

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Mecanismos de Resistência de Camundongos BALB/c e C57BL/6
à Infecção por *Leishmania (Viannia) guyanensis*

BÁRBARA PINHEIRO MENDES

BELO HORIZONTE-MG
2011

BÁRBARA PINHEIRO MENDES

**Mecanismos de Resistência de Camundongos BALB/c e C57BL/6
à Infecção por *Leishmania (Viannia) guyanensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima
Martins Horta**

**Belo Horizonte
2011**

A minha avó, Maria Helena, e as minhas tias, Gleuza (in memoriam) e Leda (in memoriam), por tornarem mais fácil o caminho até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Patiu, por ter me recebido tão bem em seu laboratório; pela orientação atenciosa; por todas as oportunidades de aprendizado científico ou não.

À professora Dra. Leda Quércia Vieira, pela co-orientação, por todo apoio desde o início, por ter me incentivado e motivado; além de disponibilizar seu laboratório e ceder os camundongos *Phox knockout*.

A todos os alunos do laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, por me receberem tão bem e, sempre estarem dispostos a ajudar no que eu precisei. Especialmente ao Matheus, Waldionê, Louisa e Eric, por estarem diretamente envolvidos nos meus experimentos, sempre muito atenciosos.

Ao Juan, por ter me acompanhado no início, me ensinando várias técnicas. Por sua paciência e boa vontade.

A **todos** os colegas do laboratório (1 e 2), pela convivência sempre muito agradável. Por sempre estarem dispostos a ajudar em tudo, dando idéias, se interessando pelo meu trabalho, por toda experiência trocada e toda a oportunidade de crescimento juntos. Um agradecimento especial para a Jarina, pelo maior envolvimento no meu trabalho e por toda a disponibilidade em todos os momentos.

Ao Elimar, por ser essencial à vida no laboratório, fazendo as coisas funcionarem e ajudando sempre e em tudo que foi preciso.

A todos os colegas do departamento, ao pessoal de Bases, pelos momentos de descontração e diversão indispensáveis. Por esses momentos agradeço também ao Thiago, Pati, Ramon, Jarina e Juliano, que tornaram tudo mais divertido.

Aos meus alunos de iniciação científica. Everton, pela oportunidade de ensinar e aprender, por toda a ajuda gigantesca nos experimentos e por todo interesse no trabalho. Laís, também pelo seu interesse e comprometimento. Ótimos alunos.

A minha mãe, por todo incentivo, por toda fé, pelo exemplo, por todo apoio incondicionais.

Aos meus irmãos, porque sempre quiseram o melhor para mim, pelo apoio e cumplicidade e por sempre me acompanharem nesse caminho.

A Andreia, pela força, por sempre acreditar, pelo apoio, por todo carinho e amor, pela segurança e cumplicidade. Por sua presença, me fazendo seguir em frente em todos os momentos.

A Márcia, pelas mudanças positivas que trouxe. Pelo incentivo, pelo carinho. E, claro, pela revisão.

A todo pessoal do Kung Fu e, principalmente, ao Vânio, pelos ensinamentos e pelos treinos que foram essenciais durante esse processo.

A Mônica, pelo começo disso tudo.

A todos os que foram citados e os que por ventura não tenham sido, agradeço de coração, reconheço a importância e contribuição de cada um, e expesso aqui meu respeito e admiração por todos vocês.

RESUMO

Os vários tipos de manifestações clínicas da Leishmaniose, resistência ou susceptibilidade à infecção, são determinados por fatores como a espécie do parasita e o tipo de resposta imune do hospedeiro. Neste trabalho, camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram usados como modelo experimental de resistência à infecção causada por *Leishmania guyanensis*, uma espécie de parasito que causa leishmaniose cutânea em humanos e tem grande relevância em alguns países da América do Sul. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos de resistência à infecção causada por esta espécie de *Leishmania* nessas linhagens de camundongos. Para isso, camundongos de ambas as linhagens foram infectados com *L. guyanensis* e, o curso da infecção foi acompanhado. Segundo nossos resultados, esta espécie de parasito não causa lesão em nenhuma dessas duas linhagens de camundongos e os parasitas são eliminados do local de infecção e do linfonodo drenante deste local. Mostramos, também, que macrófagos peritoneais não ativados de BALB/c e C57BL/6 eliminam as amastigotas intracelulares *in vitro*. Já era sabido que esta eliminação é mediada pela explosão respiratória. Aqui nós mostramos que promastigotas de *L. guyanensis* realmente induzem esta reação nos macrófagos de BALB/c, *in vitro*, mas de maneira muito menor em C57BL/6. Além disso, vimos que macrófagos peritoneais de ambas as linhagens de camundongo não produzem óxido nítrico quando infectados com *L. guyanensis*, *in vitro*. O curso da infecção de camundongos C57BL/6 *knockout* para a subunidade catalítica gp91phox da NADPH oxidase foi igual ao do tipo selvagem, indicando que a explosão respiratória não parece ser importante na eliminação dos parasitas *in vivo* nesta linhagem de camundongo. Porém, camundongos BALB/c tratados com apocinina, um inibidor específico da NADPH oxidase, mostraram-se mais susceptíveis a infecção por *L. guyanensis* do que os não tratados. Esses resultados indicam que, para esta linhagem de camundongos, a explosão respiratória tem um papel importante na sua resistência à infecção por *L. guyanensis*. O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, produtos da explosão respiratória, parecem ser importantes para a eliminação das amastigotas intracelulares pelos macrófagos de BALB/c, *in vitro*. Camundongos BALB/c parecem montar uma resposta do tipo Th1 frente à infecção por *L. guyanensis*, com baixa produção de IFN- γ e nenhuma de IL-4. Estes resultados indicam que a imunidade inata, por intermédio da explosão respiratória, pode ser, pelo menos em parte, responsável pelo controle da infecção com *L. guyanensis* em camundongos BALB/c, mas não em C57BL/6, e sugerem que a resistência seja mantida por uma resposta adaptativa do tipo Th1.

Palavras chave: *L. guyanensis*, explosão respiratória, ROS, NADPH oxidase, BALB/c.

ABSTRACT

The many types of clinical manifestations of leishmaniasis, resistance or susceptibility to infection is determined by factors such as parasite species and the type of immune response of the host. In this present work, BALB/c and C57BL/6 mice strains were used as experimental models of resistance to infection caused by *Leishmania guyanensis*, a parasite species that causes cutaneous leishmaniasis in humans and is very important in some countries of South America. The aim of this study was to investigate the mechanisms of resistance to infection caused by this species of *Leishmania* in these mice strains. Thus, mice of both strains were infected at the hind footpad with *L. guyanensis* and the course of infection was followed. Our data shows that this parasite species causes no lesion in both mice strains and that the parasites are eliminated both on the site of infection and its draining lymph node. It was also demonstrated that non-activated peritoneal macrophages of both mice strains eliminate the intracellular amastigotes *in vitro*. It was already known that this elimination occurs through the respiratory burst. Here we also demonstrated that *L. guyanensis* promastigotes induces this reaction in BALB/c macrophages *in vitro*, but in a lower extent in C57BL/6 macrophages. Furthermore, it was showed in this work that peritoneal macrophages of both mice strains do not produce nitric oxide when infected *in vitro* with *L. guyanensis*. The course of infection in C57BL/6 mice gp91phox (the catalytic subunit of NADPH oxidase enzyme) knockout was similar to that of the wild type mice, not presenting lesion or swelling in the footpad. However, BALB/c mice treated with apocynin, a specific NADPH oxidase inhibitor, became susceptible to infection with *L. guyanensis*. Our data indicates that superoxide anion and hydrogen peroxide, two respiratory burst products, are important in the elimination of intracellular amastigotes by BALB/c macrophages, *in vitro*. BALB/c mice apparently mount a Th1 type response to the infection with *L. guyanensis*, with low production of IFN- γ and no production of IL-4. These results indicate that the innate immunity, through the respiratory burst, could be, at least in part, responsible for the control of infection with *L. guyanensis* in BALB/c mice, but not in C57BL/6 mice.

Key words: *L. guyanensis*, respiratory burst, ROS, NADPH oxidase, BALB/c mice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	15
Figura 2	Espécies reativas do oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species - ROS</i>).....	21
Figura 3	Progressão da lesão em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>L. guyanensis</i> ou <i>L. amazonensis</i>	34
Figura 4	Quantificação de parasitas nas patas e nos linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>L. guyanensis</i> ou <i>L. amazonensis</i>	36
Figura 5	Atividade leishmanicida de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57BL/6 infectados com <i>L. guyanensis</i> ou <i>L. amazonensis</i>	38
Figura 6	Produção de ROS por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 na presença de promastigotas de <i>L. guyanensis</i> ou <i>L. amazonensis</i>	40
Figura 7	Produção de NO por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>L. guyanensis</i> ou <i>L. amazonensis</i>	42
Figura 8	Progressão da lesão em camundongos C57BL/6 Phox <i>KO</i> infectados com <i>L. guyanensis</i>	44
Figura 9	Efeito da Apocinina na explosão respiratória de macrófagos de camundongos BALB/c.....	46
Figura 10	Progressão da lesão em camundongos BALB/c tratados com apocinina.....	47
Figura 11	Papel do ânion superóxido na eliminação de amastigotas de <i>L. guyanensis</i> por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	49
Figura 12	Papel do peróxido de hidrogênio na eliminação de amastigotas de <i>L. guyanensis</i> por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	50
Figura 13	Produção de IFN- γ pelas células de linfonodo de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>L. guyanensis</i>	52

LISTA DE SIGLAS

- ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)
- gp63 – Glicoproteína de 63kD
- IFN- γ – Interferon gama
- IL-4 – Interleucina 4
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-12 – Interleucina 12
- i.p. – Intraperitoneal
- KO – *Knockout*
- LC – Leishmaniose cutânea
- LCD – Leishmaniose cutâneo difusa
- LMC – Leishmaniose mucocutânea
- LPG – Lipofosfoglicano
- LV – Leishmaniose visceral
- MGG - May-Grünwald/Giemsa
- NADPH – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato)
- NO – *Nitric oxide* (óxido nítrico)
- PBS - *Phosphate Buffer Saline* (salina tamponada com fosfato)
- Phox – *Phagocyte oxidase* (oxidase de fagócito)
- ROS – *Reactive oxygen species* (espécies reativas do oxigênio)
- RPMI - Roswell P Mem. Inst., meio de cultura
- SFB - Soro fetal bovino
- SOD – *Superoxide dismutase* (superóxido dimutase)
- TNF- α - *Tumour Necrosis Factor* - alfa (Fator de necrose tumoral – alfa)
- Th1 – Linfócito T *helper* (auxiliar) do tipo 1
- Th2 – Linfócito T *helper* (auxiliar) do tipo 2
- WT – *Wild type* (tipo selvagem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1 Parasitas.....	23
2.2 Criopreservação.....	23
2.3 Cultivos dos parasitas.....	24
2.4 Separação de formas promastigotas metacíclicas de <i>Leishmania</i>	24
2.5 Animais.....	25
2.6 Tratamento com Apocinina.....	25
2.7 Infecção dos camundongos.....	26
2.8 Curso da infecção na pata dos camundongos e quantificação de parasitas na pata infectada e no linfonodo.....	26
2.9 Obtenção de macrófagos peritoniais.....	27
2.10 Infecção dos macrófagos.....	28
2.11 Quantificação de NO.....	28
2.12 Avaliação da taxa de infecção e multiplicação de parasitas no interior dos macrófagos.....	29
2.13 Ensaio de quimioluminescência.....	30
2.14 Obtenção de antígeno de <i>L. guyanensis</i>	30
2.15 Cultura de células do linfonodo.....	31
2.16 ELISA.....	31
2.17 Reprodutibilidade, apresentação dos resultados e análise estatística.....	32
3 RESULTADOS.....	33
3.1 <i>L. guyanensis</i> não causa lesão em camundongos BALB/c e C57BL/6	33
3.2 A replicação dos parasitas é suprimida no sítio de infecção e no linfonodo drenante.....	35
3.3 Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 são capazes de eliminar amastigotas de <i>L. guyanensis</i> , mas não de <i>L. amazonensis</i> , <i>in vitro</i>	37
3.4 Promastigotas de <i>L. guyanensis</i> induzem a explosão respiratória em macrófagos de BALB/c, mas não de C57BL/6	39
3.5 Produção de NO pelos macrófagos C57BL/6.....	41
3.6 <i>L. guyanensis</i> não causa lesão em camundongos C57BL/6 PHOX KO.....	43
3.7 Camundongos BALB/c tratados com apocinina, inibidor específico da NADPH oxidase, parecem tornar-se susceptíveis à infecção por <i>L. guyanensis</i>	45
3.8 Papel do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio na eliminação de amastigotas de <i>L. guyanensis</i> por macrófagos de camundongos BALB/c.....	48
3.9 Produção de IFN- γ e IL-4 pelas células de linfonodo poplíteo frente à infecção com <i>L. guyanensis</i>	51
4 DISCUSSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias de distribuição global, transmitida aos humanos pela picada de aproximadamente 30 espécies diferentes de mosquitos flebotomíneos infectados por protozoários do gênero *Leishmania* (PAHO, 2007). São antropozoonoses infecciosas, não contagiosas. (Ministério da Saúde, 2007)

A doença apresenta vários tipos de manifestações clínicas dependendo da espécie de *Leishmania*, dos fatores de virulência do vetor e das respostas imunes do hospedeiro, numa interação complexa entre este e o parasita. A doença, em humanos, é tradicionalmente dividida em três tipos de síndromes: leishmaniose visceral (LV) ou Calazar, cutânea (LC) e mucocutânea (LMC); existindo, no entanto, algumas variações. Existem pelo menos 20 espécies (TAB.1) desse parasita capazes de causar infecção específica para cada espécie de hospedeiro. Sua distribuição difere geograficamente e, assim também, o padrão da doença em cada região geográfica e, ainda, uma única espécie de *Leishmania* pode causar mais de uma das síndromes clínicas e cada síndrome pode ser causada por várias das espécies. Os reservatórios da doença são animais como cães e roedores (ciclo zoonótico) e, em alguns países, o homem (ciclo antroponótico) (PISCOPO; MALLIA, 2006; PEARSON; SOUSA, 1996).

As leishmanioses ocorrem, atualmente, em 4 continentes e são consideradas endêmicas em 88 países. Noventa por cento dos casos de LV ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão; de LMC na Bolívia, Brasil e Peru; de LC no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. Há uma estimativa de que ocorram 2 milhões de novos casos anuais, com mais de 12 milhões de pessoas já infectadas e 350 milhões expostas ao risco (WHO, 2002), sendo que os números oficiais são subestimados devido aos casos não notificados em muitos países.

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (MS), a Leishmaniose Tegumentar Americana apresentou média anual de 26.021 casos, esses registrados no período de 1988 a 2009 e menciona uma tendência ao crescimento da endemia ao longo desse período. No ano de 2003, foi confirmada a autoctonia em todas as unidades federais do país. A LV, que no Brasil é endêmica, apresentou 34.583 casos registrados no período entre 2003 e 2009; e atualmente está distribuída em 21 Unidades Federais, atingindo as cinco regiões brasileiras. A letalidade da LV aumentou de 3,4%, em 1994, para 5.5%, em 2008.

Em locais onde ocorrem 90% dos casos, as grandes dificuldades no combate à doença são a pobreza e a falta de informação, aliadas ao tratamento de longo curso, à relutância no tratamento de recorrências dérmicas do Calazar e aos casos assintomáticos. A leishmaniose está associada à desnutrição, deslocamento de pessoas do campo para a cidade, más condições sanitária e de moradia, analfabetismo, discriminação de classe, além de fatores ambientais como desmatamento, construção de represas, novos métodos de irrigação e urbanização. É uma doença que carece de consciência e alerta globais (KILLICK-KENDRICK, 2010), sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada (NTD). Além disso, caracteriza um sério impedimento do desenvolvimento socioeconômico, pois já causa atrasos na implementação de numerosos programas de desenvolvimento (WHO, 2002). É considerada pela OMS como uma das seis mais importantes doenças infecciosas pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de causar deformidades. É um problema de saúde pública de grande magnitude, que tem envolvimento psicológico com reflexos no campo social e econômico, pois pode ser considerada uma doença ocupacional (MS, 2007).

Tabela 1: Principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose humana (Adaptado de Ameen, 2010).

Espécie	Forma clínica	Localização
<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i> (raramente LMC/LCD)	LC	VM
<u>Complexo <i>L. mexicana</i></u> <i>L. mexicana</i> (raramente LCD) <i>L. amazonensis</i> (raramente LCD) <i>L. venezuelensis</i>	LC	NM
<u>Complexo <i>L. braziliensis</i></u> <i>L. braziliensis</i> <i>L. colombiensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. peruviana</i>	LC/LMC	NM
<u>Complexo <i>L. donovani</i></u> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i>	LV/LC LV	VM NM

LC = Leishmaniose Cutânea; LMC = Leishmaniose Cutâneo-Mucosa; LV = Leishmaniose Visceral; VM = Velho Mundo; NM = Novo Mundo.

Nas Américas, são atualmente reconhecidas onze espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas, somente em animais. No entanto, no Brasil só foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (MS, 2007).

A LC é a manifestação clínica mais frequente, com lesões exclusivamente cutâneas que tendem à cicatrização, únicas ou em pequeno número. Em casos raros, as lesões podem ser numerosas, caracterizando a leishmaniose cutânea disseminada. É uma doença benigna, e na maioria dos casos, resolve-se mesmo sem tratamento. A úlcera típica é indolor e costuma estar localizada em áreas expostas da pele. A lesão inicial costuma ser nodular, localizada profundamente na hipoderme, ou pequenas pápulas, semelhantes à picada do inseto, que evolui aumentando em tamanho e profundidade e ulcerando no vértice (MS, 2007; PEARSON; SOUSA, 1996).

A forma clínica cutâneo difusa (LCD) é rara, porém grave. Inicia-se de maneira insidiosa com lesão única e evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrimdo grandes extensões cutâneas. Apresenta má resposta ao tratamento (MS, 2007; PEARSON; SOUSA, 1996).

A LMC se expressa por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores. A forma clássica é secundária à lesão cutânea. Geralmente a lesão é indolor e se inicia no septo nasal anterior, cartilaginoso, logo, é de fácil visualização. Podem ser observados eritema, infiltração, erosão e ulceração com fundo granuloso. Os doentes têm como queixas, obstrução nasal, eliminação de crostas, epistaxe, disfagia, odinofagia, rouquidão, dispnéia e tosse; raramente há prurido nasal e dor. Na mucosa do nariz pode haver perfuração ou até destruição do septo cartilaginoso. Na boca, pode haver perfuração do palato mole. Nas lesões crônicas e avançadas pode haver mutilações com perda parcial ou total do nariz, lábios, pálpebras, causando deformidades e consequente estigma social. É mais suscetível a complicações e pode evoluir para o óbito em 1% dos casos (MS, 2007; PEARSON; SOUSA, 1996).

A LV é uma doença crônica, sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, astenia, adinamia e anemia. Quando não tratada pode evoluir para o óbito em mais 90% dos casos. Inicialmente, na fase aguda da doença, na maioria dos casos, há febre com duração inferior a 4 semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. A doença

evolui para um estado em que há febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. No período final da doença, há febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral. Instala-se a desnutrição e edema dos membros inferiores, que pode evoluir para anasarca. Pode haver, também, hemorragias, icterícia e ascite (Secretaria de Vigilância em Saúde/MS; PEARSON; SOUSA, 1996).

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida (HONINGBERG, 1963 apud LAISON; SHAW, 1979) e à família Trypanosomatidae (DOFLEIN, apud LAINSON; SHAW, 1979) e seu ciclo vital (FIG.1) consiste em uma fase na qual são parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos como forma não-flagelada ou amastigota. Em outra fase do ciclo de vida vivem como promastigotas flageladas extracelulares no trato digestivo das fêmeas de flebotomíneos (MS, 2006; PEARSON; SOUSA, 1996).

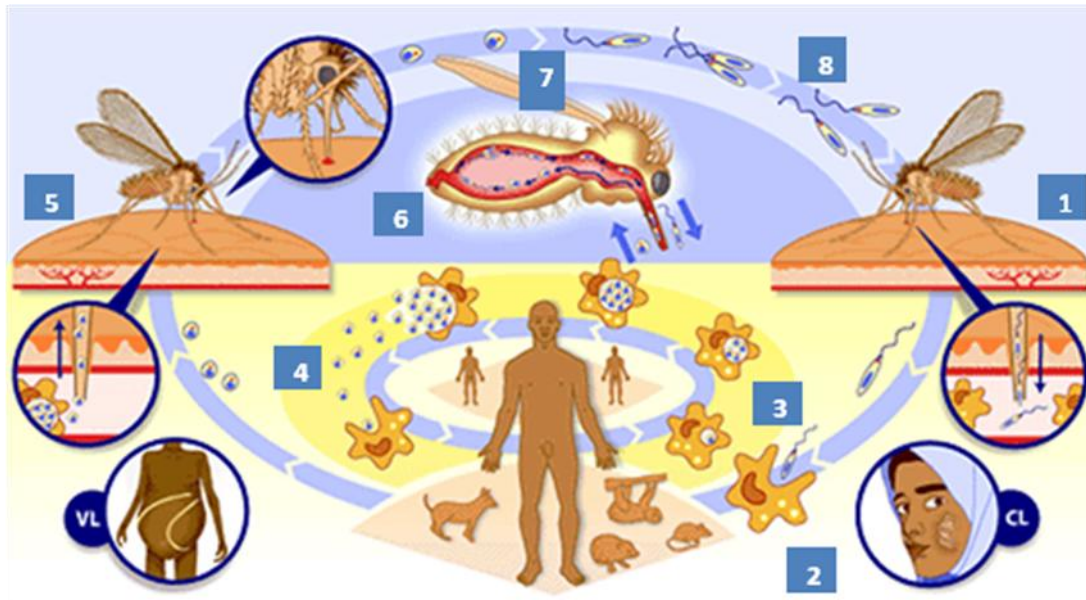


Figura 1: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. 1 – infecção do hospedeiro vertebrado por formas promastigotas metacíclicas do parasita durante o repasto sanguíneo. 2 – fagocitose das promastigotas. 3 – transformação das promastigotas em amastigotas e multiplicação. 4 – rompimento do macrófago e liberação das amastigotas. 5 – ingestão de células infectadas pelo vetor. 6 – lise de células infectadas durante a digestão. 7 – transformação de amastigotas em promastigotas. 8 – multiplicação das promastigotas. (Adaptado de TDR/WHO)

As fêmeas do inseto vetor, ao sugarem o sangue de um mamífero infectado, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo anterior do mosquito, ocorre o rompimento dos macrófagos e liberação das amastigotas, que se diferenciam rapidamente em formas promastigotas flageladas. As formas promastigotas diferenciam-se em formas paramastigotas e colonizam o esôfago e a faringe do vetor, permanecendo aderidas ao epitélio pelo lipofosfoglicano (LPG), a principal molécula de superfície das promastigotas. Esta adesão é uma capacidade inerente às formas promastigotas não infectantes. Pelo processo da metaciclo-gênese, as promastigotas passam por modificações estágio-específicas no LPG, o que controla a sua aderência ou liberação (MS, 2006; PIMENTA *et al.*, 1992). Quando completa a metaciclo-gênese, o parasita apresenta-se em sua forma infectante, promastigota metacíclica, que é restrita às formas que não sofrem divisão (SACKS; PERKINS, 1984), completando o ciclo no vetor em cerca de 72 horas (MS, 2006).

As fêmeas infectantes liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com sua saliva, que parece favorecer a infectividade das promastigotas (THEODOS *et al.*, 1991; NORSWORTHY, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2005), ao realizarem novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado. Estes parasitas, então, se ligam às células do sistema mononuclear fagocitário por intermédio de suas moléculas de superfície, como a gp63 e o LPG, que têm a capacidade de se ligar, por exemplo, aos receptores dos macrófagos como o receptor de manose-fucose, receptor do complemento 3 (CR3), CD11b-CD18 (TURCO; DESCOTEAUX, 1992; NADERER *et al.*, 2004; NOVOZHILOVA; BOVIN, 2010) e são interiorizados em um fagossomo que se funde com o lisossomo formando o vacúolo parasitóforo (ALEXANDER *et al.*, 1999; COURRET *et al.*, 2002; REAL *et al.*, 2010). No interior dos macrófagos, as promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas que são adaptadas à temperatura corporal humana e ao ambiente ácido do fagolisossomo dos macrófagos. Aí, as formas amastigotas se instalam e multiplicam-se intensamente até romperem a célula e serem liberadas para sofrerem fagocitose por novos macrófagos, ocorrendo então a disseminação para outros tecidos como linfonodo, baço, fígado e medula óssea (MS, 2006; PEARSON; SOUSA, 1996).

Para garantir sua transmissão e estabelecer uma infecção crônica, os parasitas precisam escapar do sistema imune do hospedeiro e atrasar o desenvolvimento da imunidade. A maioria dos parasitas desenvolveu estratégias para evitar que sejam eliminados pelo sistema imune. Porém, a falha do sistema imune em eliminá-los não está necessariamente associada à doença clínica (YAZDANBAKHSH; SACKS, 2010).

A resposta imune de humanos frente à infecção por este parasita é celular e os sintomas dependem do tipo de resposta mediada por linfócitos T helper do tipo 1 (Th1) ou do tipo 2 (Th2). A resistência e resolução da doença estão associadas à resposta celular do tipo Th1, mediada por IFN- γ , fator de necrose tumoral (TNF) e IL-12. Este perfil de resposta está geralmente associado às lesões localizadas e autocurativas. A resposta celular do tipo Th2, mediada por IL-4, está geralmente associada à susceptibilidade e progressão da doença, geralmente associada às lesões difusas que não curam. A leishmaniose mucocutânea apresenta uma resposta mista do tipo Th1 e Th2 (REED; SCOTT, 1993).

A maioria dos dados sobre os mecanismos imunológicos relacionados com a infecção ou proteção contra parasitas do gênero *Leishmania* vem de estudos em camundongos, que têm se mostrado muito úteis no estudo de suas diversas manifestações. Algumas descobertas críticas sobre a leishmaniose cutânea murina foram confirmadas em humanos recentemente. No entanto, a resposta imune frente à leishmaniose visceral e a patogêneses da doença em humanos é bastante diferente do modelo murino (SHARMA; SINGH, 2009). Certas linhagens de camundongos, como BALB/c, desenvolvem lesões cutâneas não controláveis enquanto outras, como C57BL/6, são capazes de controlar a infecção cutânea após inoculação de *L. major* ou *L. amazonensis* (ANDRADE *et al.*, 1984; BARRAL *et al.*, 1983). Os inúmeros estudos realizados no modelo experimental da leishmaniose murina causado por *L. major*, espécie causadora da leishmaniose cutânea no Velho Mundo e que não ocorre no Brasil, foram fundamentais para o estabelecimento do chamado “paradigma Th1/Th2”, que tem servido como base para a compreensão da relação parasita-hospedeiro. A leishmaniose murina mostra-se, então, um bom modelo para estudos da população de células mononucleares e citocinas que medeiam a imunidade à patógenos intracelulares.

A maioria das linhagens de camundongos (C57BL/6, C3H, CBA) desenvolvem uma doença cutânea autolimitante quando infectados com *L. major*. Nestes camundongos, a resolução da infecção é mediada por células Th1 que produzem IFN- γ . O IFN- γ induz a produção de óxido nítrico (NO) nos macrófagos infectados com *L. major*, que leva a destruição do parasita. Logo, a infecção por *L. major* nessas linhagens se parece com a LC em humanos. Por outro lado, camundongos BALB/c susceptíveis desenvolvem uma resposta tipicamente Th2. Nessas linhagens, a resolução e a progressão da doença causada por *L. major* parecem ser determinadas pela ativação preferencial de células Th1 ou Th2, respectivamente (SHARMA; SINGH, 2009; MILON *et al.*, 1995; REINER; LOCKSLEY, 1995).

Esta polarização da resposta em Th1 ou Th2, entretanto, não é tão clara para outras espécies de *Leishmania*. Por exemplo, camundongos da linhagem C57BL/10, enquanto capazes de curar uma infecção por *L. major*, não conseguem resolver a lesão se infectados por *L. amazonensis*. A infecção por *L. major* induz a produção de altos níveis de IFN- γ e nenhuma IL-4, ao passo que a infecção por *L. amazonensis* induz baixa produção de IL-4 e pouca ou nenhuma de IFN- γ (AFONSO; SCOTT, 1993). Em outro exemplo, camundongos BALB/c são resistentes à infecção por *L. braziliensis*. Neste modelo de infecção, observa-se a produção de níveis baixos de IFN- γ semelhantes à infecção por *L. major*, porém, produção bem mais baixa de IL-4 se comparada àquela causada pela infecção por *L. major* (DeKREY *et al.*, 1998).

No primeiro exemplo acima citado, a susceptibilidade não parece ser devido ao desenvolvimento preferencial de uma resposta Th2, mas sim à incapacidade do animal de desenvolver uma resposta Th1 adequada. Ao passo que, no segundo exemplo, a resistência parece ser devido à ausência de uma resposta Th2, e não à presença de uma resposta Th1. Além disso, um tipo de resposta mista Th1/Th2 pode ser mantida, como é o caso do modelo de infecção com *L. amazonensis* (JI *et al.*, 2002). Assim, um mesmo tipo de hospedeiro reage de maneira diversa a diferentes espécies de *Leishmania* (SOUZA *et al.*, 2000) e, portanto, resistência e susceptibilidade, bem como padrão Th1/Th2 de resposta, dependem tanto do *background* genético do hospedeiro como da espécie infectante.

O paradigma Th1/Th2 da resistência/susceptibilidade é uma simplificação de uma rede muito mais complicada de interações regulatórias/contra-regulatórias e isto difere de acordo com a espécie de *Leishmania* estudada, o tipo de hospedeiro usado e o tecido examinado. Estudos recentes enfatizam a importância do balanço entre as duas citocinas regulatórias IL-12 e IL-10, críticas para a regulação da modulação da imunidade, em contraste às ideias iniciais de que as funções antagônicas de IFN- γ e IL-4 determinam a proteção ou patogêneses da doença. Outros processos independentes de células T, que atuam no início da doença, têm sido sugeridos como sendo importantes para o fenótipo de susceptibilidade, como atuação da IL-10, produzida por macrófagos infectados por *Leishmania* antes mesmo da produção de IL-4, que atuaria mais tarde favorecendo a progressão da doença (SHARMA; SINGH, 2009).

As espécies de *Leishmania* do velho mundo divergiram há cerca de 40-80 milhões de anos das do novo mundo, desenvolvendo estratégias diferentes para sobreviver em tecidos diferentes e/ou hospedeiros diferentes, por fatores de virulência diversos. O complexo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*), por exemplo, desenvolveu

mecanismos adicionais para subverter a resposta imune do hospedeiro. A contribuição de fatores de virulência para o estabelecimento e manutenção da infecção difere entre as espécies de *Leishmania*, por exemplo, o LPG é fator de virulência para *L. major* e *L. donovani*, mas não para *L. mexicana*, enquanto gp63 é um fator de virulência vital para *L. major*, *L. mexicana*/*L. amazonensis* e *L. donovani*, portanto, a interação dessas espécies com a resposta imune do hospedeiro difere significativamente. Logo, a imunobiologia das espécies de *Leishmania* é consideravelmente diferente (McMAHON-PRATT ; ALEXANDER, 2004).

A resposta imune que envolve a infecção por *Leishmania* é, assim, complexa, uma vez que pode ser determinada pelas características tanto do hospedeiro quanto da espécie de *Leishmania*. Mais especificamente, no modelo murino, é aceito que a imunidade protetora contra estes parasitas é mediada pela resposta do tipo Th1, enquanto o papel preciso da resposta do tipo Th2 ainda não é bem caracterizado, já que a atividade significativa de IL-4, por exemplo, pode se tornar redundante diante da atividade compensatória de IL-13, que compartilha muitas das propriedades da IL-4 (McMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004) e, além disso, já foram descritos papéis protetores para IL-4 e IL-13 durante infecções com *L. major* (BOGDAN *et al.*, 1991), e *L. donovani* (ALEXANDER *et al.*, 2000) mas não com *L. mexicana* ou *L. amazonensis*.

A imunidade inata também parece desempenhar um papel importante no curso da infecção causada por *Leishmania*. Os macrófagos são um exemplo. Servindo de célula hospedeira para o parasita, essas células desempenham, além disso, a função de célula efetora na eliminação do mesmo, em geral, pela fagocitose e mecanismos microbicidas. É possível que, por si só, já determinem diferenças iniciais na susceptibilidade de camundongos à infecção por *Leishmania*. No modelo murino, nosso grupo e outros pesquisadores mostraram, por exemplo, que, independente da resposta de linfócitos Th, macrófagos de camundongos C57BL/6 produzem muito mais NO do que macrófagos de BALB/c, quando estimulados com LPS com ou sem IFN- γ *in vitro* (SANTOS *et al.*, 2006; MILLS *et al.*, 2000). Nosso grupo mostrou ainda que, por isso, esses macrófagos possuem capacidade microbicida para *L. amazonensis* muito maior do que a de macrófagos de BALB/c (SANTOS, 1997).

Além do NO, espécies reativas do oxigênio (ROS), peptídeos microbicidas e proteases constituem o arsenal antimicrobiano dos macrófagos (BEAMAN; BEAMAN, 1984; LOCKSLEY ; KLEBANOFF, 1983). As ROS são produzidas abruptamente durante o evento chamado de explosão respiratória, que é um grande aumento no consumo de oxigênio molecular, aumento no consumo de glicose, com geração, desencadeada pela enzima NADPH oxidase (EL-BENNA, 2005). A NADPH oxidase é uma enzima ligada à membrana celular

que catalisa a produção de superóxido (O_2^-) a partir do oxigênio molecular e da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (BABIOR, 2000). A enzima NADPH oxidase de fagócito (Phox, *phagocyte oxydase*), encontrada principalmente em neutrófilos e macrófagos, consiste de uma unidade catalítica gp91phox e das unidades regulatórias p22phox, p47phox, p40phox, p67phox e a RAC GTPase. A atividade enzimática de gp91phox é regulada pelas subunidades regulatórias que se juntam e formam um complexo ativo. Elétrons são transferidos da NADPH, que é um substrato específico, pela enzima, ao oxigênio molecular para gerar superóxido, com produção secundária de outras ROS (FIG. 2). Esta oxidase é inicialmente inativa, mas é ativada pela união dessas subunidades mediada pela exposição a microorganismos ou a mediadores inflamatórios (LAMBETH, 2004).

Macrófagos e neutrófilos são a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, uma vez que, além de fagocitarem, produzem agentes oxidantes reativos capazes de matá-los, mas que também podem causar danos aos tecidos vizinhos. Essas células agem em conjunto, por uma variedade de mecanismos onde estes dois tipos de células cooperam na imunidade inata a patógenos microbianos (CARMO *et al.*, 2010).

Os neutrófilos podem proteger ou aumentar a infecção com *L. major* pela interação com macrófagos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004); podem também facilitar a invasão dos macrófagos pelos parasitas, agindo como “cavalos de Tróia” (PETERS *et al.*, 2008; ZANDBERGEN *et al.*, 2004) e já foi mostrado, também, um papel importante na resposta imune protetora à *L. braziliensis* (NOVAIS *et al.*, 2009). Neutrófilos de camundongos C57BL/6, assim como seus macrófagos, produzem mais NO do que neutrófilos de camundongos BALB/c, linhagens respectivamente resistentes e susceptíveis à infecção por *L. major*, como observado por Duarte (2008).

O presente trabalho focalizou a espécie *L. guyanensis*, agente etiológico da leishmaniose cutânea que, apesar de altamente prevalente em várias áreas endêmicas do Brasil, da Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Peru e Suriname (GRIMALDI *et al.*, 1989; ESCOBAR *et al.*, 1992; LAINSON *et al.*, 1994; ROMERO *et al.*, 2002), pouco se sabe sobre a patogênese e sobre a resposta imune do hospedeiro frente à infecção por essa espécie. A *L. guyanensis* causa uma forma cutânea da leishmaniose, na qual uma pápula ou um nódulo pequeno contendo macrófagos com amastigotas e infiltrado inflamatório transforma-se em uma úlcera com bordas definidas (GUTIERREZ *et al.*, 1991; SANCHES *et al.*, 1992; BIDDLESTONE *et al.*, 1994). Essa espécie de *Leishmania* também pode causar a forma mucocutânea da doença (GRIMALDI Jr *et al.*, 1991).

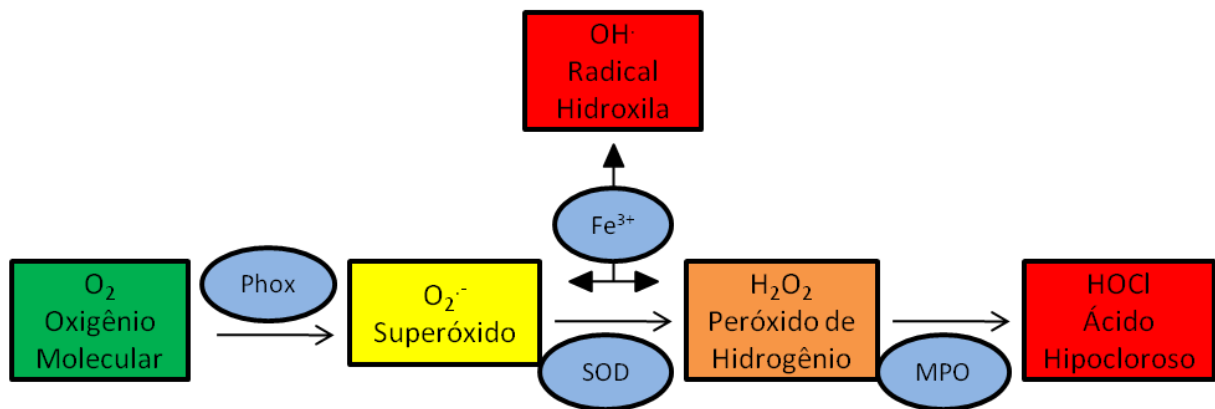


Figura 2: Espécies reativas do oxigênio (*Reactive Oxygen Species - ROS*). O ânion superóxido é gerado a partir de várias fontes, que incluem as enzimas NADPH oxidases tais como a fagócito oxidase (Phox). Duas moléculas de superóxido podem reagir para gerar peróxido de hidrogênio (H₂O₂), numa reação conhecida como dismutação, que é acelerada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Na presença de ferro, o ânion superóxido e H₂O₂ reagem para gerar radicais hidroxila (OH[•]). Em áreas inflamadas outras ROS podem ser formadas, incluindo o ácido hipocloroso (HOCl), formado em neutrófilos a partir de H₂O₂ e Cl⁻ pela enzima de fagócito, a mieloperoxidase (MPO). O código de cores indica a reatividade de moléculas individuais (verde = relativamente não reativo; amarelo = reatividade limitada; laranja = reatividade moderada; vermelho = alta reatividade). (Adaptado de LAMBETH, 2004)

Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que camundongos BALB/c, linhagem extremamente susceptível à infecção por *L. major* e por *L. amazonensis*, não desenvolvem lesão cutânea quando infectados com a mesma quantidade de parasitas da espécie *L. guyanensis*. Foi ainda mostrado que macrófagos desses camundongos infectados com *L. guyanensis* são capazes de eliminar as formas amastigotas *in vitro*. Nesse mesmo trabalho foi verificado que a morte das amastigotas *in vitro* ocorre por mecanismo semelhante à apoptose, é independente de NO e é causada pela explosão respiratória induzida pela infecção com o parasita (SOUSA-FRANCO et al, 2006).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune de camundongos BALB/c e C57BL/6 à infecção por *L. guyanensis in vivo*, particularmente o papel da explosão respiratória na determinação da resistência, bem como o perfil da resposta Th. Teve-se ainda como objetivo determinar qual das ROS é a molécula responsável pela eliminação das amastigotas de *L. guyanensis in vitro* por macrófagos dessas linhagens de camundongos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Parasitas

As cepas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*, código internacional MHOM/BR/75/M4147 e de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, código internacional IFLA/BR/67/PH8, utilizadas nesta pesquisa, foram fornecidas pela Professora Dra. Maria Norma de Melo do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), ambas na forma promastigota e cultivadas no laboratório de imunologia e biologia celular de parasitas do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da mesma instituição.

2.2 Criopreservação

Adicionava-se 10% de glicerol PA estéril à cultura de promastigotas, gota a gota, sob agitação constante. Após 30 minutos agitando, a cultura era aliquoteada em tubos de 1,8 mL (Nunclon-Delta, Nunc, Dinamarca) apropriados para criopreservação. As alíquotas eram mantidas em *deep-freezer* (Bio Freezer, Forma Scientific, Marietta, Ohio) a -80°C por 24 horas. Em seguida, os tubos eram transferidos para botijões de nitrogênio (N_2) líquido (Omega EM-32, MVE Cryogenics, New Prague, Minnesota, USA). Para recuperar as formas promastigotas previamente criopreservadas, estas eram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C , inoculadas em meio de cultura Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) estéril e inativado, e mantidas a 25°C (estufa BOD-REVCO). As culturas recuperadas só eram utilizadas em experimentos após dois repiques consecutivos para total recuperação dos parasitas.

Durante o seu preparo, de acordo com as instruções do fabricante, o meio de cultura Schneider's insect medium (Sigma) era dissolvido em água Milli-Q, tamponado com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (0,4g/L). O pH da solução era então ajustado para 9,0 com hidróxido de sódio (NaOH), e depois da solução ter ficado turbida, o pH era ajustado para 6,9 com ácido clorídrico (HCl). Uma solução de cloreto de cálcio (0,79g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em

50mL de água Milli-Q) era adicionada para cada litro de meio preparado, vagorosamente para evitar precipitação. Após adição do antibiótico gentamicina (50mg/L), o pH da solução era finalmente ajustado para 7,2. O meio de cultura era filtrado em filtros com membrana de porosidade 0,2µm, para esterilização e estocados em recipientes estéreis. Imediatamente antes do uso era sempre adicionado soro fetal bovino (SFB) estéril.

2.3 Cultivos dos parasitas

A cada 5 dias eram feitos repiques das promastigotas visando a sua manutenção *in vitro* em Schneider com 10% SFB em estufa a 25°C. O inóculo utilizado era de 1×10^6 parasitas por mL de cultura. As formas promastigotas utilizada nos experimentos eram mantidas por, no máximo, 15 repiques, devido à perda de virulência após longos períodos de cultura (NOLAN & HERMAN, 1985; NASYROVA *et al.* 1989).

O acompanhamento da cultura era realizado por observação em microscópio invertido (Olympus IMT, Tóquio, Japão) para verificar a ausência de contaminação por outros microrganismos. A contagem dos parasitas era feita em câmara hemocitométrica de Neubauer (C.A. Hausser & Son, Filadélfia, PA, E.U.A.), a contagem era feita em microscópio óptico (Olympus), em aumento de 400x, após uma diluição da cultura de 1:100 em Isoton (0,05 M ácido cítrico, 0,12 M NaCl, 0,5% formaldeído p/v, pH 7,2). A média aritmética de duas contagens era utilizada para calcular o número de parasitas por mililitro de cultura, pela fórmula:

Nº de parasitas = média de 4 quadrantes x diluição da amostra x 10^4 (fator de correção).

2.4 Separação de formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania*

Uma cultura de 60mL dos parasitas em fase estacionária era centrifugada a 2000g por 15 minutos a 4°C. O pellet era novamente suspenso em 2mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (NaCl 145mM, Na₂HPO₄ 9mM, NaH₂PO₄.H₂O 1 mM, pH 7,6) estéril. Durante esta centrifugação um gradiente de Ficoll era preparado, colocando-se em um tubo 2mL de Ficoll 20% e, vagorosamente, por cima deste, 2mL de Ficoll 10%, preparado na

hora do uso. Os 2mL da cultura de parasitas eram colocados vagarosamente no topo do gradiente de Ficoll e, então, esta preparação era centrifugada a 1300g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante (onde se encontravam as formas metacíclicas), que fica por cima do anel esbranquiçado que é formado entre os gradientes, era coletado e centrifugado a 2000g, por 15 minutos a 4°C, duas vezes suspendendo novamente em 10mL de PBS. Ao final da segunda centrifugação, o pellet era suspenso novamente em 1mL de PBS e os parasitas eram quantificados em câmara de Neubauer.

O Ficoll 20% era preparado adicionando-se 20g de Ficoll PM 400 (Sigma, Sigma-Aldrich) em 100mL de água Milli-Q aquecida. Esta solução era esterilizada por filtração em filtro de 0,22 µm. O Ficoll 10% era preparado adicionando-se 1mL do Ficoll 20% estéril, 800µL de água Milli-Q estéril e 200µL de PBS 10x estéril.

2.5 Animais

Camundongos BALB/c e C57BL/6 machos com 5 a 10 semanas de idade foram utilizados nos experimentos. Estes animais eram comprados do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. Camundongos C57BL/6 *knockout* para a subunidade gp91phox da enzima NADPH oxidase (POLLOCK, 1995), com 5 semanas de idade também foram utilizados em alguns experimentos e estes animais foram gentilmente cedidos pela Professora Dra. Leda Quércia Vieira. Todos os animais eram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica desse mesmo Instituto.

Nos experimentos foram usados grupos de 5 camundongos por ponto ou *pool* de células de 5 camundongos.

2.6 Tratamento com apocinina

Camundongos BALB/c eram tratados diariamente com 10mg/kg de apocinina (Acetovanilona 98%, Sigma-Aldrich) (USUI *et al.*, 2009; KIELLAND *et al.*, 2009) dissolvida em PBS, 0,1% de etanol. Considerou-se que cada camundongo pesa 25g. Nas duas primeiras semanas foram tratados com 100 µL da solução de apocinina 5x diluída em 400 µL de PBS,

via intraperitoneal. Após as duas primeiras semanas, essa mesma dose foi administrada via oral na água, diariamente, durante 5 semanas.

2.7 Infecção dos camundongos

Camundongos BALB/c e C57BL/6 eram infectados injetando-se, subcutaneamente, na pata traseira, 40µL de uma suspensão de 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. guyanensis* ou *L. amazonensis* em PBS.

2.8 Curso da infecção na pata dos camundongos e quantificação de parasitas na pata infectada e no linfonodo

O curso da infecção na pata dos camundongos era acompanhado pelas medidas semanais do tamanho da pata com auxílio de um paquímetro (Mitutoyo). A medida do tamanho da lesão foi representada pela diferença do tamanho (média \pm EP) entre a pata infectada e a contralateral não infectada. A infecção com *L. guyanensis* foi acompanhada durante 18 semanas nas duas linhagens de camundongo. A infecção com *L. amazonensis* foi acompanhada durante 9 semanas em BALB/c e durante 11 semanas em C57BL/6.

O número de parasitas nas patas e nos linfonodos era estimado pelo ensaio de diluição limitante descrito em Afonso & Scott (1993), com algumas modificações. Resumidamente, as patas e os linfonodos poplíteos dos camundongos infectados por *L. guyanensis* ou *L. amazonensis* eram coletados em PBS gelado. Cada pata ou linfonodo era macerado com auxílio de macerador de tecidos de vidro e ressuspensionado em 6mL de Schneider. Para remover restos de tecido, a suspensão era centrifugada a 50g por 4 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para outro tubo e centrifugado a 2000g por 15 minutos a 4°C, no caso das patas. Para os linfonodos, era feita apenas uma centrifugação a 2000g por 15 minutos a 4°C. Os pellets eram ressuspensionados em 200µL de Schneider com 10% de SFB. Até esta etapa tudo era mantido no gelo. As suspensões contendo parasitas eram diluídas seriadamente em fator de diluição de 4, de $1:4^1$ até $1:4^{24}$, para um volume final de 200µL de Schneider com 10% de SFB em placa de cultura celular de 96 poços. As ponteiros eram

trocadas para cada diluição diferente e foram feitas 24 diluições. As placas eram incubadas por 7 dias a 25°C e analisadas em microscópio invertido (Olympus, IMT, Tóquio, Japão) para observação do crescimento dos parasitas. Os resultados foram representados como o logaritmo negativo do título da maior diluição na qual os parasitas ainda eram encontrados.

2.9 Obtenção de macrófagos peritoniais

Os camundongos eram injetados intraperitonealmente com 2mL de meio tioglicolato 3% (GORDON *et al.*, 1974). Após 3 a 4 dias, os animais eram sacrificados e 5 mL de PBS estéril gelado eram injetados na cavidade peritoneal desses animais. O abdômen dos animais era, então, massageado, e o PBS contendo macrófagos era retirado com auxílio de seringa e agulha (21G1) e mantido no gelo. As células eram então centrifugadas a 600 g por 10 minutos, suspendidas novamente e lavadas com PBS gelado, centrifugando-as novamente a 600g por 10 minutos, depois eram suspendidas novamente em meio RPMI com 10% de SFB. Em seguida, as células eram contadas em câmara de Neubauer para serem plaqueadas em placas de cultura celular. As células eram, então, incubadas por 2 horas em estufa (Forma Scientific) a 37°C com 5% de CO₂ para adesão dos macrófagos. Após esse tempo, as células eram lavadas cuidadosamente 2 vezes com RPMI em temperatura ambiente, para retirar células não aderidas. Adicionava-se novo RPMI com 10% de SFB e as células eram novamente incubadas a 37°C até o dia seguinte, quando eram usadas. Para o ensaio de quimioluminescência, os macrófagos eram utilizados logo depois de serem extraídos e contados, sem passarem pelas incubações para aderência.

O meio de cultura RPMI 1640 era dissolvido em água Milli-Q, tamponado com 2g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e 5,96 g/L de HEPES ([N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfônico)]). Após adição de 50mg/L do antibiótico gentamicina, o pH era acertado para 7,2. O meio era esterilizado em filtros de poros 0,2µm e estocado em recipientes estéreis. O SFB estéril sempre era adicionado imediatamente antes do uso.

2.10 Infecção dos macrófagos

Os macrófagos aderidos em placas de cultura eram infectados por promastigotas de fase estacionária de *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*. Os parasitas da cultura eram contados em câmara hemocitométrica de Neubauer, como descrito acima, para o cálculo da quantidade necessária de parasitas que seria usado em cada experimento. Os macrófagos eram incubados com os parasitas em RPMI com 10% SFB, em estufa (Forma Scientific) a 34°C na presença de 5% de CO₂, durante 4 horas, para permitir a infecção dos macrófagos. Após esse período, as células eram lavadas duas vezes com RPMI em temperatura ambiente para remover o excesso de parasitas que não foram internalizados; este momento era considerado o “tempo zero” de infecção. Os macrófagos eram, então, reincubados por tempos variados em RPMI com 10% SFB a 34°C em 5% de CO₂, até o final dos experimentos.

2.11 Quantificação de NO

O NO em meio aquoso é oxidado a nitrito (NO₂⁻), que era quantificado pela reação colorimétrica de Griess. Combinava-se, em placas de 96 poços, 100µL da amostra com 100µL do reagente de Griess, mistura feita na hora do uso na proporção de 1:1 de 1% de sulfanilamida em 2,5% de H₃PO₄ e 0,1% de diaminadihidrocloridonaftaleno (NEED) em 2,5% de H₃PO₄ (HIBBS *et al.*, 1988). Após 10 minutos, as absorbâncias a 540 nm, das diferentes amostras, eram comparadas com os valores da curva padrão, obtida pela dosagem de nitrito de sódio diluído em RPMI, em concentrações que variavam de 2 a 200µM. As absorbâncias eram quantificadas em espectrofotômetro (SpectraMAX 340, Molecular Devices, Sunnyvale, California).

2.12 Avaliação da taxa de infecção e multiplicação de parasitas no interior dos macrófagos

Macrófagos peritoneais (1×10^6 células por lamínula) de camundongos BALB/c ou C57BL/6 eram cultivados em placas de cultura celular de 24 poços (TPP) em 1mL de RPMI com 10% de SFB sobre lamínula de vidro redonda de 13 mm. Após 24h, 48h, 72h ou 96h de infecção com 10 promastigotas de fase estacionária de *L. guyanensis* ou *L. amazonensis* por macrófago, as lamínulas eram coradas pela técnica May-Grünwald/Giemsa e seladas sobre lâmina de vidro com Entellan (Merck).

A técnica de coloração May-Grünwald/Giemsa consiste na coloração do conjunto célula-parasita (GIAIMIS *et al.*, 1992), na qual, primeiramente, as células são fixadas em metanol PA por 5 minutos, em seguida adiciona-se o corante May-Grüwald por 1 a 3 minutos. Logo após este intervalo, adiciona-se o volume total dos poços em água Milli-Q (pH 7,0) sem retirar o corante, a solução é retirada imediatamente. O corante Giemsa, preparado na hora do uso pela adição de duas gotas do corante por mililitro de água Milli-Q (pH 7,0), é adicionado por 6 a 10 minutos. As lamínulas são retiradas do fundo da placa e lavadas em água corrente. Depois de secas, são seladas.

A atividade leishmanicida dos macrófagos infectados era avaliada pela contagem do número de macrófagos infectados e do número de parasitas intracelulares após tempos variados de infecção. O número de macrófagos infectados e o número de parasitas intracelulares eram obtidos pela contagem em microscópio óptico de 500 macrófagos. A taxa de infecção era estimada pela porcentagem de macrófagos infectados, assim como pelo número de parasitas por 500 macrófagos, em duplicata (BARRAL-NETTO *et al.*, 1996). Os resultados foram representados como média de duplicatas \pm desvio padrão da porcentagem de macrófagos infectados ou do número de parasitas por 500 macrófagos.

Em alguns experimentos, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^4 macrófagos/poço em 200 μ L de RPMI com 10% de SFB) eram cultivados em câmaras plásticas de oito poços sobre lâminas de vidro para microscópio (BD Falcon, BD Biosciences). Uma hora antes da infecção e durante todo o período posterior do experimento, as culturas de macrófagos eram incubadas ou não com 20U em 10 μ L da enzima superóxido dismutase (SOD) (Sigma-Aldrich) ou 100U em 10 μ l da enzima Catalase (Beckman *et al.*, 1988), ambas, enzimas antioxidantes que têm sua ação sobre o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o

peróxido de hidrogênio (H₂O₂), respectivamente. A atividade leishmanicida era comparada entre as culturas infectadas, incubadas ou não, com as enzimas.

2.13 Ensaio de Quimioluminescência

Macrófagos peritoneais (1×10^6 em 50 μ L de RPMI sem indicador de pH) de camundongos BALB/c ou C57BL/6 eram incubados com 2×10^{-4} M de Luminol (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione), na presença de promastigotas de fase estacionária de *L. guyanensis* (10 parasitas/célula em 50 μ L de RPMI sem indicador de pH) ou de *L. amazonensis* (10 parasitas/célula 50 μ L de RPMI sem indicador de pH) ou de 50 μ L de Zymosan, em placa de 96 poços apropriada para a quantificação da emissão de luz (NUNC), sempre na seguinte ordem: células, Luminol, parasitas e por último o Zymosan. A emissão de luz era quantificada em luminômetro Packard Luminocount, imediatamente após as células e estímulos serem colocados na placa. As leituras eram feitas em intervalos de 1 minuto durante 1 hora e meia.

2.14 Obtenção de antígeno de *L. guyanensis*

Culturas de promastigotas de fase estacionária de *L. guyanensis* (480 mL) eram centrifugadas a 2000g por 10 minutos e ressuspensas em 10 mL de PBS e submetidas a sete ciclos de congelamento-descongelamento em N₂ líquido e banho-maria 37°C para rompimento dos parasitas. O extrato total dos parasitas era, então, submetido à quantificação de proteína pelo reagente de Folin. O extrato total quantificado era, finalmente, distribuído em alíquotas de 1mg/mL de proteína e estocado a -80°C.

2.15 Cultura de células do linfonodo

Os linfonodos poplíteos esquerdos e direitos dos camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados nas duas patas traseiras por *L. guyanensis* eram coletados em RPMI gelado. Os linfonodos de cada camundongo eram macerados com auxílio de macerador de tecidos de vidro e ressuspensos em 3mL de RPMI. Depois de macerados, os linfonodos eram centrifugados a 300g por 10 minutos a 4°C. Os pellets eram ressuspensos em 1mL de RPMI com 10% de SFB. Até esta etapa tudo era mantido no gelo. A quantidade de células dos linfonodos de cada camundongo era quantificada em câmara de Neubauer, diluição 1:100. As células eram plaqueadas em placas de 24 poços na quantidade de 1×10^6 células/poço em 1mL de RPMI com 10% SFB, eram estimuladas ou não com 50µg/mL de antígeno de *L. guyanensis* e, então, encubadas a 37°C em estufa a 5% de CO₂. Os sobrenadantes das culturas eram coletados após 72 horas e mantidos a -20°C.

2.16 ELISA

Os sobrenadantes das culturas de células do linfonodo eram utilizados nesse ensaio para a detecção da produção de IFN- γ ou IL-4.

Para a detecção do IFN- γ , as placas de ELISA (Nalgene NUNC, Rochester, NY, EUA) eram sensibilizadas com 100 µL a 2 µg/mL do anticorpo de captura anti-IFN γ murino (R4-6A2) (gentilmente cedido pelo Prof. Luís Carlos Crocco Afonso, NUPEB, UFOP) e incubadas por 18 horas a 4°C. No dia seguinte, as placas eram transferidas para estufa seca a 37°C por uma hora. Em seguida, era feito o bloqueio da placa com PBS 5% de SFB por 1h. Passado esse tempo, as placas eram lavadas cinco vezes com uma solução de Tween a 0,05% em PBS e as amostras eram distribuídas na placa. O padrão era colocado a uma concentração de 1 ng/mL em duplicata e diluído (1:2) nos poços subsequentes para montagem da curva padrão. Então, as placas eram incubadas por 2h a 25°C. As placas eram lavadas novamente por cinco vezes e adicionavam-se anticorpos policlonais anti-IFN- γ feitos em coelho (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso). Incubava-se por 1h a 25°C. Depois de lavadas cinco vezes com Tween 0,05% em PBS/, era adicionado o anticorpo anti-

IgG de coelho conjugado com peroxidase, seguido de incubação por 1h a 25°C. Após novo ciclo de lavagem, agora por 10 vezes, adicionava-se a solução substrato de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benz-tiazolino sulfônico) (Sigma Aldrich) 0,05% em tampão citrato-fosfato (0,1M, pH=4,0) acrescido de H₂O₂ a 0,005%. Após acompanhar o aparecimento de cor, a reação era parada com a utilização de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich) a 1%. As placas eram lidas em um comprimento de onda de 405nm com um leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Para a dosagem de IL-4 eram utilizados dois anticorpos monoclonais (11B11 para a captura e BVD-6 biotilado para a revelação, gentilmente cedidos pelo Prof. Luís Carlos Crocco Afonso); estreptoavidina-peroxidase (Zymed Laboratories, São Francisco, CA, EUA) e o ABTS para a revelação. O procedimento da ELISA foi o mesmo descrito para a dosagem de IFN- γ .

2.17 Reprodutibilidade, apresentação dos resultados e análise estatística

Todos os experimentos deste trabalho foram repetidos no mínimo 3 vezes e foram reprodutíveis. Em alguns experimentos foi aplicado o teste t de Student pareado, com nível de significância 0,05, para análise estatística.

3 RESULTADOS

3.1 *L. guyanensis* não causa lesão em camundongos BALB/c e C57BL/6

Para verificar o papel da explosão respiratória no controle da infecção de camundongos BALB/c com *L. guyanensis*, inicialmente, verificou-se o desenvolvimento da infecção nessa linhagem de camundongo, como já havia sido feito anteriormente (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2005). Acompanhou-se também a infecção de camundongos BALB/c com a espécie *L. amazonensis* apenas como comparação. Foi feita ainda a infecção de camundongos C57BL/6 com as duas espécies do parasito, uma vez que, posteriormente, utilizariam-se camundongos *knockout* para a subunidade gp91phox da NADPH oxidase (phox (*phagocyte oxydase*) KO), cujo *background* genético é a linhagem C57BL/6. Além disso, nada é conhecido sobre a infecção dessa linhagem de camundongo com a espécie *L. guyanensis*.

Para verificar o desenvolvimento da infecção, camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram infectados com formas metacíclicas de *Leishmania guyanensis* e *L. amazonensis*. Como pode ser observado na Figura 3, em ambas as linhagens de camundongos infectadas com *L. guyanensis*, não foi observada lesão na pata infectada, nem sequer um aumento das mesmas, pelo menos durante as 18 semanas de infecção com essa espécie de parasita. Ao contrário, a infecção de camundongos das mesmas linhagens com o mesmo número de formas metacíclicas de *Leishmania amazonensis* causou nos camundongos BALB/c um aumento contínuo do tamanho da pata infectada, atingindo valores próximos a 7,5 mm, com posterior lesão ulcerativa nas patas e nos camundongos C57BL/6 somente o aumento da pata com regressão do tamanho até pelo menos a 10^a semana, nunca ultrapassando 2,0 mm. Por se apresentar mais severa, a infecção nos camundongos BALB/c com *L. amazonensis*, foi acompanhada durante 9 semanas, quando os animais foram então sacrificados. Esses não são capazes de curar a lesão causada por essa infecção, enquanto os camundongos C57BL/6 parecem controlar a lesão. Nesses últimos, parece haver um pico do desenvolvimento da lesão na 6^a semana de infecção, mas a partir desse ponto, o quadro se inverte e a lesão regride como observado até a 10^a semana de infecção (FIG. 3).

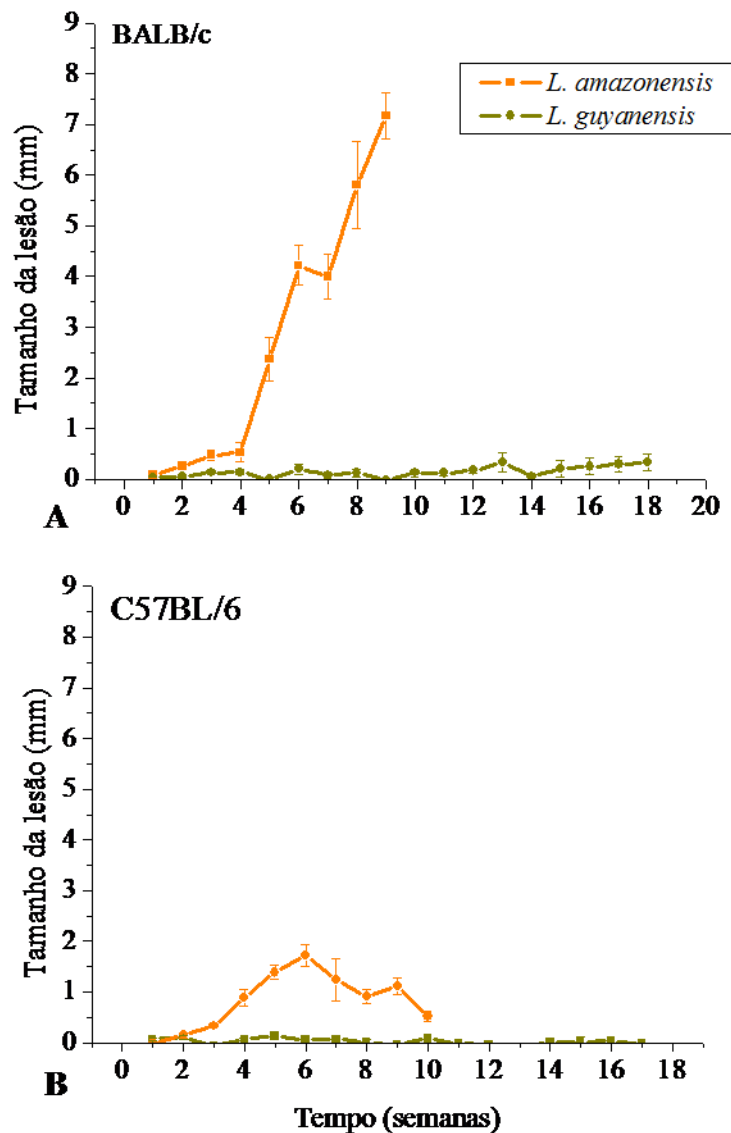


Figura 3: Progressão da lesão em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*. Grupos de 5 camundongos BALB/c (A) ou C57BL/6 (B) foram infectados na pata esquerda traseira com 1×10^6 formas metacíclicas de *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*. A progressão da lesão foi monitorada durante 18 semanas (*L. guyanensis*), 9 semanas (BALB/c com *L. amazonensis*) ou 10 semanas (C57BL/6 com *L. amazonensis*) de infecção pela medida da espessura da pata infectada. O tamanho da lesão foi representado como a diferença entre a espessura da pata infectada e a espessura da não infectada (média \pm EP) de um de pelo menos três experimentos realizados. EP: erro padrão.

3.2 A replicação de *L. guyanensis* é suprimida no sítio de infecção e no linfonodo drenante

Para verificar se a ausência de lesão e/ou do aumento do tamanho da pata correlacionava-se com a quantidade de parasitas no animal, foi feita a quantificação de parasitas nas patas infectadas e nos linfonodos drenantes do local da infecção. Como pode ser visto na Figura 4, o número de parasitas correlacionou-se com o desenvolvimento das lesões e/ou o aumento do tamanho das patas. Na infecção de camundongos BALB/c com *L. guyanensis*, a carga parasitária diminuiu consideravelmente já na 2ª semana (de 10^6 para 10^2 parasitas) chegando a números desprezíveis na 11ª semana, mas voltando a aumentar para cerca de 10^3 parasitas na 18ª semana na pata (FIG. 4A). Nos linfonodos, a carga parasitária também foi baixa, nunca ultrapassando cem parasitas (FIG 4B). Nos camundongos C57BL/6, a carga parasitária encontrada foi sempre bem menor do que em BALB/c, tanto na pata quanto no linfonodo, e os parasitas pareceram ser totalmente eliminados até a 18ª semana (FIG. 4C e D).

Na infecção com *L. amazonensis*, a carga parasitária encontrada foi, como esperado, bem maior do que na infecção com *L. guyanensis*. Percebe-se que já na 2ª semana a quantidade de parasitas é maior (de cerca de 10 a até mais de 100 vezes) do que na infecção por *L. guyanensis* em ambos os hospedeiros, indicando que a espécie *L. guyanensis* é eliminada com maior eficiência já nesse ponto. Na 6ª semana, podemos observar que a espécie *L. amazonensis* foi capaz de replicar tanto no local da infecção como nos linfonodos para os camundongos BALB/c (FIG. 4A e B) e apenas no local da infecção para os C57BL/6 (FIG. 4C e D). Ambas as linhagens de camundongos testadas não foram, então, capazes de eliminar os parasitas tanto na pata infectada, quanto no linfonodo drenante do local da infecção, quando infectadas com *L. amazonensis*. Em BALB/c a quantidade de parasitas parece aumentar correlacionando-se com o agravamento da lesão e da doença (que eventualmente levaria ao óbito). Já em C57BL/6, a carga parasitária se mantém bem mais baixa (nunca ultrapassando 100 parasitas no linfonodo), também acompanhando o curso da lesão na pata sem eliminar os parasitas.

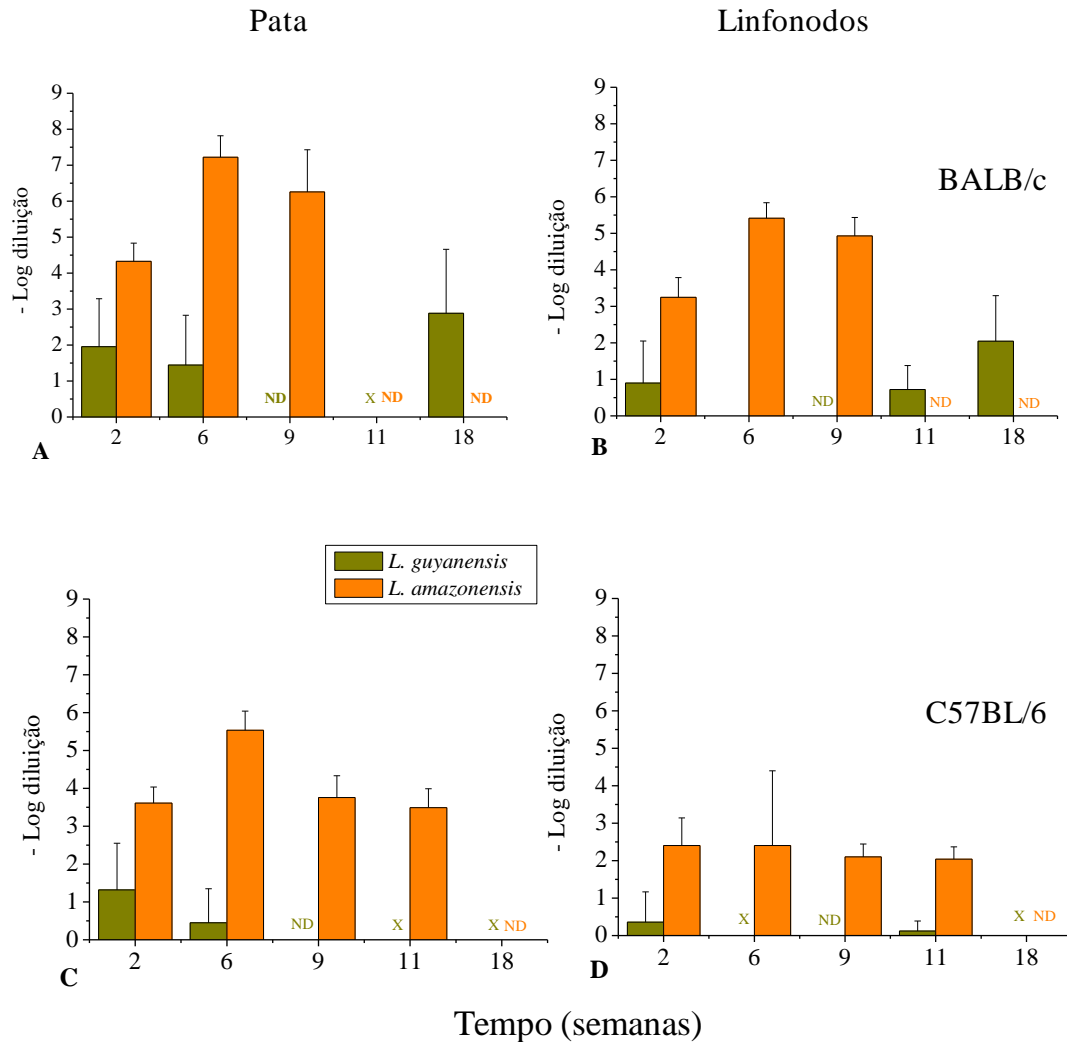


Figura 4: Quantificação de parasitas nas patas e nos linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*. Grupos de 20 camundongos BALB/c (A e B) ou C57BL/6 (C e D) foram infectados na pata esquerda traseira com 1×10^6 formas metacíclicas de *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*. Para cada ponto analisado, foram utilizadas as patas infectadas e os linfonodos drenantes de 5 camundongos no ensaio de diluição limitante. As barras verticais representam o número médio de parasitas \pm DP por pata ou linfonodo (representados como o logaritmo negativo do título de parasitas).

DP = desvio padrão. X = zero; ND = não foi feito.

3.3 Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 são capazes de eliminar amastigotas de *L. guyanensis*, mas não de *L. amazonensis*, *in vitro*

Como macrófagos são as células hospedeiras para *Leishmania*, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados com *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*, para investigar a progressão da infecção *in vitro*. Durante o período de quatro dias, a atividade leishmanicida dessas células foi avaliada quantificando-se o número de macrófagos infectados nos intervalos mostrados. Em 24 horas os macrófagos dos camundongos BALB/c apresentaram cerca de 30% de células infectadas após o contato com *L. guyanensis* o que permaneceu até 48h. A partir de 72h e até 96h, cerca de 10% das células, apenas, estavam infectadas. Os macrófagos desses mesmos animais não foram capazes de eliminar as amastigotas de *L. amazonensis*, mantendo-se entre 50% e 80% de células infectadas durante as 96 horas de infecção (FIG. 5A).

Os macrófagos dos camundongos C57BL/6 também eliminaram as amastigotas de *L. guyanensis*. Nas primeiras 48h, a infecção permaneceu entre 50% e 60%, chegando a cerca de 20% após 72h. As amastigotas de *L. amazonensis* não foram eliminadas pelos macrófagos desses mesmos camundongos e o número de macrófagos infectados permaneceu entre 70% e 85% durante às 96h (FIG.5B). As infecções dos macrófagos de C57BL/6 apresentaram infecção inicial um pouco maior do que os macrófagos de BALB/c, sugerindo que ou a infecção é mais eficiente em C57BL/6 ou a eliminação das amastigotas intracelulares é mais eficiente nos macrófagos de camundongos BALB/c.

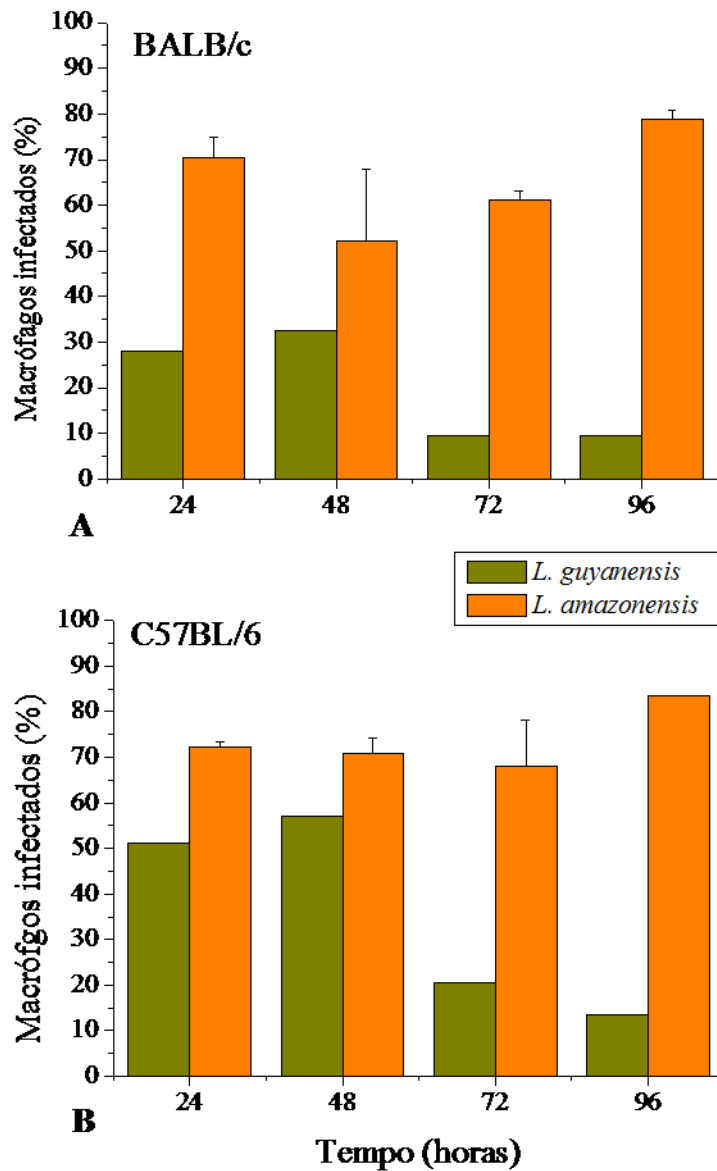


Figura 5: Atividade leishmanicida de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57BL/6 infectados com *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (A) ou C57BL/6 (B) foram infectados com promastigotas de *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*, na proporção de 10 parasitas/célula. Após os tempos indicados, a porcentagem de macrófagos infectados foram determinados. As barras verticais representam a média de duplicatas \pm DP da porcentagem de macrófagos infectados de um experimento representativo de pelo menos 3 realizados.

3.4 Promastigotas de *L. guyanensis* não induzem a explosão respiratória em macrófagos de BALB/c, mas não de C57BL/6

Nosso grupo de pesquisa já havia demonstrado que *L. guyanensis*, mas não *L. amazonensis*, induz a explosão respiratória nos macrófagos de BALB/c e, que esta é a responsável pela eliminação das amastigotas *in vitro* (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006). Em camundongos C57BL/6, isto não havia sido feito. Para verificar se *L. guyanensis* era capaz de induzir a explosão respiratória em macrófagos de camundongos C57BL/6, como acontece para macrófagos de camundongos BALB/c, macrófagos peritoneais desses camundongos foram incubados com formas metacíclicas de *L. guyanensis* e a medida da explosão respiratória foi feita. Conforme mostra a Figura 6, verificou-se que, enquanto os macrófagos de BALB/c expostos à *L. guyanensis* iniciam a explosão respiratória em cerca de 5 minutos apenas, as células de C57BL/6 o fazem de forma muito discreta e levam 20 minutos para iniciar. Se comparar os níveis de ROS produzido pelas células das duas linhagens de camundongos, é irrisória a produção em C57BL/6, chegando a níveis cerca de 6 vezes menores, além de ser menos duradoura. O contato com *L. amazonensis* não ativa a explosão respiratória em nenhuma das linhagens de camundongos. A explosão respiratória induzida por zymosan também foi maior nas células de BALB/c do que nas de C57BL/6.

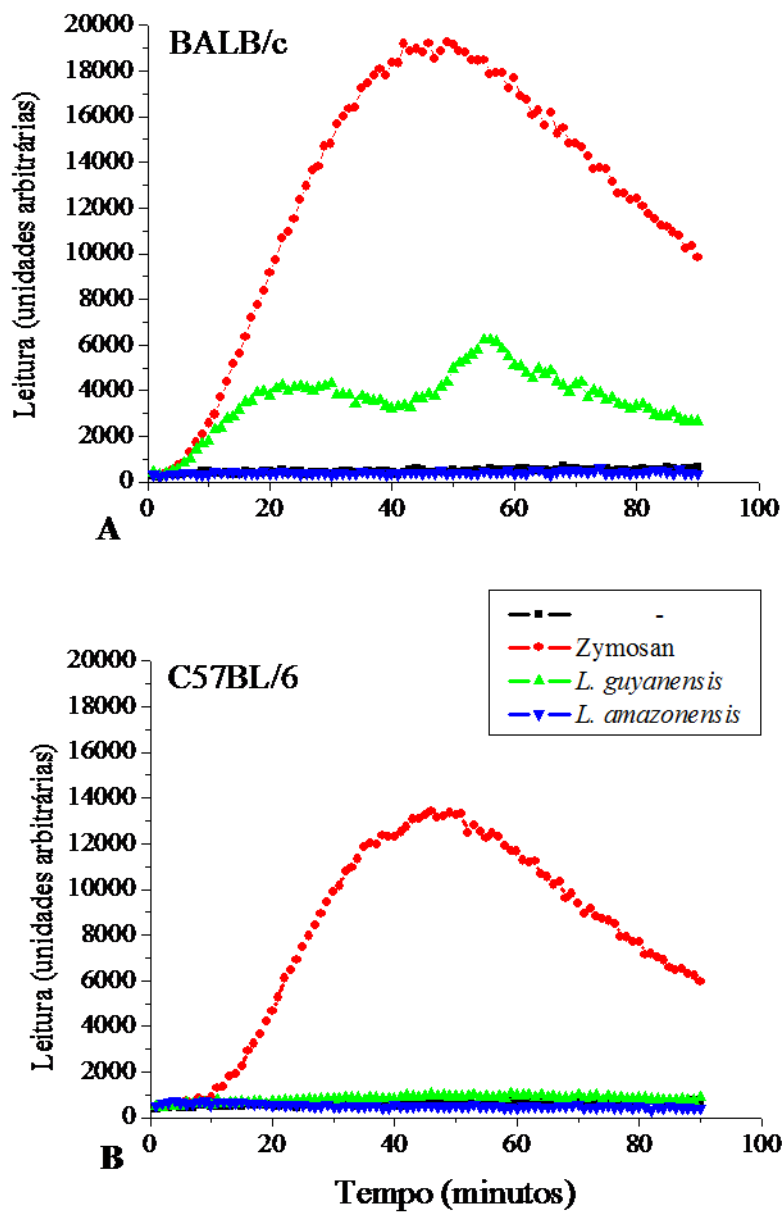


Figura 6: Produção de ROS por macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 na presença de promastigotas de *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (**A**) ou C57BL/6 (**B**) foram incubados com promastigotas de *L. guyanensis* ou de *L. amazonensis* (10 parasitas/célula). A produção de ROS foi quantificada como descrito em Materiais e Métodos. Este resultado é representativo de pelos menos 3 experimentos.

3.5 Produção de NO pelos macrófagos C57BL/6

Nosso grupo também já havia determinado que a eliminação de *L. guyanensis* por macrófagos de BALB/c *in vitro* é independente da produção de NO (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006). Para verificar se macrófagos de camundongos C57BL/6 eram capazes de produzir NO quando infectados com *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*, quantificou-se o NO no sobrenadante da cultura de macrófagos infectados durante 4 dias. Os macrófagos de camundongos C57BL/6, da mesma forma que de camundongos BALB/c, não produziram níveis detectáveis de NO quando infectados com qualquer uma das duas espécies de *Leishmania* (FIG. 7). Os macrófagos estavam aptos a sintetizar NO, uma vez que a estimulação com LPS induziu a sua produção em ambas as linhagens, com produção maior pelas células de C57BL/6 comparadas com BALB/c, como já havia sido demonstrado por nosso grupo (SANTOS *et al.*, 2006).

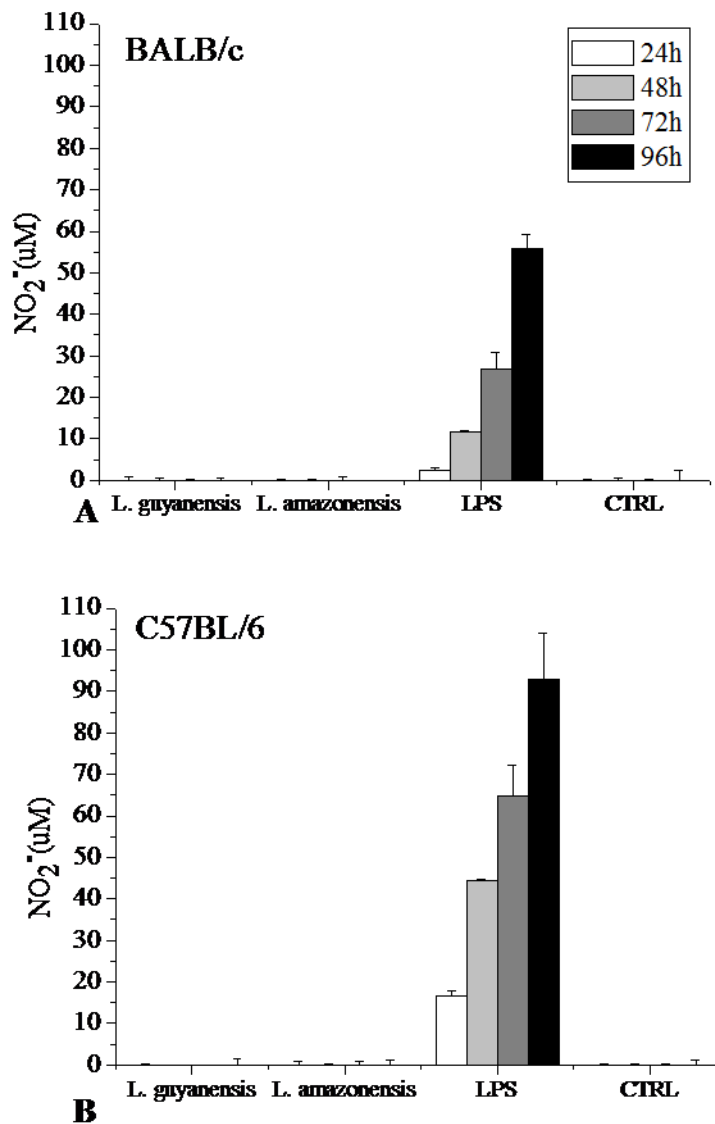


Figura 7: Produção de NO por macrófagos de camundongos BALB/c e C57/BL6 infectados com *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) foram infectados com *L. guyanensis* ou *L. amazonensis* (10 parasitas/ célula) e após 24, 48, 72 e 96 horas de infecção, o NO foi quantificado no sobrenadante das culturas, como descrito em Materiais e Métodos. Macrófagos ativados com LPS (1 mg/mL) foram usados como controle positivo e macrófagos não ativados e não infectados foram usados como controle negativo. As barras verticais representam a média \pm DP da quantidade de nitrito produzida (μ M) de um experimento representativo de 3.

3.6 *L. guyanensis* não causa lesão em camundongos C57BL/6 PHOX KO

Para verificar o papel de espécies reativas do oxigênio (ROS) na eliminação dos parasitas *in vivo*, camundongos C57BL/6 knockout para a proteína gp91phox, sítio catalítico da enzima NADPH oxidase, foram infectados com um milhão de formas metacíclicas de *L. guyanensis* nas patas e o curso da infecção foi acompanhado semanalmente, comparado com camundongos C57BL/6 tipo selvagens (WT). As patas infectadas não apresentaram lesão nem inchaço, quando comparadas com a pata não infectada e o curso da infecção não diferiu da dos C57BL/6 WT, submetidos à mesma infecção, como visto até a oitava semana (FIG 8).

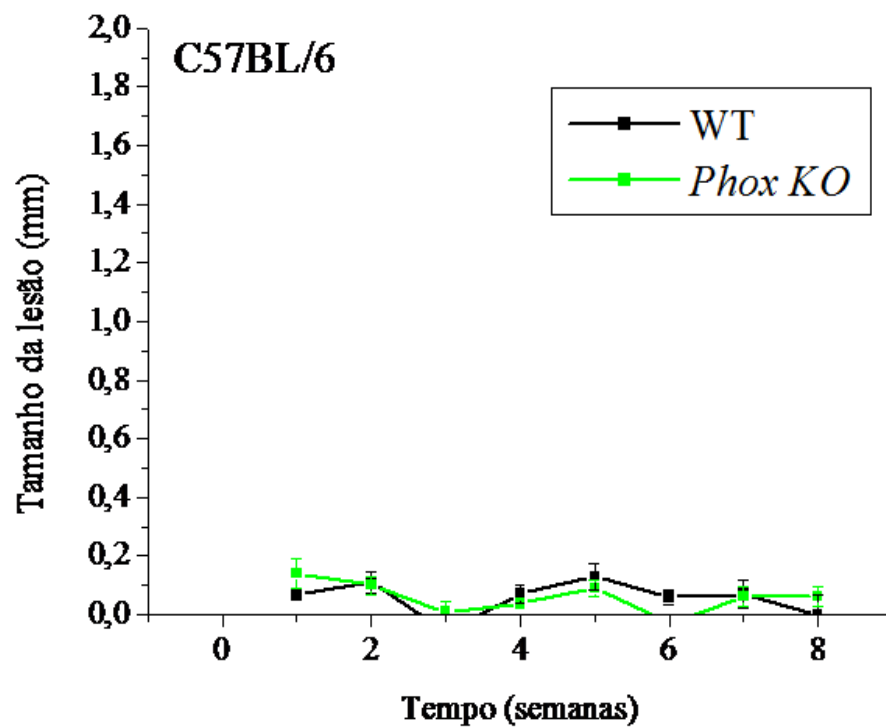


Figura 8: Progressão da lesão em camundongos C57BL/6 *Phox KO* infectados com *L. guyanensis*. Grupos de 5 camundongos C57BL/6 *Phox KO* ou tipo selvagem (WT) foram infectados na pata esquerda traseira com 1×10^6 formas metacíclicas de *L. guyanensis*. A progressão da lesão foi monitorada durante 8 semanas de infecção pela medida da espessura da pata infectada. O tamanho da lesão foi representado como a diferença entre a espessura da pata infectada e a espessura da não infectada (média \pm EP) de um de pelo menos 3 experimentos realizados.

3.7 Camundongos BALB/c tratados com apocinina, inibidor específico da NADPH oxidase, parecem tornar-se susceptíveis à infecção por *L. guyanensis*

No experimento anterior, verificamos que a ausência da atividade da enzima NADPH oxidase não afeta a resistência de camundongos C57BL/6, sugerindo que a explosão respiratória não é um mecanismo importante na eliminação dos parasitas por esta linhagem de camundongos. Assim, para verificar a importância da explosão respiratória em camundongos BALB/c, cujos macrófagos eliminam amastigotas de *L. guyanensis* pela explosão respiratória induzida pela infecção *in vitro*, administramos apocinina, um inibidor específico da NADPH oxidase, em camundongos BALB/c, antes e durante todo o período de infecção por *L. guyanensis*. Verificamos que, já no dia seguinte à primeira administração de apocinina, os macrófagos dos camundongos BALB/c não foram capazes de fazer a explosão respiratória quando estimulados com zymosan, um forte indutor dessa reação (FIG. 9). A medida da pata foi feita por 5 semanas, até o momento. A Figura 10 mostra claramente que, até 5 semanas, as patas dos camundongos tratados com apocinina tiveram a medida da pata aumentada quando comparada com camundongos não tratados. Esses resultados preliminares sugerem, até o momento, que a explosão respiratória é importante para a resistência de camundongos BALB/c à *L. guyanensis*.

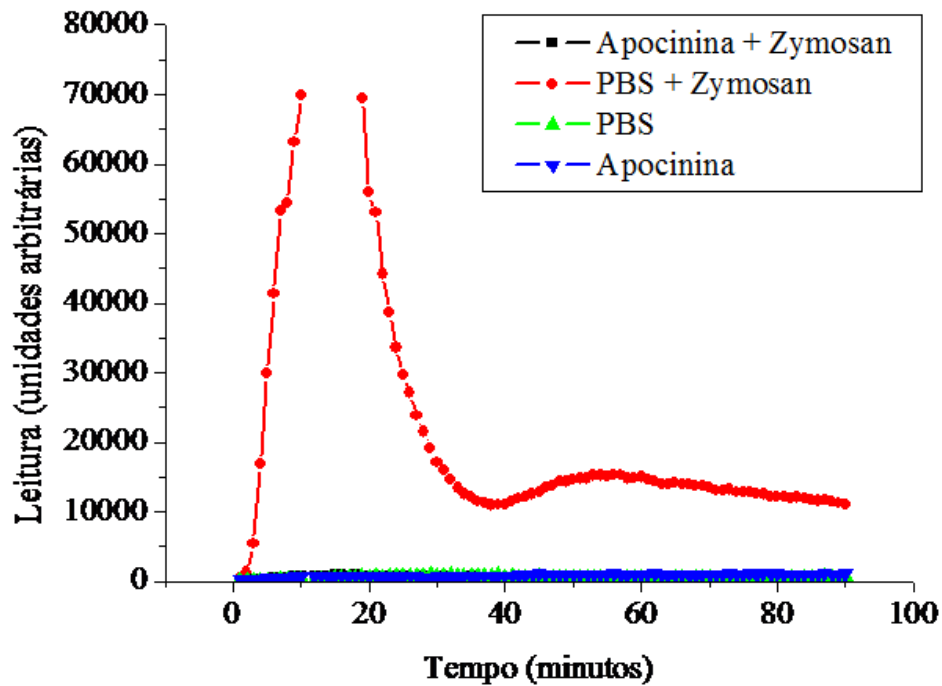


Figura 9: Efeito da Apocinina na explosão respiratória de macrófagos de camundongos BALB/c. Camundongos BALB/c foram tratados com 10mg/Kg de Apocinina, via intraperitoneal. 24 horas depois, os macrófagos peritoneais desses camundongos foram utilizados no ensaio de quimioluminescência para detecção da produção de ROS. Camundongos tratados com PBS foram usados com controle.

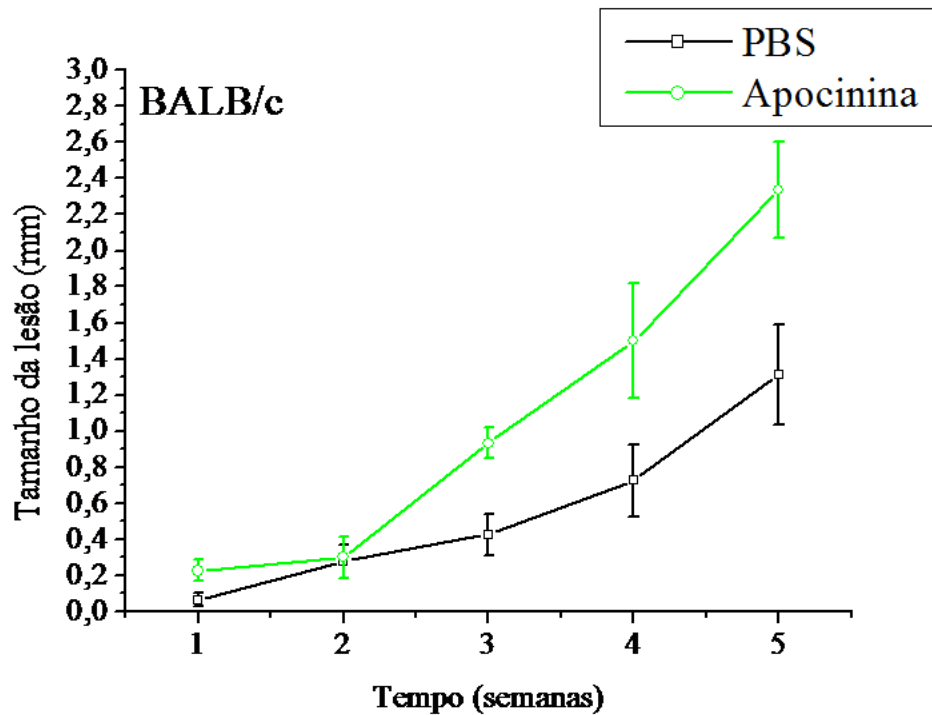


Figura 10: Progressão da lesão em camundongos BALB/c tratados com apocinina. Camundongos BALB/c foram tratados com 10mg/Kg de Apocinina, diariamente, durante 2 semanas, via i.p. Após o terceiro dia de tratamento foram infectados com 1×10^7 formas metacíclicas de *L. guyanensis* na pata direita. Após as duas semanas de tratamento i.p. os animais continuaram a receber Apocinina (10mg/Kg) diariamente, via oral, na água, durante todo o período do experimento. A progressão da lesão foi monitorada pela medida da espessura da pata infectada. O tamanho da lesão foi representado como a diferença entre a espessura da pata infectada e a espessura da não infectada (média \pm EP). Camundongos tratados com PBS foram usados como controle.

3.8 Papel do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio na eliminação de amastigotas de *L. guyanensis* por macrófagos de camundongos BALB/c.

Uma vez que a explosão respiratória, que elimina amastigotas de *L. guyanensis in vitro*, parece ser importante para a eliminação do parasita *in vivo*, investigamos qual dos produtos da explosão respiratória seria o responsável pela eliminação do parasita. Para isto, incubamos a cultura de macrófagos com a enzima superóxido dismutase (SOD), que elimina o ânion superóxido convertendo em peróxido de hidrogênio ou a enzima catalase que elimina o peróxido de hidrogênio. Esses macrófagos foram então infectados com *L. guyanensis* e a atividade leishmanicida destas células foi avaliada diariamente durante 4 dias (FIG.11) O tratamento dos macrófagos de BALB/c com SOD parece ter causado um ligeiro aumento no número de células infectadas até 48 h de infecção, quando a diferença foi estatisticamente significativa (FIG. 11A). No entanto, o número de macrófagos infectados diminuiu de forma semelhante aos não tratados após esse tempo. Da mesma forma, macrófagos incubados com SOD apresentaram um atraso de 1 dia na eliminação dos parasitas em relação aos não tratados (FIG. 11B). Os macrófagos tratados com catalase apresentaram essa mesma tendência, tanto para quantidade de macrófagos infectados quanto para eliminação de parasitas intracelulares (FIG. 12A e B), porém essa tendência foi melhor observada a partir de 48 horas de infecção até as 96 horas.

Estes resultados demonstram que tanto o O_2^- e o H_2O_2 podem ser importantes para a eliminação das formas amastigotas de *L. guyanensis* pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, visto que a eliminação destes radicais livres da cultura atrasa a eliminação dos parasitas.

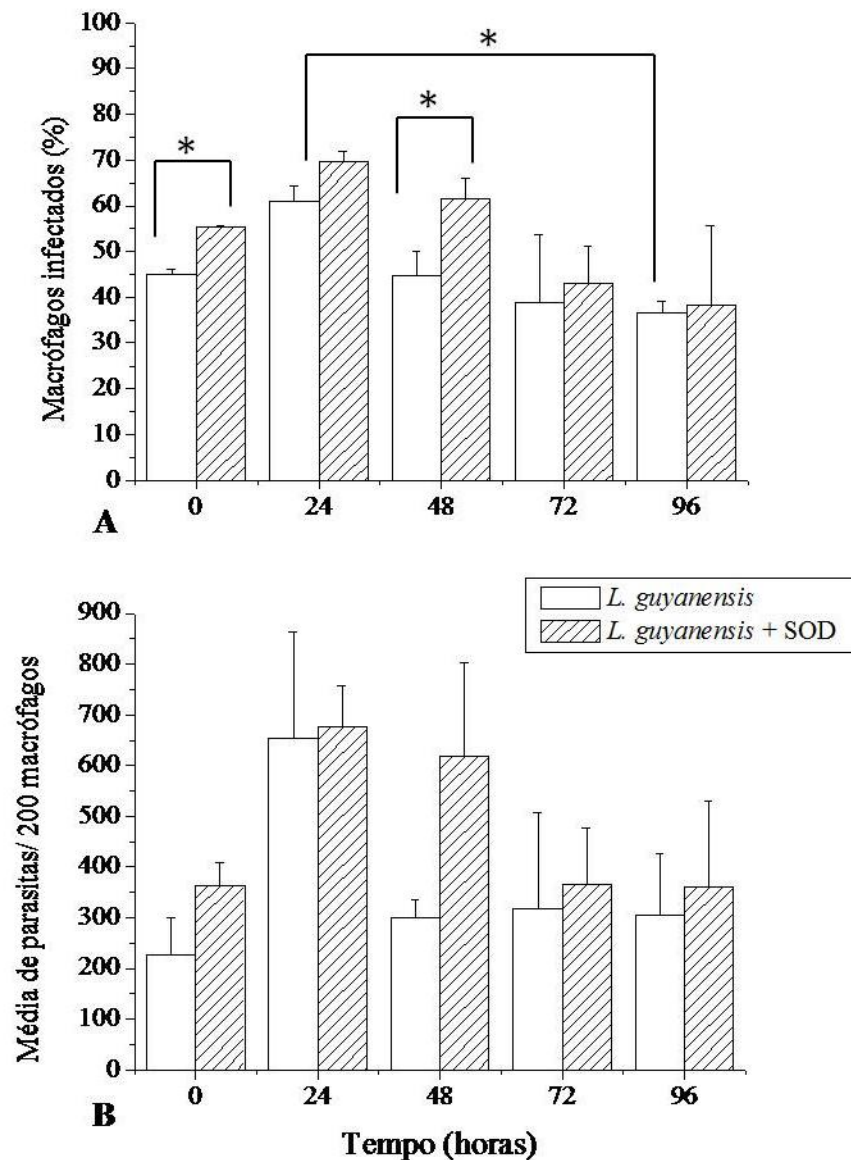


Figura 11: Papel do ânion superóxido na eliminação de amastigotas de *L. guyanensis* por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram incubados com SOD (20U) durante 1 hora. Após esse período, os macrófagos foram infectados com *L. guyanensis* (10 parasitas/célula) na presença de SOD (20U). Os macrófagos permaneceram incubados com a enzima durante todo o tempo. Após 0, 24, 48, 72 e 96 horas, a porcentagem de macrófagos infectados e o número médio de parasitas no interior dos macrófagos foram determinados. As barras verticais representam a média de duplicatas \pm DP da porcentagem de macrófagos infectados (**A**) e a média de duplicatas \pm DP do número de parasitas no interior de 200 macrófagos (**B**) de um experimento representativo de pelo menos 3. (*) = diferença estatisticamente significativa. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo no teste *t* pareado.

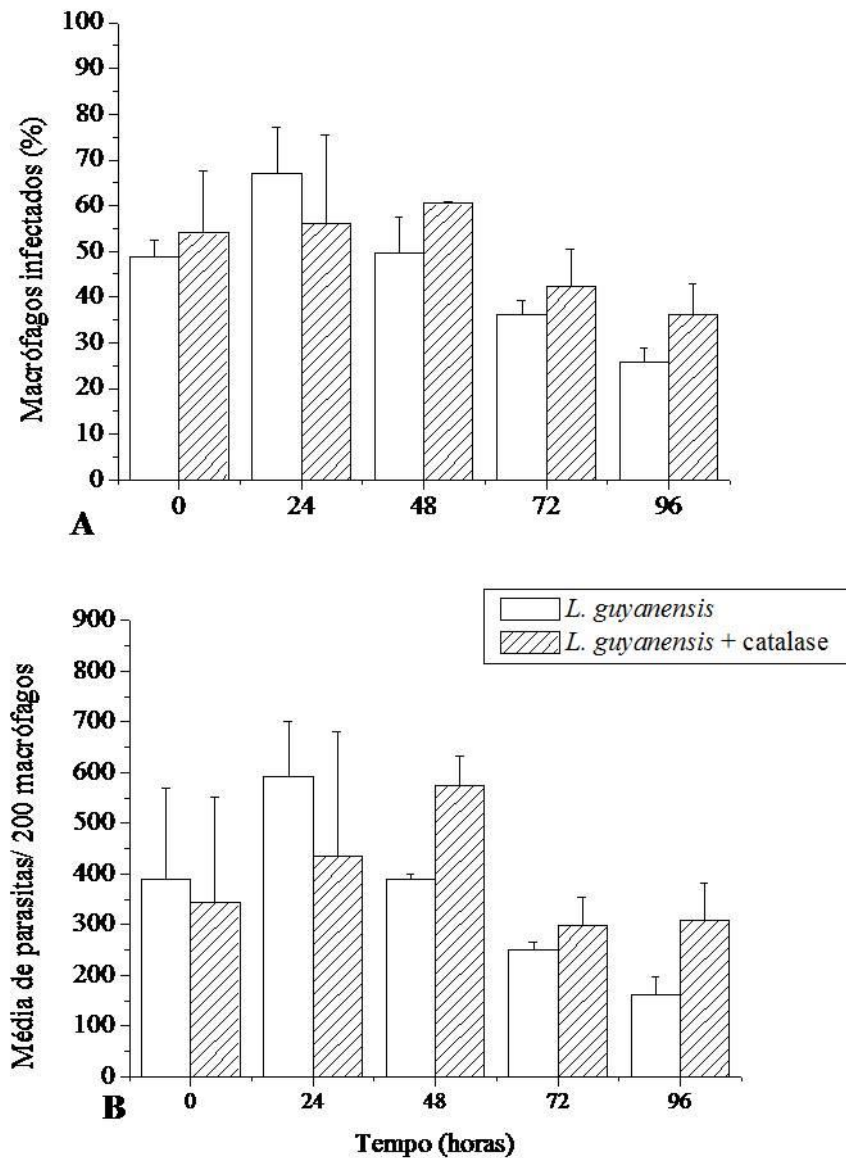


Figura 12: Papel do peróxido de hidrogênio na eliminação de amastigotas de *L. guyanensis* por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram incubados com catalase (100U) durante 1 hora. Após esse período os macrófagos foram infectados com *L. guyanensis* (10 parasitas/célula) na presença de catalase (100U). Os macrófagos permaneceram incubados com a enzima durante todo o tempo. Após 0, 24, 48, 72 e 96 horas a porcentagem de macrófagos infectados e o número médio de parasitas no interior dos macrófagos foram determinados. As barras verticais representam a média de duplicatas \pm DP da porcentagem de macrófagos infectados (**A**) e a média de duplicatas \pm DP do número de parasitas no interior de 200 macrófagos (**B**) de um experimento representativo de pelo menos 3.

3.9 Produção de IFN- γ e IL-4 pelas células de linfonodo poplíteo frente à infecção com *L. guyanensis*

Para identificarmos qual o tipo de resposta de linfócitos T auxiliares estava sendo montada frente à infecção e se havia polarização da resposta para Th1 ou Th2, os linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com formas metacíclicas de *L. guyanensis*, foram coletados na 6ª e na 10ª semana pós-infecção e as células foram cultivadas na presença de extrato total de *L. guyanensis* como estímulo antigênico para a produção de citocinas. Após 72 horas de cultura, os sobrenadantes foram coletados e analisados pelo ensaio de ELISA para dosagem de INF- γ e IL-4, citocinas caracteristicamente produzidas por células Th1 ou Th2, respectivamente.

Em um resultado preliminar, detectamos a produção de IFN- γ pelas células dos linfonodos tanto dos camundongos BALB/c quanto dos C57BL/6. As células de camundongos BALB/c produziram mais IFN- γ do que as células de C57BL/6 na 6ª semana e ambas decresceram na 10ª semana (FIG. 13). Não foi detectada produção de IL-4 pelas células de nenhuma das duas linhagens de camundongo testadas, na sexta ou décima semana de infecção (resultados não mostrados).

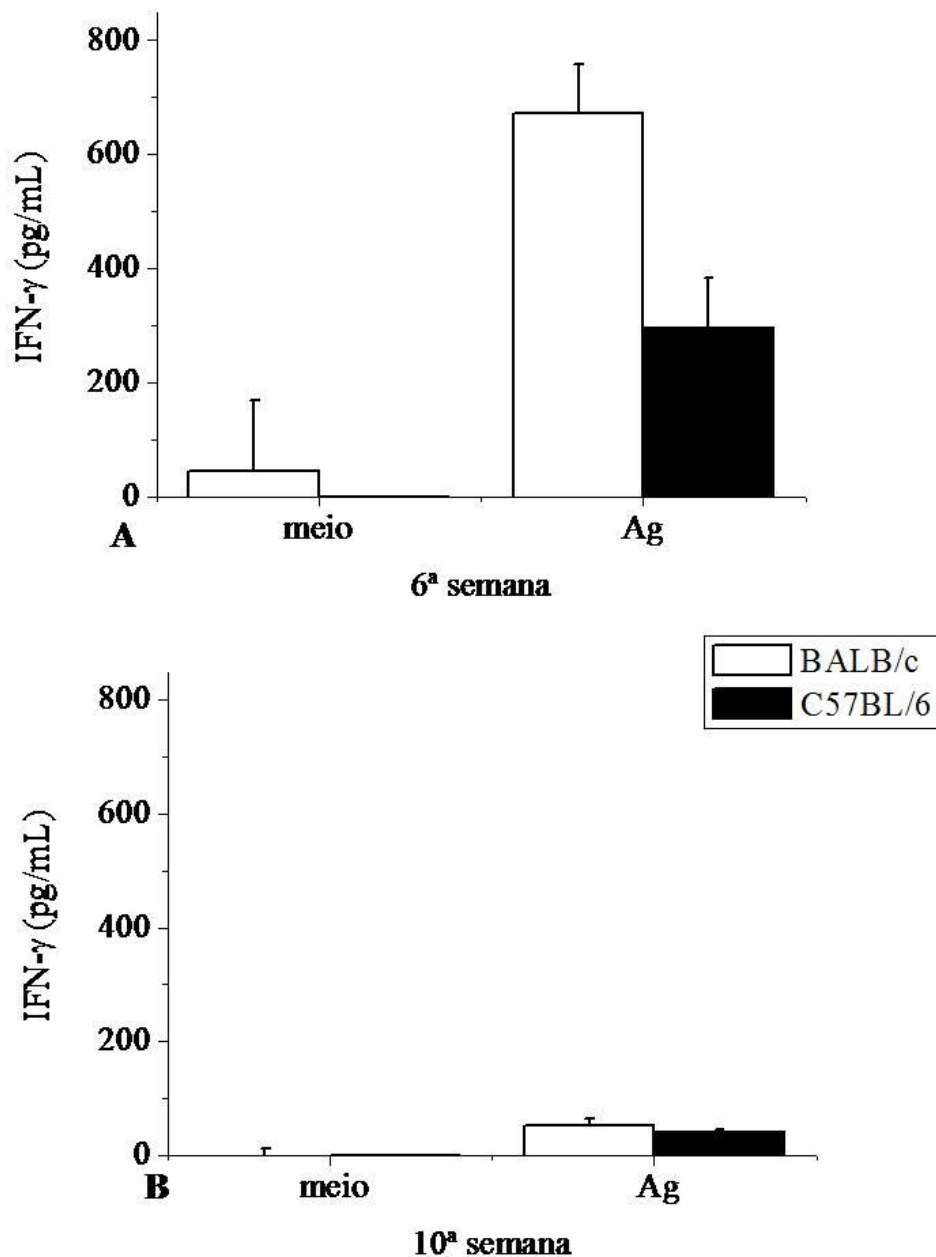


Figura 13: Produção de IFN- γ pelas células de linfonodo de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. guyanensis*. Os linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados nas patas traseiras com 1×10^6 formas metacíclicas de *L. guyanensis* foram coletados após 6 (A) ou 10 (B) semanas de infecção. Os linfonodos foram macerados e após 72 horas, o sobrenadante da cultura de células dos linfonodos foi analisado através do ensaio de ELISA para detecção da produção de IFN- γ . As barras verticais representam a média de cinco a quatro camundongos \pm DP da quantidade de citocina produzida.

4 DISCUSSÃO

As espécies causadoras da LC prevalentes no Brasil são a *Leishmania braziliensis* e a *Leishmania guyanensis*. As doenças causadas por estas duas espécies diferem entre si quanto à apresentação clínica. A infecção causada por *L. braziliensis* é caracterizada pelo espectro de doenças que vai desde a forma onde há uma ulceração cutânea única à forma disseminada menos frequente da doença, e até o envolvimento mucoso potencialmente letal das vias aéreas superiores. A *L. guyanensis* causa predominantemente lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas. As lesões podem ser mais numerosas e o envolvimento linfático é comumente observado, sendo que as lesões múltiplas são consequências de picadas simultâneas de vários flebótomos infectados ou de metástases linfáticas secundárias. É muito raro o comprometimento mucoso por esta espécie e não foram descritos casos de LCD. Apesar da importância epidemiológica de *L. guyanensis*, poucos estudos têm sido feitos para entender a patogênese associada a esta espécie de *Leishmania*. (ROMERO *et al.*, 2001; WHO, 1990)

Anteriormente, nosso grupo havia mostrado que camundongos BALB/c, que são extremamente susceptíveis à *L. major* e *L. amazonensis*, desenvolvendo lesões que aumentam de tamanho sem se curar e levando à morte dos animais, não desenvolvem lesões e nem morrem quando infectados com o mesmo número de promastigotas de *L. guyanensis* (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006). A manifestação da doença causada nessa linhagem de camundongos por *L. major* e *L. amazonensis*, é atribuída a uma forte resposta de linfócitos Th2 (HEINZEL *et al.*, 1989) ou a uma resposta mista Th1/Th2 (JI *et al.*, 2002), respectivamente. No entanto não se conhece o tipo de resposta imune que camundongos BALB/c produzem frente à infecção com *L. guyanensis* que causa esse comportamento tão diverso e intrigante. Sousa-Franco *et al.* (2006) haviam mostrado ainda que macrófagos de camundongos BALB/c são capazes de eliminar as forma amastigotas de *L. guyanensis in vitro*. Mostraram também que a eliminação das amastigotas é devido à explosão respiratória causada pela infecção *in vitro*, é independente da produção de NO, e que as amastigotas morriam por um processo semelhante à apoptose. Diante disso, resolvemos investigar o papel da explosão respiratória *in vivo*, bem como a resposta de linfócitos Th em camundongos infectados com *L. guyanensis*. Nossa primeira abordagem foi utilizar camundongos deficientes da enzima NADPH oxidase (*knockout* para a subunidade gp91phox - Phox -/-).

Como os camundongos Phox^{-/-} disponíveis tinham o *background* genético de C57BL/6, foi necessário definir o curso da infecção em camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT).

Nesta dissertação mostramos, então, que a cepa M4147 de *L. guyanensis* não causa uma doença fatal em camundongos BALB/c, como já demonstrado pelo nosso grupo, e tampouco em camundongos e C57BL/6, não provocando lesões externas significativas em ambas as linhagens (FIG.3). Estes camundongos foram acompanhados até 21 semanas de infecção, sem apresentar lesão, sendo que BALB/c, por vezes, apresentam um pequeno inchaço na pata infectada (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006), como confirmado neste trabalho, até a 18^a semana (FIG. 3). Este dado é surpreendente, pois a infecção com o mesmo número de promastigotas da cepa PH8 de *L. amazonensis* causa lesões que aumentam sem regredirem, levando à morte em camundongos BALB/c e lesões muito pequenas que regridem em camundongos C57BL/6 (FIG. 3). Mostramos também que tanto camundongos BALB/c quanto camundongos C57BL/6, frente à infecção com *L. guyanensis*, parecem eliminar os parasitas do sítio de infecção e do linfonodo drenante deste local. Ao contrário, os parasitas replicam no sítio da infecção e nos linfonodos e os camundongos não eliminam os parasitas quando a infecção é com *L. amazonensis* (FIG. 4). Nos dois modelos de infecção, a quantidade de parasitas nas patas se apresentou sempre maior do que nos linfonodos. Em comparação com a replicação de *L. amazonensis* em BALB/c e em C57BL/6, a replicação de *L. guyanensis* se mostrou mais lenta. Os dados relativos aos camundongos BALB/c confirmam dados anteriores (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006) e adicionam novas informações sobre o curso da infecção de camundongos C57BL/6 com a espécie *L. guyanensis*. Nesse sentido, podemos observar que camundongos C57BL/6 eliminam com mais eficiência as amastigotas de *L. guyanensis* do que camundongos BALB/c. No entanto, a atividade leishmanicida de macrófagos das duas linhagens não é diferente. Macrófagos peritoneais não ativados de camundongos BALB/c e C57BL/6 conseguem eliminar as amastigotas intracelulares de *L. guyanensis*, mas não as amastigotas de *L. amazonensis* (FIG.5). Este resultado mostra uma correlação entre a eliminação ou não das amastigotas de *L. guyanensis* e *L. amazonensis* pelos macrófagos *in vitro* e o desenvolvimento de lesão na pata infectada e a sobrevivência pós-infecção. As infecções dos macrófagos de C57BL/6 apresentaram taxa de infecção um pouco maior do que os macrófagos de BALB/c, sugerindo que ou a infecção é mais eficiente em C57BL/6 ou a eliminação das amastigotas intracelulares é mais eficiente nos macrófagos de camundongos BALB/c.

Novamente, nossos resultados confirmam resultados de Sousa-Franco *et al.* (2006) e adicionam uma nova informação sobre a infecção de *L. guyanensis* em camundongos C57BL/6.

Uma vez que: 1) macrófagos não ativados de ambas as linhagens de camundongos são capazes de eliminar a *L. guyanensis in vitro*; 2) a eliminação por macrófagos de BALB/c é devida à explosão respiratória e, 3) já no início da infecção há uma grande eliminação de parasitas *in vivo*, havia a necessidade de verificarmos o papel desse mecanismo nas duas linhagens de camundongos.

Verificamos se a infecção por *L. guyanensis* induzia a explosão respiratória em macrófagos das duas linhagens de camundongos. De fato, verificamos que a explosão respiratória é induzida por *L. guyanensis* em macrófagos de BALB/c, mas é bem menor em células camundongos C57BL/6, enquanto macrófagos de ambas as linhagens de camundongos não responderam ao contato com *L. amazonensis* (FIG.6). Além disso, macrófagos de ambas as linhagens de camundongos não produziram NO, *in vitro*, quando infectados com *L. guyanensis* ou *L. amazonensis* (FIG.7), também confirmando os dados obtidos anteriormente para camundongos BALB/c *in vitro*. Assim, era possível que *in vivo* a explosão respiratória estivesse tendo um papel importante no controle da infecção.

Contudo, camundongos C57BL/6 Phox -/- tiveram o curso da infecção com *L. guyanensis* equivalente ao de camundongos C57BL/6 WT (FIG.8). Esses resultados indicam que a explosão respiratória não é um mecanismo importante na resistência de camundongos C57BL/6 à infecção por *L. guyanensis*. De fato, *in vitro*, *L. guyanensis* induz uma explosão respiratória muito baixa em macrófagos dessa linhagem (FIG. 6), embora essas células sejam capazes de eliminar o parasita *in vitro* (FIG. 5). Logo, outros mecanismos podem estar agindo para este controle. *In vitro*, verificamos que esses macrófagos não produzem NO em níveis detectáveis quando infectados com *L. guyanensis*. No entanto, ainda é necessário utilizar um inibidor da síntese de NO para verificarmos a sua participação na eliminação do parasita pelos macrófagos. Além disso, é necessário utilizarmos animais KO para a iNOS para verificarmos a participação do NO na resistência de camundongos C57BL/6 à infecção por *L. guyanensis*. Nossos resultados indicam que os mecanismos de resistência das duas linhagens de camundongos à infecção por esta mesma espécie de *Leishmania* são diferentes. Assim, para determinar o papel da explosão respiratória em camundongos BALB/c infectado com *L. guyanensis*, uma vez que não tínhamos o correspondente KO para a NADPH oxidase, utilizamos o tratamento desses animais com apocinina, um inibidor específico da NADPH oxidase, em protocolos já bem descritos na literatura (RABÊLO *et al.*, 2010).

Nossos resultados mostraram que, de fato, camundongos BALB/c tratados com apocinina, tiveram a explosão respiratória totalmente inibida, como verificado pela incapacidade de seus macrófagos de produzirem ROS (FIG.9). Esses camundongos apresentaram o curso de infecção com *L. guyanensis*, diferente daquele que ocorre nos BALB/c não tratados. Aqueles tratados com apocinina, apresentaram lesão progressiva na pata infectada com *L. guyanensis* já a partir da 3^a. semana de infecção (FIG.10). Esses resultados são preliminares, mas corroboram o fato de que macrófagos eliminam amastigotas de *L. guyanensis* pela ativação da explosão respiratória *in vitro*, mostrado por Sousa-Franco *et al.* (2006), sugerindo que a explosão respiratória é um mecanismo que faz com que os camundongos BALB/c sejam resistentes à *L. guyanensis*, mostrando que a imunidade inata participa de forma determinante no controle da infecção .

Será necessário determinar posteriormente se são de fato os macrófagos ou outras células, como neutrófilos, que também podem estar envolvidos no início da infecção, as responsáveis pela eliminação de amastigotas de *L. guyanensis*.

As ROS reagem de forma não específica e rápida com biomoléculas incluindo DNA, proteína, lipídios e carboidratos, portanto, a geração de ROS tóxicas seria o mecanismo microbicida catalisado pela Phox (ROOS & WINTERBOURN, 2002). A reatividade de moléculas individuais, derivadas do oxigênio, varia muito. Como um redutor relativamente forte, o superóxido pode funcionar tanto como um redutor como um oxidante, dependendo do potencial oxirredutor da molécula com que reage. Embora seja o precursor de mais espécies reativas, o superóxido reage com um repertório limitado de alvos químicos, como os centros ferro-enxofre que funcionam como carreadores de elétrons nas cadeias respiratórias de bactérias e da mitocôndria. O H₂O₂ é um oxidante mais potente e é mais reativo, embora seus alvos ainda sejam limitados, e incluem metionina e alguns resíduos de cisteína muito reativos como aqueles encontrados nos sítios ativos de algumas enzimas. As peroxidases usam o H₂O₂ para produzir oxidantes altamente reativos, que tem maior variedade de alvos (LAMBETH, 2004).

Uma vez que a explosão respiratória parece ter papel fundamental no controle da infecção por *L. guyanensis* em BALB/c, procuramos definir qual das ROS estava envolvida na eliminação das amastigotas pelos macrófagos *in vitro*. Mostramos que os macrófagos destes camundongos parecem ter uma taxa de infecção maior e eliminar menos parasitas quando incubados com SOD, que elimina ou diminui o ânion superóxido gerando mais peróxido de hidrogênio, ou com catalase que elimina ou diminui os níveis de peróxido de

hidrogênio, *in vitro* (FIG. 8 e 9). No entanto, é necessário aumentar o número de nossas amostras e verificar se essas ROS foram realmente eliminadas.

A maioria das ROS descritas ocorre em áreas de inflamação, onde há infiltração de neutrófilos. Sem a mieloperóxidase ou anticorpos opsonizantes, muitas das espécies mais reativas não são formadas. Portanto, o objetivo nesses locais, é produzir dano molecular disseminado (LAMBETH, 2004). Por outro lado, há um estudo que sugere que a eliminação do microrganismo não seja diretamente pelas ROS, e sim indireta pela ativação iônica das proteases no fagolisossomo (REEVES *et al.*, 2002). Logo, precisamos investigar o papel de ROS mais reativas, já que o O_2^- é a fonte de todas as outras ROS geradas no fagossomo. A dismutação enzimática catalisada pela SOD, transforma o O_2^- em H_2O_2 , o peróxido de hidrogênio, por sua vez, dá origem a outras ROS mais reativas (EL-BENNA, 2005). Seria importante, também, eliminar o ânion superóxido e o H_2O_2 ao mesmo tempo, utilizando SOD juntamente com a catalase, uma vez que tanto o ânion superóxido como o peróxido de hidrogênio podem ter uma participação na eliminação das amastigotas pelos macrófagos de camundongos BALB/c.

No modelo de infecção utilizado neste trabalho, pouco se sabe sobre a resposta imune adaptativa de linfócitos T helper. Assim, tentamos, inicialmente, definir se havia polarização da resposta de células T $CD4^+$ pela quantificação das citocinas IFN- γ e IL-4, que são caracteristicamente produzidas por linfócitos Th1 e Th2, respectivamente. Nossos resultados preliminares mostram que há uma produção de IFN- γ e não há a produção de IL-4 tanto na 6ª como na 10ª semana de infecção, quando foram quantificadas. A produção de IFN- γ observada na 6ª semana parece decrescer como observado até a 10ª Semana (FIG. 10). É interessante notar que os camundongos BALB/c produziram mais IFN- γ do que camundongos C57BL/6. No entanto, a produção dessa citocina é baixa quando comparada com a resposta a outras espécies de *Leishmania* (MAIOLI *et al.*, 2004; DeKREY *et al.*, 1998). Esse experimento tem que ser repetido mais vezes para verificarmos sua reprodutibilidade. Investigaremos também a produção dessas citocinas com maior frequência ao longo da infecção. A confirmação desses resultados pode significar que a baixa produção dessa citocina seja suficiente para manter o controle da infecção nesses camundongos, como já visto no modelo de infecção de BALB/c com *L. braziliensis*, na qual essa espécie de parasita não é capaz de induzir a produção de IL-4 como acontece para *L. major* nessa linhagem de camundongo. No entanto, não há diferença na quantidade de IFN- γ produzida frente à infecção por essas duas espécies de *Leishmania*, assim uma resposta do tipo Th1 prevalece nesse modelo de infecção (DeKREY *et al.*, 1998).

Dentre os inibidores da atividade da NADPH oxidase estão as citocinas IL-10 (ELBIM *et al.*, 2001) e IL-4 (ZHOU *et al.*, 1995), e o NO (CLANCY *et al.*, 1992). Portanto, a não-produção dessas moléculas seria mais um indicativo da importância dos nossos resultados sobre o papel desta enzima na resistência à infecção nesse modelo. Assim, tanto a IL-10 que também está envolvida no fenótipo de susceptibilidade (ANDERSON *et al.*, 2007; BELKAID *et al.*, 2001), como a IL-12, que tem papel fundamental no início da infecção para desenvolver uma resposta tipo Th1 (MACATONIA *et al.*, 1995; REINER *et al.*, 1994) deverão ser avaliadas, a fim de se ter dados mais precisos a respeito da polarização da resposta Th.

Podemos então chegar às seguintes conclusões:

- na dose utilizada e comparada com *L. amazonensis*, *L. guyanensis* não causa lesão nas patas de camundongos BALB/c;
- a replicação de *L. guyanensis*, mas não de *L. amazonensis*, *in vivo* é suprimida no sítio de infecção e no linfonodo drenante;
- macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 são capazes de eliminar amastigotas de *L. guyanensis*, mas não de *L. amazonensis*, *in vitro* (em BALB/c sabidamente devido à explosão respiratória);
- promastigotas de *L. guyanensis* induzem a explosão respiratória *in vitro* em macrófagos de BALB/c, mas pouco em células de C57BL/6, enquanto que *L. amazonensis* não a induz em células de nenhuma das duas linhagens de camundongo;
- macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 não produzem níveis detectáveis de NO quando infectados *in vitro* com *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*;
- a eliminação das amastigotas *in vitro* pela explosão respiratória em BALB/c parece depender do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio;
- a explosão respiratória parece ser importante na resistência de camundongos BALB/c, mas não de C57BL/6, *in vivo*;
- além de uma resposta inata protetora, pelo menos em parte, camundongos BALB/c parecem montar uma resposta do tipo Th1 (com produção de IFN- γ mas não de IL-4).

Nossos resultados mostram que a imunidade inata, por intermédio da explosão respiratória de macrófagos, talvez seja realmente importante no controle da infecção por *L. guyanensis* em camundongos BALB/c, mas não em camundongos C57BL/6. Este modelo, enquanto hospedeiro resistente a uma espécie pouco estudada de *Leishmania*, mostra-se valioso para o estudo dos mecanismos responsáveis pela resistência a diferentes espécies de *Leishmania*, ampliando o conhecimento sobre a resposta imune na leishmaniose.

REFERÊNCIAS

AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune Responses Associated with Susceptibility of C57BL/10 Mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**. 61: 2952-2959, 1993.

ALEXANDER, J.; CARTER, K. C.; AL-FASI, N.; SATOSKAR, A.; BROMBACHER, F. Endogenous IL-4 is Necessary for Effective Drug Therapy Against Visceral Leishmaniasis. **European Journal of Immunology**. 30: 2935-2943, 2000.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**. 112: 2993-3002, 1999.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**. 35: 699-705, 2010.

ANDERSON, C. F.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. J.; SACKS, D. CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Th1 Cells are the Source of IL-10-Mediated Immune Suppression in Chronic Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**. 204: 285-297, 2007.

ANDRADE, Z. A.; REED, S. G.; ROTERS, S. B.; SADIGUSKY, M. Immunopathology of Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **American Journal of Pathology**. 114: 137-148, 1984.

BABIOR, B. M. Phagocytes and Oxidative Stress. **The American Journal of Medicine**. 109: 33-44, 2000.

BARRAL, A.; PETERSEN, E. A.; SACKS, D. L.; NEVA, F. A. Late Metastatic Leishmaniasis in the Mouse. A Model for Mucocutaneous Disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 32: 277-285, 1983.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R. L.; TEIXEIRA, M.; DOS SANTOS, W. L.; POMPEU, M. L.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T.; CAVADA B. S.; FALCOFF, E.; BARRAL A.. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**. 60: 237-250, 1996.

BEAMAN, L.; BEAMAN, B. L. The Role of Oxygen and Its Derivatives in Microbial Pathogenesis and Host Defense. **Annual Review of Microbiology**. 38: 27-48, 1984.

BECKMAN, J. S.; MINOR, R. L.; WHITE, C. W.; REPINE, J. E.; ROSEN, G. M.; FREEMAN, B. A. Superoxide Dismutase and Catalase Conjugated to Polyethylene Glycol Increases Endothelial Enzyme Activity and Oxidant Resistance. **The Journal of Biological Chemistry**. 263: 6884-6892, 1988.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M. C.; WYNN, T. A.; SACKS, D. L.. The Role of Interleukin (IL)-10 in the Persistence of *Leishmania major* in the Skin after Healing and the Therapeutic Potential of Anti-IL-10 Receptor Antibody for Sterile Cure. **The Journal of Experimental Medicine**. 194: 1497-1506 , 2001.

BIDDLESTONE, L. R.; HEPBURN, N. C.; McLAREN, K. M. A Clinico-Pathological Study of Cutaneous Leishmaniasis in British Troops from Belize. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 88: 672-676, 1994.

BOGDAN, C.; STENGER, S.; RÖLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Cytokine Interactions in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. Interleukine 4 Synergizes with Interferon-gamma to Activate Murine Macrophages for Killing of *Leishmania major* Amastigotes. **European Journal of Immunology**. 21: 327-333, 1991.

CARMO, E.V. S.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. Neutrophils Reduce the Parasite Burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-Infected Macrophages. **PLoS ONE**. 5: e13815, 2010.

CLANCY, R. M.; LESZCZYNSKA-PIZIAK J.; ABRAMSON, S. B. Nitric Oxide, an Endothelial Cell Relaxation Factor, Inhibits Neutrophil Superoxide Anion Production Via a Direct Action on the NADPH Oxidase. **The Journal of Clinical Investigation**. 90: 1116-1121, 1992.

COURRET, N.; FRÉHEL, C.; GOUHIER, N.; POUCHELET, M.; PRINA, E.; ROUX, P.; ANTOINE, J. C.. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring Parasitophorous Vacuoles Following Phagocytosis of the Metacyclic Promastigote or Amastigote Stages of the parasites. **Journal of Cell Science**. 115: 2303-2316, 2002.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the Immune Responses of Mice to Infection with *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**. 66: 827-829, 1998.

DUARTE, M. M. **Produção diferencial de óxido nítrico e intermediários reativos do oxigênio por neutrófilos de camundongos susceptíveis e resistentes à infecção por *Leishmania major***. Tese de Doutorado, Departamento de Microbiologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M. C.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a Multicomponent Enzyme Essential for Host Defenses. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 53: 199-206, 2005.

ELBIM, C.; REGLIER, H.; FAY, M.; DELARCHE, C.; ANDRIEU, V.; EL BENNA, J.; GOUGEROT-POCIDALO M. A.. Intracellular Pool of IL-10 Receptors in Specific Granules of Human Neutrophils: Differential Mobilization by Proinflammatory Mediators. **The Journal of Immunology**. 166: 5201-5207, 2001.

ESCOBAR, M. A.; MARTINEZ, F.; SMITH, D. S.; PALMA, G. I. American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis (Tegumentary): A Diagnostic Challenge. **Tropical Doctor**. 22: 69-78, 1992.

GIAIMIS, J.; LOMBARD, Y.; MAKAYA-KUMBA, M.; FONTENEAU, P.; POINDRON, P. A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. **Journal of Immunological Methods**. 154: 185-193, 1992.

GORDON, S.; UNKELESS, J. C.; COHN, Z. A. Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis: evidence for a two-stage process. **Journal of Experimental Medicine**. 140: 995-1010, 1974.

GRIMALDI Jr., G.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. A Review of the Geographic Distribution and Epidemiology of Leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 41: 687-725, 1989.

GRIMALDI Jr, G.; MOMEN, H.; NAIFF, R. D.; McMAHON-PRATT, D.; BARRETT, T. V. Characterization and Classification of Leishmanial Parasites from Humans, Wild Animals, and Sandflies in the Amazon Region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 44: 645-661, 1991.

GUTIERREZ, Y.; SALINAS, G. H.; PALMA, G.; VALDERRAMA, L. B.; SANTRICH, C. V.; SARAIVA, N. G. Correlation between Histopathology, Immune Response, Clinical Presentation and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 45: 281-289, 1991.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**. 169:59-72, 1989.

HIBBS, J. B. Jr.; TAINTOR, R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. Nitric Oxide: a Cytotoxic Activated Macrophage Effector Molecule. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 157: 87-94, 1988.

JI, J.; SUN, J.; Qi, H.; SOONG, L. Analysis of T Helper Cell Responses During Infection with *Leishmania amazonensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 66: 338-345, 2002.

KILLICK-KENDRICK, R. Education is Key to Controlling Visceral Leishmaniasis. **Bulletin of the World Health Organization** 88: 11–12, 2010.

KIELLAND, A.; BLOM, T.; NANDAKUMAR, K. S.; HOLMDAHL, R.; BLOMHOFF, R.; CARLSEN, H. In vivo Imaging of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Inflammation Using the Luminescent Prob L-012. **Free Radical Biology & Medicine**. 47: 760-766, 2009.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The Role of Animals in the Epidemiology of South American Leishmaniasis. In: Lumsden, W. H. R., Evans D. A (eds). **Biology of the Kinetoplastida**. London Academic Press. Vol. 2, chap.1, 1-116, 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; DE SOUZA, A. A.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. The Dermal Leishmaniasis of Brazil, with Special Reference to the Ecoepidemiological of the Disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 89: 435-443, 1994.

LAMBETH, L. D. NOX Enzymes and the Biology of Reactive Oxygen. **Nature Reviews Immunology**. 4: 181-189, 2004.

LOCKSLEY, R. M.; KLEBANOFF, S. J. Oxygen Dependent Microbicidal Systems of Phagocytes and Host Defense Against Intracellular Protozoa. **Journal of Cellular Biochemistry**. 22: 173-185, 1983.

MACATONIA, S. E.; HOSKEN, N. A.; LITTON, M.; VIEIRA, P.; HSIEH, C. S.; CULPEPPER, J. A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; MURPHY, K. M.; O'GARRA, A. Dendritic Cells Produce IL-12 and Direct the Development of Th1 Cells from Naïve CD4⁺ T Cells. **Journal of Immunology**. 154: 5071-5079, 1995.

MAIOLI, T. U.; TAKANE, E.; ARANTES, R. M.; FIETTO, J. L.; AFONSO, L. C. Immune Response Induced by New World Leishmania Species in C57BL/6 Mice. **Parasitology Research**. 94: 207-212, 2004.

McMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* Paradigm of Pathogenesis and Protection Hold for New World Cutaneous Leishmaniasis or the Visceral Disease? **Immunological Reviews**. 201: 206-224, 2004.

MILLS, C.D; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J.; HILL, A. M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology** 164: 6166–6173, 2000.

MILON, G.; DEL GIUDICE, G.; LOUIS, J. A. Immunobiology of Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Parasitology Today**. 11: 244-247, 1995.

Ministério da Saúde (MS). **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª Ed. 2007.

Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1ª Ed. 2006

NADERER, T.; VINCE, J. E.; McCONVILLE, M. J. Surface Determinants of Leishmania Parasites and their Role in Infectivity in the Mammalian Host. **Current Molecular Medicine**. 4: 649-665, 2004.

NASYROVA, R. M.; KALLINIKOVA, V. D.; NASYROV, F. Sh.; SAF'YANOVA, V. M. Variation of the Morphogenesis of *Leishmania* During Long Term Culturing. **Doklady Biological Sciences**. 301: 375-378. 1989.

NOLAN, T. J.; HERMAN, R. Effects of long Term *in vitro* Cultivation on *Leishmania donovani* Promastigotes. **Journal of Protozoology**. 32: 70-75, 1985.

NORSWORTHY, N. B.; SUN, J.; ELNAIEM, D.; LANZARO, G.; SOONG, L. Sand Fly Saliva Enhances *Leishmania amazonensis* Infection by Modulating Interleukin-10 Production. **Infection and Immunity**. 72: 1240-1247, 2004.

NOVAIS, F. O.; SANTIAGO, R. C.; BÁFICA, A.; KHOURI, R.; AFONSO, L.; BORGES, V. M.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; DE OLIVEIRA, C. I. Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance Against *Leishmania braziliensis* Infection. **The Journal of Immunology**. 138: 8088-8098, 2009.

NOVOZHILOVA, N. M.; BOVIN, N. V. Structure, Functions, and Biosynthesis of Glycoconjugates of *Leishmania* spp. Cell Surface. **Biochemistry (Moscow)**. 75: 770-780, 2010.

PAHO. **Leishmaniasis: 2007 Update.** Disponível em: <<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/leish-2007.pdf>>. Acesso em: 29 dez 2010.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**. 22: 1-13, 1996.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**. 321: 970-974, 2008.

PIMENTA, P. F.; TURCO, S. J.; McCONVILLE, M. J.; LAWYER, P. G.; PERKINS, P. V.; SACKS, D. L. Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* Promastigotes to the Sandfly Midgut. **Science**. 256: 1812-1815, 1992.

PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal** 82: 649-657, 2006.

POLLOCK, J. D.; WILLIAMS, D. A.; GIFFORD, M. A.; LI, L. L.; DU, X.; FISHERMAN, J.; ORKIN, S. H.; DOERSCHUK, C. M.; DINAUER, M. C. **Mouse Model of X-Linked Chronic Granulomatous Disease, an Inherited Defect in Phagocyte Superoxide Production.** *Nature Genetics*. 9: 202-209, 1995.

RABÊLO, L. A.; SOUZA, V. N.; FONSECA, L. J. S. F.; SAMPAIO, W. O. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 94: 684-693, 2010.

REAL, F.; MORTARA, R. A.; RABINOVITCH, M. Fusion Between *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* Parasitophorous Vacuoles: Live Imaging of Coinfected Macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 4: e905, 2010.

REED, S. G.; SCOTT, P. T-cell and Cytokine responses in leishmaniasis. **Current Opinion in Immunology**. 5: 524-531, 1993.

REEVES, E. P.; LU, H.; JACOBS, H. L.; MESSINA, C. G.; BOLSOVER, S.; GABELLA, G.; POTMA, E. O.; WARLEY, A.; ROES, J.; SEGAL, A. W. Killing Activity of Neutrophils is Mediated Through Activation of Proteases by K⁺ Flux. **Nature**. 416: 291-297, 2002.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of Immunity to *Leishmania major*. **Annual Review of Immunology**. 13: 151-177, 1995.

REINER, S. L.; ZHENG, S.; WANG, Z. E.; STOWRING, L.; LOCKSLEY, R. M. *Leishmania* Promastigotes Evade Interleukine 12 (IL-12) Introduction by Macrophage and Stimulates a Broad Range of Cytokines from CD4+ T Cells During Initiation of Infection. **Journal of Experimental Medicine**. 179: 447-456, 1994.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C.; GOMES, N. A.; MONIZ-DE-SOUZA, M. C.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; ARNHOLDT, A. C.; CALICH, V. L.; COUTINHO, S. G.; LOPES, M. F.; DosREIS, G. A. Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate *Leishmania major* Infection. **The Journal of Immunology**. 172: 4454-4462, 2004.

ROOS, D.; WINTERBOURN, C. C. Immunology. Lethal Weapons. **Science**. 296: 669-671, 2002.

ROMERO, G. A. S.; GUERRA, M. V. F.; PAES, M. G.; MACÊDO, V. O. Comparison of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Clinical Findings and Diagnostic Approach. **Clinical Infectious Diseases**. 32: 1304-1312, 2001.

ROMERO, G.; ISHIKAWA, E.; CUPOLILLO, E.; TOALDO, C. B.; GUERRA, M. V.; PAES, M. G.; MACÊDO, V. O.; SHAW, J. J. The Rarity of Infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among Patients from the Manaus Region of Amazonas State, Brazil, who Have Cutaneous Leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 96: 131-136, 2002.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**. 223: 1417-1419, 1984.

SANCHES, J. L.; DINIEGA, B. M.; SMALL, J. W.; MILLER, R. N.; ANDUJAR, J. M.; WEINA, P. J.; LAWYER, P. G.; BALLOU, W. R.; LOVELACE, J. K. Epidemiologic Investigation of an Outbreak of Cutaneous Leishmaniasis in a Defined Geographic Focus of Transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 47: 47-54, 1992.

SANTOS, J. L. **Participação do Óxido Nítrico na Citotoxicidade de Macrófagos de Camundongos Susceptíveis e Resistentes à Infecção por *Leishmania amazonensis***. Dissertação de mestrado, Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG, 1997.

SANTOS, J. L.; ANDRADE, A. A.; DIAS, A. A.; BONJARDIM, C. A.; REIS, L. F.; TEIXEIRA, S. M.; HORTA, M. F. Differential Sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) Macrophages to IFN- γ /LPS for the Production of NO: Correlation with iNOS mRNA and Protein Expression. **Journal of Interferon and Cytokine Research**. 26: 682-688, 2006.

Secretaria de Vigilância em Saúde/ MS. **Guia de Vigilância Epidemiológica – Caderno 11.**

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of Leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology.** 47: 412-423, 2009.

SOUSA-FRANCO, J.; ARAÚJO-MENDES, E.; SILVA-JARDIM, I.; L-SANTOS, J.; DUTRA, W. O.; HORTA, M. F. Infection-induced Respiratory Burst in BALB/c Macrophages Kills *Leishmania guyanensis* Amastigotes Through Apoptosis: Possible Involvement in Resistance to Cutaneous Leishmaniasis. **Microbes and Infection.** 8: 390-400, 2006.

SOUZA, V. L.; SOUZA, J. A.; SILVA, T. M. C.; VERAS, P. S. T.; DE-FREITAS, L. A. R. Different Leishmania Species Determine Distinct Profiles of Immune and Histopathological Responses in CBA Mice. **Microbes and Infection.** 2: 1807-1815, 2000.

TEIXEIRA, C. R.; TEIXEIRA, M. J.; GOMES, R. B.; SANTOS, C. S.; ANDRADE, B. B.; RAFFAELE-NETTO, I.; SILVA, J. S.; GUGLIELMOTTI, A.; MIRANDA, J. C.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment. **The Journal of Immunology.** 175: 8346-8353, 2005.

THEODOS, C. M.; RIBEIRO, J. M.; TITUS, R. G. Analysis of Enhancing Effect of Sand Fly Saliva on Leishmania Infection in Mice. **Infection and Immunity.** 59: 1592-1598, 1991.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The Lipophosphoglycan of *Leishmania* Parasites. **Annual Reviews Microbiology.** 46: 65-94 1992.

USUI, S.; OVESON, B. C.; LEE, S. Y.; JO, Y. J.; YOSHIDA, T.; MIKI, A.; MIKI, K.; IWASE, T.; LU, L.; CAMPOCHIARO, P. A. NADPH Oxidase Plays a Central Role in Cone Cell Death in Retinitis Pigmentosa. **Journal of Neurochemistry.** 110: 1028-1037, 2009.

WHO. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record** 77: 44, 365-370, 2002.

WHO. Control of the Leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: World Health Organization. **Technical Report Series.** 793, 1990.

YAZDANBAKHSH, M. ; SACKS, D. Why does immunity to parasites take so long to develop? **Nature Reviews Immunology.** 10: 80-81, 2010.

ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for Leishmania Entry into Macrophages. **The Journal of Immunology**. 173: 6521-6525, 2004.

ZHOU, Y.; LIN, G., MURTAUGH, M. P. Interleukin-4 Suppresses the Expression of Macrophage NADPH oxidase Heavy Chain Subunit (gp91-phox). **Biochimica et Biophysica Acta**. 1265: 40-48, 1995.