



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

DULCILENE MAYRINK DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE MODELOS DE INFECÇÃO VISCERAL
CAUSADA POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*
EM CAMUNDONGOS BALB/c:
DETECÇÃO DO PARASITA NO PARÊNQUIMA CEREBRAL DOS ANIMAIS

Belo Horizonte

2010

DULCILENE MAYRINK DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE MODELOS DE INFECÇÃO VISCERAL
CAUSADA POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*
EM CAMUNDONGOS BALB/c:
DETECÇÃO DO PARASITA NO PARÊNQUIMA CEREBRAL DOS ANIMAIS**

Dissertação aprovada junto ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais, para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Área de concentração: Neurobiologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Colaboradora: Prof^a. Dr^a. Maria Norma Melo

Belo Horizonte

2010

DEDICO ESTE TRABALHO

À DEUS, fonte inesgotável de VIDA, por toda a alegria e pelas tristezas que me tornam um ser humano cada vez mais lúcido e menos orgulhoso!

AOS MEUS PAIS, Clóvis e Zélia, meus amores eternos e incondicionais! A eles dedico TODAS as minhas vitórias, pois fazem parte de cada sonho, de cada pensamento, de toda a alegria da minha vida! Tudo o que me ensinaram, ao longo do meu caminho, constitui a base sólida a que me apoio, SEMPRE! O que me esforço para ser neste mundo tem o único propósito de retribuir a vocês todo o amor e dedicação que me doaram, durante todos esses anos! Obrigada por acreditarem e investirem em mim!

AOS MEUS IRMÃOS, Bizinha, Serginho e Aninha, meus grandes amigos, também eternos e incondicionais! Obrigada por toda a cumplicidade, pela amizade, pela presença em minha vida! Cada qual com sua maneira de ser, deixam a minha vida muito mais feliz!

AOS MEUS AVÓS, TIOS E PRIMOS, alguns não mais entre nós, mas sempre presentes em minha memória, em meus pensamentos e em meu coração!!!

À QUERIDA AMIGA Flávia, companhia para todas as horas. Seu jeito e humor inigualáveis preenchem a minha vida com muita alegria! Uma figura!!!

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Eduardo Coelho, orientador e amigo, que procurou passar o máximo de seu vasto conhecimento técnico e científico, durante esses quatro anos de trabalho, sempre com muita paciência e didática, a alguém que acabara de chegar a um laboratório de pesquisa, cheia de dúvidas e expectativas. Obrigada por ter apostado em mim, pela amizade, pela sinceridade, pelos conselhos, conversas e brincadeiras! Obrigada, inclusive, pelos “puxões de orelha”, quando necessários, que me fizeram amadurecer muito! Obrigada pelo exemplo de pesquisador que trabalha árdua e incansavelmente, com muita garra e determinação, sem jamais perder a honestidade e a ética! MUITO OBRIGADA!!!

À prof^ª. Maria Norma Melo e a Rosângela Gomes, pessoas muito queridas, que tive o prazer de conviver durante as fases finais deste trabalho. Obrigada prof^ª. Norma por abrir as portas de seu laboratório a uma “estranha” e pelo exemplo de sabedoria e humildade, de atenção e dedicação! Obrigada Rosângela, pela ajuda nos experimentos, pelo seu tempo e inestimáveis conselhos, pelas conversas e companhia super agradáveis.

Aos profs. Thomaz e Ângela Maria Ribeiro, pelos quais cultivo profunda admiração e carinho!

Ao prof. Carlos Chávez, por abrir as portas de seu laboratório e permitir que, lá, eu iniciasse minha vida acadêmica!

À todos os amigos e colegas de laboratório! Muitos já seguiram seu caminho, mas permanecerão sempre em minha memória! Agradeço especialmente ao Eduardo (mais uma vez), à Mariana Amália, ao Miguel, ao Clóvis (que, além de pai, é amigo de laboratório), à Lourena, à Mariana Duarte, à Fernanda e à Vívian, sem a ajuda dos quais não conseguiria terminar meus experimentos em tempo hábil!

Às professoras Karina e Landa; e às responsáveis técnicas D. Alair e Rejane, do Setor de Patologia Clínica do Colégio Técnico (COLTEC) da UFMG, presenças constantes e super agradáveis, agradeço por toda a ajuda!

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Jaqueline, Fabiana, Heidi e D. Nely, por toda a ajuda e suporte!

À Betinha, responsável técnica pelo Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG, pela amizade e constante colaboração!

Aos amigos Jaques Diogo, Leandro Sacramento e Marcelo Martins (meu cunhado), pela ajuda nos detalhes técnicos da finalização deste trabalho!

Às agências de fomento que apoiaram este trabalho: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais)!

Aos professores Oscar Bruna Romero e Carlos Alberto Pereira Tavares pelos inestimáveis conselhos e discussões em minha Defesa de Dissertação e à professora Karina Braga Gomes Borges, pela atenção e dedicação na correção da parte escrita do meu trabalho!

À todos não citados nominalmente, mas que foram altamente relevantes em meu aperfeiçoamento profissional e pessoal. Muito obrigada!

“O que sabemos é uma gota comparada ao oceano do que não sabemos”

Isaac Newton

“Diante de Deus, somos todos igualmente sábios e igualmente tolos”

Albert Einstein

RESUMO

As leishmanioses são doenças que apresentam uma elevada taxa de incidência no Brasil. Na América Latina, uma das formas clássicas e graves da doença, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela espécie *Leishmania chagasi*. Entre as manifestações clínicas da LV, aquelas que envolvem o sistema nervoso central (SNC) são escassas ou não são devidamente diagnosticadas. Há relatos da invasão do parasita junto ao SNC via migração de leucócitos, fato que pode causar danos graves ao hospedeiro. O emprego de modelos murinos para o estudo da infecção por *L. chagasi* tem sido realizado para diferentes avaliações de resposta imune e da eficácia de antígenos vacinais; entretanto, os diferentes tempos de avaliação utilizados, assim como os inóculos infectivos e as rotas de infecção variadas não permitem a definição de um modelo ideal de estudo para a evolução da doença visceral, o que acaba por comprometer a qualidade de avaliação da eficácia dos antígenos vacinais nestes trabalhos. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar diferentes modelos (vias de infecção e tamanho de inóculo) de infecção causada por *L. chagasi* em camundongos BALB/c. Camundongos foram infectados com 10^3 , 10^5 ou 10^7 parasitas pela via subcutânea ou infectados com 10^7 parasitas pela via endovenosa. A carga parasitária foi determinada no baço, fígado, linfonodo inguinal, parênquima cerebral e na medula óssea femural dos animais infectados; 15, 30, 45 e 60 dias após o desafio. A técnica PCR foi utilizada para a detecção do parasita no cérebro dos animais infectados. O perfil da resposta celular e humoral foi avaliado pela produção de IFN- γ , IL-4, IL-10 e dos isotipos de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos ao parasita, nos diferentes períodos de tempo. Na análise dos resultados, observou-se que a carga parasitária encontrada nos órgãos analisados foi diretamente proporcional ao tamanho do inóculo infectivo e progrediu com a cronicidade da infecção; a detecção do DNA de *L. chagasi* no parênquima cerebral dos camundongos, 15 dias após o desafio, evidenciou o envolvimento do órgão na visceralização do parasita e permitiu inferir a existência de um comprometimento sistêmico do animal, já na fase aguda da doença. Uma relação direta entre a carga parasitária nos diferentes órgãos dos animais avaliados, a produção de IL-4, IL-10 e de anticorpos IgG1 específicos ao parasita foi observada nos grupos experimentais infectados com 10^5 e, especialmente, com 10^7 parasitas. Em conclusão, observou-se que o modelo murino para a infecção utilizando 10^7 parasitas e a rota subcutânea foi aquele no qual se observou uma infecção mais grave nos animais avaliados nos diferentes períodos de tempo.

ABSTRACT

The leishmaniasis are diseases that present a high incidence in Brazil. In the Latin America, one of its classic and serious forms of the disease, visceral leishmaniasis (VL), is caused by the *Leishmania chagasi* specie. Among the clinical manifestations of VL, those that involve the central nervous system (CNS) are poor or it's not diagnosed properly. There are reports of the invasion of the parasite through leucocyte migration into the CNS. The use of murine models to the study of the *L. chagasi* infection has been done for different evaluations of immune response and the effectiveness of antigens candidates; however, the different evaluation periods used, as well as the parasite inoculums and the several infection routes don't allow the definition of an ideal model of study for the evolution of the visceral disease, compromising the efficiency of the evaluation of vaccinate antigens. The present work has for objective to evaluate different models (infection routes and inoculums size) of visceral disease caused by *L. chagasi* in BALB/c mice. Mice were infected with 10^3 , 10^5 or 10^7 parasites for the subcutaneous route or 10^7 parasites for intravenous route. The parasite burden was determined in the spleen, liver, lymph nodes, brain and in the bone marrow of the animals; 15, 30, 45 and 60 days after challenge. PCR was used for the detection of the parasite in the brain of the infected animals. The profile of the cellular and humoral responses was evaluated by production of IFN- γ , IL-4, IL-10 and of specific-parasite IgG1 and IgG2a antibodies, in the different periods of time. In the results, was verified that the parasite burden found in the analyzed organs was directly proportional to the size of the parasites inoculum and it progressed with the chronicity of the infection; the detection of DNA of *L. chagasi* in the cerebral parenchyma of the mice, 15 days after the challenge, evidenced the involvement of this organ in the visceralization of the parasite and allowed to infer the existence of the systemic compromising of the animal, even in the acute phase of the infection. A direct correlation among the parasitic load in the different evaluated organs, a production of IL-4, IL-10 and specific-parasite IgG1 antibodies was observed in the experimental groups infected with 10^5 and, specially, 10^7 parasites. Therefore, our conclusion showed that the murine model of infection using 10^7 parasites and the subcutaneous route was that in which a more severe infection was observed in the evaluated animals, in all periods of time evaluated.

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

FIGURA 1 -	Ciclo biológico do parasita do gênero <i>Leishmania</i>	26
FIGURA 2 -	Quantificação de parasitas no baço de camundongos infectados por <i>L. chagasi</i>	49
FIGURA 3 -	Quantificação de parasitas no fígado de camundongos infectados por <i>L. chagasi</i>	50
FIGURA 4 -	Quantificação de parasitas na medula óssea femural de camundongos infectados por <i>L. chagasi</i>	51
FIGURA 5 -	Quantificação de parasitas no linfonodo inguinal de camundongos infectados por <i>L. chagasi</i>	53
FIGURA 6 -	Quantificação de parasitas no cérebro de camundongos infectados por <i>L. chagasi</i>	55
FIGURA 7 -	Detecção de <i>L. chagasi</i> no parênquima cerebral de camundongos BALB/c, por meio da técnica de PCR, após 15 e 30 dias de infecção	57
FIGURA 8 -	Produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com <i>L. chagasi</i>	60
FIGURA 9 -	Níveis de IgG1 e IgG2a presentes em amostras de soro de camundongos BALB/c inoculados com <i>L. chagasi</i>	62
QUADRO 1 -	Modelos murinos experimentais utilizados em testes vacinais contra a leishmaniose visceral	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs -	Absorbância
AIDS -	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC -	Célula apresentadora de antígenos
BHE -	Barreira Hemato-Encefálica
BHL -	Barreira Hemato-Liquórica
bp -	Pares de base
BSA -	Albumina sérica bovina
CEBIO -	Centro de Bioterismo
CETEA -	Comitê de Ética em Experimentação Animal
COLTEC -	Colégio Técnico
ConA -	Concanavalina A
C ₆ H ₈ O ₇ -	Ácido cítrico
CO ₂ -	Dióxido de carbono
DAT -	Teste de Aglutinação Direta
DMEM -	Dulbecco's Modified Eagle's Médium
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
EDTA -	Ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA -	Análise de Imunoabsorção por Ligação Enzimática
EV -	Endovenosa
g -	Força centrífuga
g -	Gramma
HIV -	Vírus da imunodeficiência humana
HRP -	Peroxidase
h -	Hora
HCL -	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂ -	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄ -	Ácido sulfúrico
ICB -	Instituto de Ciências Biológicas
ID -	Intradérmica
IFAT -	Reação de Imunofluorescência Indireta
IFN- γ -	Interferon-gama

IgG -	Imunoglobulina do tipo G
IgG1 -	Imunoglobulina do tipo G1
IgG2a -	Imunoglobulina do tipo G2a
IL-4 -	Interleucina-4
IL-5 -	Interleucina-5
IL-6 -	Interleucina-6
IL-10 -	Interleucina-10
IL-12 -	Interleucina-12
IL-13 -	Interleucina-13
iNOS -	Óxido nítrico sintetase induzível
KCl -	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄ -	Fosfato de potássio monobásico
L -	Litro
LC -	Leishmaniose cutânea
LCD -	Leishmaniose cutâneo-difusa
LMC -	Leishmaniose muco-cutânea
log -	Logarítimo
LT -	Leishmaniose tegumentar
LV -	Leishmaniose visceral
LVA -	Leishmaniose visceral americana
LVC -	Leishmaniose visceral canina
LV ₁ -	Par número 1 de iniciadores específicos para o “complexo <i>L. donovani</i> ”
LV ₂ -	Par número 2 de iniciadores específicos para o “complexo <i>L. donovani</i> ”
MHC -	Complexo Principal de Histocompatibilidade
M -	Molar
min -	Minuto
mL -	Mililitro
mM -	Milimolar
mg -	Miligrama
mg/mL -	Miligrama por mililitro
N -	Normal
µg/mL -	Micrograma por mililitro
µg -	Micrograma

μL -	Microlitro
mRNA -	RNA mensageiro
n -	Tamanho da amostragem
ng -	Nanograma
nm -	Nanômetro
NO -	Óxido nítrico
NaCl -	Cloreto de sódio
Na_2CO_3 -	Carbonato de sódio
NaHCO_3 -	Bicarbonato de sódio
Na_2HPO_4 -	Fosfato de sódio dibásico
NH_4Cl -	Cloreto de amônio
OMS -	Organização Mundial de Saúde
OPD -	<i>Orto</i> -fenilenodiamino
PBS -	Tampão salina-fosfato
PBMC -	Células mononucleares do sangue periférico
PCR -	Reação em cadeia da polimerase
pH -	Potencial hidrogeniônico
PKDL -	Leishmaniose dérmica pós-calazar
$\text{pM}/\mu\text{L}$ -	Picomolar por microlitro
p/v -	Peso por volume
PVC -	Cloreto de polivinil
<i>q.s.p.</i> -	Quantidade suficiente para
Real-time PCR -	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA -	Ácido ribonucléico
s -	Segundo
SC -	Subcutânea
SFB -	Soro fetal bovino
SLA -	Extrato protéico solúvel de <i>Leishmania</i>
SNC -	Sistema Nervoso Central
SNP -	Sistema Nervoso Periférico
TBE -	Tampão tris EDTA borato
TGF- β -	Fator de crescimento transformante beta
Th1 -	Linfócitos T CD4 ⁺ helper 1

Th2 -	Linfócitos T CD4 ⁺ helper 2
TNF- α -	Fator de necrose tumoral alfa
Tris -	Tris base
UFMG -	Universidade Federal de Minas Gerais
U/mL -	Unidade por mililitro
v/v -	Volume por volume
°C -	Graus <i>Celsius</i>
% -	Porcentagem

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1.	As barreiras encefálicas	20
2.2.	Entrada de patógenos no sistema nervoso central	21
2.2.1.	Microrganismos patogênicos utilizam diversos mecanismos de invasão do sistema nervoso central	21
2.2.2.	Envolvimento de parasitas do gênero <i>Leishmania</i> no sistema nervoso central	21
2.3.	Introdução às Leishmanioses	23
2.3.1.	Prevalência e distribuição geográfica	23
2.3.2.	Etiologia	23
2.3.3.	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	24
2.3.4.	Aspectos clínicos da leishmaniose visceral	27
2.3.5.	Diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral	28
2.3.6.	Medidas profiláticas e de controle das leishmanioses	30
2.4.	Imunologia das leishmanioses	31
2.5.	Modelo murino para estudo da leishmaniose visceral	34
3.	OBJETIVOS	37
3.1.	Objetivo geral	37
3.2.	Objetivos específicos	37
4.	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1.	Material	39
4.1.1.	Animais de experimentação	39
4.1.2.	Parasitas	39
4.2.	Métodos	40
4.2.1.	Preparo do extrato protéico solúvel de <i>Leishmania chagasi</i>	40
4.2.2.	Dosagem de proteínas	40
4.2.3.	Protocolos de infecção experimental	41
4.2.4.	Isolamento e cultivo de esplenócitos	41
4.2.5.	Avaliação da resposta imune celular	42
4.2.6.	Avaliação da resposta humoral	42
4.2.7.	Quantificação de parasitas	43

4.2.8.	Detecção de parasitas no parênquima cerebral de camundongos BALB/c por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)	44
4.2.9.	Análise estatística	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1.	Carga parasitária avaliada em diferentes órgãos e períodos de tempo em camundongos BALB/c após a infecção com <i>Leishmania chagasi</i>	48
5.2.	Avaliação da carga parasitária no parênquima cerebral de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania chagasi</i>	54
5.2.1.	Determinação da carga parasitária no parênquima cerebral de camundongos BALB/c infectados, por meio da técnica de diluição limitante	55
5.2.2.	Detecção de parasitas no parênquima cerebral de camundongos BALB/c infectados, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)	56
5.3.	Avaliação da resposta imune celular em camundongos infectados com <i>Leishmania chagasi</i>	58
5.4.	Avaliação da resposta humoral em camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania chagasi</i>	60
6.	CONCLUSÕES	64
7.	PERSPECTIVAS	66
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por parasitas protozoários do gênero *Leishmania*, afetam, anualmente, cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo e são consideradas endêmicas em 88 países. A leishmaniose visceral (LV), uma forma fatal da doença quando não tratada, é causada pelas espécies *Leishmania chagasi* na América Latina e *L. donovani* e *L. infantum* em países do Velho Mundo (Neves, 2006). Estima-se uma incidência anual de 50 mil mortes decorrentes da LV em todo o mundo; uma mortalidade que, entre as doenças tropicais, só é superada em números pela malária. A maioria dos casos de LV (em torno de 90%) é registrada em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (Piscopo e Mallia, 2006; Chappuis *et al.*, 2007).

A LV humana pode se manifestar clinicamente causando febre intermitente, anemia, hepatoesplenomegalia e caquexia progressiva; que se desenvolvem em níveis variáveis, de semanas a anos após a infecção. Sintomas clínicos menos comuns incluem linfadenopatia, diarreia persistente e sintomas neurológicos (Ashford, 2000; Lima *et al.*, 2003). As manifestações clínicas envolvendo o sistema nervoso central (SNC) são mais escassas, porém, têm sido observadas em indivíduos com imunossupressão, geralmente associadas às infecções disseminadas (Walker *et al.*, 2006).

O cérebro é considerado um local imunologicamente privilegiado pela menor expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), pelo baixo número de células apresentadoras de antígenos (APCs) e pelas barreiras encefálicas existentes, no caso, a barreira hemato-encefálica (BHE) e a barreira hemato-liquórica (BHL); duas estruturas capazes de isolar o SNC da corrente sanguínea. No entanto, diversos patógenos são capazes de atravessar as barreiras encefálicas e penetrar no cérebro, podendo causar lesões, dentre eles, o parasita *Leishmania* (Nassif *et al.*, 2002; Abreu-Silva *et al.*, 2003).

Existem estudos demonstrando que a espécie *L. chagasi* é capaz de atravessar a BHE e causar danos significativos no SNC de camundongos experimentalmente infectados com este parasita. Em outros trabalhos, anticorpos específicos ao parasita *L. chagasi* foram encontrados no líquido de pacientes que apresentavam LV e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS); bem como em cães naturalmente infectados com *L. infantum* (Ramos *et al.*, 1994; Garcia-Alonso *et al.*, 1996; Prasad e Sen, 1996; Viñuelas *et al.*, 2001; Abreu-Silva *et al.*, 2003).

A resistência à infecção por *Leishmania* parece ocorrer por meio de uma resposta imune específica do tipo celular por parte do hospedeiro mamífero infectado. O mecanismo imunológico efetor responsável pelo controle dos parasitas parece ser decorrente da ativação de macrófagos via interferon gama (IFN- γ) (Scott, 2003). A utilização de modelos murinos para estudos envolvendo a espécie *L. major*, uma espécie causadora de leishmaniose cutânea (LC), permitiu a definição do paradigma Th1/Th2 de resistência/susceptibilidade, respectivamente, à infecção por essa espécie e o papel de citocinas como a interleucina-12 (IL-12) e interleucina-4 (IL-4) no desenvolvimento de linhagens de linfócitos do tipo Th1 e Th2, respectivamente (Alexander e Bryson, 2005). Ao contrário do que é observado na LC, o fenótipo de susceptibilidade na LV murina parece estar mais relacionado à incapacidade de desenvolvimento de uma resposta Th1 efetiva, preferencialmente, do que a elaboração de uma resposta Th2 exacerbada (Afonso e Scott, 1993).

Na análise comparativa entre os modelos de infecção experimental e natural, nesse último caso, os vetores infectados inoculam algumas centenas de formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro, na região da orelha ou da face dos animais. As infecções experimentais, por sua vez, são realizadas pela inoculação de milhares de formas promastigotas, normalmente na fase estacionária de crescimento, que são cultivadas *in vitro* ou de formas amastigotas recuperadas do baço de animais infectados e que utilizam como vias de infecção as rotas subcutânea (SC) ou endovenosa (EV). Neste caso, a infecção pode permanecer restrita ao local de inoculação do parasita ou visceralizar, condições relacionadas à combinação de diversos fatores, dentre os quais a linhagem utilizada dos camundongos, a espécie da *Leishmania* inoculada, a virulência do parasita isolado, a natureza do inóculo infectivo e a via de infecção utilizada (Garg e Dube, 2006).

Os diversos trabalhos descritos na literatura acerca da utilização de modelos murinos para o estudo da LV causada pela espécie *L. chagasi*, empregam milhares de formas promastigotas do parasita em sua fase estacionária de crescimento, cultivadas *in vitro* e que são inoculados pela via endovenosa (EV) nos animais. Entretanto, tais medidas parecem burlar o que realmente acontece na infecção natural, na qual formas promastigotas metacíclicas dos parasitas são inoculadas em pequeno número (cerca de 100 a 1000 parasitas por picada) na derme do hospedeiro e as mesmas ainda enfrentam os mecanismos de defesa do hospedeiro, representados por sua imunidade inata.

Em relação ao emprego de antígenos vacinais contra a LV, os tempos de avaliação utilizados nos trabalhos científicos variam entre os diversos trabalhos e não há um consenso sobre o melhor período de tempo para a avaliação dos parâmetros relacionados à eficácia da

vacina, tais como para a determinação da resposta imune celular e humoral gerada e a carga parasitária nos diferentes órgãos dos animais, o que pode acabar por comprometer a avaliação mais criteriosa da eficácia dos antígenos vacinais utilizados nos trabalhos experimentais (Marques-da-Silva *et al.*, 2005).

Dessa forma, o presente trabalho propõe-se a avaliar diferentes modelos de infecção visceral com o parasita *L. chagasi*, em camundongos BALB/c, avaliando a carga parasitária após a infecção desafio utilizando diferentes inóculos infectivos, nas diferentes vísceras dos animais e em diferentes períodos de tempo, assim como a resposta imune celular e humoral gerada e relacionar os resultados obtidos com o desenvolvimento da infecção experimental.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. AS BARREIRAS ENCEFÁLICAS

O sistema nervoso central (SNC) possui um ambiente interno exclusivo, cujo conteúdo depende da permeabilidade altamente seletiva das barreiras encefálicas (Tuomanen, 1996). A principal função dessas barreiras é restringir a troca de substâncias entre o tecido nervoso central e os diversos compartimentos líquidos do SNC (Machado, 1993), os quais mantêm os componentes solúveis do sangue fisicamente impedidos de entrar em contato com o líquido extracelular das células neuronais (Tuomanen, 1996).

Duas estruturas diferentes separam o SNC da corrente sanguínea: a barreira hemato-encefálica (BHE) e a barreira hemato-liquórica (BHL) (Nassif *et al.*, 2002).

A BHE é formada pelo endotélio que reveste os capilares do cérebro (Machado, 1993; Nassif *et al.*, 2002). Os capilares cerebrais são formados pelo endotélio e por uma membrana basal delgada. Por fora, os pés vasculares dos astrócitos formam uma camada quase completa em torno do capilar. Os três elementos já foram considerados como sede da BHE, porém, atualmente, admite-se que a BHE encontra-se no endotélio. Vários processos patológicos como infecções e traumatismos, podem levar a uma ruptura parcial ou completa da BHE, afetando sua permeabilidade (Machado, 1993).

A BHL localiza-se nos plexos coróides, seus capilares, no entanto, não participam do fenômeno de barreira. O epitélio endimário que reveste os plexos coróides, ao contrário dos demais epitélios endimários, possui junções íntimas que unem as células próximas à superfície ventricular e impedem a passagem de macromoléculas, constituindo a base anatômica da BHL (Machado, 1993). Plexo coróides são estruturas enoveladas compostas por dobras da pia-máter, um grande número vasos sanguíneos e por células endimárias modificadas. As células endimárias representam o elemento central na produção do líquido. Trata-se de células cúbicas ou cilíndricas, cujas membranas são justapostas umas às outras por junções oclusivas. Essas junções mantêm as células fortemente aderidas e vedam a passagem de substâncias do sangue para o líquido através do espaço intersticial, obrigando-as a utilizar o caminho através da membrana celular, por dentro do seu citoplasma (Lent, 2004).

2.2. ENTRADA DE PATÓGENOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O cérebro saudável é considerado um local imunologicamente privilegiado devido à pequena expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), ao baixo número de células apresentadoras de antígenos (APC) e pelas barreiras encefálicas eficientes. No entanto, patógenos são capazes de atravessar as barreiras encefálicas e causar lesões, como é o caso de bactérias do gênero *Brucella* e das espécies *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium tuberculosis* (Abreu-Silva *et al.*, 2003).

2.2.1. Microrganismos patogênicos utilizam diversos mecanismos de invasão do sistema nervoso central

Microrganismos patogênicos podem utilizar estratégias diferentes para invadir o SNC (Drevets e Leenen, 2000). Tais estratégias podem ser classificadas pelo local de entrada do patógeno e pelo modo de como são contornadas as junções intercelulares estreitas do endotélio dos capilares cerebrais. Desse modo, quatro possíveis vias de penetração no cérebro são consideradas: **(a)** a penetração direta pelo epitélio endimário do plexo coróide para o espaço preenchido pelo líquido cruzando, assim, a BHL; **(b)** a entrada pelo endotélio do capilar cerebral que conduz ao parênquima cerebral, atravessando a BHE; **(c)** podem afetar indiretamente as funções das células endoteliais dos capilares, dos gliócitos, ou da membrana basal que circunda o endotélio, de tal forma que as junções íntimas intercelulares são rompidas (Tuomanen, 1996) e, finalmente, **(d)** podem utilizar a entrada por leucócitos, um mecanismo pelo qual patógenos intracelulares são capazes de estabelecer uma infecção, aproveitando-se do tráfego regular de leucócitos no SNC (Drevets e Leenen, 2000).

2.2.2. Envolvimento de parasitas do gênero *Leishmania* no sistema nervoso central

Garcia-Alonso *et al.* (1996) encontraram anticorpos específicos ao parasita *Leishmania* no líquido de cães naturalmente infectados pela espécie *Leishmania infantum*, um importante agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) em diversos países no mundo. No cérebro e cerebelo dos cães avaliados houve uma reação patológica do tipo esponjosa acompanhada por uma degeneração neuronal, pela mobilização de células gliais e por depósitos de proteínas amilóides. A deposição intersticial e intravascular de imunoglobulinas do tipo G (IgG) específicas à *Leishmania* nos plexos coróides dos animais sugeriu uma falha

na BHL, fato que pode predispor o SNC ao desenvolvimento de patologias relacionadas a esse compartimento (Garcia-Alonso *et al.*, 1996).

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* foi também observada no líquido de cães experimentalmente infectados pela espécie *L. chagasi*, um agente causador de LV nas Américas, em um estudo realizado por Lima *et al.* (2003). Essa observação sugere que a *L. chagasi* pode causar a ruptura na BHL, ocorrendo a transferência de antígenos e anticorpos do sangue para os compartimentos preenchidos pelo líquido. No entanto, este estudo não mostrou nenhuma correlação entre os títulos de anticorpos encontrados no líquido e os sintomas neurológicos observados (Lima *et al.*, 2003). Além dos estudos em cães, há relatos da penetração de parasitas da espécie *L. donovani* no líquido de humanos infectados (Prasad e Sen, 1996).

Viñuelas *et al.* (2001) foram os primeiros a descrever um caso de meningite associada à LV. Manifestações clínicas próprias da meningite granulomatosa foram observadas em cães naturalmente infectados com *L. infantum*. A meningite foi acompanhada por infiltrados inflamatórios compostos de células, linfa e plasma, e pela presença de um grande número de parasitas no interior de macrófagos. Estudos imunológicos do líquido dos animais mostrou que anticorpos presentes no líquido dos animais foram capazes de reconhecer um grande número de proteínas do parasita e que essas eram semelhantes às reconhecidas pelos soros destes animais (Viñuelas *et al.*, 2001).

Alterações patológicas no SNC foram também observadas na leishmaniose cutânea (LC) causada pela espécie *Leishmania amazonensis* em camundongos infectados. Estudos histológicos e imunocitoquímicos detectaram macrófagos parasitados no parênquima cerebral dos animais infectados. Tais parasitas foram também encontrados no interior de mastócitos, linfócitos e células polimorfonucleares analisadas; além de uma necrose no parênquima cerebral ter sido também observada. Desse modo, neste estudo, observou-se que o parasita *L. amazonensis* foi capaz de atravessar a BHE e causar alterações patológicas significativas no SNC dos camundongos infectados (Abreu-Silva *et al.*, 2003).

2.3. INTRODUÇÃO ÀS LEISHMANIOSES

2.3.1. Prevalência e distribuição geográfica

As leishmanioses afetam, anualmente, aproximadamente 12 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo consideradas endêmicas em 88 países. De acordo com levantamentos da Organização Mundial de Saúde (OMS), 350 milhões de pessoas estão expostas aos riscos de infecção e, a cada ano, ocorrem 1,5 a 2,0 milhões de novos casos, dos quais cerca de 500 mil casos registrados são de LV e aproximadamente 1,0 a 1,5 milhão de casos de leishmaniose tegumentar (LT) (Tavares *et al.*, 2009).

2.3.2 - Etiologia

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias causadas por parasitas protozoários do gênero *Leishmania* (Tavares *et al.*, 2009), pertencentes ao sub-filo *Mastigophora*, por apresentarem flagelo; à ordem *Kinetoplastida*, pois seu flagelo emerge de uma bolsa flagelar, na base da qual se condensa uma mitocôndria única e formam uma estrutura denominada cinetoplasto ou kDNA e à família *Trypanosomatidae*, por apresentarem mais de uma forma biológica durante seu desenvolvimento (Neves, 2006). Os vetores responsáveis pela transmissão dos parasitas são insetos da ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus*, em países do Velho Mundo e *Lutzomyia*, nas Américas. Apenas os vetores fêmeas possuem hábitos hematófagos e, dessa forma, são capazes de transmitir o parasita ao hospedeiro mamífero, no qual se incluem o homem e o cão (Grimaldi e Tesh, 1993).

As leishmanioses podem ser classificadas em dois grandes grupos: (1) a leishmaniose visceral (também conhecida como calazar), causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* (= *L. chagasi*) e (2) a leishmaniose tegumentar, subdividida em: leishmaniose cutânea (LC), causada por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no Velho Mundo e por *L. mexicana* e *L. amazonensis* nas Américas, e a leishmaniose muco-cutânea (LMC), causada por *L. braziliensis* (Ashford, 2000; Alexander e Bryson, 2005). Além das formas citadas, há ainda a leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), uma variação da LV e a leishmaniose cutâneo-difusa (LCD), uma variante da LC (Ashford, 2000; Piscopo e Mallia, 2006).

A LV é uma doença sistêmica e que pode ser fatal quando não tratada, e apresenta importante epidemiologia tanto na América Latina quanto no Velho Mundo. As principais

espécies pertencentes ao complexo de parasitas causadores de LV são: *L. donovani*, encontrada na África Oriental, Índia e China; *L. infantum*, presente nos países do Mediterrâneo, na África Central e Ocidental, Oriente Médio e China e *L. chagasi*, espécie predominante na América Latina (Neves, 2006).

A espécie *L. chagasi* é considerada, por alguns autores, uma variante geográfica de *L. infantum*. No entanto, estudos genéticos e enzimáticos indicam que *L. infantum* e *L. chagasi* parecem se tratar de uma mesma espécie correlata (Hommel, 1999; Maurício *et al.*, 2000).

2.3.3. Ciclo biológico de *Leishmania*

Os parasitas da espécie *Leishmania* apresentam duas formas morfológicas distintas: a promastigota, forma extracelular que parasita o trato digestivo do vetor flebotomíneo e a amastigota, um parasita intracelular obrigatório encontrado em células do sistema fagocítico-mononuclear no hospedeiro mamífero. As promastigotas são formas afiladas que apresentam um longo flagelo e podem medir de 15 a 20 micrômetros (μm) de comprimento. As amastigotas são formas arredondadas ou ovóides, com diâmetro entre 3 a 5 μm , possuem um flagelo rudimentar e são mais infectivas do que as formas promastigotas (Hommel, 1999).

O ciclo biológico do parasita *Leishmania spp.* é bem definido. Os parasitas são transmitidos após a picada do vetor que injeta, junto com sua saliva, algumas centenas de formas promastigotas metacíclicas (geralmente de 100 a 1000 parasitas, por picada) na derme do hospedeiro vertebrado, enquanto realizam seu repasto sanguíneo. No local da picada, essas formas podem escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, representados principalmente pela imunidade inata e podem ser fagocitadas por células residentes no local, tais como macrófagos, monócitos e células de *Langerhans* (Sacks e Noben-Trauth, 2002; Engwerda *et al.*, 2004). No interior dessas células, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas, permanecendo dentro de fagolisossomos, onde, então, originam o vacúolo parasitóforo, no qual iniciam os processos de reprodução por divisão binária e desenvolvimento celular. Cada célula infectada é capaz de abrigar grande número de formas amastigotas, quando então as células se rompem e liberam os parasitas, que podem ser tomados por novas células (Hommel, 1999; Neves, 2006). Os macrófagos infectados movem-se do local da picada para os linfonodos drenantes e, posteriormente, migram para outros órgãos como o baço, fígado e a medula óssea, visceralizando a infecção.

Certos parasitas exibem um tropismo específico em determinados hospedeiros mamíferos. Esse fenômeno pode explicar o fato das espécies *L. chagasi* e *L. donovani*,

inerentemente viscerotrópicas, estarem frequentemente associadas à LV (Hommel, 1999), enquanto que outras espécies, como *L. major*, serem capaz de desenvolver lesão no local de sua inserção no hospedeiro vertebrado, não visceralizando no mesmo.

Durante a hematofagia, um novo vetor flebotomíneo, ainda não infectado, pode ingerir células infectadas do hospedeiro mamífero contaminado e que contenham formas amastigotas do parasita. As mesmas chegam ao intestino do vetor e se diferenciam em promastigotas, que são encontradas livres no trato digestivo médio e anterior do flebotomíneo. As promastigotas denominadas procíclicas multiplicam-se, amadurecem e aderem-se ao epitélio do esôfago e faringe do vetor, local onde se processa uma nova diferenciação para a forma promastigota metacíclica. As formas promastigotas metacíclicas, livres, dirigem-se para a parte anterior do aparelho bucal do vetor. O ciclo biológico do parasita completa-se quando o vetor flebotomíneo, agora infectado, alimenta-se de um outro hospedeiro vertebrado ainda não infectado (Neves, 2006). O ciclo biológico da *Leishmania spp.* encontra-se ilustrado na Figura 1.

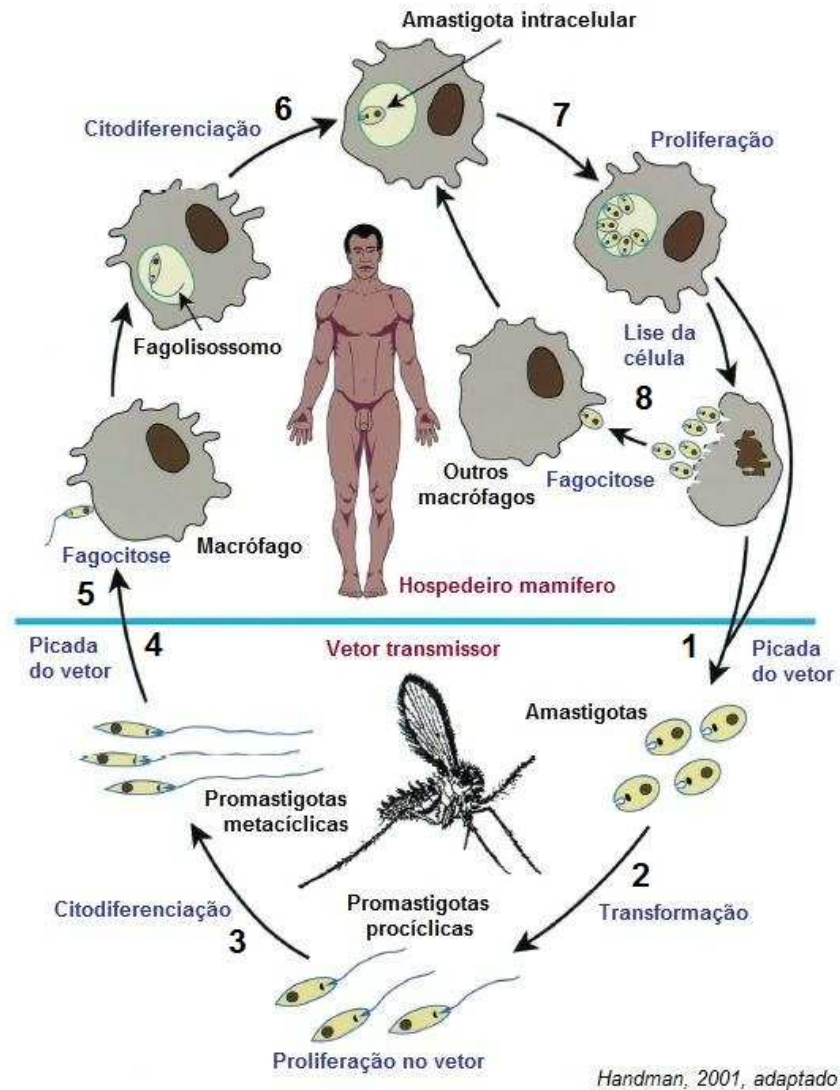


Figura 1 – Ciclo biológico do parasita do gênero *Leishmania*. (1) Macrófagos infectados são ingeridos por fêmeas do vetor, durante seu repasto sanguíneo; (2) no intestino do vetor, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas não-infectivas e, posteriormente, (3) em formas promastigotas metacíclicas, que migram para a porção anterior do intestino do vetor e (4) são transmitidas após sua picada na derme do hospedeiro; (5) ocorre, então, a fagocitose das formas promastigotas metacíclicas por macrófagos do hospedeiro mamífero; (6) no interior dessas células, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas e (7) iniciam os processos de reprodução por divisão binária e desenvolvimento celular. (8) Os macrófagos infectados são lisados, liberando formas amastigotas que podem infectar novas células. (Fonte: adaptado de Handman, 2001.)

2.3.4. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral

O espectro clínico das leishmanioses é caracterizado por sua diversidade e complexidade: as leishmanioses são doenças causadas por cerca de 20 diferentes espécies do parasita e transmitidas ao hospedeiro mamífero por, aproximadamente, 30 diferentes espécies de vetores (Chappuis *et al.*, 2007).

As manifestações clínicas da doença dependem, principalmente, da espécie infectiva do parasita e da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro mamífero durante e após a infecção (Tavares *et al.*, 2009).

A LV, uma das formas clínicas clássicas das leishmanioses, caracteriza-se por ser uma doença que acomete as vísceras do paciente sendo invariavelmente fatal, quando não tratada (Daher *et al.*, 2009). O período de incubação da doença no homem pode variar de 3 a 8 meses, com um alcance de 10 dias a 34 meses (Piscopo e Mallia, 2006). A doença é, normalmente, precedida por uma lesão seca ou ulcerada no local da picada do vetor. Os sinais sistêmicos de febre intermitente de grau médio, anemia, hepatoesplenomegalia e caquexia progressiva desenvolvem-se em níveis variáveis, de semanas a alguns anos após a infecção. Sinais clínicos menos frequentes incluem linfadenopatia, diarréia persistente e, em alguns casos, sintomas neurológicos. A doença em estágio avançado é fatal devido às infecções concomitantes resultantes do estado imunológico enfraquecido do paciente (Ashford, 2000; Lima *et al.*, 2003).

A imunossupressão associada à infecção pelo HIV ou seguida por tratamento imunossupressor de transplantes aumenta a susceptibilidade do SNC à ação dos parasitas. No entanto, independente do estado imunológico do paciente, a manifestação neurológica mais comum na LV é a neuropatia periférica, apesar da existência de relatos sobre a disfunção dos nervos cranianos e meningites. As manifestações clínicas envolvendo o SNC são mais escassas, porém, têm sido relatadas nos indivíduos com imunossupressão. O envolvimento do SNC parece ocorrer via extensão da infecção contígua, na maioria das vezes, através dos seios paranasais. Além de neuropatias periféricas dolorosas, há também relatos de doença desmielinizante ascendente, semelhante à síndrome de *Guillain-Barre*, porém, em grande parte, localizada no sistema nervoso periférico (SNP) (Walker *et al.*, 2006).

Apesar de ser uma doença grave, nem todos os indivíduos infectados desenvolvem a forma clínica fatal de LV. A desnutrição, as situações de estresse e deficiências no sistema imunológico do hospedeiro humano são fatores que contribuem para a maior gravidade dos sintomas da doença e não é de se estranhar que epidemias de LV são quase sempre

associadas à fome, pobreza e a um estado de imunossupressão (Hommel, 1999). A infecção pelo HIV, por exemplo, pode aumentar de 10 a 100 vezes o risco de desenvolvimento de LV em áreas endêmicas (Daher *et al.*, 2009).

As manifestações clínicas da LV canina (LVC), similar à doença humana, também podem variar consideravelmente e são dependentes da interação da espécie infectiva, da resposta imunológica apresentada pelo cão e da fase atual da doença. O período de incubação pode variar de 1 mês a 4 anos (Lanotte *et al.*, 1979; Keenan *et al.*, 1984). As principais manifestações na fase aguda da LVC são: linfadenomegalia generalizada, febre e ausência de lesões na pele (Alvar *et al.*, 1994; Ciaramella *et al.*, 1997; Ferrer *et al.*, 1999). As manifestações clínicas na fase crônica da LVC compreendem a linfadenomegalia, alopecia, caquexia (enfraquecimento crônico do animal), lesões cutâneas tais como úlceras, dermatite esfoliativa e onicogribose; anemia, hepatoesplenomegalia, disfunção renal severa, trombose, colites e comprometimento do SNC dos animais (Gonzalez *et al.*, 1990; Abranches *et al.*, 1991; Ferrer *et al.*, 1991; Ciaramella *et al.*, 1997; Font e Closa, 1997; Tafuri *et al.*, 2001).

2.3.5. Diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral

O diagnóstico da LV humana é dificultado pela semelhança dos sintomas clínicos com outras doenças de incidência mais comum, como malária e tuberculose e baseia-se, inicialmente, na detecção de anticorpos específicos às proteínas do parasita em amostras de soro dos pacientes. Nesses casos, a Análise de Imunoabsorção por Ligação Enzimática (ELISA), a Reação de Imunofluorescência Indireta (IFAT) e o Teste de Aglutinação Direta (DAT) são utilizados, porém, não apresentam a capacidade de diferenciar pacientes com a doença subclínica, com a doença na forma ativa ou com a mesma já curada. O diagnóstico definitivo é realizado por testes parasitológicos, nos quais se realizam culturas de aspirados do baço, fígado e medula óssea; embora os métodos de coleta sejam considerados invasivos e por isso não são recomendados (Sundar e Rai, 2002; Tavares *et al.*, 2003). Métodos baseados em técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que são aplicados na detecção de DNA dos parasitas, são mais confiáveis em sua identificação, não só dos casos ativos da doença, como também no monitoramento da cura parasitológica após o tratamento quimioterápico. No entanto, um resultado negativo da PCR, com a existência de uma suspeita clínica, não é suficiente para descartar uma possível infecção. Paralelamente, a utilização da PCR em triagens de campo é dificultada, pois há necessidade de equipamentos específicos e do emprego de pessoal técnico qualificado (Maia e Campino, 2008).

O diagnóstico clínico-laboratorial da LVC também é dificultado por uma série de fatores, como a ocorrência de manifestações clínicas variadas da doença nos animais, a ausência de lesões características da doença nos estágios iniciais da mesma e à baixa sensibilidade e/ou especificidade dos testes sorológicos utilizados (Roura *et al.*, 1999).

As técnicas laboratoriais empregadas no diagnóstico da LVC apresentam sensibilidade e especificidade variáveis e, nos estágios iniciais da doença, uma porcentagem elevada dos animais pode-se apresentar soronegativos e outros, mesmo clinicamente curados, podem permanecer sorologicamente reativos por longos períodos de tempo (Ferrer *et al.*, 1995). Ressalta-se também que a especificidade dos testes é comprometida quando os mesmos são utilizados em áreas endêmicas de outras parasitoses, como a doença de Chagas, uma vez que uma reatividade cruzada elevada nas amostras de soro dos animais em relação aos antígenos dos dois parasitas é observada (Ferrer *et al.*, 1995; Mancianti *et al.*, 1996; Tavares *et al.*, 2003). Dessa forma, tais fatores acarretam taxas de infecções subestimadas e, conseqüentemente, permitem a manutenção dos animais infectados nas áreas endêmicas.

O tratamento das leishmanioses envolve a aplicação local e/ou sistêmica de compostos antimoniais pentavalentes, dos quais os mais utilizados são o estibogluconato de sódio (Pentostan[®], Glaxo Wellcome, Inglaterra) e o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime[®], Rhône Poulenc Rorer, França) (Herwaldt, 1999). A utilização de antimoniais pentavalentes no tratamento da LV humana apresenta limitações que reduzem a adesão dos pacientes ao mesmo. Entre elas, a longa duração do tratamento (de cerca de 1 mês), as vias de aplicação utilizadas (intramuscular ou endovenosa) e os fortes efeitos colaterais provocados (Romero *et al.*, 2001). No Brasil, o antimoniato de N-metilglucamina tem sido utilizado como a droga de escolha. Fármacos como a anfotericina B e o isotiocianato de pentamidina são recomendados nos casos de intolerância ou resistência ao tratamento e devem ser administrados em ambiente hospitalar (Ministério da Saúde, Brasil, 2003). Paralelamente, o tratamento quimioterápico da LVC não é recomendado pela OMS, uma vez que pode ocorrer o aumento dos casos de resistência dos parasitas aos fármacos comumente utilizados no tratamento da LV humana, além do fato de que cães clinicamente saudáveis ainda podem conter parasitas na pele comportando-se como reservatórios dos mesmos (Grimaldi e Tesh, 1993).

2.3.6. Medidas profiláticas e de controle das leishmanioses

As medidas profiláticas e de controle das leishmanioses visam, principalmente, à interrupção do ciclo biológico do parasita; entretanto, o número elevado de diferentes espécies do parasita que podem causar doença em mamíferos, o caráter zoonótico da doença e a manutenção do ciclo biológico em vetores silvestres dificultam a adoção de medidas de controle eficazes (Tesh, 1995).

O controle do vetor pode ser realizado pela aplicação de inseticidas no ambiente doméstico e peridoméstico. Entretanto, sua utilização possui eficácia relativa, principalmente, em regiões florestais. No que se refere à LVC, o cão, como importante hospedeiro reservatório doméstico do parasita, representa uma fonte importante de infecção para o vetor e se comporta como um elo na manutenção da transmissão entre o mesmo e o homem (Tesh, 1995; Barbieri, 2006).

Até o presente momento, a eliminação de cães infectados tem se constituído como a principal medida profilática adotada pelos órgãos de Saúde competentes na tentativa de se controlar a disseminação da doença (Tesh, 1995). Entretanto, devido ao fato de serem animais de estimação, a eliminação de cães infectados, mas clinicamente saudáveis nem sempre é bem vista pelo seu proprietário que, muitas vezes, prefere omitir a doença aos órgãos competentes.

Paralelamente, a eliminação de reservatórios do parasita, como marsupiais e roedores silvestres, não é uma medida executável por ser considerada ecologicamente incorreta. Há, ainda, a possibilidade de adaptação do parasita a outros reservatórios existentes no mesmo ambiente, quando ocorre a eliminação de um dos reservatórios utilizados por ele (Grimaldi e Tesh, 1993; Gramiccia e Gradoni, 2005).

O tratamento dos casos humanos e a utilização de repelentes individuais não apresentam impacto significativo na redução dos casos da doença (Grimaldi e Tesh, 1993). Assim, a pesquisa por uma vacina eficaz contra a doença parece ser a melhor alternativa para seu controle. No entanto, devido à diversidade epidemiológica da doença e ao grande número de espécies que podem causar leishmanioses, o desenvolvimento de vacinas efetivas contra a doença é uma tarefa árdua e complexa, embora considerada uma solução real e importante (Gonzalo *et al.*, 2002; Sukumaran *et al.*, 2003; Desjeux, 2004).

2.4. IMUNOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

Segundo Scott (2003), a resistência à infecção por *Leishmania* parece ocorrer por meio de uma resposta imune específica do tipo celular por parte do hospedeiro mamífero infectado. O mecanismo imunológico efetor responsável pelo controle dos parasitas parece ser decorrente da ativação de macrófagos via IFN- γ .

A utilização de modelos murinos em estudo de vacinação contra as leishmanioses permitiu a identificação de dois subtipos diferentes de linfócitos T que produzem e secretam citocinas capazes de induzir funções efetoras diferentes. Os estudos que utilizaram como base o modelo murino de infecção por *L. major* em camundongos BALB/c, proposto por Sacks *et al.* (2002), definiram o paradigma Th1/Th2 de resistência/susceptibilidade à infecção e o papel de citocinas como a interleucina-12 (IL-12) e interleucina-4 (IL-4), respectivamente, no desenvolvimento de linhagens de células Th1 e Th2 (Alexander e Bryson, 2005).

A inoculação de *L. major* em linhagens de camundongos geneticamente resistentes ao parasita como C57BL/6, C57BL/10, C3H/HeN, CBA e B10.D2, resulta no desenvolvimento de uma lesão cutânea inicial, seguida do seu controle e resolução apenas algumas semanas após a infecção. A resistência e cura estão associadas à ativação e diferenciação seletivas das células T em LT CD4⁺ helper 1 (Th1) que produzem citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12. Por sua vez, a inoculação de *L. major* em linhagens de camundongos geneticamente susceptíveis como BALB/c, DBA/2 e A/Jax, resulta em uma lesão cutânea progressiva, que não apresenta cura espontânea, na qual o parasita pode visceralizar e causar uma doença fatal ao animal. Nestes animais, há a diferenciação de células T em LT CD4⁺ helper 2 (Th2) que produzem citocinas como IL-4, interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13) (Locksley e Scott, 1991; Launois *et al.*, 2002).

Os macrófagos são as principais células da linhagem monocítico-fagocitária parasitadas por *Leishmania*. Espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e óxido nítrico (NO) são os principais responsáveis pela atividade leishmanicida dos macrófagos. O NO é produzido nos macrófagos a partir do metabolismo da L-arginina, em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). Citocinas como IFN- γ e TNF- α estimulam a expressão de iNOS enquanto que IL-4, IL-10 e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) inibem sua expressão, tornando a célula refratária à atividade microbicida (Brunet, 2001; Van der Veen, 2001).

Espécies de *Leishmania* que causam LT normalmente exigem um padrão de resposta imune do tipo Th1 para a cura em modelos murinos (Wilson *et al.*, 2005). A imunidade protetora na infecção visceral, relacionada ao padrão de resposta Th1, ocorre na presença de citocinas ativadoras de macrófagos, como IL-12 e IFN- γ , pela formação de granulomas, estruturas capazes de conter a infecção pela ação de células fagocitárias mononucleares e que são ativadas por IFN- γ (Murray *et al.*, 2002). No entanto, em paralelo à doença causada por *L. major*, a dicotomia do perfil de resposta imune Th1 e Th2 não é evidente em modelos murinos de LV (Ahmed *et al.*, 2003).

Na LV murina, o perfil de resposta Th1, protetor na LC, é reprimido pela produção de citocinas como IL-10 e TGF- β . *L. chagasi* afeta diretamente seu microambiente local pela produção de TGF- β de modo a suprimir a atividade leishmanicida dos macrófagos parasitados por tal espécie (Wilson *et al.*, 2005). Assim, o fenótipo de susceptibilidade à LV murina parece mais se relacionar à incapacidade de desenvolvimento de uma resposta Th1 efetiva ao invés da elaboração de uma resposta Th2 exacerbada (Miralles *et al.*, 1994). A citocina IL-4 não parece ser suficiente para influenciar a resposta Th1 nem o curso da infecção por *L. donovani* em camundongos BALB/c, ao contrário do observado pela ação da IL-10 (Miralles *et al.*, 1994). A existência de um ou mais fatores solúveis, como o TGF- β , parecem exercer este efeito relacionado à expressão de IL-10, o que sugere que a modulação negativa da resposta Th1, na infecção visceral murina, cause a susceptibilidade à doença (Wilson *et al.*, 1998).

A resposta imune no cão, normalmente, tem sido avaliada através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR). Entretanto, existe grande variabilidade na metodologia utilizada em relação ao material utilizado para a extração do RNA mensageiro (mRNA) das citocinas; tais como células mononucleares do sangue periférico (PBMC), aspirados de medula, linfonodos ou de outros órgãos. Há divergência também quanto à raça dos cães utilizada, quanto ao tipo de infecção desenvolvida nos animais (natural ou experimental) e finalmente, quanto à espécie de *Leishmania* com a qual o animal foi infectado (Quinnell *et al.*, 2001).

A resistência de cães assintomáticos à infecção por *L. infantum* parece estar relacionada à produção de citocinas como IFN- γ , IL-12 e TNF- α . A IL-12 e o TNF- α foram detectados, principalmente, em cães assintomáticos; nos animais sintomáticos, por sua vez, não houve detecção de IFN- γ (Pinelli *et al.*, 1994). Uma predominância na expressão de citocinas relacionadas à resposta Th1, como IFN- γ e IL-12, foi observada em cultivos de

PBMC estimulados com antígenos do parasita em cães infectados com *L. infantum*. Houve um aumento considerável da porcentagem de cães que expressavam IFN- γ entre o 8^o e o 11^o mês após a infecção. Este período foi caracterizado como o que antecede o estabelecimento da infecção, pois, após este período, houve uma queda acentuada na expressão das citocinas e no aparecimento dos sinais clínicos sugerindo que IFN- γ e IL-12 atuariam impedindo a progressão da doença (Santos-Gomes *et al.*, 2002).

Estudos sobre a resposta humoral canina mostram um aumento dos níveis das imunoglobulinas do tipo G2a (IgG2a) específicos ao parasita em cães assintomáticos e naqueles resistentes à infecção. Já um aumento dos níveis de produção de imunoglobulinas do tipo G1 (IgG1) foi relacionado ao desenvolvimento da doença nos animais infectados (Deplazes *et al.*, 1995; Bourdoiseau *et al.*, 1997).

2.5. MODELO MURINO PARA ESTUDO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O principal pré-requisito para a escolha de um modelo animal aplicado ao estudo das leishmanioses é o de que o mesmo deve apresentar certa correspondência com a fisiologia humana e, ao mesmo tempo, que sua disponibilidade e tratamento não devam ser tarefas complicadas (Awasthi *et al.*, 2004).

As espécies causadoras da LV (*L. donovani* e *L. infantum/L. chagasi*) e da LT (*L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* e *L. amazonensis*), com exceção de *L. braziliensis*, espécie causadora de LMC, são capazes de infectar camundongos e reproduzir, com relativa facilidade, espectros da doença humana, facilitando a utilização desses animais como modelos de estudo não somente da genética do hospedeiro vertebrado e do controle da infecção, como também para determinar como as repostas imunes são desenvolvidas e reguladas (Alexander e Bryson, 2005).

Os estudos iniciais utilizaram, como base, o modelo murino de infecção por *L. major*, proposto por Sacks *et al.* (2002), e definiram o paradigma Th1/Th2 de resistência/susceptibilidade à infecção por LC (Alexander e Bryson, 2005). No entanto, muitos modelos experimentais de estudo da LV têm sido utilizados sem que nenhum deles reproduza com precisão o que é observado no hospedeiro mamífero. O hamster sírio, *Mesocricetus auratus* parece ser um modelo adequado para a caracterização da doença, uma vez que a infecção de hamsters com *L. donovani* reproduz as características clínicas e patológicas da LV humana, causando até a morte do animal. No entanto, o hamster parece não ser um bom modelo para o desenvolvimento de vacinas, devido a sua insuficiência para produção de NO. Além disso, a falta de reagentes adequados para as análises imunológicas faz com que o hamster não seja o modelo mais empregado, sendo mais utilizado na manutenção de cepas virulentas (Carrión *et al.*, 2006).

Alguns animais comportam-se como importantes hospedeiros experimentais para estudos *in vivo* de testes vacinais da LV. Entre eles, destacam-se os camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 (Quadro 1) para testes primários; cães para testes secundários e primatas e esquilos para testes terciários (Garg e Dube, 2006). A disponibilidade e facilidade de manuseio dos camundongos e a susceptibilidade dos mesmos para a LV tem feito desses animais os mais utilizados nos modelos experimentais (Carrión *et al.*, 2006).

Quadro 1 – Modelos murinos experimentais utilizados em testes vacinais contra a leishmaniose visceral

Animal / linhagem	Parasita	Via de infecção	Características
Camundongo:			
BALB/b	<i>L. chagasi</i>	endovenosa (EV)	Tipo de cura espontânea à não-cura
BALB/c	<i>L. donovani</i>	intradérmica (ID)	Resposta Th1/Th2
C57BL/6	<i>L. infantum</i>	subcutânea (SC)	Todos os marcadores imunológicos estão disponíveis Bom modelo para estudos da resposta imune protetora

Fonte: Garg e Dube, 2006, p.443, com modificações

A LV murina causada por *L. donovani* tem sido amplamente estudada, porém, tal modelo não reproduz as características da LV humana. Nesses animais, há o aumento da carga parasitária no início da infecção, mas cerca de 4 a 8 semanas após, os animais são capazes de montar uma resposta imune celular anti-*Leishmania* eficiente e controlar a infecção. Esse controle é mediado pela produção de IFN- γ por células T esplênicas e por um padrão de resposta do tipo Th1, via participação da IL-12. A produção de NO, através do aumento da regulação de iNOS mediada por IFN- γ , é um mecanismo crítico no controle da infecção, no qual macrófagos efetores estão envolvidos no controle da replicação de parasitas em camundongos. Desse modo, o modelo murino de infecção por *L. donovani* é um bom modelo de replicação precoce de parasitas seguido do controle imunológico da infecção subclínica, mas não há modelo murino para a progressão da doença observada na LV humana (Melby *et al.*, 2001).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar diferentes modelos de infecção causada por *Leishmania chagasi* em camundongos BALB/c, relacionando a carga parasitária com a resposta imune celular e humoral geradas após a infecção experimental, nos diferentes períodos de tempo.

3.2. Objetivos Específicos

1. Infectar camundongos BALB/c com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *Leishmania chagasi* (cepa MHOM/BR/1970/BH46) utilizando diferentes vias de infecção (subcutânea ou endovenosa) e inóculos infectivos (10^3 , 10^5 ou 10^7 parasitas);
2. Determinar a carga parasitária no baço, fígado, medula óssea femural, linfonodo inguinal e parênquima cerebral dos animais infectados, por meio da técnica de diluição limitante, nos diferentes períodos de tempo avaliados após a infecção experimental;
3. Relacionar os resultados obtidos na carga parasitária do parênquima cerebral dos animais com os resultados da PCR realizada em diferentes períodos de tempo;
4. Avaliar o perfil da resposta imune celular gerada por meio da dosagem das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10, produzidas após a cultura *in vitro* dos esplenócitos dos animais infectados;
5. Avaliar o perfil da resposta humoral gerada por meio da produção dos subtipos de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos aos parasitas nos animais infectados, após os diferentes períodos de tempo;
6. Avaliar diferentes modelos de infecção com a espécie *L. chagasi* em camundongos BALB/c relacionando com os resultados obtidos de carga parasitária nas diferentes vísceras e, em especial, no sistema nervoso central dos animais infectados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Animais de Experimentação

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade. Os animais foram adquiridos junto ao Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos nos biotérios do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB e do Setor de Patologia Clínica do Colégio Técnico (COLTEC) da UFMG. O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG e encontra-se sob avaliação.

4.1.2. Parasitas

A cepa MHOM/BR/1970/BH46 de *Leishmania chagasi* foi gentilmente cedida pela professora Maria Norma Melo, coordenadora do Laboratório de Leishmanioses, Setor de Biologia de *Leishmanias*, do Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG.

Formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. chagasi* foram preparadas, conforme descrito a seguir, e utilizadas nos protocolos de infecção.

Os parasitas foram cultivados em meio de Schneider completo, o qual foi constituído pelo meio de Schneider (Schneider's Insect Medium, BR30100-05, LGCBIO) acrescido com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado (10-bio500, LGCBIO), 200 unidades por mililitro (U/mL) de penicilina e 200 microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) de estreptomicina (Penicillin-Streptomycin solution, P0781, Sigma). Os parasitas permaneceram em cultivo a 24 graus *Celsius* ($^{\circ}\text{C}$) e repiques foram efetuados para sua manutenção. Estoques de parasitas foram congelados em glicerol estéril e armazenados em nitrogênio líquido.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparo do extrato protéico solúvel de *Leishmania chagasi*

Os parasitas foram cultivados em meio de Schneider completo e a 24°C. Após cinco dias de cultivo e sendo constatada sua viabilidade e a ausência de agentes contaminantes no meio, as formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram quantificadas em câmara de Neubauer sendo ajustadas para a concentração final de 2×10^8 promastigotas por mililitro (mL).

Para o preparo do extrato protéico solúvel (SLA) de *L. chagasi*, os parasitas foram recuperados por centrifugação a 2900 x g, por 20 minutos (min), e lavados por quatro vezes em tampão salina-fosfato pH 7,4 (PBS) estéril, o qual foi constituído por 8,0 gramas (g) de NaCl, 1,16 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KH₂PO₄, 0,2 g KCl e água destilada na quantidade suficiente para (*q.s.p.*) 1 L (litro). O precipitado foi ressuspendido em 5 mL de PBS estéril e submetido a seis ciclos de choque térmico, com congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C (Coelho *et al.*, 2003).

O extrato protéico solúvel foi coletado após centrifugação a 6000 x g por 20 min e sua concentração foi estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

4.2.2. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas presentes no SLA de *L. chagasi* foi estimada pelo método descrito por Bradford (1976), com algumas modificações:

Vinte microlitros (µL) da amostra bruta foram acrescentados em 180 µL de água destilada. Dessa diluição, foram adicionados 5, 10, 15 e 20 µL, em duplicata, em placas de microtitulação de 96 poços e 15, 10, 5 e 0 µL de água destilada, respectivamente. Após, 180 µL do reagente de Bradford foi acrescentado, perfazendo, em todos os poços, um total de 200 µL de volume final de reação. O reagente “branco” foi constituído por 20 µL de água destilada e 180 µL do reagente de Bradford. Após 20 min de incubação da reação ao abrigo da luz, a intensidade da cor, em absorbância (Abs), foi determinada em leitor de ELISA (BioRad), no comprimento de onda de 600 nanômetros (nm). A concentração de proteínas nas amostras foi estimada após a construção de uma curva padrão, a partir de uma solução de albumina sérica bovina (BSA) na concentração de 1 miligrama por mililitro (mg/mL).

4.2.3. Protocolos de infecção experimental

Os modelos de infecção realizados neste trabalho foram baseados em modelos utilizados por Carrión *et al.* (2006), com modificações.

Para tanto, grupos de camundongos BALB/c (n=12, por grupo) foram inoculados pela via subcutânea (SC) no coxim plantar direito com 10^3 , 10^5 ou 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. chagasi*. Animais (n=12) foram também inoculados pela via endovenosa (EV) na veia lateral da cauda com 10^7 promastigotas por animal. Como controle do experimento, camundongos (n=12) receberam apenas o diluente usado na preparação dos parasitas, pela via subcutânea.

Após 15, 30, 45 e 60 dias da infecção desafio, animais (n=3, por grupo, em cada período de tempo) foram sacrificados e amostras do baço, fígado, cérebro, medula óssea femural, linfonodo inguinal e alíquotas de sangue foram coletados, processados e/ou armazenados para as análises imunológicas. Os experimentos foram repetidos por duas vezes, com resultados similares.

4.2.4. Isolamento e cultivo dos esplenócitos

Os camundongos infectados e os animais do grupo controle, inoculados com PBS, foram sacrificados após 15, 30, 45 e 60 dias da infecção e uma amostra do baço foi coletada para o isolamento, cultivo e estimulação dos esplenócitos e posterior análise das citocinas produzidas e encontradas nos sobrenadantes da cultura celular.

Os órgãos foram macerados em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, BR30003-05, LGCBIO) completo, o que foi constituído pelo meio DMEM acrescido com 20% de SFB inativado, 200 U/mL de penicilina e 200 µg/mL de estreptomicina.

Após a maceração do órgão, as células foram lavadas em meio DMEM incompleto e o material foi submetido à lise das hemácias com uma solução de lise (17 mM de Tris HCL em pH 7,4 e 144 mM de NH_4Cl) durante 4 min. Em seguida, interrompeu-se a reação de lise pela adição do meio DMEM incompleto e as células foram recuperadas por centrifugação (1500 x g por 10 min e a 4°C) e ressuspendidas em 1 mL de DMEM completo.

As células foram quantificadas na câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração final de 2×10^6 células por mL sendo, em seguida, diluídas em meio DMEM completo e plaqueadas em placas de cultivo celular de 24 poços (cód. 83.1836, Sarstedt).

Para a estimulação dos esplenócitos, utilizou-se a menor concentração possível do SLA *L. chagasi* capaz de induzir a máxima produção de citocinas, definida por meio de uma curva padrão “dose-resposta”. Assim, a concentração de SLA *L. chagasi* utilizada foi de 50 µg/mL (curva de 10 a 100 µg/mL; dados não mostrados). A concanavalina A (ConA; 5 µg/mL) foi utilizada como controle de viabilidade celular. Após o acréscimo das células e dos estímulos, em duplicata, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, por 48 horas (h). Como controle do experimento, as células foram acrescentadas sem estímulo. Após o período de incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as citocinas foram quantificadas.

4.2.5. Avaliação da resposta imune celular

O perfil da resposta imune celular foi avaliado pela produção das citocinas interferon-gama (IFN-γ), interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) nos sobrenadantes das culturas dos esplenócitos. As dosagens das citocinas foram realizadas por Análise de Imunoabsorção por Ligação Enzimática (ELISA) de captura com emprego dos kits “BD OptEIA™ Set Mouse IL-4” (cat. 2651KI, BD Bioscience), “BD OptEIA™ Set Mouse IL-10” (cat. 2657KI, BD Bioscience) e “BD OptEIA™ Set Mouse IFN-γ” (cat. 2612KI, BD Bioscience), de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.6. Avaliação da resposta humoral

Após 15, 30, 45 e 60 dias da infecção desafio, o perfil da resposta humoral nos animais infectados e no grupo controle foi avaliado pela produção dos anticorpos IgG1 e IgG2a específicos ao parasita (SLA *L. chagasi*), avaliados por ELISA direta. Para tanto, após o sacrifício dos animais, aproximadamente 1 mL de sangue total foi retirado do plexo braquial e as amostras foram centrifugadas (1500 x g por 15 min e a 4°C) para a obtenção dos soros. Os ensaios foram realizados em placas flexíveis de cloreto de polivinil (PVC), 96 poços (cód. 353912, DL Falcon), utilizando-se o SLA *L. chagasi* como antígeno sensibilizador.

Curvas de titulação foram realizadas para a determinação da menor concentração possível de antígeno a ser utilizado na sensibilização das placas, sem a alteração qualitativa dos resultados. Dessa forma, foi determinada a concentração de 2 microgramas (µg) de SLA

de *L. chagasi* (curva de 0,5 a 4 µg; dados não mostrados). Curvas de titulação com as amostras de soro foram também realizadas. Nesse caso, a diluição de 1:50 foi utilizada (dados não mostrados).

As placas foram sensibilizadas com o SLA de *L. chagasi* diluído em tampão carbonato/bicarbonato (0,1 M de Na₂CO₃ e 0,05 M de NaHCO₃, pH 9,6) e incubadas a 4°C, por 16 h. Em seguida, 4 lavagens foram efetuadas com solução de lavagem (PBS 0,15 M e 0,05% de Tween 20). Após a secagem das placas, a solução bloqueadora (PBS 0,15 M pH 7,4 e caseína 3%) foi acrescentada e as placas foram incubadas por 2 h e a 37°C. Novamente, as placas foram lavadas por 4 vezes e as amostras de soro foram acrescentadas na diluição de 1:50, em duplicata, diluídas em tampão de incubação (PBS 0,15 M pH 7,4; caseína 0,3% e 0,05% de Tween 20) e mantidas em incubação por 1 h e a 37°C.

Para a determinação das absorvâncias de IgG1 e IgG2a, as placas foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem e os anticorpos anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo, conjugados à enzima peroxidase (HRP, Sigma), foram acrescentados na diluição de 1:5000 diluídos em tampão de incubação e as placas foram mantidas em incubação por 1 h e a 37°C. Após 5 lavagens, a solução reveladora foi acrescentada. Essa, foi composta por *orto*-fenilenodiamino (OPD) a 0,002% e H₂O₂ 20 volumes para cada 100 mL de tampão citrato-fosfato 0,5 M (Na₂HPO₄ 24 mM, C₆H₈O₇ 17,5 mM; *q.s.p.* 1 L de água destilada, pH 5,0). As placas foram incubadas por 30 min, ao abrigo da luz, e a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 2 N. A leitura das absorvâncias foi realizada em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 492 nm. Em todos os ensaios, controles foram utilizados.

4.2.7. Quantificação de parasitas

A carga parasitária foi avaliada em fragmentos coletados do fígado, baço, linfonodo inguinal, medula óssea femural e cérebro dos animais infectados; 15, 30, 45 e 60 dias após a infecção desafio, pelo método da diluição limitante conforme descrito por Buffet *et al.* (1995), com modificações.

Para tal, após o sacrifício dos animais, fragmentos dos órgãos foram coletados, homogeneizados em meio de Schneider incompleto, na proporção de 100 miligramas (mg) de tecido para cada 1 mL de meio, e macerados em triturador de vidro estéril. A suspensão foi plaqueada e diluições sucessivas foram realizadas até a ordem de grandeza de 10⁻⁸, em placas de cultura celular de 96 poços (cód. 83.1835, Sarstedt).

Para a coleta da medula óssea, o fêmur livre do tecido circundante foi obtido e suas extremidades foram excisadas com material cirúrgico estéril para expor a cavidade óssea. Uma agulha de calibre 0.3 (30 G) foi inserida na cavidade e a medula óssea foi obtida após lavagem da cavidade femural com 1 mL de PBS estéril. A suspensão de células foi utilizada na determinação da carga parasitária. O tecido homogeneizado foi diluído em meio de Schneider completo até a ordem de grandeza de 10^{-8} e cultivado em placa de cultura celular de 96 poços (Sarstedt).

As placas de cultura celular foram incubadas por 7 dias a 24°C e, após esse período, foram levadas a um microscópio trinocular invertido (modelo Axiovert 25, Zeiss) e o resultado final foi determinado pelo logaritmo (log) da maior diluição na qual parasitas viáveis podiam ser visualizados e o inverso da maior diluição foi considerado o número de parasitas por mg de tecido.

4.2.8. Detecção de parasitas no parênquima cerebral de camundongos BALB/c por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

Camundongos BALB/c infectados ou inoculados com PBS foram sacrificados após 15, 30, 45 e 60 dias do desafio e amostras de seu parênquima cerebral foram coletadas e armazenadas a -20°C, até o momento do uso.

A extração e purificação do ácido desoxirribonucléico (DNA) das amostras do parênquima cerebral dos animais foram realizadas utilizando-se o kit comercial Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System (A2360, Promega), com o protocolo adaptado para uso em microcentrífuga, de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação do DNA de *L. chagasi*, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), o desenho dos iniciadores (“primers”), bem como o protocolo da reação foram realizados segundo a técnica descrita por Piarroux *et al* (1993), com modificações.

Para tal, a amplificação do DNA de *L. chagasi* foi realizada em termociclador (PTC-100[®], M.J. Research Inc., EUA) utilizando o par de iniciadores LV₁ (5' ACGAGGTCAGCTCCACTCC 3') e LV₂ (5' CTGCAACGCCTGTGTCTACG 3'), específicos para o complexo *L. donovani* (Invitrogen, Brasil). Para a reação de PCR, 0,8 a 2,0 µL de DNA foram adicionados a uma mistura contendo 1,0 µL do iniciador LV₁ (10 pM/µL), 1,0 µL do iniciador LV₂ (10 pM/µL), 5,0 µL da solução de *Go Taq[®] Green Master Mix* (kit *Go Taq[®] Green Master Mix*, Promega, EUA) e água deionizada *nuclease-free q.s.p.* para 10 µL. Em todas as reações, um controle positivo foi utilizado, o qual foi composto por 1 ng

(nanograma) de DNA de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR/1970/BH46, obtida em meio de cultura; e um branco da reação composto por todos os reagentes utilizados na PCR, exceto o DNA da *Leishmania*, também foi empregado. A amplificação foi realizada a partir da desnaturação inicial a 95°C por 5 min, desnaturação a 94°C por 30 s e o anelamento a 59°C por 30 segundos (s). Após, a extensão foi processada a 72°C por 30 s e a desnaturação a 94°C por 30 s, sendo seguidas por 33 ciclos repetitivos. A extensão final ocorreu a 72°C por 2 min.

Os produtos amplificados por PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em condição não-desnaturante, na concentração de 5%, em tampão TBE (89 mM Tris-Borato e 2 mM EDTA, pH 8,0), por aproximadamente 1 h e 30 min. O padrão de peso molecular “100 bp DNA Ladder” (Promega, EUA) foi utilizado como marcador de peso molecular.

Após a corrida eletroforética, os fragmentos amplificados foram visualizados por meio da coloração pela prata (Synth, Brasil), segundo a técnica descrita por Santos *et al.* (1993), com modificações. Para tal, o gel foi fixado à temperatura ambiente por 5 min em solução contendo 10% de etanol absoluto volume por volume (v/v) (Merck, Alemanha) e 0,5% de ácido acético v/v (Merck, Alemanha), seguido de incubação por 5 min em 150 mL de solução contendo 0,7% de nitrato de prata p/v (Synth, Brasil). Uma nova incubação foi realizada utilizando a solução reveladora, a qual foi composta por 3% de hidróxido de sódio peso por volume (p/v) (Merck, Alemanha) e 0,1% de formaldeído v/v (Merck, Alemanha) por 10 min ou até o aparecimento das bandas, sempre sob agitação suave (*Orbit Shaker*[®], Lab-Line). Posteriormente, o gel foi transferido para a solução fixadora e documentado por fotografia digital para análise.

A contaminação do experimento por *amplicons* foi inibida pelo uso de diferentes ambientes para o processamento das amostras, além dos processos rotineiros de descontaminação da área de trabalho.

4.2.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste *t* de Student para comparação de médias e o teste de Scott-Knott para as comparações múltiplas. O teste de Scott-Knott é um método de agrupamento utilizado como alternativa no qual procedimentos de comparações múltiplas são necessários, com a característica de não apresentar ambiguidades no resultado final. O nível de significância empregado foi de 5% e diferenças foram

consideradas significativas quando $P < 0.05$. Os resultados foram processados pelo software Sisvar, versão 5.1 Build 72.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Carga parasitária avaliada em diferentes órgãos e períodos de tempo em camundongos BALB/c após a infecção com *Leishmania chagasi*

Com o objetivo de avaliar a evolução da infecção visceral em camundongos BALB/c após a infecção desafio com *L. chagasi*; o baço, fígado, a medula óssea femural, o linfonodo inguinal e o parênquima cerebral dos animais infectados foram coletados em diferentes períodos de tempo e a carga parasitária foi determinada pela técnica de diluição limitante nos dias 15, 30, 45 e 60 após a infecção.

Na avaliação da carga parasitária no baço dos animais infectados, nos diferentes grupos e períodos de tempo avaliados, observou-se um aumento gradual no log do número de parasitas durante a evolução da infecção. Tal aumento foi observado de forma mais acentuada a partir do 30º dia da infecção desafio (Figura 2). A carga parasitária no baço dos camundongos inoculados com 10^3 ou 10^5 parasitas, pela via SC (grupos 1 e 2, respectivamente), mostrou-se significativamente menor ($P < 0,05$) quando comparada à dos animais inoculados com 10^7 parasitas, seja pela via SC ou EV (grupos 3 e 4, respectivamente), no 45º dia de infecção. Entre os animais infectados com 10^7 parasitas, aqueles inoculados pela via SC mostraram-se com uma maior média do log de parasitas recuperados ($P < 0,05$), quando comparados ao grupo infectado pela via EV. Assim, a recuperação da carga parasitária foi diretamente proporcional ao tamanho do inóculo infectivo e, quando avaliado o maior inóculo utilizado (10^7 parasitas), a rota de infecção pela via SC foi capaz de induzir uma infecção mais exacerbada nos animais.

Dessa forma, tal fato indica a existência de um maior número de parasitas no baço dos animais com a infecção realizada com 10^7 parasitas pela via SC e também que a avaliação da carga parasitária no baço de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi* pode ser realizada nos dias 45º ou 60º após o desafio, períodos nos quais as maiores diferenças significativas foram observadas em relação aos todos os grupos avaliados. Cabe ressaltar que animais infectados com 10^3 parasitas apresentaram uma manutenção de valores de carga parasitária entre os dias 45º e 60º após o desafio, o que pode indicar uma tendência ao controle de parasitas pelos mecanismos de defesa dos animais (Figura 2).

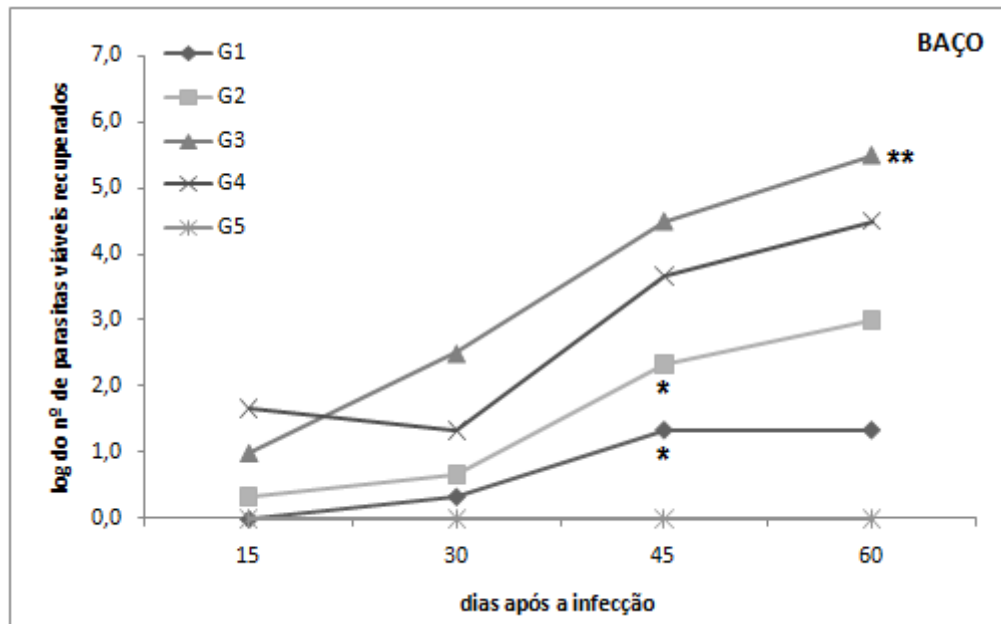


Figura 2 – Quantificação de parasitas no baço de camundongos infectados por *L. chagasi*. G1, G2 e G3: grupos de camundongos BALB/c inoculados com 10^3 , 10^5 e 10^7 parasitas por animal, pela via SC, respectivamente; G4: animais inoculados com 10^7 parasitas por animal, pela via EV; G5: animais inoculados com PBS, grupo controle do experimento. Cada ponto no gráfico representa a média do logaritmo (log) do número de parasitas viáveis recuperados. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. *indica diferença significativa em relação aos grupos 3 e 4, 45 dias após o desafio. **indica diferença significativa em relação ao grupo 4, 60 dias após o desafio.

Na avaliação da carga parasitária no fígado dos animais infectados, observou-se que, com a evolução da infecção experimental, houve um pico de carga parasitária no 30º dia após a mesma. No entanto, após a infecção tornar-se crônica, uma diminuição gradual da carga de parasitas foi visualizada nos diferentes grupos, podendo-se especular a ocorrência de uma fase de recuperação hepática (Figura 3).

De modo similar ao observado na avaliação da carga parasitária esplênica, o log de parasitas recuperados no fígado foi diretamente proporcional ao tamanho do inóculo infectivo. Assim, a carga parasitária em camundongos inoculados com 10^3 ou 10^5 parasitas (grupos 1 e 2, respectivamente) foi menor em todos os períodos avaliados e apresentou diferença significativa no 30º dia de infecção quando comparada ao grupo de animais inoculados com 10^7 parasitas pela via SC (grupo 3).

Mesmo com a gradual diminuição da carga parasitária nos grupos avaliados, parasitas ainda foram detectados no fígado dos animais 60 dias após a infecção. Em estudos realizados

em camundongos BALB/c e infecção com *L. infantum* pela via SC, Ahmed *et al.* (2003) demonstraram que a carga parasitária hepática atingiu um pico entre 20 e 30 dias após a infecção desafio e que, a partir daí, a mesma apresentou um declínio acentuado sugerindo a depuração dos parasitas pelos animais infectados.

Carrión *et al.* (2006) relataram que a persistência de parasitas no fígado de camundongos inoculados com um número elevado de parasitas (acima de 10^6 promastigotas de *L. infantum* por via EV) reflete uma limitação da resposta imune do fígado, que pode superar cargas relativamente baixas de parasitas (10^3), mas não uma carga parasitária elevada. Entretanto, neste trabalho, os resultados apresentados demonstraram que a recuperação hepática ocorreu, ainda que em menor proporção, mesmo naqueles camundongos inoculados com 10^7 parasitas pelas vias SC ou EV.

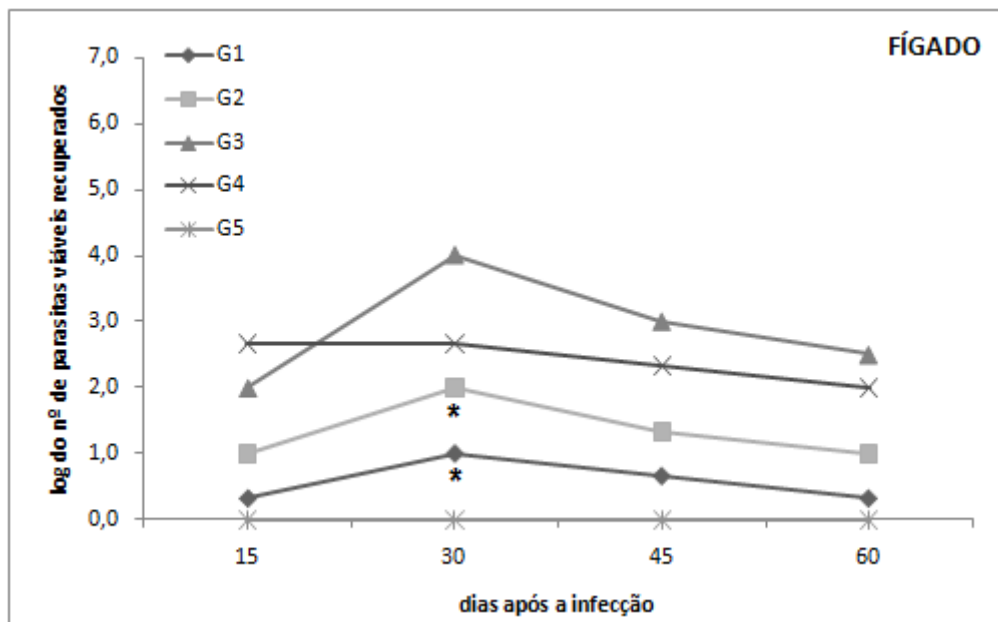


Figura 3 – Quantificação de parasitas no fígado de camundongos infectados por *L. chagasi*. G1, G2 e G3: grupos de camundongos BALB/c inoculados com 10^3 , 10^5 e 10^7 parasitas por animal, pela via SC, respectivamente; G4: animais inoculados com 10^7 parasitas por animal, pela via EV; G5: animais inoculados com PBS, grupo controle do experimento. Cada ponto no gráfico representa a média do logaritmo (log) do número de parasitas viáveis recuperados. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. *indica diferença significativa em relação ao grupo 3, 30 dias após o desafio.

Na avaliação da carga parasitária na medula óssea femural dos animais infectados, observou-se que, de forma similar à carga parasitária esplênica, houve um aumento gradual da mesma, relacionado à evolução da infecção, nos diferentes grupos experimentais, exceção feita aos animais do grupo infectado com 10^3 parasitas, nos quais no 60º dia após o desafio a média do log de parasitas recuperados foi menor ($P < 0,05$) em relação ao 45º dia após a infecção, o que pode indicar, neste caso, uma depuração de parasitas pelos mecanismos de defesa imune dos animais (Figura 4).

O aumento do log de parasitas nos grupos infectados com 10^5 ou 10^7 parasitas ocorreu de forma mais acentuada a partir do 45º dia de infecção. No 60º dia após a infecção, a carga parasitária dos animais inoculados com 10^7 parasitas pela via SC (grupo 3) foi significativamente maior ($P < 0,05$) quando comparada à dos camundongos infectados com 10^3 ou 10^5 parasitas pela via SC (grupos 1 e 2) ou com 10^7 parasitas pela via EV (grupo 4).

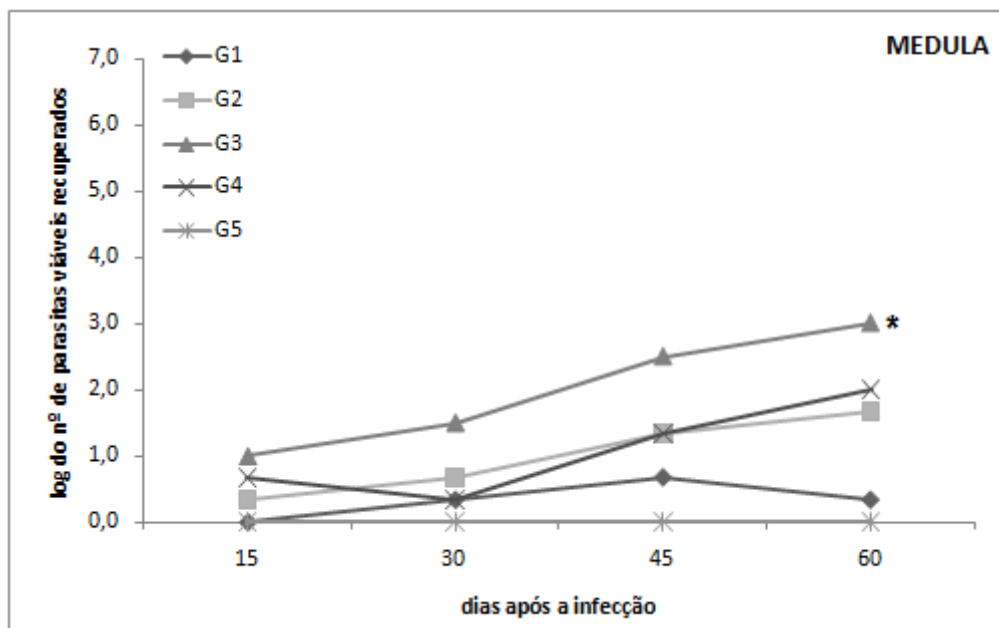


Figura 4 – Quantificação de parasitas na medula óssea femural de camundongos infectados por *L. chagasi*. G1, G2 e G3: grupos de camundongos BALB/c inoculados com 10^3 , 10^5 e 10^7 parasitas por animal, pela via SC, respectivamente; **G4:** animais inoculados com 10^7 parasitas por animal, pela via EV; **G5:** animais inoculados com PBS, grupo controle do experimento. Cada ponto no gráfico representa a média do logaritmo (log) do número de parasitas viáveis recuperados. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. *indica diferença significativa em relação aos grupos 1, 2 e 4, 60 dias após o desafio.

Na avaliação da carga parasitária no linfonodo inguinal dos animais inoculados com 10^3 , 10^5 ou 10^7 parasitas pela via SC (grupos 1, 2 e 3, respectivamente), observou-se um aumento gradual da mesma com a evolução do período de infecção. A exceção compreendeu os animais infectados com 10^3 parasitas, como observado nos valores encontrados da carga parasitária na medula óssea destes animais, nos quais, após o aumento da carga parasitária entre 15 e 30 dias, a mesma apresentou valores estáveis e uma tendência à diminuição com a evolução da infecção, o que pode indicar a depuração dos parasitas pelo sistema imune dos animais neste grupo experimental (Figura 5).

Os animais infectados com 10^5 ou 10^7 parasitas apresentaram valores crescentes de carga parasitária no linfonodo inguinal, na medida em que o tempo de evolução da infecção progredia, atingindo seu pico no 60^o dia de infecção. Pode-se notar também que, de maneira similar à observada na avaliação da carga parasitária nos demais órgãos avaliados, foram os animais infectados com 10^7 parasitas, pela via SC, que apresentaram os maiores níveis de recuperação de parasitas, indicando que a utilização de tal via de infecção pode-se constituir como a mais apropriada para a obtenção de uma infecção mais robusta e progressiva com a espécie *L. chagasi* em camundongos BALB/c.

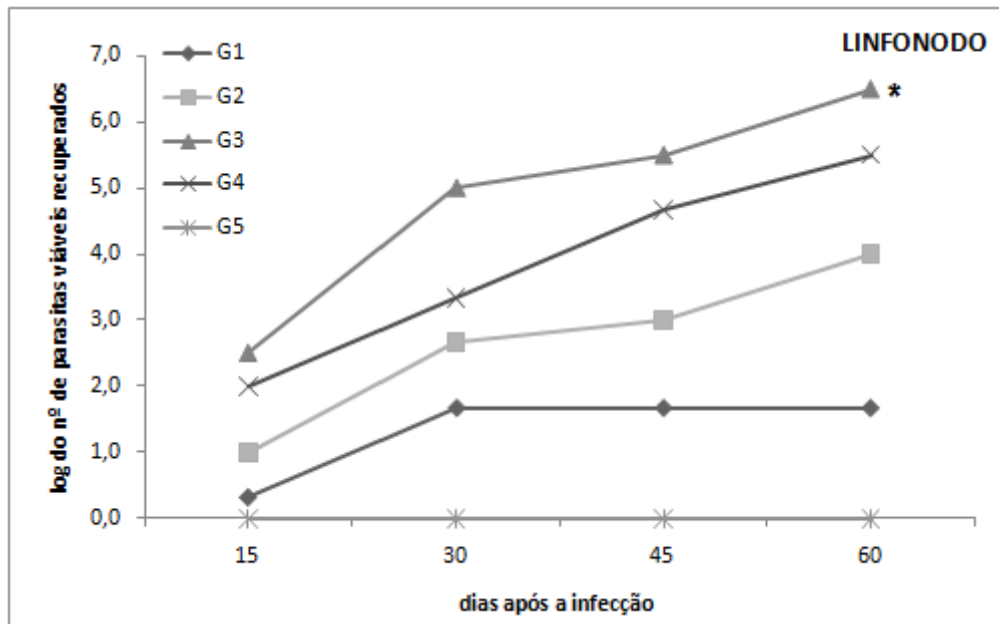


Figura 5 – Quantificação de parasitas no linfonodo inguinal de camundongos infectados por *L. chagasi*. G1, G2 e G3: grupos de camundongos BALB/c inoculados com 10^3 , 10^5 e 10^7 parasitas por animal, pela via SC, respectivamente; G4: animais inoculados com 10^7 parasitas por animal, pela via EV; G5: animais inoculados com PBS, grupo controle do experimento. Cada ponto no gráfico representa a média do logaritmo (log) do número de parasitas viáveis recuperados. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. *indica diferença significativa em relação aos grupos 1, 2 e 4, 60 dias após o desafio.

Em humanos e linhagens de camundongos susceptíveis, como BALB/c, o fígado, o baço e a medula óssea são os principais locais de manutenção de parasitas e da patologia da LV. No fígado, formas amastigotas multiplicam-se durante as primeiras semanas de infecção e, dependendo da linhagem do animal, são depuradas com o avançar do tempo após o desafio. A resistência hepática à infecção é resultado de uma resposta coordenada do hospedeiro e envolve uma ampla variação de vias efetoras e regulatórias específicas, dentro de estruturas definidas do tecido, chamadas de granulomas. Em contrapartida, o baço e a medula óssea tornam-se locais sistêmicos e de infecção crônica, para os quais os parasitas migram e podem sobreviver durante meses a anos (Engwerda e Kaye, 2000; Kaye *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que, na fase aguda de infecção, houve um maior encontro de parasitas no fígado dos animais infectados. Com o avançar da mesma, notou-se a diminuição gradual da presença de parasitas neste órgão e seu aumento no baço, na medula óssea e, especialmente, nos linfonodos. Tais fatos podem ser relacionados

com observações descritas por Carrión *et al.* (2006) as quais sugerem que, em um mesmo animal, a resposta imune desenvolvida pode contribuir para a eliminação de parasitas e que tal eliminação pode variar de órgão para órgão do animal.

Após a administração dos três diferentes concentrações de inóculos infectivos (10^3 , 10^5 e 10^7 parasitas) e de duas diferentes rotas de infecção (SC e EV), a infecção na medula óssea femural persistiu durante todo o experimento e tornou-se crônica. Segundo Carrión *et al.* (2006), a presença de parasitas na medula óssea de camundongos infectados pode ser tomada como um marcador da evolução de infecção com *L. infantum* e, sua ausência, um indicador de proteção em estudos de vacinas em modelos murinos contra a LV.

Paralelamente, observou-se também que, em todos os órgãos avaliados, houve uma relação direta entre a quantidade de parasitas recuperados e as diferentes concentrações de inóculos infectivos. Os resultados pontuam que, com uma infecção experimental realizada com 10^5 ou 10^7 parasitas, os animais desenvolvem uma infecção crônica que atinge órgãos sistêmicos de sua anatomia. No entanto, com a utilização de um inóculo infectivo de 10^3 parasitas, observou-se a detecção inicial dos mesmos nos linfonodos e no fígado dos animais, que diminui com a evolução da infecção e pode indicar que a mesma está sendo depurada pelo sistema imune do animal e que o mesmo pode vir a desenvolver um provável fenótipo de cura.

5.2. Avaliação da carga parasitária no parênquima cerebral de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania chagasi*

Com o propósito de avaliar a evolução da infecção visceral no cérebro de camundongos BALB/c após a infecção desafio com *L. chagasi*, o parênquima cerebral dos animais infectados foi coletado e a carga parasitária foi pela técnica de diluição limitante. Paralelamente, uma análise qualitativa da presença de parasitas neste órgão foi realizada com a pesquisa para detecção do DNA do parasita no parênquima cerebral dos animais infectados, pela técnica de PCR.

5.2.1. Determinação da carga parasitária no parênquima cerebral de camundongos BALB/c infectados, por meio da técnica de diluição limitante

A carga parasitária no cérebro dos camundongos infectados, após diferentes períodos de tempo, foi avaliada após a coleta do parênquima cerebral dos animais. Os resultados demonstraram uma menor presença geral de parasitas em relação aos demais órgãos avaliados, nos diferentes períodos de tempo. Observou-se ausência de parasitas no 15º dia de infecção. Entretanto, um aumento gradual no log da carga parasitária foi observado nos animais inoculados com 10^5 ou 10^7 parasitas, após o 30º dia da infecção experimental (Figura 6). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos infectados com 10^5 ou 10^7 parasitas, pelas vias SC ou EV, embora uma tendência a um maior número de parasitas tenha sido observada nos animais infectados com 10^7 parasitas pela via SC; fato condizente com os achados obtidos nas avaliações da carga parasitária no baço, fígado, na medula óssea e nos linfonodos dos animais (Figuras 2, 3, 4 e 5, respectivamente).

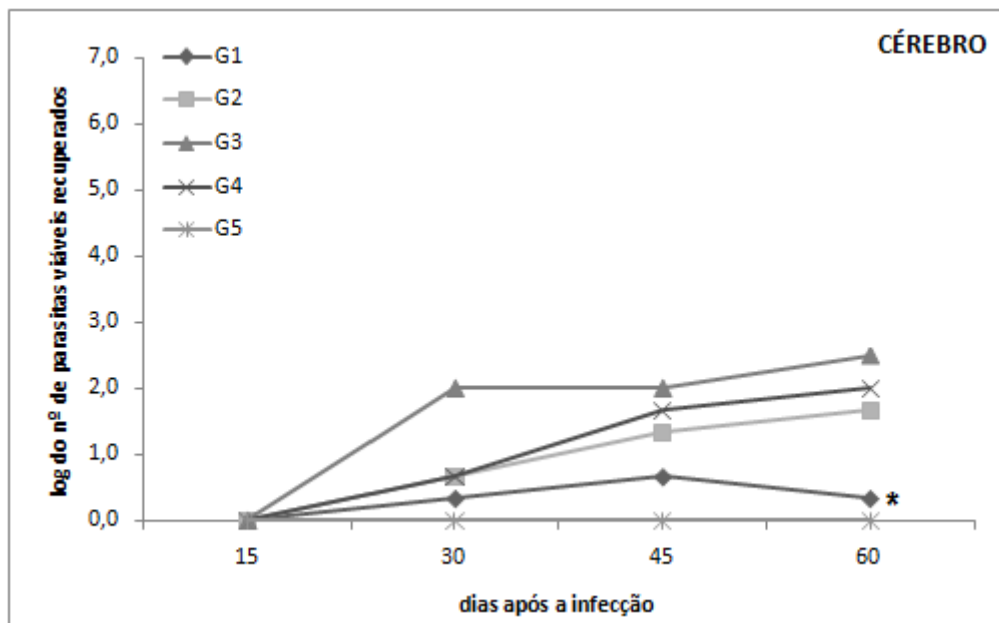


Figura 6 - Quantificação de parasitas no cérebro de camundongos infectados por *L. chagasi*. G1, G2 e G3: grupos de camundongos BALB/c inoculados com 10^3 , 10^5 e 10^7 parasitas por animal, pela via SC, respectivamente; **G4:** animais inoculados com 10^7 parasitas por animal, pela via EV; **G5:** animais inoculados com PBS, grupo controle do experimento. Os pontos no gráfico representam a média do logaritmo (log) do número de parasitas viáveis recuperados. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0.05$. *indica diferença significativa em relação aos grupos 2, 3 e 4, 60 dias após o desafio.

5.2.2. Detecção de parasitas no parênquima cerebral de camundongos BALB/c infectados, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a extração, purificação e detecção do DNA genômico de *Leishmania* no parênquima cerebral dos animais infectados, os mesmos foram sacrificados 15 e 30 após o desafio e amostras foram coletadas e analisadas por PCR.

Estudos utilizando os iniciadores LV₁ e LV₂ relatam que o DNA de *Leishmanias* que compõem o complexo *L. donovani* amplifica um fragmento de cerca de 100 pares de base (bp), o que evidencia a presença do parasita na amostra analisada (Piarroux *et al.*, 1993).

A amostra representativa de cada grupo foi constituída por uma mistura proporcional do DNA extraído de diferentes camundongos pertencentes ao mesmo grupo, de modo que um resultado positivo na PCR levou à conclusão de que pelo menos um animal do grupo apresentava o parasita *L. chagasi* em seu parênquima cerebral. Gastos excessivos para a realização da técnica nos levaram à utilização da mistura (“pool”) de amostras de DNA extraído do cérebro de animais de um mesmo grupo, dada a finalidade de análise qualitativa dos resultados.

Segundo Maia *et al.* (2008), métodos baseados em PCR e aplicados na detecção *Leishmania* são mais confiáveis para identificar a presença do parasita. Na avaliação dos resultados obtidos, observou-se que, 15 dias após a infecção, em todos os grupos de animais infectados, uma banda na altura de 100 bp foi observada, o que indica a presença do parasita em 1 ou mais animais dos respectivos grupos. Tal fato está em discordância com os dados apresentados na figura 6, nos quais parasitas não foram detectados em nenhum dos grupos de animais infectados, após 15 dias de infecção, pela técnica de diluição limitante.

O método de diluição limitante para a avaliação da carga parasitária em grupos experimentais representa um método extensivamente utilizado na detecção de parasitas em fragmentos de órgãos e tecidos de modelos murinos. Entretanto, para a realização da técnica, especialmente em relação à leitura das placas de parasitas, há necessidade da presença de um profissional qualificado e atento para o encontro dos parasitas, principalmente, quando os mesmos apresentam-se em menor quantidade. Paralelamente, a PCR utilizada neste trabalho utilizou, como amostra base, o pool de DNA extraído do parênquima cerebral de animais de um mesmo grupo; dessa forma, caso apenas um desses animais apresentasse parasitas no cérebro e, ainda, os mesmos estivessem em pequeno número, a PCR, uma técnica altamente sensível, apresentaria um resultado positivo. Desta maneira, pressupõe-se que pelo menos um

dos animais de cada grupo possa ter apresentado poucos parasitas que, embora não tenham sido detectados pela diluição limitante, foram detectados na PCR.

Na avaliação da presença de parasitas pela PCR no 30º dia de infecção, observou-se uma relação direta entre o achado de parasitas pelo método da diluição limitante e a pesquisa de seu DNA pela PCR, ainda que poucos parasitas tenham sido vistos na diluição limitante. Dessa forma, nos animais inoculados com 10^3 , 10^5 ou 10^7 parasitas, pelas vias SC ou EV, todos os grupos apresentaram resultado positivo na PCR neste período de tempo avaliado (Figura 7).

Embora experimentos não tenham sido conduzidos com amostras do parênquima cerebral dos animais infectados, coletadas nos dias 45 e 60 após a infecção, postula-se que a PCR indicaria um resultado positivo no encontro de parasitas nos grupos experimentais infectados, haja vista que os dados de carga parasitária por diluição limitante nestes animais terem sido elevadas e aumentaram com a cronicidade da infecção, principalmente, naqueles animais infectados com 10^7 parasitas.

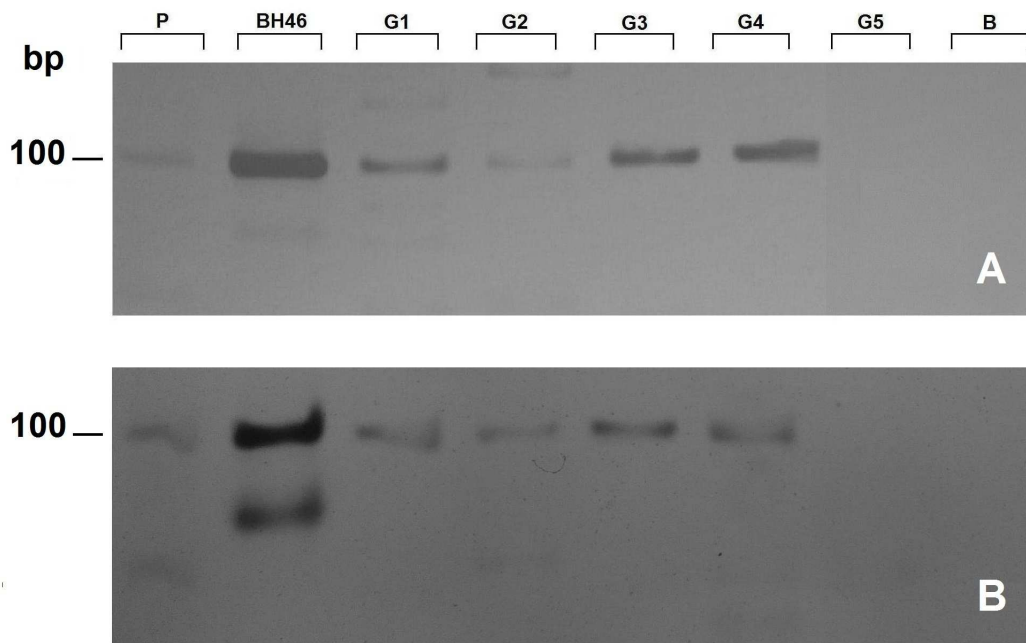


Figura 7 – Detecção de *L. chagasi* no parênquima cerebral de camundongos BALB/c, por meio da técnica de PCR, após 15 e 30 dias de infecção. Camundongos BALB/c infectados e os animais inoculados com PBS foram sacrificados após 15 (A) e 30 (B) dias de infecção. **P:** padrão de peso molecular 100 bp; **BH46:** DNA de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR/1970/BH46, utilizada como controle positivo; **G1, G2, G3 e G4:** grupos infectados por 10^3 , 10^5 e 10^7 parasitas pela via SC e 10^7 parasitas pela via EV, respectivamente; **G5:** grupo de camundongos inoculados com PBS; **B:** controle do experimento, no qual todos os reagentes da PCR foram usados, exceto o DNA.

Uma das diversas estratégias utilizadas por microrganismos patogênicos para invadir o SNC do hospedeiro mamífero é a entrada facilitada via migração de leucócitos, na qual os patógenos são capazes de desenvolver uma infecção aproveitando-se do tráfego de leucócitos no SNC. A migração de leucócitos para o SNC é semelhante à transmigração de células do sistema imune via endotélio de vasos sanguíneos: um processo de evolução celular constituído por adesão e diapedese, mediado e dirigido por moléculas de adesão, quimiocinas e seus receptores (Drevets e Leenen, 2000). O encontro de *L. chagasi* pela diluição limitante e a presença do DNA de *Leishmania* no parênquima cerebral de camundongos infectados pode ser uma forte evidência de que o parasita tenha utilizado a entrada facilitada de leucócitos para penetrar no SNC dos animais, fato observado até com 15 dias de infecção desafio.

5.3. Avaliação da resposta imune celular em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania chagasi*

Esplenócitos de camundongos BALB/c infectados foram cultivados *in vitro* e estimulados com SLA *L. chagasi* para a determinação do perfil da resposta imune celular gerada após o encontro do parasita com o sistema imune do animal. Dessa forma, citocinas como IFN- γ , IL-4 e IL-10 foram quantificadas nos sobrenadantes, uma vez que, em camundongos BALB/c, um perfil de resposta Th1 é primado pela produção de citocinas como IFN- γ e pela presença de anticorpos IgG2a específicos às diversas espécies de *Leishmania*. Paralelamente, uma resposta Th2 é baseada na produção de citocinas como IL-4 e pela produção de anticorpos IgG1 específicos aos parasitas. A IL-10, embora não seja considerada uma citocina do tipo Th2, atua concomitantemente a IL-4 na desativação de macrófagos parasitados, tornando-os susceptíveis à ação de *Leishmanias* (Afonso e Scott, 1993; Murray *et al.*, 2002).

Na avaliação dos resultados obtidos, observa-se que os animais dos grupos experimentais produziram níveis similares de IFN- γ nos dias 15 e 30 após a infecção. Entretanto, a partir do 30^o dia, animais inoculados com 10³ parasitas produziram níveis significativamente maiores desta citocina quando comparados aos demais grupos avaliados (grupos 2, 3, 4 e 5), sendo observado um aumento significativo ($P < 0,05$) na produção de IFN- γ nos dias 45 e 60 após a infecção (Figura 8A). Tal fato pode ser relacionado à menor carga parasitária observada nestes animais (grupo 1) e com o fato de que, com a evolução da

infecção, a depuração dos parasitas pode estar relacionada com a ativação de uma resposta Th1 baseada na produção de IFN- γ .

Na avaliação dos níveis de IL-4, observou-se que, de modo similar à produção de IFN- γ , os grupos não apresentaram diferenças na produção desta citocina nos dias 15 e 30 após o desafio. Entretanto, após o 30^o dia de infecção, observou-se um aumento na produção de IL-4 nos animais infectados com 10^7 parasitas. A produção de IL-4 elevou-se significativamente após 30 dias de infecção em camundongos inoculados com 10^7 parasitas pelas vias SC e EV (grupos 3 e 4, respectivamente) quando comparados aos animais inoculados com 10^5 parasitas e, principalmente, com 10^3 parasitas (grupo 1). Pode-se observar uma relação direta entre a carga parasitária nos animais infectados, a maior produção de IL-4 e menor produção de IFN- γ , nos diferentes grupos experimentais avaliados (Figura 8B).

De maneira semelhante à produção de IL-4, a IL-10 manteve-se em níveis similares entre os diferentes grupos até o 30^o dia de infecção, a partir do qual a produção desta citocina elevou-se significativamente nos grupos inoculados com 10^7 parasitas pelas vias SC e EV (grupos 3 e 4, respectivamente), seguido daqueles infectados com 10^5 parasitas (grupo 2) (Figura 8C). A menor produção da IL-10 nos animais infectados com 10^3 parasitas, confirmada pelo encontro de uma menor produção de IL-4 e pela maior produção de IFN- γ nestes animais, vem a corroborar os resultados de que tais animais podem vir a controlar a infecção frente ao menor número de parasitas utilizados no inóculo infectivo e que a depuração dos parasitas nestes animais possa estar relacionada com a indução de uma resposta imune do tipo Th1.

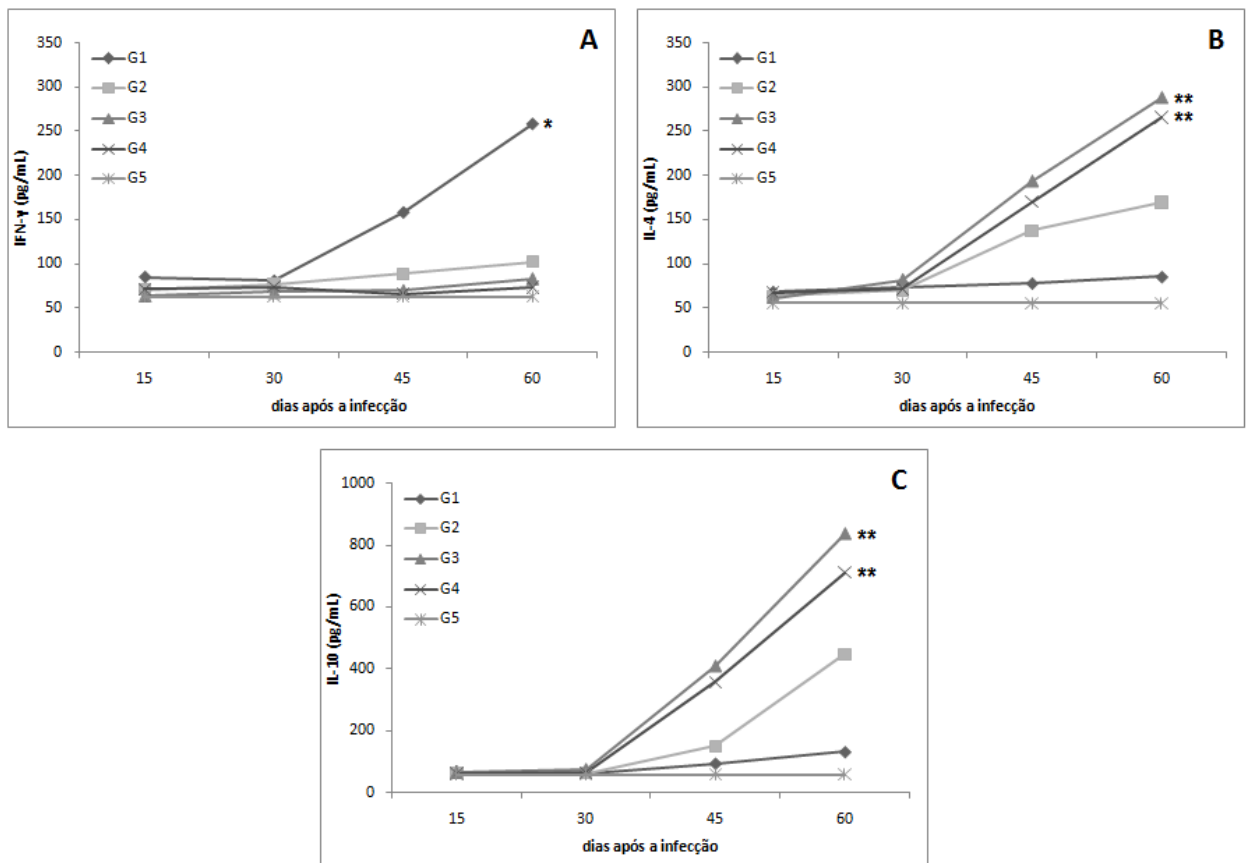


Figura 8 – Produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*. As concentrações das citocinas (A) IFN- γ , (B) IL-4 e (C) IL-10 foram determinadas por ELISA de captura (Pharmingen). Cada ponto no gráfico representa a média da produção da citocina, em picogramas por mililitro (pg/mL). **G1, G2, G3 e G4** representam os grupos infectados por 10³, 10⁵ ou 10⁷ parasitas por animal, pela via SC, ou com 10⁷ parasitas por animal, pela via EV, respectivamente. **G5** representa o grupo de camundongos inoculados com PBS. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. *indica diferença significativa em relação aos grupos 2, 3 e 4, 60 dias após o desafio. **indica diferença significativa em relação ao grupo 1, 60 dias após o desafio.

5.4. Avaliação da resposta humoral em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania chagasi*

Amostras de soro dos animais infectados foram coletadas 15, 30, 45 e 60 dias após a infecção com *L. chagasi* para a avaliação da resposta humoral induzida pela infecção nos diferentes grupos e períodos de tempo avaliados. O perfil da resposta humoral nos animais

infectados foi avaliado pela produção das subclasses de anticorpos IgG1 e IgG2a, específicas ao parasita *L. chagasi*, por meio de ensaios de ELISA.

Na avaliação dos resultados obtidos para IgG1 nos diferentes grupos avaliados, observou-se que o perfil de produção dessa subclasse de anticorpos correlacionou-se com a produção de IL-4 oriunda dos esplenócitos dos animais infectados, avaliados nos diferentes períodos de tempo. Assim, os animais dos diferentes grupos apresentaram resultados similares até o 30º dia de infecção, a partir do qual houve uma maior produção de IgG1 nos animais infectados com o número mais elevado de parasitas (10^5 e 10^7 parasitas) (Figura 9A). Dessa forma, os níveis encontrados de IgG1 específicos ao parasita foram maiores nos dias 45 e 60 após a infecção, em camundongos inoculados com 10^7 parasitas pelas vias SC e EV (grupos 3 e 4, respectivamente) quando comparados aos animais inoculados com 10^5 parasitas e, principalmente, naqueles infectados com 10^3 parasitas (grupos 2 e 1, respectivamente).

Na avaliação das absorbâncias encontradas para os anticorpos IgG2a, observou-se que em todos os grupos avaliados os animais produziram níveis baixos deste isotipo de IgG, de modo que nenhuma diferença significativa foi encontrada nos diferentes grupos e períodos de tempo avaliados (Figura 9B). Os valores médios de IgG2a obtidos nos grupos experimentais indicam uma relação direta com os dados apresentados de IgG1 anti-SLA *L. chagasi*, porém, no caso de anticorpos IgG2a, os valores entre os grupos se encontram mais próximos e, aparentemente, as diferenças nos inóculos infectivos e na rota de infecção utilizada não foi pré-determinante para induzir alterações na produção deste isotipo de IgG.

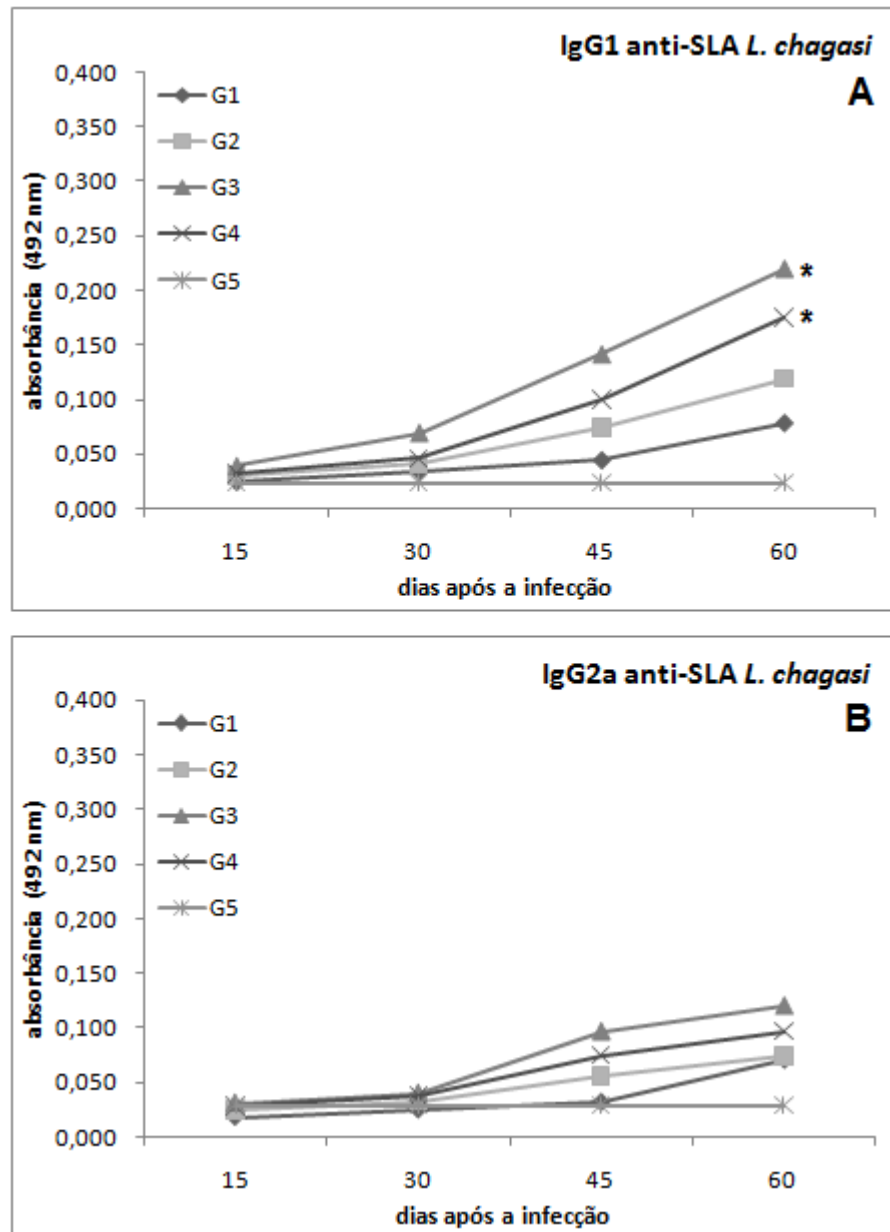


Figura 9 – Níveis de IgG1 e IgG2a presentes em amostras de soro de camundongos BALB/c inoculados com *L. chagasi*. O perfil da resposta humoral nos animais infectados foi avaliado pela produção de anticorpos das subclasses IgG1 (A) e IgG2a (B), específicos ao SLA *L. chagasi*, avaliados por ELISA. Cada ponto no gráfico representa a média da produção dos anticorpos em cada grupo. **G1, G2, G3 e G4** representam os grupos infectados por 10^3 , 10^5 ou 10^7 parasitas por animal pela via SC ou 10^7 parasitas por animal pela via EV, respectivamente e **G5**, o grupo de camundongos inoculados com PBS. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. *indica diferença significativa em relação ao grupo 1, 60 dias após o desafio.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A carga parasitária encontrada nos grupos experimentais foi diretamente proporcional ao tamanho do inóculo infectivo, indicando que a utilização de um número elevado de parasitas pode acarretar a uma infecção mais grave nos animais infectados.
- O fígado comportou-se como um órgão de tropismo na fase aguda da doença causada por *L. chagasi* nos camundongos BALB/c, uma vez que um número elevado de parasitas foi observado neste órgão em relação aos valores obtidos nos demais órgãos.
- Com a cronicidade da infecção, o baço, linfonodos, parênquima cerebral e a medula óssea apresentaram um maior número de parasitas recuperados, o que pode indicar um tropismo dos parasitas para tais órgãos.
- A demonstração de *L. chagasi* no parênquima cerebral dos camundongos infectados, já observada 15 dias após a infecção desafio, permite inferir sobre o envolvimento do SNC na infecção por essa espécie do parasita *Leishmania*.
- Houve uma relação inversa entre a produção de IFN- γ e a carga parasitária recuperada nos animais infectados com 10^3 parasitas, nos diferentes períodos de tempo avaliados.
- Uma relação direta entre a produção de IL-4 e IL-10, a presença de anticorpos IgG1 específicos ao parasita e a carga parasitária recuperada nos animais infectados com 10^5 parasitas e, principalmente, com 10^7 parasitas, foi observada nos diferentes períodos de tempo avaliados.
- O modelo murino de infecção utilizando 10^7 parasitas e a rota de infecção pela via subcutânea foram aqueles que induziram a uma infecção mais grave nos animais, uma vez que tais animais apresentaram maiores valores de carga parasitária recuperada, de produção de IL-4, IL-10 e de anticorpos IgG1 anti-*L. chagasi*, além de uma menor produção de IFN- γ ; nos diferentes períodos de tempo avaliados.

7. PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

- Repetição dos experimentos avaliando os animais infectados por um maior período de tempo da infecção visceral (150 dias);
- Realizar experimentos de PCR utilizando as amostras do parênquima cerebral de animais infectados com *L. chagasi*, 45 e 60 dias após a infecção desafio;
- Realizar análises histopatológicas e imunocitoquímicas de amostras do parênquima cerebral dos animais infectados para verificar a natureza dos infiltrados celulares nos dias 15, 30, 45 e 60 após a infecção desafio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P., SILVA-PEREIRA, M. C. *et al.* Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J Parasitol**, v.77, n.4, Aug, p.557-61. 1991.

ABREU-SILVA, A. L., CALABRESE, K. S. *et al.* Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Am J Trop Med Hyg**, v.68, n.6, Jun, p.661-5. 2003.

AFONSO, L. C. e SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, v.61, n.7, Jul, p.2952-9. 1993.

AHMED, S., COLMENARES M. *et al.* Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v.71, n.1, Jan, p.401-10. 2003.

ALEXANDER, J. e BRYSON, K. T helper (Th)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunol Lett**, v.99, n.1, Jun 15, p.17-23. 2005.

ALVAR, J., MOLINA, R. *et al.* Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann Trop Med Parasitol**, v.88, n.4, Aug, p.371-8. 1994.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v.30, n.12-13, Nov, p.1269-81. 2000.

AWASTHI, A., MATHUR, R. K. *et al.* Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res**, v.119, n.6, Jun, p.238-58. 2004.

BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v.28, n.7, Jul, p.329-37. 2006.

BOURDOISEAU, G., BONNEFONT, C. *et al.* Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Vet Immunol Immunopathol**, v.59, n.1-2, Oct 6, p.21-30. 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. **Int Immunopharmacol**, v.1, n.8, Aug, p.1457-67. 2001.

BUFFET, P. A., SULAHIAN, A. *et al.* Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, n.9, Sep, p.2167-8. 1995.

CARRIÓN, J., NIETO, A. *et al.* Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunol**, v.28, n.5, May, p.173-83. 2006.

CHAPPUIS, F., SUNDAR, S. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.11, Nov, p.873-82. 2007.

CIARAMELLA, P., OLIVA, G. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet Rec**, v.141, n.21, Nov 22, p.539-43. 1997.

COELHO, E. A., TAVARES, C. A. *et al.* Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infect Immun**, v.71, n.7, Jul, p.3988-94. 2003.

DAHER, E. F., FONSECA, P. P. *et al.* Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis and HIV co-infection in fifteen patients from Brazil. **J Parasitol**, v.95, n.3, Jun, p.652-5. 2009.

DEPLAZES, P., SMITH, N. C. *et al.* Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol**, v.17, n.9, Sep, p.451-8. 1995.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.27, n.5, Sep, p.305-18. 2004.

DREVETS, D. A. e LEENEN, P. J. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. **Microbes Infect**, v.2, n.13, Nov, p.1609-18. 2000.

ENGWERDA, C. R. e KAYE, P. M. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. **Immunol Today**, v.21, n.2, Feb, p.73-8. 2000.

ENGWERDA, C. R., ATO, M. *et al.* Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends Parasitol**, v.20, n.11, Nov, p.524-30. 2004.

FERRER, L., AISA, M. J. *et al.* Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet Rec**, v.136, n.20, May 20, p.514-6. 1995.

FERRER, L., ALBEROLA, J. *et al.* Clinical anti-inflammatory efficacy of arofylline, a new selective phosphodiesterase-4 inhibitor, in dogs with atopic dermatitis. **Vet Rec**, v.145, n.7, Aug 14, p.191-4. 1999.

FERRER, L., JUANOLA, B. *et al.* Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. **Vet Pathol**, v.28, n.4, Jul, p.342-3. 1991.

FONT, A. e CLOSA, J. M. Ultrasonographic localization of a caudal vena cava thrombus in a dog with leishmaniasis. **Vet Radiol Ultrasound**, v.38, n.5, Sep-Oct, p.394-6. 1997.

GARCIA-ALONSO, M., NIETO, C. G. *et al.* Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite Immunol**, v.18, n.11, Nov, p.539-46. 1996.

GARG, R. e DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian J Med Res**, v.123, n.3, Mar, p.439-54. 2006.

GONZALEZ, J. L., FERMIN, M. L. *et al.* Erosive colitis in experimental canine Leishmaniasis. **Zentralbl Veterinarmed B**, v.37, n.5, Jul, p.377-82. 1990.

GONZALO, R. M., DEL REAL, G. *et al.* A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v.20, n.7-8, Jan 15, p.1226-31. 2002.

GRAMICCIA, M. e GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int J Parasitol**, v.35, n.11-12, Oct, p.1169-80. 2005.

GRIMALDI JR., G. e TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev**, v.6, n.3, Jul, p.230-50. 1993.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v.354, n.9185, Oct 2, p.1191-9. 1999.

HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. **J Infect**, v.39, n.2, Sep, p.101-11. 1999.

KAYE, P. M., SVENSSON, M. *et al.* The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol Rev**, v.201, Oct, p.239-53. 2004.

KEENAN, C. M., HENDRICKS, L. D. *et al.* Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Vet Pathol**, v.21, n.1, Jan, p.74-9. 1984.

LANOTTE, G., RIOUX, J. A. *et al.* [Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. (author's transl)]. **Ann Parasitol Hum Comp**, v.54, n.3, May-Jun, p.277-95. 1979.

LAUNOIS, P., GUMY, A. *et al.* Rapid IL-4 production by *Leishmania* homolog of mammalian RACK1-reactive CD4(+) T cells in resistant mice treated once with anti-IL-12 or -IFN-gamma antibodies at the onset of infection with *Leishmania major* instructs Th2 cell development, resulting in nonhealing lesions. **J Immunol**, v.168, n.9, May 1, p.4628-35. 2002.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência**. Rio de Janeiro: Atheneu. 2004. 698 p.

LIMA, V. M., GONCALVES, M. E. *et al.* Anti-*leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v.36, n.4, Apr, p.485-9. 2003.

LOCKSLEY, R. M. e SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. **Immunol Today**, v.12, n.3, Mar, p.A58-61. 1991.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia Funcional**. Rio de Janeiro: Atheneu. 1993. 363 p.

MAIA, C. e CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol**, v.158, n.4, Dec 20, p.274-87. 2008.

MANCIANTI, F., PEDONESE, F. *et al.* Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Vet Parasitol**, v.65, n.1-2, Oct 15, p.1-9. 1996.

MARQUES-DA-SILVA, E. A., COELHO, E. A. *et al.* Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. **Parasitol Res**, v.98, n.1, Dec, p.67-74. 2005.

MAURICIO, I. L., STOTHARD, J. R. *et al.* The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v.16, n.5, May, p.188-9. 2000.

MELBY, P. C., CHANDRASEKAR, B. *et al.* The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **J Immunol**, v.166, n.3, Feb 1, p.1912-20. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, Brasília, Brasil, p.122, 2003

MIRALLES, G. D., STOECKLE, M. Y. *et al.* Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v.62, n.3, Mar, p.1058-63. 1994.

MURRAY, H. W., LU, C. M. *et al.* Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect Immun**, v.70, n.11, Nov, p.6284-93. 2002.

NASSIF, X., BOURDOULOUS, S. *et al.* How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? **Trends Microbiol**, v.10, n.5, May, p.227-32. 2002.

NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. São Paulo: Atheneu. 2006

PIARROUX, R., AZAIEZ, R. *et al.* Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**, v.49, n.3, Sep, p.364-9. 1993.

PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R. *et al.* Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun**, v.62, n.1, Jan, p.229-35. 1994.

PISCOPO, T. V. e MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgrad Med J**, v.82, n.972, Oct, p.649-57. 2006.

PRASAD, L. S. e SEN, S. Migration of *Leishmania donovani* amastigotes in the cerebrospinal fluid. **Am J Trop Med Hyg**, v.55, n.6, Dec, p.652-4. 1996.

QUINNELL, R. J., COURTENAY, O. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v.122, n.Pt 3, Mar, p.253-61. 2001.

RAMOS, C. C., DUARTE, M. I. *et al.* [Fatal visceral leishmaniasis associated with acquired immunodeficiency syndrome: report of a case with necropsy findings and immunohistochemical study]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.27, n.4, Oct-Dec, p.245-50. 1994.

ROMERO, G. A., GUERRA, M. V. *et al.* Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **Am J Trop Med Hyg**, v.65, n.5, Nov, p.456-65. 2001.

ROURA, X., SANCHEZ, A. *et al.* Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Vet Rec**, v.144, n.10, Mar 6, p.262-4. 1999.

SACKS, D. e NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.11, Nov, p.845-58. 2002.

SANTOS, F. R., PENA, S. D. *et al.* Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Hum Genet**, v.90, n.6, Feb, p.655-6. 1993.

SANTOS-GOMES, G. M., ROSA, R. *et al.* Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol**, v.88, n.1-2, Sep 6, p.21-30. 2002.

SCOTT, P. Development and regulation of cell-mediated immunity in experimental leishmaniasis. **Immunol Res**, v.27, n.2-3, p.489-98. 2003.

SUKUMARAN, B., TEWARY, P. *et al.* Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*. **Vaccine**, v.21, n.11-12, Mar 7, p.1292-9. 2003.

SUNDAR, S. e RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.9, n.5, Sep, p.951-8. 2002.

TAFURI, W. L., DE OLIVEIRA, M. R. *et al.* Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet Parasitol**, v.96, n.3, Apr 2, p.203-12. 2001.

TAVARES, C. A., FERNANDES, A. P. *et al.* Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Rev Mol Diagn**, v.3, n.5, Sep, p.657-67. 2003.

TAVARES, N. M., SANTOS, D. M. *et al.* Estratégias de vacinação contra Leishmaniose Visceral e Cutânea: Lições dos modelos experimentais. **Gazeta Médica da Bahia**, v.79 (Supl. 3), n.143, p.110-121. 2009.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am J Trop Med Hyg**, v.52, n.3, Mar, p.287-92. 1995.

TUOMANEN, E. Entry of pathogens into the central nervous system. **FEMS Microbiol Rev**, v.18, n.4, Jul, p.289-99. 1996.

VAN DER VEEN, R. C. Nitric oxide and T helper cell immunity. **Int Immunopharmacol**, v.1, n.8, Aug, p.1491-500. 2001.

VIÑUELAS, J., GARCIA-ALONSO, M. *et al.* Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v.101, n.1, Oct 31, p.23-7. 2001.

WALKER, M., KUBLIN, J. G. *et al.* Parasitic central nervous system infections in immunocompromised hosts: malaria, microsporidiosis, leishmaniasis, and African trypanosomiasis. **Clin Infect Dis**, v.42, n.1, Jan 1, p.115-25. 2006.

WILSON, M. E., JERONIMO, S. M. *et al.* Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb Pathog**, v.38, n.4, Apr, p.147-60. 2005.

WILSON, M. E., YOUNG, B. M. *et al.* The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. **J Immunol**, v.161, n.11, Dec 1, p.6148-55. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The disease and its impact.** World Health Organization. <http://who.int/emc/diseases/leish/index.html>. 2003