO tem sido demonstrado in vivo (LIEW et al., 1990a e in vitro (LIEW et al., 1991).

Foi avaliado nesse estudo se diferenças encontradas entre as duas espécies de *Leishmania* correspondiam a distinta produção de NO. Inicialmente não foi detectado a produção de NO em MΦ sem estimulação prévia por IFN- γ . Entretanto, quando estimulados por IFN- γ , MΦ residentes de CBA produzem NO e quando foram tratados por IFN- γ e infectados, essa produção aumenta cerca de três vezes. Na infecção por *L. major* os MΦ apresentaram uma discreta elevação na produção de NO quando comparado à infecção por *L. amazonensis*, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa.

A infecção de MΦ tratados por IFN- γ e infectados por *L. major* ou *L. amazonensis* foi também avaliada no período de 24 horas de caça. Surpreendentemente, não houve diferenças significativas no padrão de resposta de células tratadas ou não tratadas por IFN- γ . Ou seja, nesse estudo o tratamento por IFN- γ e consequente produção de NO não induziram maior destruição dos parasitos. Esses dados são contrários aos encontrados na literatura que mostram a capacidade de MΦ ativados em destruir amastigotas em *L. major* in vitro por mecanismos dependentes de L-arginina (GREEN et al., 1990). Além disso, estudos anteriores mostraram que, em camundongos CBA, depois da administração de L-NMMA, a infecção por *L. major* progride, mostrando in vivo o papel de NO na resistência à infecção (LIEW et al., 1990a). Outro estudo utilizando MΦ de camundongos CBA infectados in vitro por *L. major* mostra que a resistência desse camundongo correlaciona-se com a capacidade de MΦ de sintetizar NO e iNOS depois da ativação de IFN- γ e TNF- α (LIEW et al., 1991; GREEN et al., 1990). Em MΦ ativados por IFN- γ e incubados com

anticorpo anti-TNF, observa-se diminuição na destruição do parasito e na produção de NO (GREEN et al., 1990).

Uma possível explicação para essa aparente discrepância é que outros fatores importantes na ativação de $M\Phi$ estejam ausentes no nosso sistema. Um exemplo disso é que nos sobrenadantes das culturas das células infectadas por *L. major* ou *L. amazonensis* não detectou-se a produção de TNF- α (dado não mostrado). A produção de NO no nosso sistema parece não ter efeito adicional na destruição nem de *L. major* nem de *L. amazonensis* com 24 após o período de pulso. Entretanto, a tendência ao decréscimo da infecção e ao aumento da produção de NO em células infectadas por *L. major* em relação à infecção por *L. amazonensis*, podem não mostrar significância estatística, mas pode ser biologicamente importante. Pode ser que nos momentos mais tardios após a infecção, ocorra maior destruição dos parasitos, de modo que é necessário a realização de estudos de cinética nos períodos mais tardios de incubação.

A infecção experimental de camundongos por *L. major* tem sido usada para investigar fatores envolvidos na geração da imunidade protetora contra patógenos intracelulares. A clara dicotomia entre o desenvolvimento de células Th1 e a cura da infecção de algumas linhagens tais como C3H e C57BL/6 e a dominância de Th2 em outras linhagens como BALB/c permite a comparação in vivo de mecanismos envolvidos no desenvolvimento diferencial de subpopulações de células Th entre diferentes linhagens de camundongos. O estudo comparativo da infecção por *Leishmania* em uma mesma linhagem de camundongo,

que apresenta diferentes perfis de resposta à infecção, é relevante pois, elimina as possíveis diferenças no padrão de doença que um mesmo parasito pode causar em diferentes linhagens de camundongo, devido a diferenças do "background" genético do hospedeiro.

Este estudo mostra que MΦ não ativados são capazes de destruir in vitro *L. major* e não destroem *L. amazonensis* a partir de 1,5 horas após a infecção. Esses diferentes perfis de resposta podem refletir-se em vários aspectos relacionados à ativação de MΦ e consequente indução da resposta imune adquirida in vivo. O modelo de infecção de uma mesma linhagem de camundongo que apresenta perfis diferentes de resposta imunológica abre perspectivas para importantes estudos sobre a interação parasito-célula hospedeira, como também de eventos que ocorrem nas fases iniciais que possam estar correlacionados com a indução seletiva de subpopulações de linfócitos T. Além disso, possibilita investigar aspectos relacionados ao hospedeiro como também fatores de virulência do parasito que determinam resistência ou susceptibilidade.

7. CONCLUSÕES

1. A observação de que MΦ peritoneais residentes não ativados de camundongos CBA apresentam maior capacidade de destruição contra parasitos de *L. major* do que *L. amazonensis*, sugere que os eventos que ocorrem logo após a infecção por *Leishmania* podem ser importantes na determinação dos perfis de resistência ou susceptibilidade.
2. A adição de IFN- γ não aumenta a capacidade leishmanicida dos MΦ peritoneais residentes de camundongos CBA, apesar de induzir a produção de NO, o que sugere que outros fatores além do IFN- γ , ausentes em nosso sistema, são necessários para que o IFN- γ exerça seu efeito.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, J., & RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Advances in Parasitology**, **31**, 175-254, 1992.
2. ALEXANDER, J., & VICKERMAN, K. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. **Journal of Protozoology**, **22**(4), 502-8, 1975.
3. ANDRADE, Z. A., REED, S. G., ROTERS, S. B., & SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous *Leishmaniasis*. **American Journal of Pathology**, **114**(1), 137-48, 1984.
4. ANTOINE, J. C., JOUANNE, C., LANG, T., PRINA, E., DE CHASTELLIER, C., & FREHEL, C. Localization of *major* histocompatibility complex class II molecules in phagolysosomes of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, **59**(3), 764-75, 1991.
5. ANTOINE, J. C., JOUANNE, C., RYTER, A., & ZILBERFARB, V. *Leishmania mexicana*: a cytochemical and quantitative study of lysosomal enzymes in infected rat bone marrow-derived macrophages. **Experimental Parasitology**, **64**(3), 485-98, 1987.
6. ANTOINE, J. C., PRINA, E., JOUANNE, C., & BONGRAND, P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infection and Immunity**, **58**(3), 779-87, 1990.
7. ANTOINE, J. C., PRINA, E., LANG, T., & COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, **6**(10), 392-401, 1998.
8. BARRAL, A., PEDRAL-SAMPAIO, D., GRIMALDI JÚNIOR, G., MOMEN, H., MCMAHON-PRATT, D., RIBEIRO DE JESUS, A., ALMEIDA, R., BADARO, R., BARRAL-NETTO, M., CARVALHO, E. M., & ET, A. (1991). *Leishmaniasis* in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease, **Journal** (Vol. 44, pp. 536-46). UNITED STATES.
9. BARRAL, A., PETERSEN, E. A., SACKS, D. L., & NEVA, F. A. Late metastatic *Leishmaniasis* in the mouse. A model for mucocutaneous disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **32**(2), 277-85, 1983.
10. BARRAL, A., BARRAL-NETTO, M.; YONG, E. C.; BROWNELL, C. E.; TWARDZIK, D. R. & REED, S. G. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **90**: 3442-46, 1993.

11. BARRAL-NETTO, M., CARDOSO, S. A., & BARRAL, A. Different patterns of disease in two inbred mouse strains infected with a clone of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Acta Tropica**, **44**(1), 5-11, 1987.
12. BARRERA, L. F., KRAMNIK, I., SKAMENE, E., & RADZIOCH, D. I-A beta gene expression regulation in macrophages derived from mice susceptible or resistant to infection with *M. bovis* BCG. **Molecular Immunology**, **34**(4), 343-55, 1997.
13. BARTON, C. H., WHITEHEAD, S. H., & BLACKWELL, J. M. Nrapm transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. **Molecular Medicine**, **1**(3), 267-79, 1995.
14. BEHIN, R., MAUEL, J., & SORDAT, B. *Leishmania tropica*: pathogenicity and in vitro macrophage function in strains of inbred mice. **Experimental Parasitology**, **48**(1), 81-91, 1979.
15. BELOSEVIC, M., FINBLOOM, D. S., VAN DER MEIDE, P. H., SLAYTER, M. V., & NACY, C. A. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. **Journal of Immunology**, **143**(1), 266-74, 1989.
16. BLACKWELL, J. M. Role of macrophage complement and lectin-like receptors in binding *Leishmania* parasites to host macrophages. **Immunology Letters**, **11**(3-4), 227-32, 1985.
17. BLACKWELL, J. M., ROACH, T. I., KIDERLEN, A., & KAYE, P. M. Role of Lsh in regulating macrophage priming/activation. **Research in Immunology**, **140**(8), 798-805, 1989.
18. BOGDAN, C., STENGER, S., RÖLLINGHOFF, M., & SOLBACH, W. Cytokine interactions in experimental cutaneous *Leishmaniasis*. Interleukin 4 synergizes with interferon-gamma to activate murine macrophages for killing of *Leishmania major* amastigotes. **European Journal of Immunology**, **21**(2), 327-33, 1991.
19. BOOM, W. H., LIEBSTER, L., ABBAS, A. K., & TITUS, R. G. Patterns of cytokine secretion in murine *Leishmaniasis*: correlation with disease progression or resolution. **Infection and Immunity**, **58**(12), 3863-70, 1990.
20. BRITTINGHAM, A., MORRISON, C. J., MCMASTER, W. R., MCGWIRE, B. S., CHANG, K. P., & MOSSER, D. M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Journal of Immunology**, **155**(6), 3102-11, 1995.

21. BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y., CORRADIN, S. B., & MAUËL, J. Macrophage activation for intracellular killing as induced by a Ca²⁺ ionophore. Dependence on L-arginine-derived nitrogen oxidation products. **Biochemical Journal**, **284** (Pt 2), 387-92, 1992.
22. CALABRESE K DA, S., & DA COSTA, S. C. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, **87 Suppl 1**, 49-56, 1992.
23. CHAN, J., FUJIWARA, T., BRENNAN, P., MCNEIL, M., TURCO, S. J., SIBILLE, J. C., SNAPPER, M., AISEN, P., & BLOOM, B. R. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, **86**(7), 2453-7, 1989.
24. CHANG, C. S., & CHANG, K. P. Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of *Leishmania*-macrophage binding. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, **83**(1), 100-4, 1986.
25. CHANG, K. P. *Leishmania donovani*: promastigote--macrophage surface interactions in vitro. **Experimental Parasitology**, **48**(2), 175-89, 1979.
26. CHANG, K. P., & DWYER, D. M. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. **Science**, **193**(4254), 678-80, 1976.
27. CHANNON, J. Y., & BLACKWELL, J. M. A study of the sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes to hydrogen peroxide. II. Possible mechanisms involved in protective H₂O₂ scavenging. **Parasitology**, **91** (Pt 2), 207-17, 1985.
28. CHANNON, J. Y., ROBERTS, M. B., & BLACKWELL, J. M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**, **53**(2), 345-55, 1984.
29. CHATELAIN, R., VARKILA, K., & COFFMAN, R. L. IL-4 induces a Th₂ response in *Leishmania major*-infected mice. **Journal Of Immunology**, **148**(4), 1182-7, 1992.
30. CHAUDHURI, G., CHAUDHURI, M., PAN, A., & CHANG, K. P. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. **Journal Of Biological Chemistry**, **264**(13), 7483-9, 1989.

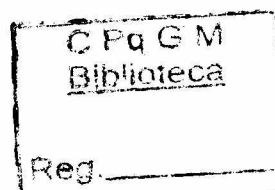
31. CHILDS, G. E., LIGHTNER, L. K., MCKINNEY, L., GROVES, M. G., PRICE, E. E., & HENDRICKS, L. D. Inbred mice as model hosts for cutaneous *Leishmaniasis*. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Annals Of Tropical Medicine And Parasitology**, **78**(1), 25-34, 1984.
32. CILLARI, E., DIELI, M., MALTESE, E., MILANO, S., SALERNO, A., & LIEW, F. Y. Enhancement of macrophage IL-1 production by *Leishmania major* infection in vitro and its inhibition by IFN-gamma. **Journal Of Immunology**, **143**(6), 2001-5, 1989.
33. CONVIT, J., CASTELLANOS, P. L., ULRICH, M., CASTÉS, M., RONDÓN, A., PINARDI, M. E., RODRÍQUEZ, N., BLOOM, B. R., FORMICA, S., VALECILLOS, L., & ET, A. Immunotherapy of localized, intermediate, and diffuse forms of American cutaneous *Leishmaniasis*. **Journal Of Infectious Diseases**, **160**(1), 104-15, 1989.
34. CORRADIN, S. B., BUCHMULLER-ROUILLER, Y., SMITH, J., SUARDET, L., & MAUËL, J. Transforming growth factor beta 1 regulation of macrophage activation depends on the triggering stimulus. **Journal Of Leukocyte Biology**, **54**(5), 423-9, 1993.
35. DA SILVA, R. P., HALL, B. F., JOINER, K. A., & SACKS, D. L. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. **Journal Of Immunology**, **143**(2), 617-22, 1989.
36. DE SOUZA LEAO, S., LANG, T., PRINA, E., HELLIO, R., & ANTOINE, J. C. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal Of Cell Science**, **108** (Pt 10), 3219-31, 1995.
37. DENIS, M., BUSCHMAN, E., FORGET, A., PELLETIER, M., & SKAMENE, E. Pleiotropic effects of the Bcg gene. II. Genetic restriction of responses to mitogens and allogeneic targets. **Journal Of Immunology**, **141**(11), 3988-93, 1988.
38. DESCOTEAUX, A., MATLASHEWSKI, G., & TURCO, S. J. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **Journal Of Immunology**, **149**(9), 3008-15, 1992.
39. DESJARDINS, M., & DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **Journal Of Experimental Medicine**, **185**(12):2061-8, 1997.
40. DING, A. H., NATHAN, C. F., & STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal Of Immunology**, **141**(7), 2407-12, 1988.

41. DING, L., LINSLEY, P. S., HUANG, L. Y., GERMAIN, R. N., & SHEVACH, E. M. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **Journal Of Immunology**, **151**(3), 1224-34, 1993.
42. FIORENTINO, D. F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T. R., HOWARD, M., & O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal Of Immunology**, **147**(11), 3815-22, 1991.
43. FIORENTINO, D. F., ZLOTNIK, A., VIEIRA, P., MOSMANN, T. R., HOWARD, M., MOORE, K. W., & O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **Journal Of Immunology**, **146**(10), 3444-51, 1991.
44. GERMANN, T., GATELY, M. K., SCHOENHAUT, D. S., LOHOFF, M., MATTNER, F., FISCHER, S., JIN, S. C., SCHMITT, E., & RÜDE, E. Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. **European Journal Of Immunology**, **23**(8), 1762-70, 1993.
45. GOVONI, G., VIDAL, S., GAUTHIER, S., SKAMENE, E., MALO, D., & GROS, P. The Bcg/Ity/Lsh locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the Nramp1 Gly169 allele. **Infection And Immunity**, **64**(8), 2923-9, 1996.
46. GREEN, S. J., CRAWFORD, R. M., HOCKMEYER, J. T., MELTZER, M. S., & NACY, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **Journal Of Immunology**, **145**(12), 4290-7, 1990.
47. GRIMALDI G, J. R., & TESH, R. B. *Leishmaniases* of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, **6**(3), 230-50, 1993.
48. GRIMALDI G, J. R., TESH, R. B., & MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of *Leishmaniasis* in the New World. **American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, **41**(6), 687-725, 1989.
49. GRUENHEID, S., PINNER, E., DESJARDINS, M., & GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. **Journal Of Experimental Medicine**, **185**(4), 717-30, 1997.
50. HANDMAN, E., CEREDIG, R., & MITCHELL, G. F. Murine cutaneous *Leishmaniasis*: disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. **Australian Journal Of Experimental Biology And Medical Science**, **57**(1), 9-29, 1979.

51. HANDMAN, E., & GODING, J. W. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. **Embo Journal**, **4**(2), 329-36, 1985.
52. HEINZEL, F. P., SADICK, M. D., HOLADAY, B. J., COFFMAN, R. L., & LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine *Leishmaniasis*. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **Journal Of Experimental Medicine**, **169**(1), 59-72, 1989.
53. HEINZEL, F. P., SADICK, M. D., MUTHA, S. S., & LOCKSLEY, R. M. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine *Leishmaniasis*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, **88**(16), 7011-5, 1991.
54. HOWARD, J. G., HALE, C., & CHAN-LIEW, W. L. Immunological regulation of experimental cutaneous *Leishmaniasis*. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunology**, **2**(4), 303-14, 1980.
55. HOWARD, J. G., NICKLIN, S., HALE, C., & LIEW, F. Y. Prophylactic immunization against experimental *Leishmaniasis*: I. Protection induced in mice genetically vulnerable to fatal *Leishmania tropica* infection. **Journal Of Immunology**, **129**(5), 2206-12, 1982.
56. HSIEH, C. S., MACATONIA, S. E., O'GARRA, A., & MURPHY, K. M. Pathogen-induced Th1 phenotype development in CD4+ alpha beta-TCR transgenic T cells is macrophage dependent. **International Immunology**, **5**(4), 371-82, 1993.
57. KUCHROO, V. K., DAS, M. P., BROWN, J. A., RANGER, A. M., ZAMVIL, S. S., SOBEL, R. A., WEINER, H. L., NABAVI, N., & GLIMCHER, L. H. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. **Cell**, **80**(5), 707-18, 1995.
58. KWEIDER, M., LEMESRE, J. L., DARCY, F., KUSNIERZ, J. P., CAPRON, A., & SANTORO, F. Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000-dalton surface antigen. **Journal Of Immunology**, **138**(1), 299-305, 1987.
59. LAINSON, R. & SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. *The Leishmaniasis*. London: Academic Press Inc., 1987. v. 1 119p
60. LANG, T., DE CHASTELLIER, C., FREHEL, C., HELLIO, R., METEZEAU, P., LEAO S DE, S., & ANTOINE, J. C. Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal Of Cell Science**, **107** (Pt 1), 69-82, 1994.

61. LAWYER, P. G., NGUMBI, P. M., ANJILI, C. O., ODONGO, S. O., MEBRAHTU, Y. B., GITHURE, J. I., KOECH, D. K., & ROBERTS, C. R. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). **American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, **43**(1), 31-43, 1990.
62. LEHN, M., WEISER, W. Y., ENGELHORN, S., GILLIS, S., & REMOLD, H. G. IL-4 inhibits H₂O₂ production and anti*Leishmanial* capacity of human cultured monocytes mediated by IFN-gamma. **Journal Of Immunology**, **143**(9), 3020-4, 1989.
63. LEPAY, D. A., NOGUEIRA, N., & COHN, Z. Surface antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal Of Experimental Medicine**, **157**(5), 1562-72, 1983.
64. LIEW, F. Y., & COX, F. E. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. **Immunology Today**, **12**(3), A17-21, 1991.
65. LIEW, F. Y., HALE, C., & HOWARD, J. G. Prophylactic immunization against experimental *Leishmaniasis*. IV. Subcutaneous immunization prevents the induction of protective immunity against fatal *Leishmania major* infection. **Journal Of Immunology**, **135**(3), 2095-101, 1985.
66. LIEW, F. Y., LI, Y., & MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **Journal Of Immunology**, **145**(12), 4306-10, 1990a.
67. LIEW, F. Y., LI, Y., & MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in *Leishmaniasis*. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Immunology**, **71**(4), 556-9, 1990b.
68. LIEW, F. Y., MILLOTT, S., LI, Y., LELCHUK, R., CHAN, W. L., & ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)3 and IL4 produced by disease-promoting T cells in *Leishmaniasis*. **European Journal Of Immunology**, **19**(7), 1227-32, 1989.
69. LIEW, F. Y., & O'DONNELL, C. A. Immunology of *Leishmaniasis*. **Advances In Parasitology**, **32**, 161-259, 1993.
70. LIU, X., & CHANG, K. P. Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (gp63)-deficient *Leishmania* increases their binding to macrophages. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, **89**(11), 4991-5, 1992.

71. LOCKSLEY, R. M., HEINZEL, F. P., FANKHAUSER, J. E., NELSON, C. S., & SADICK, M. D. Cutaneous host defense in *Leishmaniasis*: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. **Infection And Immunity**, **56**(2), 336-42, 1988.
72. LOCKSLEY, R. M., HEINZEL, F. P., HOLADAY, B. J., MUTHA, S. S., REINER, S. L., & SADICK, M. D. Induction of Th1 and Th2 CD4+ subsets during murine *Leishmania major* infection. **Research In Immunology**, **142**(1), 28-32, 1991.
73. MAUËL, J., & BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y. Effect of lipopolysaccharide on intracellular killing of *Leishmania enriettii* and correlation with macrophage oxidative metabolism. **European Journal Of Immunology**, **17**(2), 203-8, 1987.
74. MAUËL, J., RANSIJN, A., CORRADIN, S. B., & BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y. Effect of PGE2 and of agents that raise cAMP levels on macrophage activation induced by IFN-gamma and TNF-alpha. **Journal Of Leukocyte Biology**, **58**(2), 217-24, 1995.
75. McCONVILLE, M. J., & BLACKWELL, J. M. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. **Journal Of Biological Chemistry**, **266**(23), 15170-9, 1991.
76. McCONVILLE, M. J., TURCO, S. J., FERGUSON, M. A., & SACKS, D. L. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **Embo Journal**, **11**(10), 3593-600, 1992.
77. MCNEELY, T. B., ROSEN, G., LONDNER, M. V., & TURCO, S. J. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. **Biochemical Journal**, **259**(2), 601-4, 1989.
78. MCNEELY, T. B., & TURCO, S. J. Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, **148**(2), 653-7, 1987.
79. MITCHELL, G. F., CURTIS, J. M., HANDMAN, E., & MCKENZIE, I. F. Cutaneous *Leishmaniasis* in mice: disease patterns in reconstituted nude mice of several genotypes infected with *Leishmania tropica*. **Australian Journal Of Experimental Biology And Medical Science**, **58**(5), 521-32, 1980.
80. MOSMANN, T. R., & COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review Of Immunology**, **7**, 145-73, 1989.



81. MOSMANN, T. R., & MOORE, K. W. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. **Immunology Today**, **12**(3), A49-53, 1991.
82. MOSSER, D. M., & EDELSON, P. J. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. **Journal Of Immunology**, **132**(3), 1501-5, 1984.
83. MOSSER, D. M., & EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a *major* mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **Journal Of Immunology**, **135**(4), 2785-9, 1985.
84. MOSSER, D. M., & EDELSON, P. J. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. **Nature**, **327**(6120), 329-31, 1987.
85. MOSSER, D. M., & HANDMAN, E. Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind *Leishmania* promastigotes. **Journal Of Leukocyte Biology**, **52**(4), 369-76, 1992.
86. MOSSER, D. M., & ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Seminars In Cell Biology**, **4**(5), 315-22, 1993.
87. MOSSER, D. M., SPRINGER, T. A., & DIAMOND, M. S. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). **Journal Of Cell Biology**, **116**(2), 511-20, 1992.
88. MÜLLER, I., GARCIA-SANZ, J. A., TITUS, R., BEHIN, R., & LOUIS, J. Analysis of the cellular parameters of the immune responses contributing to resistance and susceptibility of mice to infection with the intracellular parasite, *Leishmania major*. **Immunological Reviews**, **112**, 95-113, 1989.
89. MURPHY, E. E., TERRES, G., MACATONIA, S. E., HSIEH, C. S., MATTSON, J., LANIER, L., WYSOCKA, M., TRINCHIERI, G., MURPHY, K., & O'GARRA, A. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. **Journal Of Experimental Medicine**, **180**(1), 223-31, 1994.
90. MURRAY, H. W. Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line. Correlation between intracellular killing and the generation of oxygen intermediates. **Journal Of Experimental Medicine**, **153**(6), 1690-5, 1981.
91. MURRAY, H. W. Cell-mediated immune response in experimental visceral *Leishmaniasis*. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **Journal Of Immunology**, **129**(1), 351-7, 1982.

92. MURRAY, H. W., & CARTELLI, D. M. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. **Journal Of Clinical Investigation**, **72**(1), 32-44, 1983.
93. NACY, C. A., FORTIER, A. H., Meltzer, M. S., Buchmeier, N. A., & Schreiber, R. D. Macrophage activation to kill *Leishmania major*: activation of macrophages for intracellular destruction of amastigotes can be induced by both recombinant interferon-gamma and non-interferon lymphokines. **Journal Of Immunology**, **135**(5), 3505-11, 1985.
94. NACY, C. A., FORTIER, A. H., PAPPAS, M. G., & HENRY, R. R. Susceptibility of inbred mice to *Leishmania tropica* infection: correlation of susceptibility with in vitro defective macrophage microbicidal activities. **Cellular Immunology**, **77**(2), 298-307, 1983.
95. NATHAN, C. F., MURRAY, H. W., WIEBE, M. E., & RUBIN, B. Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **Journal Of Experimental Medicine**, **158**(3), 670-89, 1983.
96. O'GARRA, A., & MURPHY, K. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. **Current Opinion In Immunology**, **6**(3), 458-66, 1994.
97. PEARSON, R. D., HARCUS, J. L., ROBERTS, D., & DONOWITZ, G. R. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. **Journal Of Immunology**, **131**(4), 1994-9, 1983.
98. PEARSON, R. D., HARCUS, J. L., SYMES, P. H., ROMITO, R., & DONOWITZ, G. R. Failure of the phagocytic oxidative response to protect human monocyte-derived macrophages from infection by *Leishmania donovani*. **Journal Of Immunology**, **129**(3), 1282-6, 1982.
99. PHIPPS, R. P., STEIN, S. H., & ROPER, R. L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunology Today**, **12**(10), 349-52, 1991.
100. PIMENTA, P. F., TURCO, S. J., MCCONVILLE, M. J., LAWYER, P. G., PERKINS, P. V., & SACKS, D. L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, **256**(5065), 1812-5, 1992.
101. PRINA, E., ANTOINE, J. C., WIEDERANDERS, B., & KIRSCHKE, H. Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. **Infection And Immunity**, **58**(6), 1730-7, 1990.

102. PUENTES, S. M., SACKS, D. L., DA SILVA, R. P., & JOINER, K. A. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. **Journal Of Experimental Medicine**, **167**(3), 887-902, 1988.
103. RABINOVITCH, M., TOPPER, G., CRISTELLO, P., & RICH, A. Receptor-mediated entry of peroxidases into the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with *Leishmania Mexicana amazonensis*. **Journal Of Leukocyte Biology**, **37**(3), 247-61, 1985.
104. RAMAMOORTHY, R., SWIHART, K. G., MCCOY, J. J., WILSON, M. E., & DONELSON, J. E. Intergenic regions between tandem gp63 genes influence the differential expression of gp63 RNAs in *Leishmania chagasi* promastigotes. **Journal Of Biological Chemistry**, **270**(20), 12133-9, 1995.
105. REINER, N. E. Parasite accessory cell interactions in murine *Leishmaniasis*. I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin 1 response by *Leishmania donovani*. **Journal Of Immunology**, **138**(6), 1919-25, 1987.
106. REINER, N. E., & MALEMUD, C. J. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. **Journal Of Immunology**, **134**(1), 556-63, 1985.
107. REINER, N. E., NG, W., WILSON, C. B., MCMASTER, W. R., & BURCHETT, S. K. Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. **Journal Of Clinical Investigation**, **85**(6), 1914-24, 1990.
108. REINER, S. L., & LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Review Of Immunology**, **13**, 151-77, 1995.
109. REMALEY, A. T., KUHNS, D. B., BASFORD, R. E., GLEW, R. H., & KAPLAN, S. S. *Leishmanial* phosphatase blocks neutrophil O-2 production. **Journal Of Biological Chemistry**, **259**(18), 11173-5, 1984.
110. RIZVI, F. S., OUAISSI, M. A., MARTY, B., SANTORO, F., & CAPRON, A. The *major* surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. **European Journal Of Immunology**, **18**(3), 473-6, 1988.

111. ROACH, T. I., CHATTERJEE, D., & BLACKWELL, J. M. Induction of early-response genes KC and JE by mycobacterial lipoarabinomannans: regulation of KC expression in murine macrophages by Lsh/Ity/Bcg (candidate Nramp). **Infection And Immunity**, **62**(4), 1176-84, 1994.
112. ROSENTHAL, L. A., SUTTERWALA, F. S., KEHRLI, M. E., & MOSSER, D. M. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. **Infection And Immunity**, **64**(6), 2206-15, 1996.
113. RUSSELL, D. G., & WILHELM, H. The involvement of the *major* surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. **Journal Of Immunology**, **136**(7), 2613-20, 1986.
114. RUSSELL, D. G., & WRIGHT, S. D. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the *major* surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. **Journal Of Experimental Medicine**, **168**(1), 279-92, 1988.
115. RUSSELL, D. G., XU, S., & CHAKRABORTY, P. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. **Journal Of Cell Science**, **103** (Pt 4), 1193-210, 1992.
116. SACKS, D. L. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. **Infectious Agents And Disease**, **1**(4), 200-6, 1992.
117. SACKS, D. L., BRODIN, T. N., & TURCO, S. J. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. **Molecular And Biochemical Parasitology**, **42**(2), 225-33, 1990.
118. SACKS, D. L., HIENY, S., & SHER, A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. **Journal Of Immunology**, **135**(1), 564-9, 1985.
119. SACKS, D. L., & PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, **223**(4643), 1417-9, 1984.
120. SADICK, M. D., HEINZEL, F. P., HOLADAY, B. J., PU, R. T., Dawkins, R. S., & Locksley, R. M. Cure of murine *Leishmaniasis* with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. **Journal Of Experimental Medicine**, **171**(1), 115-27, 1990.
121. SARAIVA, E. M., PIMENTA, P. F., BRODIN, T. N., ROWTON, E., MODI, G. B., & SACKS, D. L. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, **111** (Pt 3), 275-87, 1995.

122. SCHARTON, T. M., & 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. **Journal Of Experimental Medicine**, **178**(2), 567-77, 1993.
123. SCOTT, P., NATOVITZ, P., COFFMAN, R. L., PEARCE, E., & SHER, A. Immunoregulation of cutaneous *Leishmaniasis*. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **Journal Of Experimental Medicine**, **168**(5), 1675-84, 1988.
124. SHANKAR, A. H., MORIN, P., & TITUS, R. G. *Leishmania major*: differential resistance to infection in C57BL/6 (high interferon-alpha/beta) and congenic B6.C-H-28c (low interferon-alpha/beta) mice. **Experimental Parasitology**, **84**(2), 136-43, 1996.
125. SHANKAR, A. H., & TITUS, R. G. The influence of antigen-presenting cell type and interferon-gamma on priming and cytokine secretion of *Leishmania major*-specific T cells. **Journal Of Infectious Diseases**, **175**(1), 151-7, 1997.
126. SOARES, L. R., SERCARZ, E. E., & MILLER, A. Vaccination of the *Leishmania major* susceptible BALB/c mouse. I. The precise selection of peptide determinant influences CD4+ T cell subset expression. **International Immunology**, **6**(5), 785-94, 1994.
127. SOARES, M. B., DAVID, J. R., & TITUS, R. G. An in vitro model for infection with *Leishmania major* that mimics the immune response in mice. **Infection And Immunity**, **65**(7), 2837-45, 1997.
128. SOLBACH, W., MOLL, H., & RÖLLINGHOFF, M. Lymphocytes play the music but the macrophage calls the tune. **Immunology Today**, **12**(1), 4-6, 1991.
129. SOONG, L.; CHANG, C-H.; SUN, J.; LONGLEY JUNIOR, B.; RUDDLE, N. H.; FLAVELL, R. A. & McMAHON-PRATT, D. Role of CD4⁺ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, **158**: 5374-83, 1997.
130. SOTERIADOU, K. P., REMOUNDOS, M. S., KATSIKAS, M. C., TZINIA, A. K., TSIKARIS, V., SAKARELLOS, C., & TZARTOS, S. J. The Ser-Arg-Tyr-Asp region of the *major* surface glycoprotein of *Leishmania* mimics the Arg-Gly-Asp-Ser cell attachment region of fibronectin. **Journal Of Biological Chemistry**, **267**(20), 13980-5, 1992.

131. SOUZA, V. L. Estudo comparativo das infecções por *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis* em camundongos isogênicos CBA. Salvador: 1998. 119p. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) Faculdade de Medicina, UFBA, 1998.
132. STENGER, S., SOLBACH, W., RÖLLINGHOFF, M., & BOGDAN, C. Cytokine interactions in experimental cutaneous *Leishmaniasis*. II. Endogenous tumor necrosis factor-alpha production by macrophages is induced by the synergistic action of interferon (IFN)-gamma and interleukin (IL) 4 and accounts for the antiparasitic effect mediated by IFN-gamma and IL 4. **European Journal Of Immunology**, **21**(7), 1669-75, 1991.
133. STENGER, S., THÜRING, H., RÖLLINGHOFF, M., & BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **Journal Of Experimental Medicine**, **180**(3), 783-93, 1994.
134. STREET, N. E., SCHUMACHER, J. H., FONG, T. A., BASS, H., FIORENTINO, D. F., LEVERAH, J. A., & MOSMANN, T. R. Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. **Journal Of Immunology**, **144**(5), 1629-39, 1990.
135. SUNDERKÖTTER, C., KUNZ, M., STEINBRINK, K., MEINARDUS-HAGER, G., GOEBELER, M., BILDAU, H., & SORG, C. Resistance of mice to experimental *Leishmaniasis* is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo. **Journal Of Immunology**, **151**(9), 4891-901, 1993.
136. SYPEK, J. P., CHUNG, C. L., MAYOR, S. E., SUBRAMANYAM, J. M., GOLDMAN, S. J., SIEBURTH, D. S., WOLF, S. F., & SCHAUB, R. G. Resolution of cutaneous *Leishmaniasis*: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **Journal Of Experimental Medicine**, **177**(6), 1797-802, 1993.
137. TALAMÁS-ROHANA, P., WRIGHT, S. D., LENNARTZ, M. R., & RUSSELL, D. G. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. **Journal Of Immunology**, **144**(12), 4817-24, 1990.
138. TITUS, R. G., KELSO, A., & LOUIS, J. A. INTRACELLULAR destruction of *Leishmania tropica* by macrophages activated with macrophage activating factor/interferon. **Clinical And Experimental Immunology**, **55**(1), 157-65, 1984.

139. TITUS, R. G., MÜLLER, I., KIMSEY, P., CERNY, A., BEHIN, R., ZINKERNAGEL, R. M., & LOUIS, J. A. Exacerbation of experimental murine cutaneous *Leishmaniasis* with CD4+ *Leishmania major*-specific T cell lines or clones which secrete interferon-gamma and mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity. **European Journal Of Immunology**, **21**(3), 559-67, 1991.
140. TOLSON, D. L., TURCO, S. J., & PEARSON, T. W. Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. **Infection And Immunity**, **58**(11), 3500-7, 1990.
141. TURCO, S. J., & DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annual Review Of Microbiology**, **46**, 65-94, 1992.
142. ULRICH, M., ORTIZ, D. T., & CONVIT, J. The effect of fresh serum on the leptomonads of *Leishmania*. I. Preliminary report. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, **62**(6), 825-30, 1968.
143. VAN STRIJP, J. A., RUSSELL, D. G., TUOMANEN, E., BROWN, E. J., & WRIGHT, S. D. LIGAND specificity of purified complement receptor type three (CD11b/CD18, alpha m beta 2, Mac-1). Indirect effects of an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence. **Journal Of Immunology**, **151**(6), 3324-36, 1993.
144. VERAS, P. S., DE CHASTELLIER, C., & RABINOVITCH, M. Transfer of zymosan (yeast cell walls) to the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal Of Experimental Medicine**, **176**(3), 639-46, 1992.
145. VIDAL, S., TREMBLAY, M. L., GOVONI, G., GAUTHIER, S., SEBASTIANI, G., MALO, D., SKAMENE, E., OLIVIER, M., JOTHY, S., & GROS, P. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. **Journal Of Experimental Medicine**, **182**(3), 655-66, 1995.
146. VIDAL, S. M., MALO, D., VOGAN, K., SKAMENE, E., & GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. **Cell**, **73**(3), 469-85, 1993.
147. WILSON, M. E., & PEARSON, R. D. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. **Journal Of Immunology**, **136**(12), 4681-8, 1986.
148. WRIGHT, S. D., & SILVERSTEIN, S. C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **Journal Of Experimental Medicine**, **158**(6), 2016-23, 1983.

149. WU, J., CUNHA, F. Q., LIEW, F. Y., & WEISER, W. Y. IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. **Journal Of Immunology**, **151**(8), 4325-32, 1993.
150. WYLER, D. J. In vitro parasite-monocyte interactions in human *Leishmaniasis*. Evidence for an active role of the parasite in attachment. **Journal Of Clinical Investigation**, **70**(1), 82-8, 1982.
151. ZENIAN, A. *Leishmania tropica*: biochemical aspects of promastigotes' attachment to macrophages in vitro. **Experimental Parasitology**, **51**(2), 175-87, 1981.