

**Matheus Batista Heitor Carneiro**

**O papel do IFN- $\gamma$  na infecção por  
*Leishmania amazonensis***

**Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.**

**Orientadora: LEDA QUERCIA VIEIRA**

**Co-orientadora: DENISE FONSECA CÔRTEZ**

**Belo Horizonte – MG  
Julho-2010**

**Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia – ICB/UFMG e obteve auxílio dos seguintes órgãos financiadores:**

- FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais**
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior**
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

**“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil  
- e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”**

**Albert Einstein**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Leda por toda orientação nestes mais de quatro anos de convivência, desde a iniciação científica até o desfecho desta dissertação. Agradeço à preocupação com a minha formação, assim como com a harmonia de sua equipe de trabalho e com nosso futuro profissional. Obrigado por me iniciar na ciência!

Agradeço a Denise Cortês, por todo o aprendizado prático no laboratório, assim como pelos princípios éticos que me passou desde o momento que me ingressei no LAGI. Obrigado pela co-orientação neste trabalho! Também pela amizade e por ter me possibilitado aprender e ajudar com seus projetos no laboratório!

Ao Professor Wagner Tafuri, por nos possibilitar executar a imunohistoquímica e análise da mesma em seu laboratório. A Professora Rosa Arantes por ceder o anticorpo anti-iNOS para realização da imunohistoquímica, assim como pela ajuda na padronização da técnica.

À melhor equipe de trabalho possível! Agradeço a Louisa pela parceria dos últimos anos e pela disponibilidade de ajudar sempre! A Lili, por estar neste projeto desde o início, e mesmo de longe nos ajudar com críticas e sugestões. Ao Leonardo pela ajuda no desfecho deste trabalho, obrigado pela ajuda de todos os dias! A Carol pela disponibilidade e paciência na condução da realização das imunohistoquímicas!

Ao pessoal do LAGI por formamos uma equipe tão harmoniosa, com bons momentos dentro e fora do lab. Obrigado Daniel, Caio, Paula, Magda, Dionê, Alfonso, Marcelo, Luciana pelos ótimos momentos, hilários, de convivência! Obrigado, novamente Lou, Lili e Leo pela amizade incondicional! É confortável saber que poderei sempre contar com vocês!

As pessoas que já não convivem conosco diariamente no LAGI, mas que ainda se fazem presentes, ou que deixaram só boas lembranças. A Lara, pelo seu temperamento, Claudinha, pela referência, Juan, que sempre fará parte desta família, Mateus, Fernandinha, Camila, Aline, Mayra agradeço os ótimos momentos!

Agradeço a turma de BASES 2009, por compartilhar este momento “sem bases”, por todo o crescimento durante as aulas e pelas poucas, mas ótimos

encontros. Agradeço especialmente alguns amigos, cuja ajuda nos momentos críticos de ICB, se fizeram essenciais para que a realização deste trabalho fosse possível. Obrigado Ana Paula, Samara, Elisa, Polidoro, Bárbara, Marcela, Anita e Carol por nos ajudar nos piores momentos!

Agradeço também a todos os professores de BASES pelas aulas e dedicação.

A minha família pelo apoio incondicional e por fazer tudo isso possível! Obrigado aos meus pais: Murilo e Maria Inez; meus irmãos: Murilo e Lucas e minha avô, Hilda. Obrigado pela torcida e por tanto terem contribuído para minha formação pessoal!

## Resumo

O IFN- $\gamma$  é uma citocina chave para a proteção frente à infecção por uma série de parasitos intracelulares, tais quais: *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium chabaudi* e *Mycobacterium tuberculosis*. O mecanismo pelo qual esta citocina atua se dá pela ativação clássica de macrófagos, que passa a expressar iNOS, gerando a produção de NO, que leva à morte destes parasitos. A importância desta citocina, *in vivo* e *in vitro*, já está bem estabelecida para os modelos de infecção citados. Curiosamente, o mesmo não ocorre para infecção por *L. amazonensis*. Neste caso, foi demonstrado que, *in vitro*, a forma amastigota do parasito é estimulada a proliferar na presença de IFN- $\gamma$ . Além disso, a relevância desta citocina para a proteção, *in vivo*, parece ocorrer apenas nos tempos finais da infecção. O mecanismo pelo qual o IFN- $\gamma$  não é essencial nos tempos iniciais da infecção ainda não é entendido. Desta forma, constitui objetivo do nosso trabalho entender o papel do IFN- $\gamma$  na infecção *in vivo* pela cepa PH8. Além disso, a elucidação do real papel do IFN- $\gamma$  é essencial para os estudos que visam a produção de uma vacina eficaz. Nossos dados confirmam a importância do IFN- $\gamma$  apenas nos tempos finais da infecção, como já descrito para outras cepas de *L. amazonensis*. O mecanismo pelo qual camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  não exibem maior suscetibilidade após 10 semanas de infecção parece ser dependente de um balanço entre expressão de arginase I e iNOS; além de modulação de IL-10. Apesar deste papel restrito ao final da infecção, o IFN- $\gamma$  é essencial para imunização por Leishvacin, em mecanismo dependente da expressão de iNOS. Nossos dados indicam a importância desta citocina para o controle parcial da infecção por *L. amazonensis*, e também para a imunização, mas sugere a possibilidade de que outros fatores, ainda desconhecidos, possam ser importantes para o controle da infecção no seu início, e também para a geração de imunidade.

## Abstract

IFN- $\gamma$  is a key cytokine for protection against many infections caused by a number of intracellular parasites, such as: *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium chabaudi* and *Mycobacterium tuberculosis*. The mechanism by which this cytokine acts is the classical activation of macrophages that expresses iNOS, leading to production of NO, which leads to death of these parasites. The importance of this cytokine *in vivo* and *in vitro* is already well established for the models of infection cited. Surprisingly, the same is not true for infection by *L. amazonensis*. In this case, it was demonstrated that, *in vitro*, the amastigotes of the parasite are stimulated to proliferate in the presence of IFN- $\gamma$ . Moreover, the relevance of this cytokine for protection *in vivo* occurs only in the later times of infection. The mechanism by which IFN- $\gamma$  is not essential in the initial days of infection is still not understood. Thus, the aim of our study was to investigate the role of IFN- $\gamma$  during *in vivo* infection by the strain PH8. Furthermore, the elucidation of the real role of IFN- $\gamma$  is essential for studies that aim to produce an effective vaccine. Our data confirm the importance of IFN- $\gamma$  only in the later times of infection, as described for other strains of *L. amazonensis*. The mechanism by which IFN- $\gamma$   $-/-$  mice do not exhibit increased susceptibility to infection after 10 weeks appears to be dependent on a balance between expression of arginase I and iNOS, in addition to modulation of IL-10. Despite this limited role at the end of the infection, IFN- $\gamma$  is essential for immunization by Leishvacin, in a mechanism-dependent of iNOS expression. Our data indicate the importance of this cytokine for the partial control of infection by *L. amazonensis*, and also for immunization, but suggests the possibility that other factors, still unknown, may be important for infection control in the beginning, and also for the generation of immunity.

## ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 Doenças negligenciadas e a Leishmaniose .....	11
1.2 Leishmanioses .....	12
1.3 Resposta imune a <i>Leishmania major</i> , um modelo de estudo bem estabelecido .....	13
1.3.1 O paradigma T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2.....	13
1.3.2 Citocinas e antígeno, fatores determinantes para a geração de imunidade .....	18
1.4 Resposta Imune à infecção por <i>Leishmania amazonensis</i> .....	21
1.4.1 Caracterização .....	21
1.4.2 Imunização, ferramenta para o entendimento da infecção.....	27
1.5 IFN- $\gamma$ , citocina crucial para resistência a infecções por parasitos intracelulares .....	29
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
4.1 IFN- $\gamma$ apresenta maior relevância no controle do desenvolvimento da lesão e carga parasitária no final do curso de infecção <sup>-</sup> .....	45
4.2 Atividade da enzima arginase I parece estar relacionada com a carga parasitária na infecção por <i>L. amazonensis</i> . .....	48
4.3 Cinética de produção de IFN- $\gamma$ nos camundongos C57BL/6.....	50
4.4 Cinética de produção de citocinas não mostra polarização de resposta TH2 em camundongos IFN- $\gamma$ -/- .....	52
4.5 Camundongos iNOS -/- apresentam curso de infecção diferente dos camundongos IFN- $\gamma$ -/- nos tempos iniciais.....	55
4.6 Análise da expressão de iNOS no sítio de infecção revela indução desta na infecção por <i>L. amazonensis</i> em mecanismo independente de IFN- $\gamma$ .....	58
4.7 IFN- $\gamma$ é essencial para imunização por Leishvacin .....	62
4.8 Camundongos imunizados apresentam maior produção de IFN- $\gamma$ após oito semanas de infecção.....	64
4.9 Altos níveis de IL-10 são induzidos pela vacina oito semanas após o desafio .....	65
4.10 A imunidade conferida por Leishvacin é independente de modulação da atividade de arginase I.....	67
4.11 iNOS é essencial para imunização .....	68



<b>4.12 Camundongos imunizados apresentam pico de expressão de iNOS 12 semanas após o desafio .....</b>	<b>68</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Transportador Catiônico de aminoácido
CCR7	Receptor para a citocina IL-7
ERK	Quinases reguladas por sinais extra-celulares
FcR	Receptor Fc
Foxp3	Forkhead Box P3
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
JAK	Janus tirosina-quinase
LACK	<i>Leishmania</i> homolog for receptor for Activated C Kinase
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP	Proteína quimioatraente de monócitos
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear- $\kappa$ B
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização mundial de saúde
ROS	Espécies reativas de Oxigênio
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TGF	Fator transformador de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral

# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 – Doenças Negligenciadas e a Leishmaniose

Doenças podem ser consideradas negligenciadas quando não existem medidas eficazes, acessíveis e simples que resultem na geração e utilização de drogas como tratamento para as mesmas. Em geral são causadas por parasitos cujos ciclos de vida são dependentes de vetores invertebrados ou a partir do contato com água e solo contaminados com ovos de vermes (YAMEY; TORREELE, 2002). Alguns exemplos dessas doenças são: dengue, doença de Chagas, esquistossomose, leishmaniose e malária. A prevalência destas está intimamente relacionada com o grau de desenvolvimento das regiões, podendo variar mesmo dentro de um país. Nos Estados Unidos a prevalência de cisticercose, dengue e doença de Chagas entre a população hispânica é similar a incidência das mesmas nas regiões mais pobres dos países latino-americanos. Esta semelhança está relacionada às condições em que essas populações vivem (HOTEZ, 2009). Existe um ciclo vicioso entre pobreza e o descaso da indústria farmacêutica, que não investe no desenvolvimento de drogas que combatam essas doenças, uma vez que não há retorno financeiro garantido. Assim, a indústria investe pesadamente em setores como: tratamento da dor, câncer e doenças cardíacas; 1393 novas drogas foram lançadas no mercado entre 1975 e 1999, e apenas 16 dessas para as doenças negligenciadas, que afligem cerca de 10% da população mundial (YAMEY; TORREELE, 2002). Além da falta de investimento do setor farmacêutico na área, outros fatores potencializam a relação entre pobreza e incidência destas doenças parasitárias. Fatores ambientais como as condições das habitações (casas com paredes de barro rachadas, que fornecem local de repouso para flebotomíneos durante o dia; com chão de terra úmida, que prolonga a vida dos mesmos) e sanitárias (acúmulo de lixo favorecendo a reprodução dos flebotomíneos) estão relacionados com aumento do número de casos de leishmaniose visceral na América do Sul. Na Ásia e na África, a falta de nutrientes básicos na alimentação também está relacionada com desenvolvimento de leishmaniose mucocutânea (ALVAR; YACTAYO; BERN,

2006). Assim, as camadas da população expostas a estas doenças estão sujeitas a pobreza e fatores culturais que reforçam e potencializam a gravidade e incidência das mesmas.

## 1.2– Leishmanioses

As leishmanioses podem ser causadas por pelo menos 20 espécies de *Leishmania*, protozoário transmitido pela picada de flebotomíneos fêmeas. Estes vetores são do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo. Já foram identificadas em torno de 30 espécies de vetores para este parasito. Os ciclos de vida do parasito geralmente são zoonóticos, ou seja, animais são os reservatórios do mesmo. Nos casos em que o homem é a única fonte de infecção para o vetor o ciclo é denominado antroponótico (DESJEUX, 1996).

As leishmanioses constituem um sério problema de saúde pública, afetando cerca de 90 países em todo o mundo; 72 destes são países em desenvolvimento e 13 destes se enquadram entre os menos desenvolvidos do globo. Apesar desta ampla ocorrência geográfica 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem em apenas oito países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (REITHINGER *et al.*, 2007). Estima-se que há uma incidência de 1,5 milhões de novo casos anuais, e 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco (DESJEUX, 2004).

Após infecção por *Leishmania* os indivíduos podem ser assintomáticos, são naturalmente resistentes; ou sintomáticos, com vários graus de suscetibilidade. Fatores como: espécie do parasito, imunidade do hospedeiro, dose e local do inóculo de infecção e variações genéticas dos indivíduos determinam as variações assintomático/sintomáticos, e nos casos sintomáticos uma série de manifestações clínicas da doença (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). A leishmaniose cutânea localizada, caracterizada pelo surgimento de uma ou mais lesões localizadas na pele, é a mais freqüente. Embora muitos indivíduos curem de forma espontânea essas lesões, o desenvolvimento das mesmas pode gerar cicatrizes desfigurantes que permanecem mesmo após o tratamento (MORAES; SILVEIRA, 1994). A leishmaniose cutânea difusa se

desenvolve geralmente em indivíduos imunossuprimidos. Sua severidade está relacionada ao fato de se formarem lesões disseminadas que nunca curam de forma espontânea. A forma mucocutânea da doença se caracteriza por extensiva destruição das cavidades oro - nasal e faringeal, levando a mutilações faciais. Esta forma é mais associada a espécies de *Leishmania* do Novo Mundo como *L. brasiliensis* e *L. guyanensis*, mas também pode ocorrer em indivíduos infectados por espécies do Velho Mundo, *L. donovani* e *L. major*, quando os mesmos apresentam imunossupressão. A manifestação mais grave da doença é a forma visceral, letal quando não tratada. Febre, perda de peso, esplenomegalia e hepatomegalia são alguns dos sintomas associados a esta doença. O tratamento para a mesma é longo e caro (DESJEUX, 2004).

A *Leishmania* é um parasito que se apresenta sob duas formas evolutivas durante seu ciclo de vida, a promastigota, forma extracelular flagelada livre que ocorre no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, e a amastigota, forma intracelular de células do sistema fagocitário mononuclear do hospedeiro vertebrado (BATES, 1994). Flebotomíneos fêmeas adquirem os parasitos quando se alimentam de sangue de hospedeiros mamíferos infectados. A queda de temperatura e aumento de pH, leva à diferenciação da forma amastigota para a forma promastigota no trato digestivo do invertebrado. A infecção do vertebrado por *Leishmania* ocorre quando uma fêmea de flebotomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo, inocula juntamente com sua saliva formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* (BATES, 2007).

### **1.3– Resposta imune a *Leishmania major*, um modelo de estudo bem estabelecido**

#### **1.3.1- O paradigma T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2**

O estudo dos aspectos imunes envolvidos nas infecções por *Leishmania* em modelo murino devem ser sempre analisados com o cuidado de se levar em consideração alguns fatores que podem determinar respostas imunológicas e manifestações clínicas distintas. Aspectos tais quais linhagem do camundongo,

espécie da *Leishmania*, local de infecção e dose de parasitos podem variar de acordo com o objetivo do estudo e determinar diferenças na manifestação clínica da doença.

Logo após a descrição da existência de diferentes populações clonais de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, caracterizadas a partir do perfil de citocinas que produzem, foi observado que essa dicotomia da resposta imune era determinante para a resolução ou não à infecção pelo parasito *L. major* (HEINZEL *et al.*, 1989; MOSMANN *et al.*, 1986). Camundongos BALB/c são susceptíveis à infecção por este parasito, sendo incapazes de controlar a lesão ou a proliferação do parasito. Esta suscetibilidade está relacionada com o desenvolvimento de uma resposta T<sub>H</sub>2, em que se observa a produção de IL-4 e baixos níveis de produção de IFN- $\gamma$  (HEINZEL *et al.*, 1989). Em contrapartida, camundongos da linhagem C57BL/6 são capazes de controlar a replicação do parasito levando a resolução da infecção. A este perfil de resistência associa-se a polarização de uma forte resposta T<sub>H</sub>1, com produção de altos níveis de IFN- $\gamma$  (HEINZEL *et al.*, 1989). Vários trabalhos reforçam esta associação entre desenvolvimento de resposta T<sub>H</sub>1 e resistência à infecção e polarização de resposta T<sub>H</sub>2 à suscetibilidade. À transferência de células com perfil T<sub>H</sub>1 para camundongos BALB/c previamente irradiados relacionou-se à transferência também do perfil de resistência à infecção. O mesmo não pôde ser observado com a transferência de células com perfil T<sub>H</sub>2 (SCOTT *et al.*, 1988). Constatou-se também uma permanente expressão de mRNA de IL-4 em camundongos BALB/c, o que não ocorre em animais C57BL/6 (HEINZEL *et al.*, 1989). Além disso, vários estudos foram feitos a partir da depleção de IL-4 e IFN- $\gamma$  em linhagens susceptíveis e resistentes, respectivamente. Estes trabalhos mostraram novamente a importância da produção de IFN- $\gamma$  para a resolução da infecção, e de IL-4 para a persistência da mesma (BELOSEVIC *et al.*, 1989; CHATELAIN *et al.*, 1999; SADICK *et al.*, 1990). Uma vez que a produção de IL-12 nos tempos iniciais da infecção é fundamental para a geração de resposta T<sub>H</sub>1, foi realizado tratamento de camundongos BALB/c com IL-12 recombinante, estratégia que se mostrou eficaz para curar a doença (HEINZEL *et al.*, 1993; SYPEK *et al.*, 1993). Todos estes trabalhos ajudaram a construir a idéia de que essa dicotomia simples da resposta imune seria a chave para o

entendimento dos mecanismos de resistência e suscetibilidade a infecção por *L. major*.

A constatação de que o perfil de citocinas produzidas por estas populações linfocitárias determina a maneira com a qual os macrófagos, principais células efetoras nesta infecção, são ativados reforça a importância da resposta  $T_H1$  para o controle da infecção. Quando ativados por IFN- $\gamma$  e infectados com amastigotas de *L. major* macrófagos produzem óxido nítrico (NO) e matam o parasito. Este mecanismo é dependente de L-arginina, uma vez que a produção de NO se dá através do metabolismo da mesma pela enzima iNOS (GREEN *et al.*, 1990b). Além do sinal desencadeado pelo IFN- $\gamma$ , outro sinal é requerido para produção de NO em níveis tóxicos para o parasito. Este papel é exercido pelo TNF- $\alpha$ , citocina produzida pelo macrófago em resposta a própria infecção pelas formas amastigotas do parasito (GREEN *et al.*, 1990a). IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  atuam em sinergismo mediando a morte do parasito através da produção de NO. Assim, a produção de óxido nítrico é crucial para o controle do parasitismo; para o parasito em questão a produção de radicais de oxigênio não parece ser relevante (ASSREUY *et al.*, 1994; LIEW; LI; MILLOTT, 1990). Este mecanismo de morte do parasito mediado por NO também já foi descrito para outros parasitos como *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi* (LANGERMANS *et al.*, 1992; VESPA; CUNHA; SILVA, 1994). Sendo o IFN- $\gamma$  fundamental para ativação de macrófagos e posterior produção de NO, fica evidenciada a importância da resposta  $T_H1$  para a resolução da infecção por *L. major*. Populações clonais  $T_H1$  são capazes, portanto, de através da produção de suas citocinas características induzir a produção de NO por macrófagos, mas o mesmo não ocorre com populações  $T_H2$ , cuja produção de IL-4 inibe a produção de NO (TAUB; COX, 1995).

O direcionamento da ativação da resposta de macrófagos por citocinas produzidas por linfócitos  $T_H1$  e  $T_H2$  levou à crença de que também existiriam populações M-1 e M-2 de macrófagos. Isso porque macrófagos oriundos de camundongos C57BL/6 (M-1) produzem mais NO quando estimulados com IFN- $\gamma$  + LPS do que macrófagos oriundos de camundongos BALB/c (M-2) (MILLS *et al.*, 2000). Porém, os próprios autores do trabalho fazem a ressalva de que os macrófagos M-1 e M-2 apresentam apenas uma tendência de se comportarem como tais quando na presença de estímulo  $T_H1$  ou  $T_H2$ ,

respectivamente (MILLS *et al.*, 2000). Essa idéia vai de acordo com outros trabalhos que mostraram que os macrófagos são células que apresentam certa plasticidade de ativação, sendo capazes, de acordo com o estímulo externo, de mudarem sua resposta. Confirmando este conceito, foi mostrado que células M-2, na presença de citocinas  $T_H1$ , respondem produzindo níveis significativos de NO (GRATCHEV *et al.*, 2006; STOUT *et al.*, 2005). Diante desta capacidade de alterar sua resposta de acordo com os estímulos externos, a classificação de macrófagos M-1 e M-2 se tornou uma visão muito simplista. Desta forma, hoje se considera a existência de amplo espectro de ativação de macrófagos, onde as populações M-1 e M-2 são vistas como os dois extremos desse espectro (MOSSER; EDWARDS, 2008). Dentro deste espectro pelo menos três populações distintas de macrófagos já foram bem descritas: os macrófagos classicamente ativados, que produzem altos níveis de IL-12 e baixos níveis de IL-10, quando estimulados com IFN- $\gamma$  + LPS; os macrófagos denominados M-II, que produzem altos níveis de IL-10 e baixos níveis de IL-12, quando estimulados com imunocomplexos IgG-OVA + LPS; e os macrófagos alternativamente ativados, que não produzem níveis detectáveis destas citocinas quando estimulados com IL-4 (EDWARDS *et al.*, 2006).

Macrófagos ativados alternativamente são de fundamental importância para o entendimento da suscetibilidade observada em camundongos BALB/c. Isso ocorre porque durante a infecção por *L. major*, estes animais apresentam produção contínua de IL-4. Nesta situação os macrófagos não respondem produzindo NO, pelo contrário, o metabolismo de L-arginina se dá através da enzima arginase I. Nesta via metabólica ocorre a produção de poliaminas, essenciais para a proliferação do parasito. É interessante notar que não somente os macrófagos, mas também as células dendríticas expressam arginase I em resposta ao estímulo de IL-4 (CORRALIZA *et al.*, 1995; MODOLELL *et al.*, 1995; MUNDER *et al.*, 1999). A expressão de arginase I em detrimento da iNOS, além de favorecer a replicação do parasito também promove a depleção de L-arginina no meio extracelular, induzindo imunossupressão local de células T, que passam a proliferar menos e a produzir menos IFN- $\gamma$ ; o que favorece ainda mais a persistência da infecção (MODOLELL *et al.*, 2009). Além da *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* e



*Helicobacter pylori* requerem a atividade da arginase I para sobreviver e proliferar (DULEU *et al.*, 2004; GOBERT *et al.*, 2001).

Ainda que a dicotomia de resposta  $T_H1$  e  $T_H2$  seja muito bem fundamentada para a infecção por *L. major* em modelo murino, e que isso apresente um reflexo coerente em relação ao perfil de ativação de macrófagos durante a infecção, não podemos ignorar uma série de trabalhos que mostram que outros fatores também estão associados à resistência ou suscetibilidade. Afora o importante papel da IL-4 para a suscetibilidade a infecção, outras citocinas  $T_H2$ , como a IL-13, favorecem a persistência da doença, em mecanismo que parece ser independente de IL-4 (MATTHEWS *et al.*, 2000). Outra citocina importante para o perfil de suscetibilidade é a IL-10. Amastigotas de *L. major* opsonizadas com IgG do hospedeiro induzem a produção de IL-10 quando fagocitadas pelos macrófagos, um provável mecanismo de escape. Reforçando esta idéia, camundongos BALB/c deficientes em IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>) apresentam controle no desenvolvimento da lesão e da carga parasitária (KANE; MOSSER, 2001; NOBEN-TRAUTH *et al.*, 2003). Em contrapartida, de forma interessante, a IL-10 proveniente de células T regulatórias (Treg) do sítio de infecção de camundongos C57BL/6 é fundamental para a persistência do parasito mesmo quando já houve resolução da lesão (BELKAID *et al.*, 2002). As células Treg naturais, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, são consideradas importantes para a manutenção da tolerância aos antígenos próprios, a partir da inibição da ativação de linfócitos T, uma vez que a depleção destas células leva ao desenvolvimento espontâneo de doenças auto-imunes (SAKAGUCHI *et al.*, 1995). Reforçando a teoria de que vários fatores favorecem a não resolução da infecção, foi observado que camundongos BALB/c IL-4<sup>-/-</sup> são incapazes de controlar a lesão e proliferação do parasito (NOBEN-TRAUTH; KROPF; MULLER, 1996). Afora isso, foi descoberto que células dendríticas requerem baixos níveis de IL-4 no período inicial da infecção para produzir altos níveis de IL-12 e gerar conseqüente polarização de resposta para o tipo 1 (BIEDERMANN *et al.*, 2001).

Existem relatos de que para uma cepa de *L. major*, Sd, a polarização  $T_H1$  e altos níveis de produção desta citocina não são suficientes para a resolução da infecção (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005). Neste caso, IL-10, e não IL-4, oriunda de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> está relacionada à suscetibilidade

(ANDERSON *et al.*, 2007). Além disso, a infecção por uma cepa de *L. major* recém caracterizada, BH49, não requer a produção de IFN- $\gamma$  para a sua resolução, em camundongos C57BL/6. Porém, este perfil está associado à uma baixa infectividade inerente da própria cepa (SILVA *et al.*, 2009). Ainda, a polarização da resposta T<sub>H</sub>1 deve estar associada a um efetivo mecanismo efetor mediado pelos macrófagos, pois em contrário também não é possível a resolução da infecção (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

### **1.3.2- Citocinas e antígeno: fatores determinantes para a geração de imunidade**

A identificação de fatores que determinam a resolução à infecção por *L. major* direciona, obviamente, os trabalhos que procuram obter protocolos eficazes de imunização. Assim sendo, a geração de uma polarização de resposta T<sub>H</sub>1, com alta produção de IFN- $\gamma$ , é um objetivo pretendido que explica o sucesso de protocolos de imunização, assim como a falta da mesma explica o seu fracasso. O desenvolvimento da imunidade passa pela necessidade de geração de células T de memória. Isso explica a imunidade observada em camundongos C57BL/6, infectados com *L. major*, após um segundo desafio com o parasito. Doze semanas após a primeira infecção, período em que estes animais já controlaram a lesão, foi realizada segunda infecção em outro local, e o que se observa é o controle total da mesma, sem desenvolvimento de lesão (MENDEZ *et al.*, 2004). A exposição a pequenas doses de inóculo do parasito também tornaram camundongos BALB/c resistentes à infecção (MENON; BRETSCHER, 1996).

Dois protocolos básicos de imunização já foram bem descritos para este modelo de infecção. O primeiro deles é a leishmanização, em que a infecção prévia por espécies ou cepas menos virulentas do parasito induz vários graus de proteção ao desafio posterior por espécie ou cepa mais virulenta, por exemplo. Este protocolo já foi realizado em modelo murino com relativo sucesso (GONZALEZ-LOMBANA *et al.*, 2008). Em humanos nem sempre houve sucesso neste tipo de imunização, mesmo quando altos níveis de IFN- $\gamma$  estão associados a leishmanização (PETERS *et al.*, 1990). Devido a notificações de vários casos em que não houve cura à infecção prévia, que não

deveria induzir lesão progressiva, a Organização Mundial de Saúde (OMS) não recomenda este tipo de procedimento (GENARO *et al.*, 1996). O outro protocolo padrão é a utilização de frações de antígeno ou parasitos mortos para indução da imunidade. Um dos primeiros trabalhos nesta vertente mostrou que a utilização de antígeno de formas promastigotas do parasito induz proteção, e que esta é mediada por resposta celular, e não dependente da geração de resposta humoral específica (SCOTT *et al.*, 1987). Outros trabalhos mostram uma diferença relevante no padrão de resposta induzido pela imunização gerada pelo inóculo do parasito vivo ou morto. Desta forma, a vacinação por parasito morto pode induzir uma reação inflamatória transitória, assim como uma resposta celular temporária. Por outro lado, a utilização de parasitos vivos, no mesmo trabalho, gerou reação inflamatória, assim como resposta imune celular persistentes, levando à imunidade do animal (OKWOR; LIU; UZONNA, 2009). Este estudo reforçou o conceito de que a persistência dos parasitos no sítio de infecção, mesmo após a resolução da mesma, seria fundamental para a geração de imunidade duradoura. Essa idéia teve como principal alicerce estudos que mostraram que a produção de IL-10 por células Treg no local de infecção seria fundamental para a persistência do parasito em níveis residuais, assim como para a imunidade. De maneira convincente, o tratamento de camundongos C57BL/10 com anti-IL-10R levou ao que denominamos de cura estéril, nenhum parasito foi recuperado da orelha destes animais, o que comprometeu a manutenção da imunidade nos mesmos. Estes animais, embora controlem a infecção primária, são incapazes de apresentar resposta protetora frente uma re-infecção, apresentando desenvolvimento de lesão similar ao primeiro desafio (BELKAID *et al.*, 2002; MENDEZ *et al.*, 2004). Estes trabalhos reforçam um grande dilema em relação à importância da persistência do parasito, ou seja, da necessidade constante da presença do antígeno para manutenção de uma resposta protetora de longa duração. Este dilema se baseia em uma série de trabalhos que mostra que a persistência do antígeno não é requerida para a imunidade (OKWOR; KURIAKOSE; UZONNA, 2010; PAKPOUR; ZAPH; SCOTT, 2008; ZAPH *et al.*, 2004)

Sabe-se que existem dois tipos de células de memória que expressam CD62L, uma selectina importante para adesão ao endotélio. Essas populações são divididas da seguinte forma: T<sub>CM</sub>, as células T de memória central, e as T<sub>EM</sub>,

células T de memória efetora. Essas sub-populações diferem na expressão de marcadores que acabam por influenciar no papel das mesmas para geração e manutenção da imunidade. As células T<sub>CM</sub> expressam altos níveis de CD62L e expressam CCR7 (CD62L<sup>HIGH</sup>CCR7<sup>+</sup>). Ao contrário, as células T<sub>EM</sub> expressam baixos níveis de CD62L e não apresentam expressão de CCR7 (CD62L<sup>LOW</sup>CCR7<sup>-</sup>) (COLPITTS; DALTON; SCOTT, 2009; SALLUSTO *et al.*, 1999). A expressão de CD62L e CCR7 está relacionada à retenção destas células nos órgãos linfóides secundários; ao passo que, a perda da expressão de CCR7 permite a migração das células dos órgãos linfóides para o local de injúria. Dito isto, as células T<sub>CM</sub> representam a população linfocitária que sofreu expansão clonal antígeno-específica e migrou para os órgãos linfóides secundários. Em caso de re-infecção, estas se diferenciam em células T<sub>EM</sub> e migram para o sítio de infecção. Desta forma, as células T<sub>CM</sub> são de memória duradoura, ao passo que, as células T<sub>EM</sub> são de vida curta (SALLUSTO *et al.*, 1999). Em relação ao dilema do requerimento ou não do antígeno para a imunidade, a literatura nos fornece dados que nos permitem sugerir que os dois tipos de população de células de memória apresentam necessidades distintas de permanência do antígeno. A geração de células T<sub>CM</sub> requer a presença do antígeno. Ainda, requer também estímulo pela citocina IL-12 para ser gerada (STOBIE *et al.*, 2000). Em contrapartida, a persistência do parasito não é requerida para a manutenção destas células (SWAIN; HU; HUSTON, 1999; ZAPH *et al.*, 2004). Uma vez geradas, as células T<sub>CM</sub> permanecem nos órgãos linfóides secundários e em caso de re-infecção as mesmas irão dar origem as células T<sub>EM</sub>. Este processo não apresenta comprometimento prévio para diferenciação em células de perfil T<sub>H1</sub> ou T<sub>H2</sub>. Assim, a IL-12 é fundamental para que ocorra desenvolvimento de células de memória efetoras T<sub>H1</sub> (PAKPOUR; ZAPH; SCOTT, 2008). Isso explica sua utilização como adjuvante eficaz na infecção por *L. major* (AFONSO *et al.*, 1994). Ao contrário do observado para células T<sub>CM</sub> a sobrevivência das células T<sub>EM</sub> é dependente de antígeno; assim como de IL-12 (STOBIE *et al.*, 2000). Uma vez geradas, as células T<sub>EM</sub> podem apresentar diferente perfil de produção de citocinas, isto varia de acordo com os protocolos de imunização. Estes dados sugerem a possibilidade de que a eficácia ou não destes protocolos dependa do tipo de célula de memória efetora desenvolvida.

Em trabalho muito elegante, Patricia Darrah e colaboradores (2007) testaram vários protocolos de imunização e o mais eficaz foi o que apresentou a geração de células T<sub>EM</sub> multifuncionais. Estas células apresentaram produção simultânea de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (DARRAH *et al.*, 2007). A produção destas citocinas simultaneamente pelo mesmo tipo celular parece ser relevante porque IL-2 favorece a expansão destas células, enquanto que TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são fundamentais para os mecanismos de morte do parasito. O fato de que outros fatores, e não somente a produção de IFN- $\gamma$ , são importantes para a imunidade duradoura explica porque a produção em altos níveis apenas desta citocina muitas vezes não é capaz de gerar proteção adequada ao desafio pelo parasito (GICHERU *et al.*, 2001). Este trabalho nos mostra que a qualidade da resposta T<sub>H1</sub> gerada é fundamental para a eficácia da imunidade em longo prazo.

#### **1.4-Resposta imune a *Leishmania amazonensis***

##### **1.4.1- Caracterização**

A dicotomia T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub> explica, como dito anteriormente, a resistência ou suscetibilidade à infecção por *L. major*. Este quadro, entretanto, não explica o desenvolvimento da infecção por *L. amazonensis*. É interessante notar que algumas linhagens resistentes à *L. major* não o são para infecção com *L. amazonensis*. Camundongos C57BL/10, C57BL/6, CBA, C3H não conseguem controlar a replicação do parasito e tão pouco o desenvolvimento da lesão (AFONSO; SCOTT, 1993; JI; SUN; SOONG, 2003; JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000; LEMOS, V *et al.*, 2000). De forma instigante, estas linhagens, embora susceptíveis, não polarizam uma resposta T<sub>H2</sub>; assim, a produção de altos níveis de IL-4 não é observada para este modelo de infecção. Esta citocina apresenta papel relevante apenas para a suscetibilidade de camundongos BALB/c (AFONSO; SCOTT, 1993). A ausência de resposta do tipo 2 nas linhagens citadas acima não implica no desenvolvimento de uma resposta do tipo 1. Desta forma, acredita-se que a não resolução da infecção observada nestes animais esteja associada à não polarização de uma resposta T<sub>H1</sub> associada a baixos níveis de produção de IFN- $\gamma$ .

A produção de IL-12 por células dendríticas é passo fundamental para geração de uma resposta T<sub>H</sub>1. A fraca polarização deste tipo de resposta na infecção por *L. amazonensis* levou a inúmeros questionamentos em relação ao perfil de ativação e apresentação de antígenos por essas células neste modelo de infecção. Um dos aspectos relevantes para a caracterização deste perfil de ativação é a produção de IL-12 por essas células. Foi relatado que nesta infecção níveis menores desta citocina são produzidas em comparação com a infecção de células dendríticas com *L. major* (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000; XIN; LI; SOONG, 2008; XIN; LI; SOONG, 2007). Apesar desta deficiência, a administração de IL-12 recombinante não altera o perfil de suscetibilidade destes animais, e isso acontece porque além de inibir a produção da citocina, as formas amastigotas deste parasito são capazes também de inibir a expressão do receptor de IL-12 (IL-12R). Foi demonstrado que esse processo não é mediado por IL-4, IL-10 ou TGF- $\beta$ , o que sugere uma possível modulação exercida pela própria interação com o parasito (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000; XIN; LI; SOONG, 2008). As células dendríticas são capazes de endocitar o parasito, e a opsonização do mesmo facilita este processo. Estando opsonizado o parasito induz processo claro de maturação nestas células, identificado pelo aumento da expressão de moléculas de superfície como CD40, CD86 e MHC II (PRINA *et al.*, 2004). Embora a expressão destas moléculas, fundamentais para ativação de células mediada por contato, não seja comprometida, a produção de citocinas por estas células está. Vale ressaltar que estes estudos sempre utilizam como parâmetro de comparação a infecção de camundongos C57BL/6 com *L. major*, situação em que desenvolvem perfil de resistência. Foi demonstrado que, além de menores níveis de produção de IL-12, a produção de IL-1 $\beta$  e IL-6 também estão comprometidas em relação à infecção por *L. major* (FAVALI *et al.*, 2007; XIN; LI; SOONG, 2008; XIN; LI; SOONG, 2007). A menor produção de IL-1 $\beta$  explica em parte porque nesta infecção temos baixos níveis de IL-12. Além disso, sabe-se que as formas amastigotas do parasito, através de proteases ou do próprio proteossoma, levam à degradação de STAT-2, importante para sinalização desta citocina. Assim, além da produção, a sinalização via IL-12 é comprometida (XIN; LI; SOONG, 2008; XIN; LI; SOONG, 2007). Em conjunto, estes dados sugerem porque camundongos infectados com *L. amazonensis*

respondem menos a ativação por IL-12 do que quando infectados com *L. major* (RAMER; VANLOUBBEECK; JONES, 2006). Essa sinalização comprometida ajuda a explicar porque, mesmo na ausência de resposta T<sub>H2</sub>, estes animais não conseguem polarizar uma resposta T<sub>H1</sub>.

Células NK constituem importante fonte de IFN- $\gamma$  na infecção por *L. major* (SCHARTON; SCOTT, 1993). Na infecção por *L. amazonensis* amastigotas do parasito inibem a ativação deste tipo celular, o que leva também a inibição de células dendríticas. Isso ocorre uma vez que a interação destas células com células NK previamente ativadas favorece a maturação das mesmas. Em função disto, a administração de células NK previamente ativadas e não infectadas no sítio de infecção favorece a eliminação do parasito (SANABRIA *et al.*, 2008). A ativação destas células por IL-2 também favorece a posterior ativação de macrófagos, já que leva ao aumento na produção de IFN- $\gamma$  (ARANHA *et al.*, 2005).

A única linhagem de camundongo que apresenta perfil de resistência a esta infecção, HeJ, não produz mais IFN- $\gamma$  que camundongos BALB/c, susceptíveis, quando infectados. Isto sugere um mecanismo independente desta citocina, e mesmo de uma resposta T<sub>H1</sub> para a resolução desta infecção. Neste caso os camundongos BALB/c apresentam maior produção de IL-4 e IL-10, sugerindo que a resistência observada no HeJ se deva à um equilíbrio entre produção de citocinas inflamatórias e regulatórias (QI; POPOV; SOONG, 2001).

Uma deficiência foi observada em relação à produção de uma série de citocinas e quimiocinas nos estágios iniciais da infecção por *L. amazonensis*. Após duas e quatro semanas de infecção uma menor expressão e produção de IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-1- $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , CCL4, CCL5 e dos receptores CCR1, CCR2 e CCR5 foi encontrada nos linfonodos e patas de camundongos C57BL/6 (JI; SUN; SOONG, 2003). É provável que este fenômeno esteja correlacionado com o fato de que também há comprometimento na apresentação de antígeno ao linfócito T *naïve* pelas células dendríticas, devido ao processo de maturação desta célula não ocorrer como na infecção por *L. major*. Assim sendo, uma resposta mediada por linfócitos T também não se dá de maneira satisfatória nesta infecção. Desta forma, estas células, quando estimuladas com o antígeno do parasito, respondem produzindo simultaneamente baixos níveis de IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (COURRET *et al.*, 2003; JI *et al.*,

2002). Em conclusão, a resposta imune celular que encontramos em camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* é uma mistura de respostas T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, uma vez que citocinas de ambas as respostas podem ser encontradas. Vale destacar também que, em termos quantitativos, a produção de citocinas se dá em níveis muito menores ao observado para infecção por *L. major*. O linfócito T CD4<sup>+</sup> é um fator que favorece a patogenicidade na infecção por *L. amazonensis*, pois tanto animais deficientes na apresentação de antígeno via MHC II, quanto camundongos RAG -/- apresentam menor lesão que camundongos selvagens. Mais do que isso, camundongos  $\beta$ 2 microglobulina -/- também apresentam menor suscetibilidade. O perfil de ativação de linfócitos T parece favorecer, desta forma, a persistência da infecção (SOONG *et al.*, 1997). Em relação ao papel de linfócitos B poucos estudos foram realizados. Resultados contraditórios foram descritos. Uma vez que camundongos JhD, que não apresentam linfócitos B funcionais, apresentam um menor desenvolvimento de lesão, estas células parecem estar associadas à patogenicidade desta infecção. É interessante notar que estas células apresentam capacidade de ativar linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, assim como de retê-los no sítio de infecção, o que só favorece a não resolução da infecção (WANASEN; XIN; SOONG, 2008). Em contraste, outro estudo mostrou que a produção de anticorpos seria fundamental para a resistência de camundongos C57BL/6 quando estes são infectados simultaneamente com *L. major* e *L. amazonensis* (GIBSON-CORLEY *et al.*, 2010).

Além do papel dos diversos tipos celulares devemos ressaltar a participação de duas citocinas chaves para infecção por *L. amazonensis*: IL-10 e IFN- $\gamma$ . Diante do exposto de que a suscetibilidade não está relacionada à produção de IL-4 para a maioria das linhagens infectadas por este parasito, a IL-10 parece ser uma citocina que contribui para este perfil. Células dendríticas quando infectadas com este parasito apresentam uma produção elevada desta citocina (XIN; LI; SOONG, 2008). Além disso, macrófagos infectados com amastigotas do parasito opsonizadas induzem a ativação de ERK, o que, na presença de HA, principal componente da matriz extracelular, leva a produção de IL-10 (YANG; MOSSER; ZHANG, 2007). A IL-10, sendo citocina que inibe ativação de macrófagos (GAZZINELLI *et al.*, 1992), tem sua produção estimulada pelo parasito. Este também é capaz de inibir a expressão de iNOS (BALESTIERI *et*



*al.*, 2002), gerando microambiente adequado para a sua própria proliferação. Conforme esperado, camundongos IL-10 <sup>-/-</sup> infectados por *L. amazonensis* apresentam aumento na produção de IL-12, IFN- $\gamma$  e na expressão de iNOS. Diferente do esperado, estes animais não são capazes de resolver a infecção (JONES *et al.*, 2002). Afora isso, células Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, que produzem mais IL-10 que células efetoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> na lesão, quando transferidas para camundongos C57BL/6 previamente infectados favorecem a redução da lesão e da carga parasitária. A transferência das células efetoras não altera perfil da infecção. Foi demonstrado que as células Treg produzem níveis maiores de IL-10 e TGF- $\beta$  do que células efetoras, embora a utilização de anticorpos específicos anti-IL-10 e anti-TGF- $\beta$  descarte papel destas citocinas no perfil protetor induzido pelas células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Assim, o mecanismo pelo qual se observa este fenômeno de proteção não foi elucidado (JI *et al.*, 2005).

Em relação ao papel do IFN- $\gamma$  na infecção por este parasito, um dado contrasta com a infecção por *L. major*. Animais deficientes para esta citocina só apresentam maior suscetibilidade à infecção nos tempos finais da mesma (COLMENARES *et al.*, 2003; PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007). Mais do que isso, esses animais não apresentam uma resposta T<sub>H</sub>2 polarizada. Ainda mais curioso, baixos níveis de IFN- $\gamma$  favorecem a replicação de amastigotas, mas não de promastigotas, *in vitro*, no interior dos macrófagos (QI *et al.*, 2004). Esta replicação não é mediada por produção induzida pelo parasito de IL-10, TGF- $\beta$ , ou pela atividade da enzima arginase I. O que é sugerido é que na infecção por amastigotas de *L. amazonensis* há baixa produção de TNF- $\alpha$ , segundo sinal que atua em sinergismo com IFN- $\gamma$  induzindo produção de NO. Desta forma não existe sinal para a expressão de iNOS, ou para expressão de arginase I. No entanto, a produção de baixos níveis de IFN- $\gamma$  é suficiente para induzir aumento na expressão de CAT-2B, transportador de L-arginina. Desta forma, ocorre um aumento na captação deste aminoácido do meio extracelular. Mas o mesmo se acumula no interior do macrófago, já que não é metabolizado nem via iNOS, nem pela via da arginase I (WANASEN *et al.*, 2007). É possível que o parasito consiga captar, mesmo estando no interior do vacúolo parasitóforo, o excesso deste aminoácido acumulado no macrófago, utilizando-o como substrato para a enzima arginase I funcional que o próprio expressa. A partir desta metabolização ocorre a produção de poliaminas essenciais para a

proliferação do mesmo (GAUR *et al.*, 2007; ROBERTS *et al.*, 2004). Estes dados sugerem um mecanismo através do qual o IFN- $\gamma$  favorece a replicação e não a morte do parasito nestas condições.

Gerando um quadro ainda mais complexo para esta infecção, as formas amastigotas deste parasito são mais resistentes ao NO, uma vez que níveis maiores desta molécula são necessários para eliminação do mesmo (MUKBEL *et al.*, 2007). Ademais, além de NO, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) também são requeridas para eliminação do parasito (MUKBEL *et al.*, 2007). Afora isso, o momento de produção de NO parece ser fundamental para a determinação de um perfil de infecção mais resistente ou susceptível a esta infecção. Camundongos BALB/c produzem consideráveis níveis de NO, semelhantes aos camundongos C57BL/6, porém isso ocorre apenas em estágios avançados da infecção, o que parece comprometer o controle parcial da replicação dos parasitos observada nos camundongos C57BL/6 (GIORGIO *et al.*, 1998).

O panorama da infecção por *L. amazonensis* se apresenta muito mais complexo que a infecção por *L. major*, em que os fatores de resistência e suscetibilidade foram identificados. Na infecção por *L. amazonensis* esses fatores parecem ser muitos, e atuando de maneira dependente e simultânea. De qualquer forma, o paradigma T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 não explica o desenvolvimento de infecções causadas por *L. amazonensis*. A identificação de fatores que coordenam o balanço entre os mecanismos efetores e regulatórios parece ser a chave para o entendimento deste modelo de infecção. Uma ferramenta eficaz nesta busca são os protocolos de imunização que, afora o papel importante e indiscutível para o desenvolvimento de vacinas, nos fornece valiosas informações a respeito de fatores importantes para a resistência à infecção.

#### 1.4.2- Imunização, ferramenta para o entendimento da infecção

Vários protocolos de imunização já foram testados para infecção por *L. amazonensis*; resultados diversos foram descritos. Valendo-se do fato de que células dendríticas infectadas por este parasito produzem baixos níveis de IL-12, foi realizada uma terapia com a pré-ativação desta célula com antígeno de *L. amazonensis* + IL-12 recombinante. A administração no local da infecção destas células levou ao aumento na produção de IFN- $\gamma$ , e IL-12R por células do linfonodo. Apesar disto, essas mudanças não foram suficientes para reverter a suscetibilidade à infecção (VANLOUBBEECK *et al.*, 2004).

A geração de resposta T<sub>H</sub>1 na infecção por *L. major* leva à ocorrência de células T e B com perfil de ativação capaz de levar a ativação de macrófagos e conseqüente morte do parasito *L. amazonensis*. Neste caso o mecanismo é dependente de fatores solúveis oriundos de células CD4<sup>+</sup> e linfócitos B (MUKBEL; PETERSEN; JONES, 2006). Em acordo com este dado, a infecção prévia por *L. major* leva ao aumento na produção de IFN- $\gamma$  e a posterior resistência parcial a infecção por *L. amazonensis* (GONZALEZ-LOMBANA *et al.*, 2008; VERAS *et al.*, 1999)

Foi demonstrado que a IL-12 é essencial para imunização induzida pelo antígeno A2, oriundo de *L. donovani* (COELHO *et al.*, 2003). É interessante notar que a comparação entre a eficácia de diferentes procedimentos de imunização nos fornece informações importantes. Camundongos BALB/c imunizados com proteína LACK se tornam imunes à infecção por *L. major*, mas não à infecção por *L. amazonensis*. Já sua imunização por A2 confere proteção contra desafio por *L. amazonensis*, que está acompanhada de aumento na produção de IFN- $\gamma$ . Vacinas de DNA também levam à proteção, provavelmente pelo mesmo mecanismo (COELHO *et al.*, 2003; ZANIN *et al.*, 2007).

A administração de antígeno deste parasito da cepa Josefa por via oral também leva ao aumento na produção de IFN- $\gamma$ , o que pode estar associado ao efeito protetor observado com este protocolo (PINTO; DE MELLO; ROSSIBERGMANN, 2003). Já a imunização intramuscular por antígeno da cepa PH8 gerou maior suscetibilidade ao animal “imunizado”. O aumento na produção de TGF- $\beta$  parece ser a causa desta falha na geração da imunidade (PINHEIRO *et al.*, 2005). A imunização com antígeno de amastigotas do parasito requer a

participação de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Além disso, o mecanismo pelo qual as células CD8<sup>+</sup> contribuem para geração de imunidade é dependente de IFN- $\gamma$  e perforina (COLMENARES *et al.*, 2003).

Isto posto, fica evidenciado que, embora facilite a replicação de amastigotas do parasito, o IFN- $\gamma$  ainda parece estar associado à proteção neste modelo de infecção. Apesar disto, alguns trabalhos mostram que é possível gerar perfil de resistência independente de IFN- $\gamma$ . A administração de lectina de *Canavalia brasiliensis* gera proteção em camundongos BALB/c, e a administração de anti-IFN- $\gamma$  não é capaz de reverter este perfil, apesar de ser observado aumento na produção desta citocina ao longo do tratamento in vivo (BARRAL-NETTO *et al.*, 1996).

Um protocolo interessante de imunização contra *L. amazonensis* é a utilização da Leishvacin. Originalmente era composta por antígenos provenientes de cinco espécies deste parasito isoladas de pacientes brasileiros. Dentre estas cepas, encontrava-se a PH8 de *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. chagasi* e *L. major*. Uma série de triagens foram realizadas e resultados promissores foram obtidos. Isto significa dizer que a imunização de pessoas residentes de áreas endêmicas pelo Brasil resultou na diminuição de incidência do número de doentes em período avaliado de até 20 anos após imunização. Apesar dos resultados promissores, a OMS fez críticas pertinentes em relação ao uso de uma vacina multicepa. Problemas de taxonomia não resolvidos na época, diferentes requerimentos para crescimento de cada cepa e dificuldade na identificação dos fatores relacionados à imunização tornavam inviável a padronização de uma vacina em escala mundial. A sugestão feita e aceita foi que se escolhesse apenas uma cepa para imunização. A cepa PH8 de *L. amazonensis* foi a selecionada, pois o antígeno da mesma era capaz de induzir proliferação de linfócitos T e aumento na produção de IFN- $\gamma$  sistêmica de pacientes (GENARO *et al.*, 1996). Estudos posteriores com esta vacina mostraram que a mesma não induz alteração na frequência de células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> nos pacientes imunizados (BOTELHO; MAYRINK; OLIVEIRA, 2009). Em estudos com camundongos observou-se que um perfil protetor foi observado para camundongos C57BL/10, com aumento na produção de IFN- $\gamma$  por estes animais (MAYRINK *et al.*, 2002). Apesar destes resultados, ainda não está claro se esta citocina é realmente fundamental para imunização ou se este

aumento relatado seria apenas um dos fatores envolvidos. Não foi encontrada correlação entre este aumento e perfil de proteção para camundongos C57BL/10 (CARDOSO *et al.*, 2003). Ademais, é possível vacinar camundongos IL-12/23p40<sup>-/-</sup> em mecanismo que parece ser independente do aumento de IFN- $\gamma$ , uma vez que este aumento é mínimo, e não deve ter qualquer significado biológico (HERNANDEZ *et al.*, 2006). Outro dado intrigante deste modelo de imunização por Leishvacin é a possibilidade de imunizar animais que não apresentem CD8<sup>+</sup> funcionais. Mais do que isso, a depleção destas células em camundongo IL-12/23p40<sup>-/-</sup> realça efeito protetor induzido pela vacina (HERNANDEZ SANABRIA *et al.*, 2007).

Para muitos protocolos de imunização o aumento de IFN- $\gamma$  parece estar relacionado com a proteção observada. Entretanto, para a maioria deles não foram realizados experimentos utilizando animais IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> ou em que houvesse a depleção desta citocina com anti-IFN- $\gamma$ . Desta forma é inviável fazer essa correlação em um modelo de infecção em que o papel desta citocina ainda não é claro. Especialmente em relação à Leishvacin, estudos são necessários para este esclarecimento, uma vez que dados controversos foram encontrados.

### **1.5– IFN- $\gamma$ , citocina crucial para a resistência a infecções por parasitos intracelulares**

As fontes de produção de IFN- $\gamma$  são as células NK (SCHARTON; SCOTT, 1993), células T CD4<sup>+</sup> de perfil T<sub>H</sub>1 (MOSMANN *et al.*, 1986), células T CD8<sup>+</sup> ativadas (SAD; MARCOTTE; MOSMANN, 1995) e macrófagos, quando ativados por IL-12 e IL-18, também produzem esta citocina (MUNDER *et al.*, 1998). Ao ligar em seu receptor, ocorre associação de JAK1 e JAK2 nas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  das subunidades que compõem o receptor. Neste momento ocorre uma dimerização destas cadeias, o que permite a fosforilação recíproca de resíduos de tirosina destas moléculas. Uma vez fosforiladas cria-se domínio de ligação para STAT-1, que uma vez fosforilada dissocia do receptor e transloca para o núcleo, onde se liga a regiões específicas de DNA, induzindo a expressão de genes específicos (DARNELL, Jr.; KERR; STARK, 1994; IGARASHI *et al.*, 1994).

Dentre as várias funções já descritas para esta citocina destacam-se: funções regulatórias: inibe a migração de células T *naïve* e T<sub>H2</sub>, além de linfócitos B em modelo de asma. Este efeito só é observado para pequenas doses de IFN- $\gamma$  (FLAISHON *et al.*, 2002). Além disso, pode induzir a morte de células efectoras (LIU; JANEWAY, Jr., 1990). Tem importante papel na inibição da proliferação de células T<sub>H2</sub>, e pelo contrário, na expansão de células T<sub>H1</sub> (GAJEWSKI; GOLDWASSER; FITCH, 1988). É importante para mudança de isotipo de anticorpo, regulando a mudança para IgG2a (SNAPPER; PAUL, 1987). Aumenta a expressão de moléculas MHC I e II (ROSA; COCHET; FELLOUS, 1986). Estimula macrófagos a produzirem ROS (BAGGIOLINI *et al.*, 1993), assim como estimulam expressão de iNOS (MORRIS, Jr.; BILLIAR, 1994).

Devido às várias funções que desempenha na ativação do sistema imune, esta citocina é fundamental para a resistência a diversas infecções. O requerimento desta para a produção de ROS e NO é crucial para a eliminação de diversos parasitos. O IFN- $\gamma$  é determinante para a resistência contra parasitos como: *Mycobacterium tuberculosis* (FLYNN *et al.*, 1993), *Trypanosoma cruzi* na fase aguda da infecção (TORRICO *et al.*, 1991), *Plasmodium chabaudi* (STEVENSON *et al.*, 1995), *Toxoplasma gondii* (SUZUKI *et al.*, 1988) e *Leishmania major* (WANG *et al.*, 1994).

Na infecção por *L. major* camundongos IFN- $\gamma$  -/- são susceptíveis logo nos tempos iniciais da infecção e apresentam polarização de resposta T<sub>H2</sub> (WANG *et al.*, 1994). Vale ressaltar que camundongos com deficiência para esta citocina se desenvolvem normalmente e de forma saudável na ausência de patógenos (DALTON *et al.*, 1993). Ao contrário do que acontece para animais deficientes para a citocina, camundongos deficientes do receptor da mesma polarizam resposta T<sub>H1</sub>, mas são susceptíveis à infecção, uma vez que a sinalização da citocina não ocorre (SWIHART *et al.*, 1995)

Diante de inúmeros relatos do papel protetor do IFN- $\gamma$  em diversas doenças parasitárias, o relato de que esta citocina induz a proliferação de *L. amazonensis*, e de que neste modelo de infecção camundongos deficientes para esta citocina só apresentam maior suscetibilidade à infecção nos tempos finais da mesma, é no mínimo intrigante. Ainda, os estudos que mostram imunização possível na ausência desta citocina nos instigam a questionar de

que maneira isso ocorre. Um maior entendimento deste mecanismo poderá esclarecer melhor o que ocorre neste modelo de infecção, favorecendo as pesquisas que buscam uma vacina eficaz contra esta doença.

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo geral

- Avaliar o papel do IFN- $\gamma$  na resposta imune ao parasita *Leishmania amazonensis*.

### 2.2 – Objetivos específicos

- Comparar o desenvolvimento de lesão e parasitismo entre camundongos C57BL/6 e deficientes de IFN- $\gamma$ .
- Determinar a cinética e quantificar a produção de citocinas ao longo da infecção por *L. amazonensis* nos camundongos C57BL/6 e IFN- $\gamma$  -/-.
- Determinar atividade de arginase I e expressão da proteína iNOS no sítio de infecção de camundongos C57BL/6 e IFN- $\gamma$  -/-.
- Comparar curso de infecção entre camundongos IFN- $\gamma$  -/- e iNOS -/-; assim como a proliferação do parasito.
- Avaliar papel do IFN- $\gamma$  para geração de imunidade, à *L. amazonensis*, induzida pela vacinação por Leishvacin.



### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 (tipo selvagem) fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os camundongos knockout, nos quais o gene de interesse foi deletado por recombinação homóloga, utilizados foram: knockout para o gene da citocina IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  -/-, **B6.129S7-Ifng<sup>tm1Ts</sup>/J**) e knockout para o gene da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS -/-, **B6.129P2-Nos2<sup>tm1Lau</sup>/J**). Estes animais foram obtidos da Jackson Laboratories (Glensville, NJ, EUA). As colônias de criação dos mesmos foram mantidas em microisoladores dotados de filtro e ventilação no biotério de criação do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, UFMG.

Os animais experimentais passaram por dois ciclos de vermifugação, nos quais foram submetidos a banhos de deltrametrina (TRIATOX<sup>®</sup> Coopers Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e receberam ricobendazol (Ouro Fino, Ribeirão Preto, SP, Brasil) diluído 1:200 por via oral no primeiro e no sétimo dia após a entrada no biotério experimental. Estes animais foram mantidos sob condições de temperatura e fotoperíodo controladas, em espaço com barreiras ambientais. Foi oferecida ração convencional para camundongos (Labina, Purina, Paulínea, SP, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Camundongos fêmeas e machos com idade entre quatro a seis semanas foram utilizados ao início dos experimentos.

Todos os procedimentos realizados com os camundongos estão em acordo com os protocolos éticos. Este projeto foi submetido para avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), sob o protocolo: 063/09.

### 3.2 – Parasitos e Antígeno

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania major* (WHO MHOM/IL/80/Friedlin) foram cultivadas em *Grace's Insect Medium* (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), 100 U de penicilina por mL e 100 µg de estreptomicina por mL (Gibco BLR Life Technologies). As culturas foram mantidas em estufa BOD a 25°C, e repicadas a cada dois ou três dias, até no máximo 10 repiques. Após a décima passagem, os parasitos foram novamente isolados das patas de camundongos BALB/c, previamente infectados. Para o isolamento das culturas, os animais foram anestesiados com 100 µL de solução anestésica contendo cloridrato de ketamina (Vertbrands, Jacareí, SP, Brasil) a 15 mg/mL e cloridrato de xilazina (Vertbrands) a 5 mg/mL, e tiveram suas patas higienizadas com álcool. Em seguida, com o auxílio de uma seringa contendo uma agulha de calibre 26 G $\frac{1}{2}$ , as patas foram puncionadas, e o conteúdo da seringa foi transferido para o primeiro poço de uma placa de 96 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) contendo 200 µL de meio Grace completo. Posteriormente, foram transferidos 50 µL do conteúdo do primeiro poço para o segundo poço e deste para o terceiro, e assim sucessivamente. A placa foi, então, selada e mantida em estufa BOD a 25°C. Após sete dias, formas promastigotas de *Leishmania* foram recuperadas da placa e mantidas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>3</sup> (TPP).

Antígenos do parasito em fase logarítmica foram obtidos de culturas de dois dias. As culturas de *Leishmania* em fase estacionária foram centrifugadas a 2.000 x g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento diluído em aproximadamente 40 mL de salina tamponada com fosfato a 10 mM, pH 7,3 (PBS). Este procedimento foi realizado por duas vezes para que qualquer resquício de meio de cultura Grace fosse removido. Após este procedimento o PBS foi desprezado e o sedimento armazenado a -20°C até o momento do preparo do antígeno. Após coleta de vários sedimentos oriundos de diferentes culturas do parasito os mesmos foram descongelados em banho maria a 37°C e congelados em nitrogênio líquido; foram realizados

sete ciclos de congelamento e descongelamento. Os sedimentos foram juntados e uma amostra de 0,2 mL foi retirada para a realização da dosagem de proteína pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). A partir desta quantificação, foi feito o ajuste de concentração para 1 mg/mL e alíquotas foram armazenadas a - 20°C até o momento do uso.

### 3.3- Imunização e desafio com *L. amazonensis*

Os animais foram imunizados na base da cauda segundo o protocolo descrito por Costa e colaboradores (DA COSTA *et al.*, 1992). Os animais receberam duas doses de 100 µg de Leishvacin (Biommm S. A., Montes Claros, MG, Brasil) associada a 250 µg *Corynebacterium parvum* como adjuvante (Laboratório de Extratos Alergênicos Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em um intervalo de sete dias. Passados 28 dias da segunda dose os animais receberam um reforço de 10 µg de vacina sem adjuvante. O desafio foi realizado no coxim plantar da pata traseira direita sete dias após o reforço utilizando-se um inóculo de  $1 \times 10^5$  formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os grupos controle não vacinados receberam inóculo contendo apenas PBS.

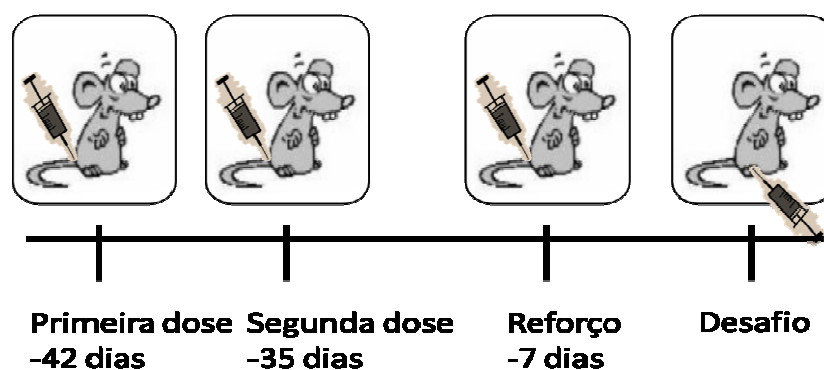


Figura 1. Esquema de imunização

### **3.4 – Infecção por *Leishmania***

Foram utilizadas  $1 \times 10^5$  formas promastigotas do parasito, obtidos com quatro dias de cultura. As culturas de *Leishmania* em fase estacionária foram centrifugadas a  $2.000 \times g$  a  $4^\circ \text{C}$  por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento suspenso em aproximadamente 40 mL de PBS. Após este procedimento o sedimento foi suspenso em 2 mL de PBS. Uma alíquota foi retirada e diluída em formol tamponado e o número de parasitas foi estimado por contagem em câmara de Neubauer. A concentração foi acertada para  $1 \times 10^5$  parasitos em 40  $\mu\text{L}$  de PBS. As patas traseiras direita dos camundongos foram infectadas subcutaneamente. A lesão induzida na pata desses camundongos foi acompanhada semanalmente, com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo Co., Kawasaki, Kanagawa, Japão).

### **3.5 – Quantificação de parasitos**

A quantificação de parasitos foi realizada pela técnica de diluição limitante, em que diluições sucessivas foram feitas a partir dos homogenatos das patas infectadas dos camundongos experimentais. Primeiramente as patas, inteiras, foram maceradas em um homogeneizador de tecidos estéril. O homogenato foi centrifugado a  $140 \times g$  por 4 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Esse sobrenadante foi centrifugado a  $2000 \times g$  por 15 minutos. O sedimento foi suspenso em 500  $\mu\text{L}$  de meio Grace completo. Em uma placa estéril de poliestireno com 96 poços e fundo chato (TPP), foram colocados 150  $\mu\text{L}$ /poço de meio de Grace completo, exceto na primeira coluna de poços, onde foi colocada 200  $\mu\text{L}$  da suspensão do órgão macerado. Em seguida, foram feitas diluições sucessivas 1:4, tomando-se o cuidado de trocar o conjunto de ponteiros da pipeta multicanal a cada diluição para evitar o arraste de parasitas e um conseqüente resultado falso-positivo. As placas foram mantidas a  $25^\circ\text{C}$  em estufa BOD e a leitura dos resultados foi feita de 7-14 dias após o início da cultura. Para os experimentos com 16 semanas de infecção as diluições sucessivas foram feitas de 1:10.

### 3.6 – Análise de imunohistoquímica

Antes do início do ensaio as lâminas ficaram por uma hora na estufa a 57°C para que o excesso de parafina fosse removido. No primeiro dia do ensaio as lâminas foram passadas em Xilol I, II e III (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), 20 minutos em cada, para garantir remoção completa da parafina. Em seguida passaram por um processo de desidratação: álcool absoluto (I, II e III) e álcool 90%, 80% e 70%. As lâminas ficaram por cinco minutos em cada solução. Em seguida foram lavadas por três vezes em PBS para a retirada do álcool; cada lavagem foi feita em imersão por cinco minutos. Em seguida foram realizados os três bloqueios da reação. O primeiro deles realizado em imersão, com solução de PBS 10% de peroxidase, por 30 minutos. Em seguida foram realizadas três lavagens de cinco minutos cada em PBS. O segundo bloqueio foi feito com solução de soro albumina 2% (Sigma-Aldrich), por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas, uma vez, em PBS por cinco minutos. Por fim, foi realizado o bloqueio com solução de PBS a 0,2% de soro albumina, 5% de soro normal de cabra, por 30 minutos. Após este bloqueio as lâminas não foram lavadas, apenas enxugamos o excesso de solução ao redor dos cortes. Em seguida pingamos o anticorpo anti-iNOS (Chemicon International, Temicula, CA) 1:500. Devido ao tamanho dos nossos cortes usamos por volta de 70 µL do anticorpo. As lâminas foram deixadas em câmara úmida escura por 12 horas a 4°C. No dia seguinte lavamos as lâminas por três vezes em PBS, cinco minutos cada lavagem, para a retirada do anticorpo não ligado. Em seguida pingamos sobre o corte os reagentes do kit DAKO (DAKO North America, Inc, Carpinteria, CA, EUA). Primeiro foi acrescentada a estreptoavidina-HRP, que permaneceu sobre o corte por 30 minutos, seguida de lavagem com PBS por três vezes, e por fim o anticorpo biotilado, incubado por 30 minutos em câmara escura e úmida. Em seguida as lâminas passaram por outro processo de lavagem. Por fim, fizemos a revelação com PBS contendo 50 mg de DAB e 0,25% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após cinco minutos mergulhamos rapidamente as lâminas em solução de hematoxilina e lavamos em água corrente. Por fim, nova lavagem em PBS foi realizada para remoção de excesso de corante. Em seguida as lâminas foram desidratadas na seqüência de álcool: 70, 80, 90%; e três banhos em álcool absoluto; por cinco minutos nos

primeiros e 10 minutos em cada absoluto. Em seguida foram passadas em três banhos de xilol, por 10 minutos em cada. Por fim montamos as lâminas com entelan (Merck) e após 30 minutos levamos ao microscópio.

### **3.7 – Análise morfométrica**

A quantificação da área de expressão de iNOS foi feita a partir de pelo menos 30 imagens obtidas de pelo menos seis animais por grupo, para cada tempo analisado. As imagens foram obtidas com magnitude de 40X através do microscópio Optical Olympus Research (Center Valley, PA, EUA) acoplado a um sistema de captura de imagem digital (MegaCybernetics, Center Valley, PA, EUA). As imagens foram analisadas com o software KS300 (Kontron Elektronik/Carl Zeiss, NY, EUA). Os resultados foram expressos como a razão entre área de expressão positiva em relação à área total dos campos capturados.

### **3.8 – Dosagem da atividade da enzima arginase**

A atividade de arginase I foi mensurada a partir do lisado de células do homogenato das patas, como descrito por Corraliza (CORRALIZA *et al.*, 1994), com algumas modificações (KROPF *et al.*, 2005). As patas, infectadas ou não, foram maceradas, como descrito anteriormente, e do homogenato obtido, 35 µL foram utilizados para o ensaio. As células que se encontravam no homogenato foram lisadas com 50 µL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) por 30 minutos em agitação. Após a lise, a arginase I foi ativada com a adição de seus co-fatores: 50 µL de 10 mM MnCl<sub>2</sub> e 50 µL de 50 mM Tris HCl (pH 7,5) a 55°C por 10 minutos. Em seguida a amostra obtida foi transferida para outra placa de 48 poços em duas diferentes concentrações. Em um dos poços foi feita a transferência da amostra pura, 55 µL, e a partir desta foi feita uma diluição de 1:10 (5 µL de amostra + 45 µL de H<sub>2</sub>O destilada). Para que fosse mensurada a atividade da enzima foi adicionado às amostras o substrato da mesma, 50 µL de 0,5 mM de L-arginina (Sigma Aldrich) (pH 9,7), após o que, as mesmas foram incubadas a 37°C por 60 minutos. Em seguida a reação foi parada com a

adição de 400 µL de uma mistura de ácidos (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O) na proporção de: 1:3:7. Foram então adicionados 25 µL de α-isonitrosopropiofenol (Sigma Aldrich) 9% em etanol 100%. A placa foi então incubada a 95°C por 45 minutos. A curva padrão foi feita a partir de uréia (Sigma Aldrich) 1 mg/mL diluído sucessivamente 1:2. Após os 45 minutos de incubação a 95°C, 100 µL de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços e foi realizada leitura em leitor de microplacas a 540 nm. O resultado é expresso como unidade de atividade de arginase I por pata. Cada unidade é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol uréia/minuto.

### **3.9 – Cultura de células do baço e linfonodo**

As células do baço e linfonodos de animais infectados foram extraídas a partir da maceração desses órgãos. As células obtidas foram lavadas e suspensas a uma concentração de 5x10<sup>6</sup> células/mL de RPMI 1640 (Gibco), contendo 10% de soro bovino fetal (Nutricell, Campinas, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich), 0,1% de solução de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) a 0,05 M, 100 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Gibco). Em seguida as células foram plaqueadas em 1mL de meio RPMI por poço em placas de 24 poços (Costar, New York, NY, EUA). As células foram estimuladas com 50 µg/mL de antígeno de *L. amazonensis* (Ag). As células do baço passaram por um processo de lise celular, que possibilitou a lise de hemácias (0,16M de NH<sub>4</sub>Cl; 0,001M de KHCO<sub>3</sub>, 0,001mM de EDTA de sódio). O sobrenadante da cultura foi coletado após 24h para dosagem de TNF-α (sendo armazenado a - 70°C) ou 72h para a detecção de IFN-γ, IL-4, IL-10 e TGF-β (armazenado a -20°C).

### 3.10 – Detecção de citocinas por ELISA

As dosagens de TNF- $\alpha$  e IL-10 a partir do sobrenadante de cultura das células do baço e linfonodo foram feitas com a utilização de kits (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) exclusivos para a detecção dessas citocinas e o procedimento foi feito exatamente como recomenda o fabricante. O limite de detecção foi de 32 pg/mL para ambas as citocinas.

Para a detecção do IFN- $\gamma$ , as placas de ELISA (Nalgene NUNC, Rochester, NY, EUA) foram sensibilizadas com 100  $\mu$ L a 2  $\mu$ g/mL do anticorpo de captura anti- IFN- $\gamma$  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 foram transferidas para estufa seca a 37°C por uma hora. Em seguida foi feito o bloqueio da placa com PBS 5% de soro fetal bovino (Nutricell) por 1h. Passado esse tempo, as placas foram lavadas cinco vezes com uma solução de Tween a 0,05% em PBS e as amostras foram distribuídas na placa com as seguintes diluições: 1:5, 1:25; 1:125; 1:625. O padrão foi colocado a uma concentração de 1 ng/mL em duplicata e diluído (1:2) nos poços subsequentes para montagem da curva. Então, as placas foram incubadas por 2h a 25°C. As placas foram lavadas novamente por cinco vezes e adicionaram-se anticorpos policlonais anti-IFN- $\gamma$  feito em coelho, (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso). Incubou-se por 1h a 25°C. Depois de lavadas cinco vezes com Tween 0,05% em PBS, foi 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, adicionou-se a solução substrato de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benz-tiazolino sulfônico) (Sigma Aldrich Co.) 0,05% em tampão citrato-fosfato (0,1M, pH=4,0) acrescido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,005%. Após acompanhar o aparecimento de cor, a reação foi parada com a utilização de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich Co.) a 1%. As placas foram lidas em um comprimento de onda de 405 nm com um leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). O limite de detecção foi de 0,03 ng/mL.

Para a dosagem de IL-4 foram 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 limite de detecção foi de 0,02 ng/mL. O procedimento da ELISA foi o mesmo descrito para a dosagem de IFN- $\gamma$ ; a única diferença é que neste caso as amostras não foram diluídas.

A detecção de TGF- $\beta$  foi feita a partir de kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as especificações do fabricante. O limite de detecção foi de 30 pg/mL.

### **3.11 – Detecção de mRNA por transcriptase reversa e PCR em tempo real (RT-PCR Real Time) das lesões causadas por *L. amazonensis***

#### **3.11.1 – Extração de RNA**

O RNA total foi isolado das patas dos camundongos experimentais após a infecção com *L. amazonensis*. As mesmas foram coletadas e foi adicionado 1 mL de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 100 mg de tecido. Os tecidos foram triturados completamente até formar um homogenato, o qual foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Posteriormente, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Hessen, ALE) para cada mL de TRIZOL utilizado. As amostras foram homogeneizadas, incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos e, então, centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a mistura foi separada em uma fase inferior cor de rosa composta por fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior. O RNA permaneceu na fase aquosa, a qual foi transferida para um microtubo novo. Para precipitar o RNA da fase aquosa, foram adicionados 500  $\mu$ L de isopropanol (Merck) para cada mL de TRIZOL utilizado, e a mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 x g por

10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi lavado em 1 mL de etanol (Merck) 75% em água tratada com DEPC (USB Corp., Cleveland, OH, EUA) e centrifugado a 7.500 x *g* por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e permitiu-se que o precipitado secasse por 5 a 10 minutos. O RNA precipitado foi diluído em 50 µL de água de alta qualidade livre de RNase tratada com DEPC, e armazenado a -70°C. A quantificação de RNA foi realizada utilizando o espectrômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. Foram consideradas apropriadas as amostras que apresentaram uma relação ácido nucléico/proteína (OD260/OD280) com valores entre 1,6 e 2,0.

### **3.11.2 – Síntese de cDNA**

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA extraído como indicado acima. Foi utilizado um volume final de reação de 25 µL, contendo 2 µg de RNA, 250 nM dNTPs (Promega Corp., Madison, WI, EUA), 10 mM TRIS-HCL (pH8,3), 15 mM KCL, 6 nM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT (Gibco BRL Life Technologies), RNAsin inibidor de RNase (Promega Corp.) e 0,75 pmoles de oligo (dT) 15 primer (Promega Corp.). A mistura foi levada a um termociclador, onde as amostras foram incubadas inicialmente por 5 minutos a 70°C e 5 minutos a 4°C. Após tal incubação, foram adicionadas, a cada amostra, 50U da enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega Corp.). Em seguida a mistura foi incubada por 5 minutos a 23°C, 60 minutos a 37 °C, 5 minutos a 90°C, e finalmente a 4°C até que as amostras serem recolhidas do termociclador. O cDNA, produto da reação, foi armazenado a -20°C até sua amplificação.

### 3.11.3 – Amplificação específica por Real time PCR

A amplificação da expressão de mRNA específica foi realizada através de PCR em tempo real (RT-PCR) usando iniciadores com sequências específicas para IFN- $\gamma$  (Forward TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA; Reverse TGGCTCTGCAGGATTTTCATG) e arginase I (Forward CTGGCAGTTGGAAGCATCTCT; Reverse: CTGGCAGTTGGAAGCATCTCT). As reações foram desenvolvidas sob um sistema de detecção de sequência ABI PRISM®7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando 20% da reação de cDNA em volume total de 15  $\mu$ L de mistura de PCR. Todas as reações foram desenvolvidas em duplicatas usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante. A quantificação relativa do produto foi determinada pelo método de limiar de ciclos para determinar o incremento em vezes do produto. O programa de PCR para amplificação de cDNA foi desenvolvido sob as seguintes condições: 2 minutos a 50°C, ativação da AmpliTaq a 95°C durante 10 minutos, desnaturação a 95°C por 15 segundos. Para o anelamento e extensão final, as amostras foram submetidas a 60°C por 1 minuto durante 45 ciclos. Para a geração da curva de dissociação, as amostras foram aquecidas a 95°C por 15 segundos, em seguida a 60°C por 5 segundos. Finalmente, as amostras foram esfriadas por 1 minuto a 4°C. O gene de interesse foi normalizado em relação à expressão da enzima expressa constitutivamente hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT forward, GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTT ;HPRT reverse, GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC), baseado no cálculo do  $\Delta\Delta$ CT. A mudança na expressão foi representada como relativa aos animais não infectados.

### 3.12 – Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão (EP) para cada grupo. Nos ensaios de cinética de produção de citocinas foi realizado o teste Two-Way ANOVA, seguido de Bonferroni para determinar diferenças

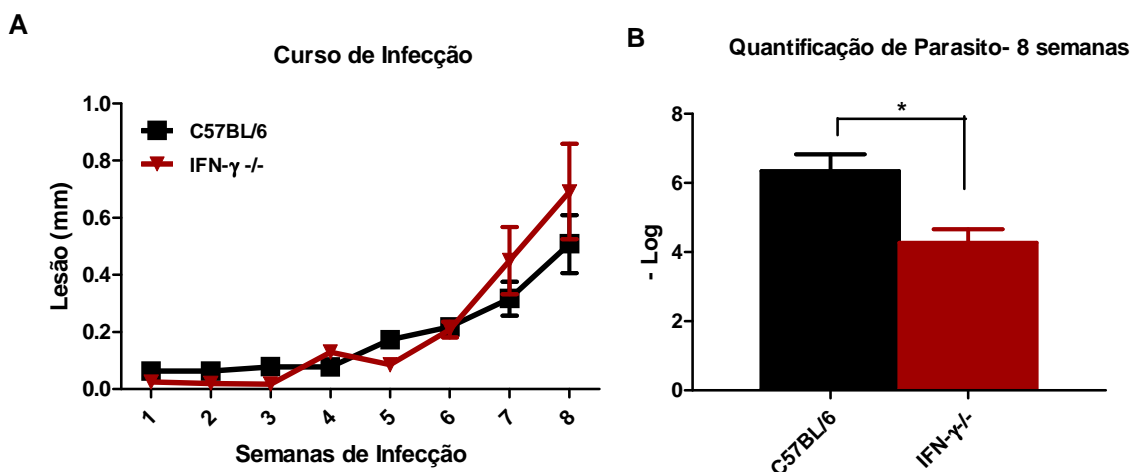
entre os tempos e os grupos avaliados. Para determinar diferenças entre dois grupos, foi utilizado o teste  $t$  de Student usando distribuição bi-caudal com amostras não pareadas, após a aplicação do teste de normalidade e verificação da simetria dos dados. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Para análise estatística de correlação foi realizado o teste de Spederman.

## 4– RESULTADOS

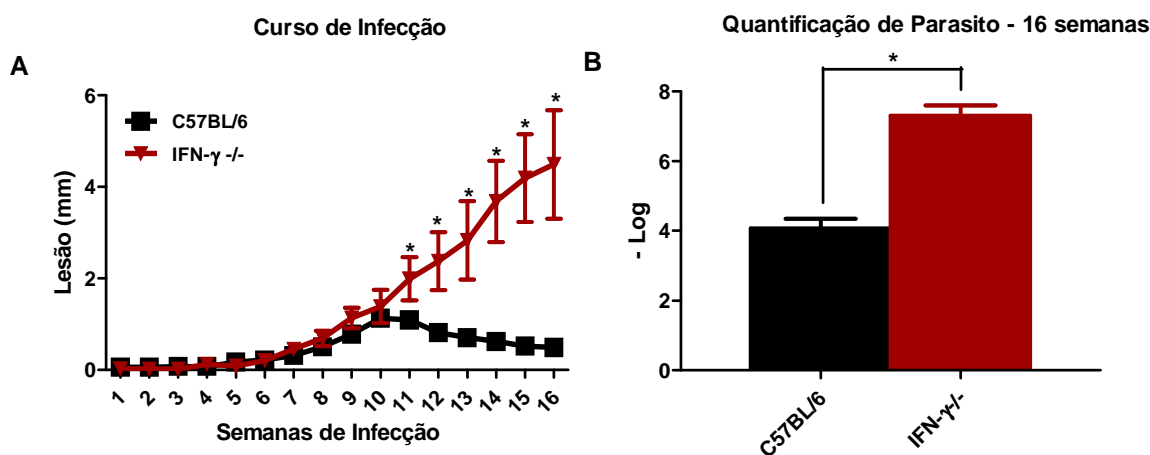
### 4.1– IFN- $\gamma$ apresenta maior relevância no controle do desenvolvimento da lesão e carga parasitária no final do curso de infecção

Visando maior entendimento do papel do IFN- $\gamma$  em infecções *in vivo* pelo parasito *L. amazonensis*, cepa PH8, camundongos IFN- $\gamma$  -/- foram infectados via subcutânea com  $1 \times 10^5$  promastigotas do parasito na pata traseira direita. Como já demonstrado para infecção por outras cepas de *L. amazonensis*, LTB0016 e Josefa (COLMENARES *et al.*, 2003; PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007), estes camundongos apresentaram um desenvolvimento de lesão similar ao encontrado em camundongos C57BL/6. Como mostrado no Gráfico 1A, até a oitava semana de infecção não se observou qualquer diferença na espessura das patas infectadas entre os grupos. Ainda mais surpreendente, camundongos C57BL/6 apresentaram maior carga parasitária neste tempo de infecção (Gráfico 1B). Diante deste quadro, resolvemos estender o período de análise para 16 semanas de infecção. Dessa forma, observamos que, até 10 semanas de infecção não há diferença de lesão quando comparamos os camundongos selvagens com os deficientes para IFN- $\gamma$ . Somente a partir da 11ª semana estes camundongos desenvolveram maior lesão (Gráfico 2A). A partir deste ponto da infecção não demonstraram mais qualquer controle no desenvolvimento da mesma, que progrediu até a 16ª semana. Em contrapartida, camundongos C57BL/6, a partir da 11ª semana de infecção, apresentaram uma regressão no desenvolvimento da lesão, que pode ser analisada como um controle parcial da mesma, processo que está ausente nos camundongos IFN- $\gamma$  -/-. Neste momento do curso de infecção os camundongos IFN- $\gamma$  -/-, além de apresentarem maior lesão, também apresentaram maior carga parasitária no sítio de infecção. Esses resultados diferem do já descrito para infecções por *L. major* em camundongos IFN- $\gamma$  -/-. Neste modelo, camundongos deficientes para esta citocina demonstram suscetibilidade desde o início da infecção (WANG *et al.*, 1994). Quando comparamos o desenvolvimento da lesão nestes camundongos, infectados com a mesma dose de parasito, para *L. major* e *L. amazonensis*, conseguimos

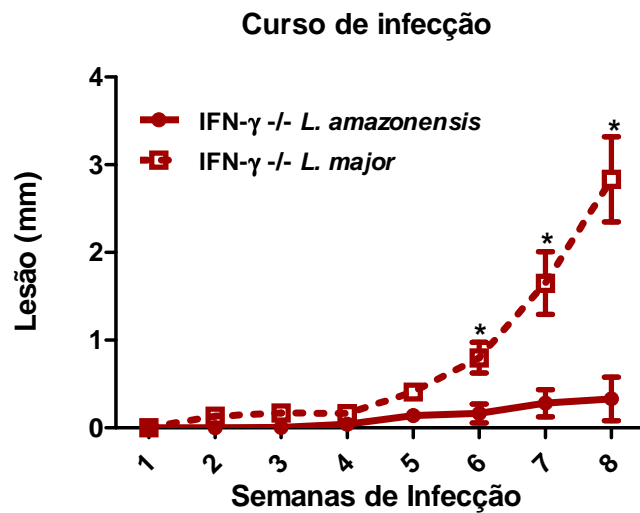
visualizar quão diferente este desenvolvimento é. No Gráfico 3 podemos observar que quando infectados com *L. major* a lesão se inicia mais cedo e se desenvolve de forma descontrolada até o final do período estudado. Já para os camundongos infectados com *L. amazonensis* a lesão se apresentou sob parcial controle até a 8ª semana. Assim, podemos concluir que o curso de infecção descrito no Gráfico 1A é característico para camundongos IFN- $\gamma$  -/- infectados com *L. amazonensis*.



**Gráfico 1. (A) Curso de Infecção:** Camundongos C57BL/6 e IFN- $\gamma$  -/- foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas, na fase estacionária, de *L. amazonensis* na pata traseira direita. O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente até o tempo de oito semanas após a infecção. O eixo Y expressa a média das diferenças de espessura entre as patas infectadas e as não infectadas  $\pm$  erro padrão de cinco camundongos por grupo. **(B) Quantificação de parasitos:** Quantificação de parasitos por diluição limitante do macerado da pata infectada dos camundongos. Análise estatística feita por teste *t* de Student onde \* =  $P < 0,05$ . Os resultados são representativos de três experimentos desenvolvidos independentemente.



**Gráfico 2. (A) Curso de Infecção:** Camundongos C57BL/6 e IFN- $\gamma$  -/- foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas, na fase estacionária, de *L. amazonensis* na pata traseira direita. O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente até o tempo de 16 semanas após a infecção. O eixo Y expressa a média das diferenças de espessura entre as patas infectadas e as não infectadas  $\pm$  erro padrão de cinco camundongos por grupo. **(B) Quantificação de parasitos:** Quantificação de parasitos por diluição limitante do macerado da pata infectada dos camundongos. Análise estatística feita por teste *t* de Student onde \* =  $P < 0,05$ . Os resultados são representativos de três experimentos desenvolvidos independentemente.



**Gráfico 3. Curso de Infecção:** Camundongos IFN- $\gamma$  -/- foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas, na fase estacionária, de *L. amazonensis* ou *L. major* na pata traseira direita. O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente até o tempo de oito semanas após a infecção. O eixo Y expressa a média das diferenças de espessura entre as patas infectadas e as não infectadas  $\pm$  erro padrão de seis camundongos por grupo. Análise estatística feita por teste *t* de Student onde \* =  $P < 0,05$ . O resultado é representativo de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

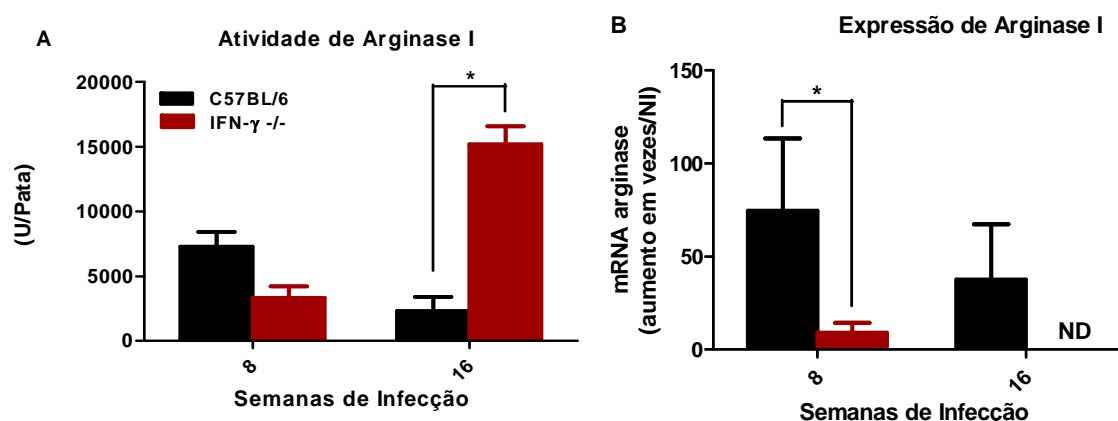
#### 4.2– Atividade da enzima arginase I parece estar relacionada com a carga parasitária na infecção por *L. amazonensis*

No modelo de infecção com *L. major* já foi demonstrado que um dos marcadores de suscetibilidade à infecção é a expressão e atividade da enzima arginase I (INIESTA *et al.*, 2002). Apesar de ser um fator relevante durante a ativação de macrófagos, principais células efetoras no nosso modelo de infecção, não há na literatura qualquer dado que suporte essa informação na infecção por *L. amazonensis*. Assim, dosamos a atividade da enzima na pata dos camundongos infectados nos tempos de oito e 16 semanas após a infecção. Após oito semanas de infecção, embora não tenha sido encontrada diferença na atividade da mesma entre os camundongos IFN- $\gamma$  -/- e os selvagens, observou-se maior tendência de atividade de arginase I nos camundongos C57BL/6 (Gráfico 4A). O inverso foi observado após 16 semanas de infecção, maior atividade da enzima nos camundongos IFN- $\gamma$  -/-, assim como maior carga parasitária (Gráficos 4A e 2B). Também foi feita análise da expressão desta enzima nas patas infectadas. Camundongos C57BL/6 expressaram, após oito semanas de infecção, mais arginase I, o que corresponde com a maior tendência na atividade da mesma e também da maior carga parasitária observada (Gráfico 1B). Para o tempo de 16 semanas

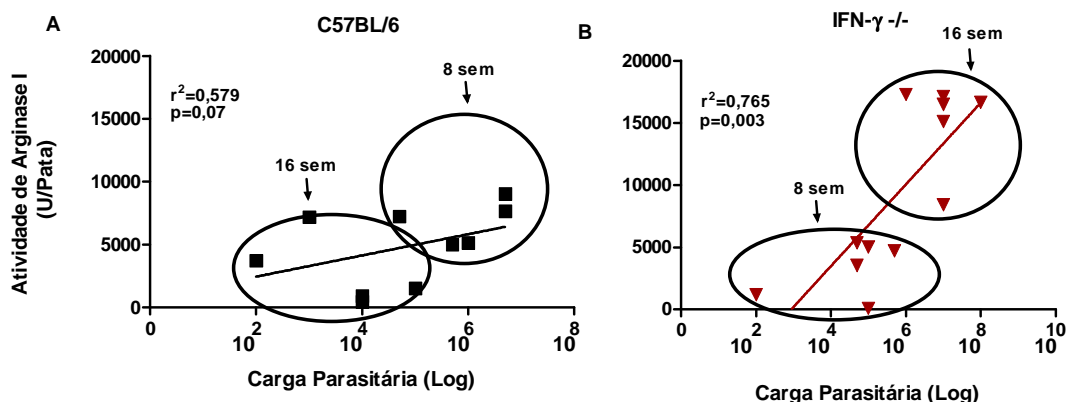


não foi possível quantificar a expressão desta enzima nos camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$ . As patas dos mesmos se encontravam por demais inflamadas, não conseguimos, portanto, obter uma amostra de RNA pura o suficiente para que pudéssemos ter confiança nos resultados após amplificação do cDNA por reação de PCR.

No Gráfico 5 podemos observar que existe uma correlação entre atividade de arginase I e a carga parasitária na pata dos camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  (Gráfico 5B). É possível ver clara associação entre aumento da atividade da enzima com o aumento da carga parasitária. Para os camundongos C57BL/6 podemos ver uma tendência deste aumento correlacionado, mas não encontramos diferença estatística.



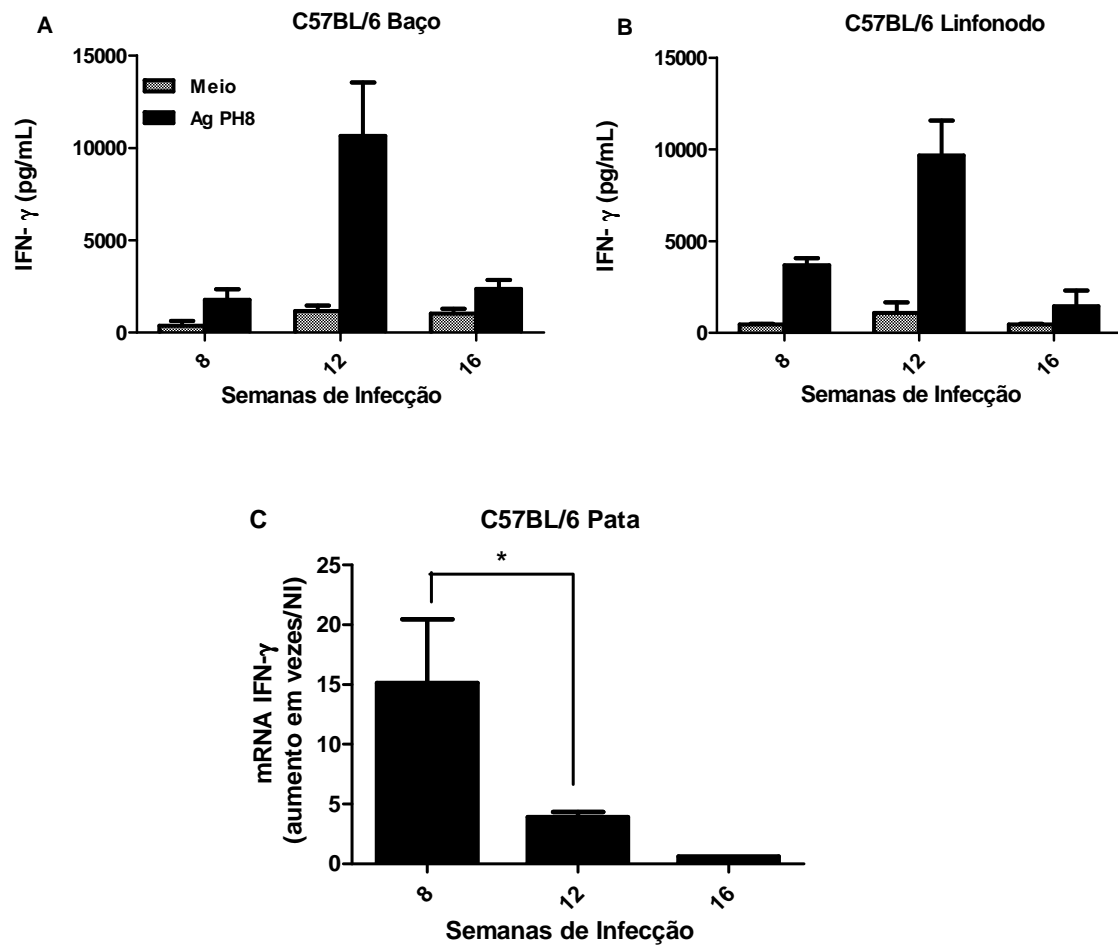
**Gráfico 4. (A) Atividade da enzima arginase I:** Determinação da atividade de arginase a partir do lisado de células das patas infectadas para os tempos indicados de infecção. **(B) Expressão da enzima Arginase I:** Após oito e 16 semanas de infecção, as patas foram coletadas e o RNA total das mesmas foi isolado, transcrito e o gene da arginase I amplificado por PCR em tempo real. O gene alvo foi normalizado com um controle endógeno e os valores são mostrados como o incremento em vezes relativo à expressão das patas dos camundongos não infectados. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EP para cada grupo. \* indica diferença significativa estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste  $t$  de Student). Em (A) o resultado é representativo de dois experimentos desenvolvidos independentemente com cinco camundongos por grupo. Em (B) são dados representativos de dois experimentos com quatro camundongos por grupo.



**Gráfico 5. Correlação entre carga parasitária e atividade de arginase I:** Em **(A)** correlação entre carga parasitária e atividade de arginase I nas patas infectadas de camundongos C57BL/6. Em **(B)**, a mesma correlação feita agora para camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$ . Dados apresentados representam média de pelo menos dois experimentos realizados de forma independente para cada tempo indicado. O teste estatístico para correlação utilizado foi de Spearman. Diferença estatística foi considerada com  $p < 0,05$ .

#### 4.3– Cinética de produção de IFN- $\gamma$ nos camundongos C57BL/6

O entendimento do papel do IFN- $\gamma$  na infecção *in vivo* por *L. amazonensis* passa pela necessidade da determinação da cinética de produção desta citocina nos camundongos C57BL/6. Assim, após 8, 12 e 16 semanas de infecção, os baços e linfonodos poplíteos foram coletados e as células estimuladas com antígeno particulado de PH8. Estes camundongos apresentaram um pico de produção desta citocina após 12 semanas de infecção tanto para as células do baço quanto para as células dos linfonodos (Gráfico 6A e 6B). Os níveis de produção da mesma se apresentaram similares para os tempos de oito e 16 semanas. Em relação à expressão desta citocina no sítio de infecção observamos maior expressão do mRNA após oito semanas de infecção. Após este tempo observamos uma queda progressiva na expressão do IFN- $\gamma$  (Gráfico 6C). Não foi possível realizar estatística com a expressão do mRNA para o tempo de 16 semanas porque para este tempo só foi realizado um experimento.



**Gráfico 6: (A) e (B) Cinética de produção de IFN- $\gamma$  no baço e linfonodo poplíteo de camundongos C57BL/6.** Camundongos C57BL/6 (cinco por grupo) foram infectados subcutaneamente na pata com  $1 \times 10^5$  formas promastigotas de *L. amazonensis* e nos tempos indicados os baços e linfonodos poplíteos foram coletadas e os níveis de IFN- $\gamma$  foram determinados por ELISA. As células foram estimuladas com antígeno particulado de PH8. **(C) Cinética da expressão do mRNA de IFN- $\gamma$  no sítio de infecção.** As patas infectadas foram coletadas nos tempos indicados e o RNA total das mesmas foi isolado, transcrito e o gene do IFN- $\gamma$  amplificado por PCR em tempo real. O gene alvo foi normalizado com um controle endógeno e os valores são mostrados como o incremento em vezes relativo à expressão das patas dos camundongos não infectados. Análise estatística feita por teste *t* de Student onde \* =  $P < 0,05$ . Os resultados são representativos de três (A) e (B) ou dois experimentos (C) desenvolvidos independentemente.

#### 4.4– Cinética de produção de citocinas não mostra polarização de resposta T<sub>H</sub>2 em camundongos IFN- $\gamma$ -/-

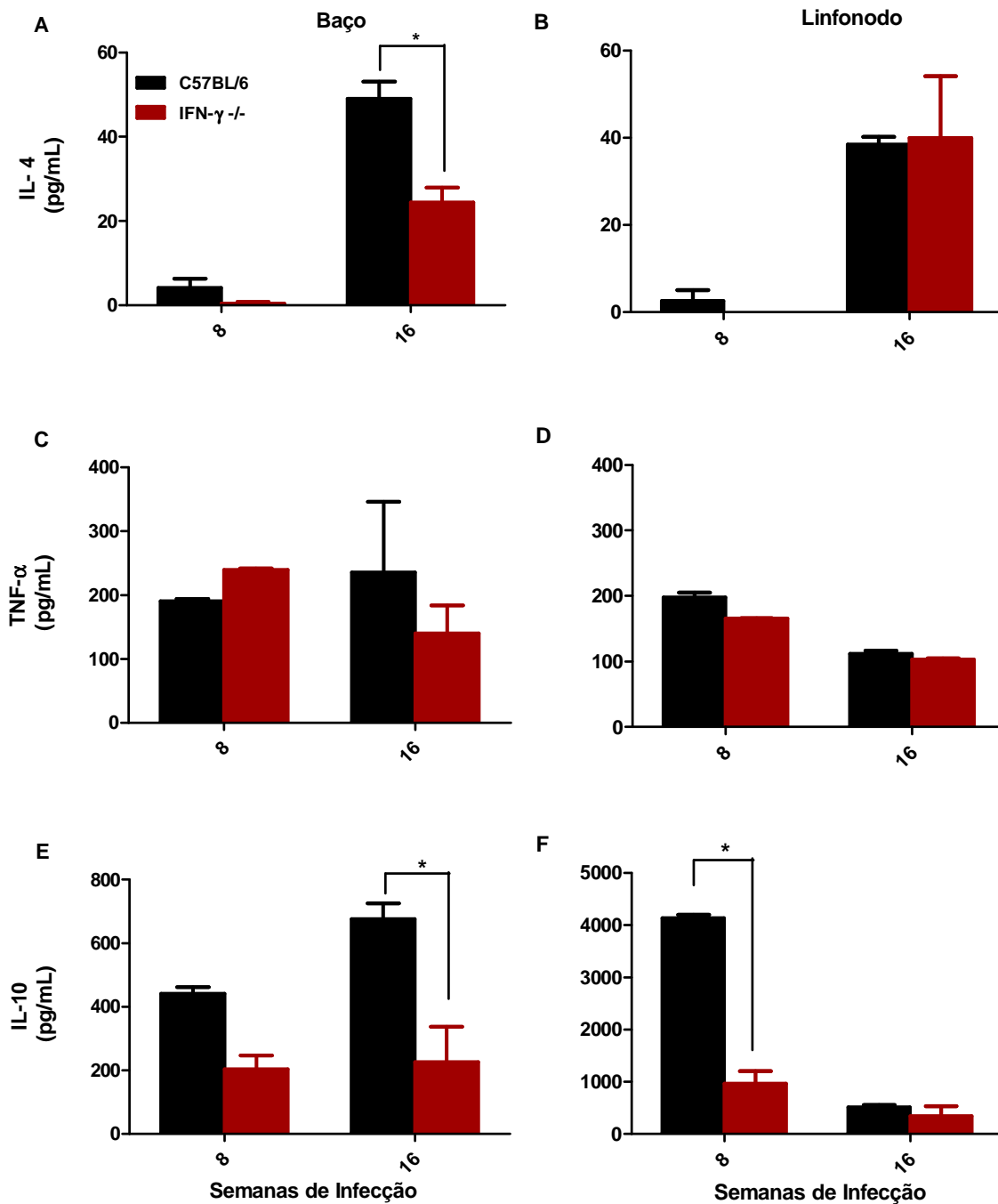
Camundongos IFN- $\gamma$  -/- infectados por *L. amazonensis* não apresentam polarização de resposta T<sub>H</sub>2. Assim, ao contrário do já relatado na literatura para infecção com *L. major* (WANG *et al.*, 1994), estes camundongos não exacerbam a produção de IL-4. Para os tempos analisados observamos aumento na produção desta citocina, tanto local quanto sistemicamente, porém os níveis são extremamente baixos, não podemos discutir se há alguma relevância biológica (Gráfico 7A e 7B). Já os camundongos C57BL/6, como esperado, também não produziram altos níveis desta citocina. Assim como os camundongos deficientes de IFN- $\gamma$ , estes apresentaram aumento na produção de IL-4 no tempo final do curso de infecção. Este mesmo perfil foi observado para as células do baço e linfonodo. Surpreendentemente, após oito semanas de infecção, os camundongos selvagens produziram mais IL-4 no baço que os camundongos IFN- $\gamma$  -/-, porém, como dito anteriormente, os níveis de produção são tão pequenos que é provável que essa diferença não apresente efeito biológico.

Quando analisamos a produção de TNF- $\alpha$ , não encontramos diferença na cinética de produção desta citocina para nenhum dos grupos de camundongos. Estes dados foram encontrados tanto para as células do baço quanto para as células do linfonodo. Não foram encontradas diferenças para a produção de TNF- $\alpha$  quando comparamos os grupos (Gráfico 7C e 7D).

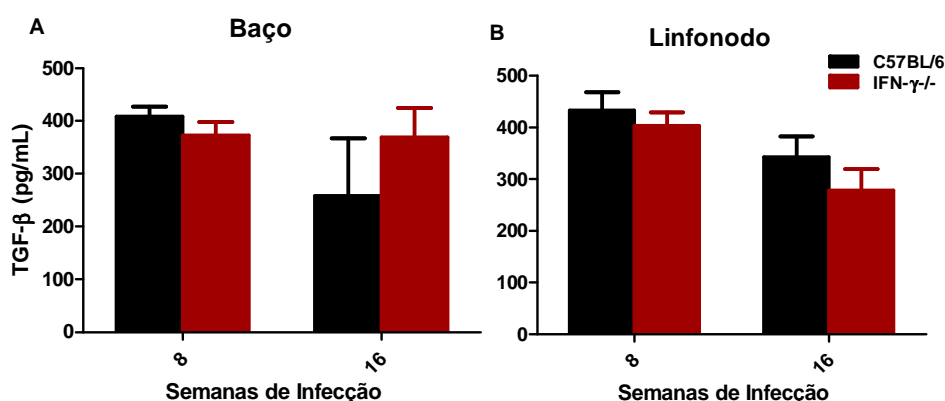
Duas citocinas de perfil regulatório, sem estarem associadas a perfil T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2, mas importantes para patogenicidade na infecção por *Leishmania*, IL-10 e TGF- $\beta$  também foram analisadas (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; PADIGEL; ALEXANDER; FARRELL, 2003). Em relação à produção de IL-10, os camundongos IFN- $\gamma$  -/- produziram quantidades semelhantes desta nos tempos analisados. Não foi encontrada variação para a produção da mesma durante a infecção (Gráfico 7E e 7F). Já para os camundongos C57BL/6 foi observada variação na cinética de produção desta citocina. Para as células do baço foi observada maior produção de IL-10 no final do curso de infecção. O contrário foi encontrado nos linfonodos, onde se observou menor produção da

mesma após 16 semanas de infecção. Quando comparamos os dois grupos experimentais observamos que após oito semanas de infecção os camundongos IFN- $\gamma$  -/- produziram cerca de quatro vezes menos desta citocina nos linfonodos. Após 16 semanas de infecção, devido à queda na produção de IL-10 pelos camundongos selvagens essa diferença deixou de existir. Em relação à produção desta citocina no baço o inverso foi observado, assim, não foi encontrada diferença na produção desta após oito semanas de infecção. No final do curso de infecção, entretanto, foi observada maior produção de IL-10 no baço dos camundongos C57BL/6.

Quando analisamos a produção de TGF- $\beta$  não encontramos diferença na produção desta citocina entre as linhagens, para qualquer órgão analisado. Também não podemos constatar grande variação na produção da mesma ao longo da infecção (Gráfico 8A e 8B).



**Gráfico 7. Cinética de produção de IL-4 (A) e (B); TNF-α (C) e (D) e IL-10 (E) e (F) no baço e linfonodo poplíteo de camundongos C57BL/6 e IFN-γ -/-. Camundongos (cinco por grupo) foram infectados subcutaneamente na pata com  $1 \times 10^5$  formas promastigotas de *L. amazonensis* e nos tempos indicados os baços e linfonodos poplíteos foram coletadas e os níveis das citocinas mencionadas foram determinados por ELISA. As células foram estimuladas com antígeno homólogo. \* indica diferença significativa estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).**



**Gráfico 8. Cinética de produção de TGF-β no baço (A) e linfonodo poplíteo (B) de camundongos C57BL/6 e IFN-γ<sup>-/-</sup>.** Camundongos (cinco por grupo) foram infectados subcutaneamente na pata com  $1 \times 10^5$  formas promastigotas de *L. amazonensis* e nos tempos indicados os baços e linfonodos poplíteos foram coletados e após estímulo com antígeno homólogo o nível da citocina foi determinado por ELISA. \* indica diferença significativa estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).

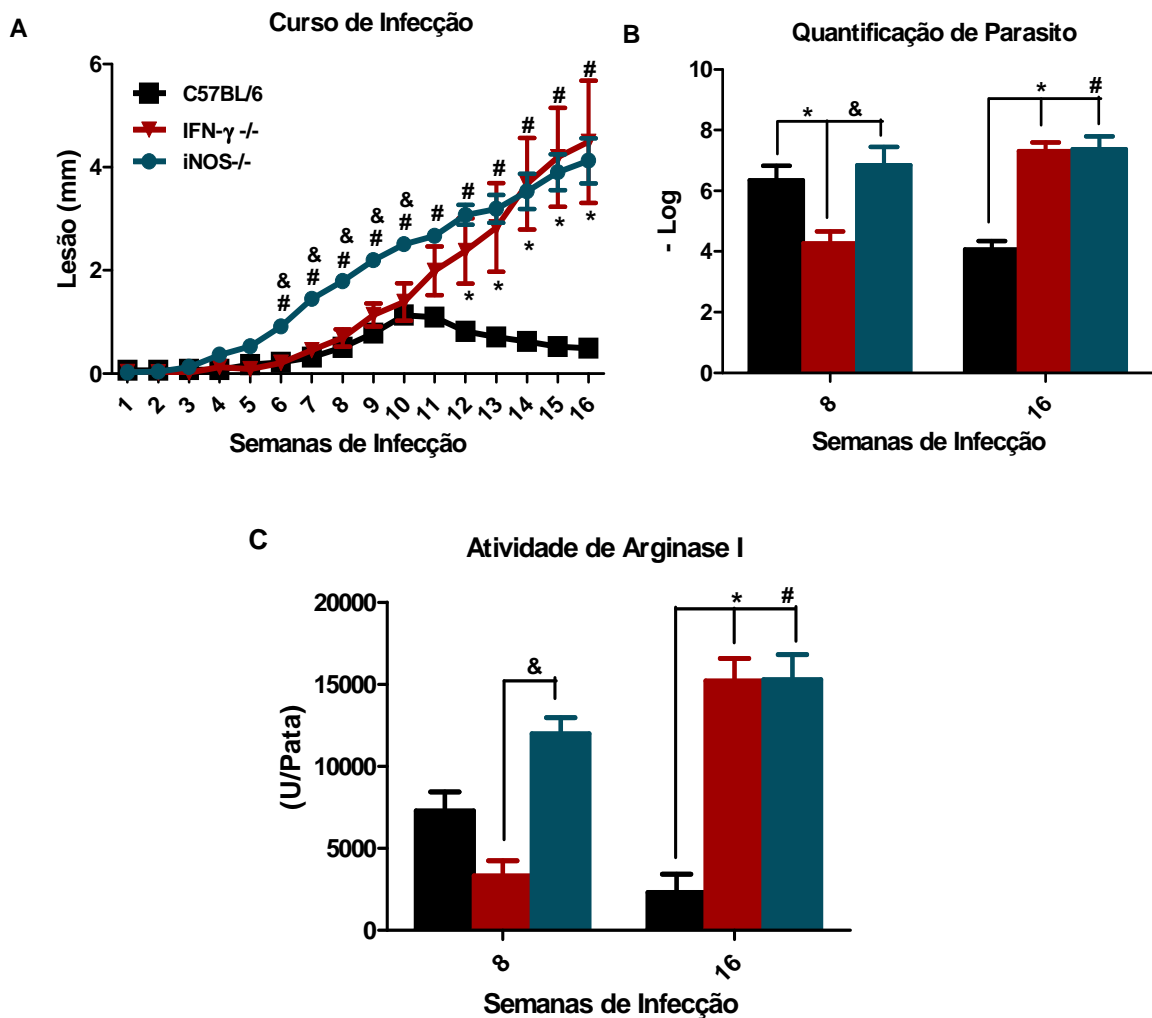
#### 4.5– Camundongos iNOS<sup>-/-</sup> apresentam curso de infecção diferente dos camundongos IFN-γ<sup>-/-</sup> nos tempos iniciais

O principal papel do IFN-γ na infecção por parasitos intracelulares é a participação na ativação de macrófagos. Assim, esta citocina é fundamental para a indução da expressão da enzima iNOS, evento crucial para a produção de NO; principal molécula leishmanicida (GREEN *et al.*, 1990b). Em função desta relação entre a ativação de macrófagos por IFN-γ e a expressão da enzima iNOS nos perguntamos se camundongos deficientes para esta enzima apresentariam mesmo desenvolvimento de lesão e carga parasitária que camundongos IFN-γ<sup>-/-</sup>, quando infectados pelo parasita *L. amazonensis*. Para respondermos a esta pergunta infectamos camundongos iNOS<sup>-/-</sup> e acompanhamos o desenvolvimento da lesão nos mesmos. Estes camundongos apresentaram maior suscetibilidade à infecção em relação aos camundongos IFN-γ<sup>-/-</sup> e C57BL/6. Em relação aos camundongos selvagens estes camundongos apresentaram maior lesão desde a sexta semana de infecção (Gráfico 9A). Esta diferença perdurou até o final do curso de infecção. Apesar desta diferença na lesão no início da infecção não encontramos diferença na carga parasitária após oito semanas de infecção. Porém, uma diferença

significativa foi encontrada após 16 semanas (Gráfico 9B). Surpreendentemente, camundongos iNOS  $-/-$  apresentaram maior lesão que camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  da sexta até 10<sup>a</sup> semana. Após a 11<sup>a</sup> semana não foi observada mais diferença entre os grupos (Gráfico 9A). Um resultado intrigante foi a menor carga parasitária encontrada nos camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  oito semanas após a infecção. Quando analisamos a carga parasitária após 16 semanas de infecção ambos os grupos apresentaram quantidades de parasito similares, o que vai de acordo com o tamanho da lesão encontrado neste momento da infecção; similar para os grupos (Gráfico 9B).

Os camundongos iNOS  $-/-$  apresentaram ainda maior atividade de arginase I quando comparados com os camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  oito semanas após a infecção. Esta diferença deixou de existir após 16 semanas (Gráfico 9C). Este dado está de acordo com menor lesão e menor carga parasitária encontradas nos camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  (Gráficos 9A e 9B). Em relação aos camundongos C57BL/6 só foi encontrada diferença na atividade desta enzima 16 semanas após a infecção. Este dado também está coerente com os resultados da quantificação de parasitos (Gráfico 9B).

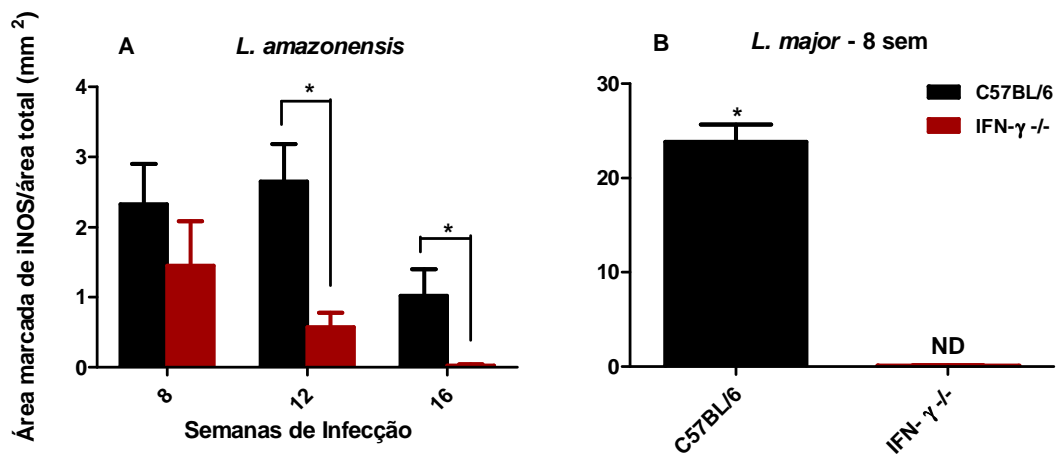




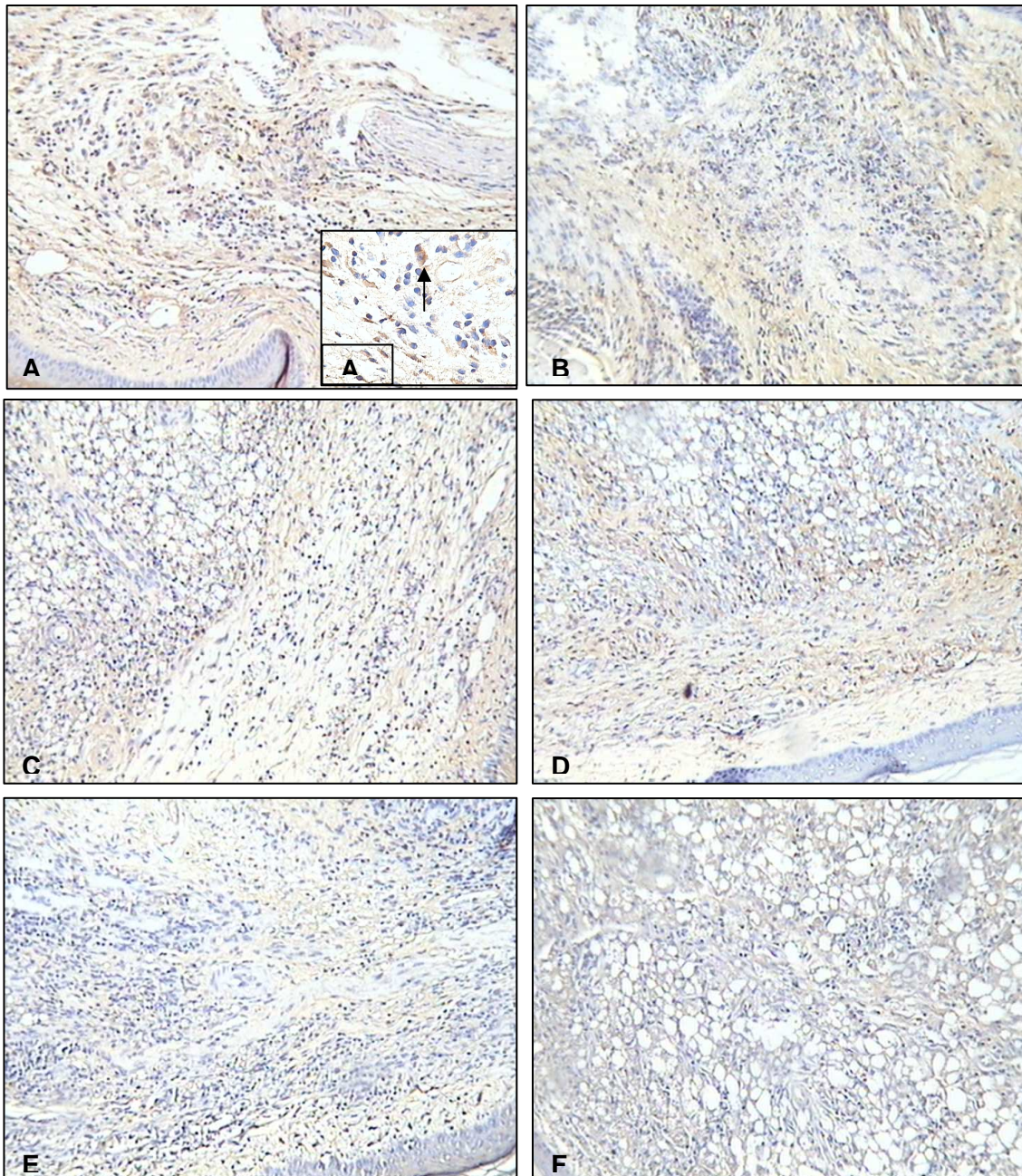
**Gráfico 9. (A) Curso de Infecção.** Camundongos C57BL/6, IFN- $\gamma$  -/- e iNOS -/- foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas, na fase estacionária, de *L. amazonensis* na pata traseira direita. **(B) Quantificação de parasitos.** Quantificação de parasitos por diluição limitante do macerado da pata infectada dos camundongos. **(C) Atividade da enzima arginase I.** Determinação da atividade de arginase a partir do lisado de células das patas infectadas para os tempos indicados de infecção. Análise estatística feita por teste *t* de Student onde \* =  $P < 0,05$ . Os resultados são representativos de três experimentos desenvolvidos independentemente. \* indica diferença estatística entre camundongos C57BL/6 e IFN- $\gamma$  -/-. # indica diferença estatística entre C57BL/6 e iNOS -/-. & indica diferença estatística entre IFN- $\gamma$  -/- e iNOS -/-.

#### **4.6– Análise da expressão de iNOS no sítio de infecção revela indução desta na infecção por *L. amazonensis* em mecanismo independente de IFN- $\gamma$**

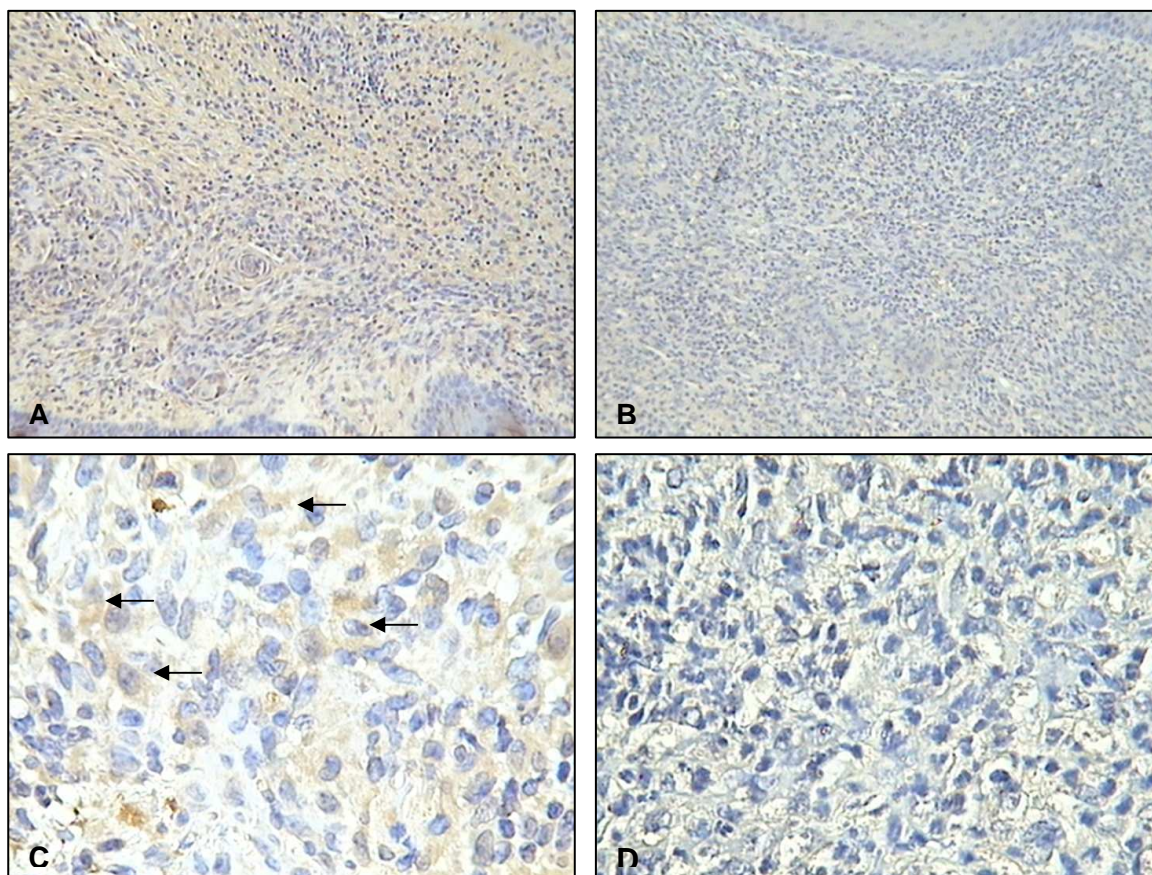
Camundongos IFN- $\gamma$  -/- apresentam controle parcial inicial da lesão e da replicação do parasito (Gráfico 1A e 1B). Além disso, camundongos iNOS -/- apresentam maior suscetibilidade nos períodos iniciais da infecção em relação aos camundongos IFN- $\gamma$  -/- (Gráficos 9A e 9B). Posto isto, nos perguntamos se o mecanismo pelo qual os camundongos IFN- $\gamma$  -/- controlam inicialmente a infecção seria dependente de iNOS. Para responder esta questão avaliamos a expressão da proteína no local da infecção por imunohistoquímica. Interessantemente, constatamos que esses camundongos expressam iNOS em quantidades similares ao expresso por camundongos C57BL/6 após oito semanas de infecção (Gráfico 10A). Entretanto, estes camundongos não mantêm a expressão sustentada da enzima, sendo que após 16 semanas de infecção níveis muito baixos foram encontrados. Em contrapartida, camundongos selvagens sustentam a expressão de iNOS 12 semanas após a infecção. Após este período, uma queda é observada, mas sua detecção ainda é possível em níveis consideráveis. Nestes tempos finais da infecção, portanto, camundongos C57BL/6 apresentaram maior expressão de iNOS que camundongos IFN- $\gamma$  -/-, porém o fato destes expressarem a enzima em níveis similares ao encontrado para os camundongos selvagens, após oito semanas de infecção, nos revela a possibilidade de um mecanismo independente de IFN- $\gamma$  para a indução da mesma. É interessante notar que este mecanismo parece ser específico da infecção por *L. amazonensis*, uma vez que a infecção destes camundongos com *L. major* não induziu a expressão da enzima após oito semanas de infecção (Gráfico 10B). É curioso observar que na infecção por *L. major*, os camundongos C57BL/6 apresentam uma expressão muito maior de iNOS do que o observado na infecção por *L. amazonensis*. Estes resultados podem ser visualizados nas Figuras 2 e 3. Foram escolhidas imagens representativas dos dados apresentados no Gráfico 10.



**Gráfico 10. Expressão da proteína iNOS por imunohistoquímica.** Camundongos C57BL/6 e IFN- $\gamma$  -/- foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas, na fase estacionária, de *L. amazonensis* (A) ou *L. major* (B) na pata traseira direita. O resultado é expresso pela razão entre a área marcada de iNOS pela área total do campo analisado. Análise estatística feita por teste *t* de Student onde \* =  $P < 0,05$ . Os resultados são representativos de três experimentos desenvolvidos independentemente.



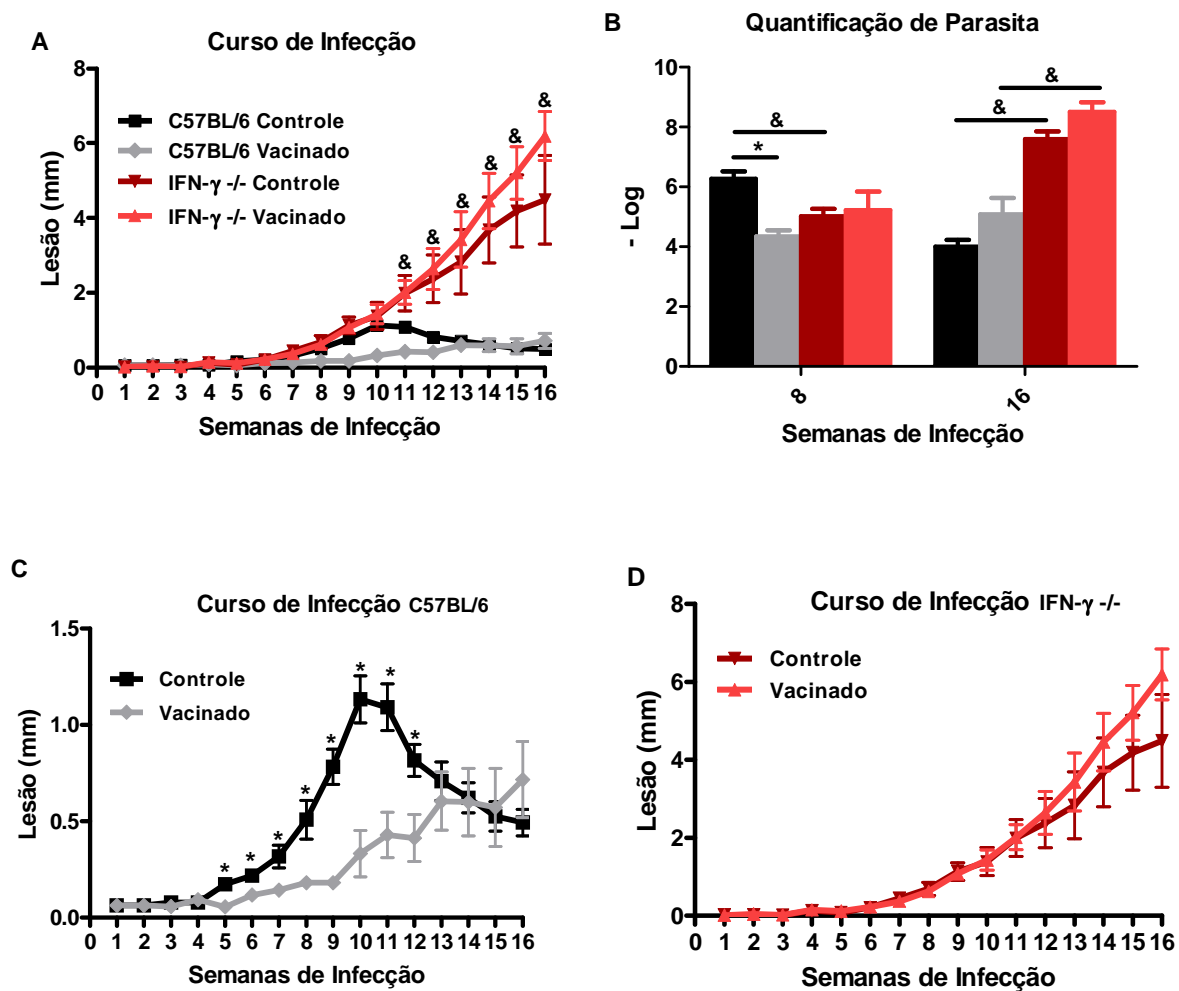
**Figura 2. Expressão de iNOS** nas lesões de camundongos das linhagens C57BL/6 (A, C, E) e IFN- $\gamma$   $-/-$  (B, D, F) após inoculação de  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*. (A-B) 8 semanas, (C-D) 12 semanas e (E-F) 16 semanas após infecção. Seta negra, células positivas para iNOS. Foi observada diferença significativa na expressão de iNOS entre as linhagens para os tempos de 12 ( $p < 0,01$ ) e 16 semanas de infecção ( $p < 0,05$ ). Aumento da objetiva: (A-F) 10X e (A1) 40X



**Figura 3. Expressão de iNOS** nas lesões de camundongos das linhagens C57BL/6 (A, C) e IFN- $\gamma$   $-/-$  (B, D) após inoculação de  $10^5$  promastigotas de *L. major* oito semanas após infecção. Setas negras, células positivas para iNOS. Foi observada diferença significativa na expressão de iNOS para este tempo de infecção ( $p < 0,0001$ ), com valores aumentados nas lesões de C57BL/6. Aumento da objetiva: (A-B) 10 X e (C-D) 40 X.

#### 4.7– IFN- $\gamma$ é essencial para imunização por Leishvacin

Uma vez que nossos resultados anteriores sugerem uma participação mais crucial do IFN- $\gamma$  apenas no final do curso de infecção, e que a indução de iNOS pode ocorrer na ausência de IFN- $\gamma$ , nos perguntamos se esta citocina seria essencial para a imunização dos camundongos neste modelo de infecção. Optamos por utilizar a Leishvacin como modelo de imunização. Esta escolha foi feita porque estudos anteriores mostram seu efeito protetor em camundongos C57BL/6 e C57BL/10 (HERNANDEZ *et al.*, 2006; MAYRINK *et al.*, 2002), assim como um aumento na produção desta citocina nos camundongos imunizados (MAYRINK *et al.*, 2002). Além disso, este protocolo já foi realizado em nosso laboratório com sucesso. Os camundongos C57BL/6 imunizados apresentaram um menor desenvolvimento da lesão no intervalo entre quatro e 12 semanas após o desafio. Estes resultados estão demonstrados no Gráfico 11A, mas podem ser vistos com mais detalhes no Gráfico 11C. É interessante observar que após 12 semanas de infecção os camundongos não imunizados apresentam uma queda na lesão, como já esperado, enquanto os camundongos imunizados apresentam um aumento no tamanho da mesma. Desta forma, a partir deste momento, não é possível observar diferença no tamanho da lesão entre estes grupos. Pelo tempo prolongado do experimento observamos pela primeira vez esta perda da diferença de lesão entre os grupos. Em acordo com o curso de infecção, os camundongos imunizados apresentaram menor carga parasitária após oito semanas de infecção. Essa diferença não pôde ser observada após 16 semanas do desafio, pois simultaneamente ao controle do parasitismo pelos camundongos não vacinados, observamos um aumento do número de parasitos na pata dos camundongos imunizados (Gráfico 11B). Camundongos IFN- $\gamma$  -/- imunizados não desenvolveram mesmo perfil de desenvolvimento de lesão como os camundongos selvagens. Não foi possível observar qualquer efeito protetor nestes camundongos induzido pela Leishvacin (Gráfico 11A e 11D). Da mesma forma, não houve diferença na carga parasitária para os tempos analisados.



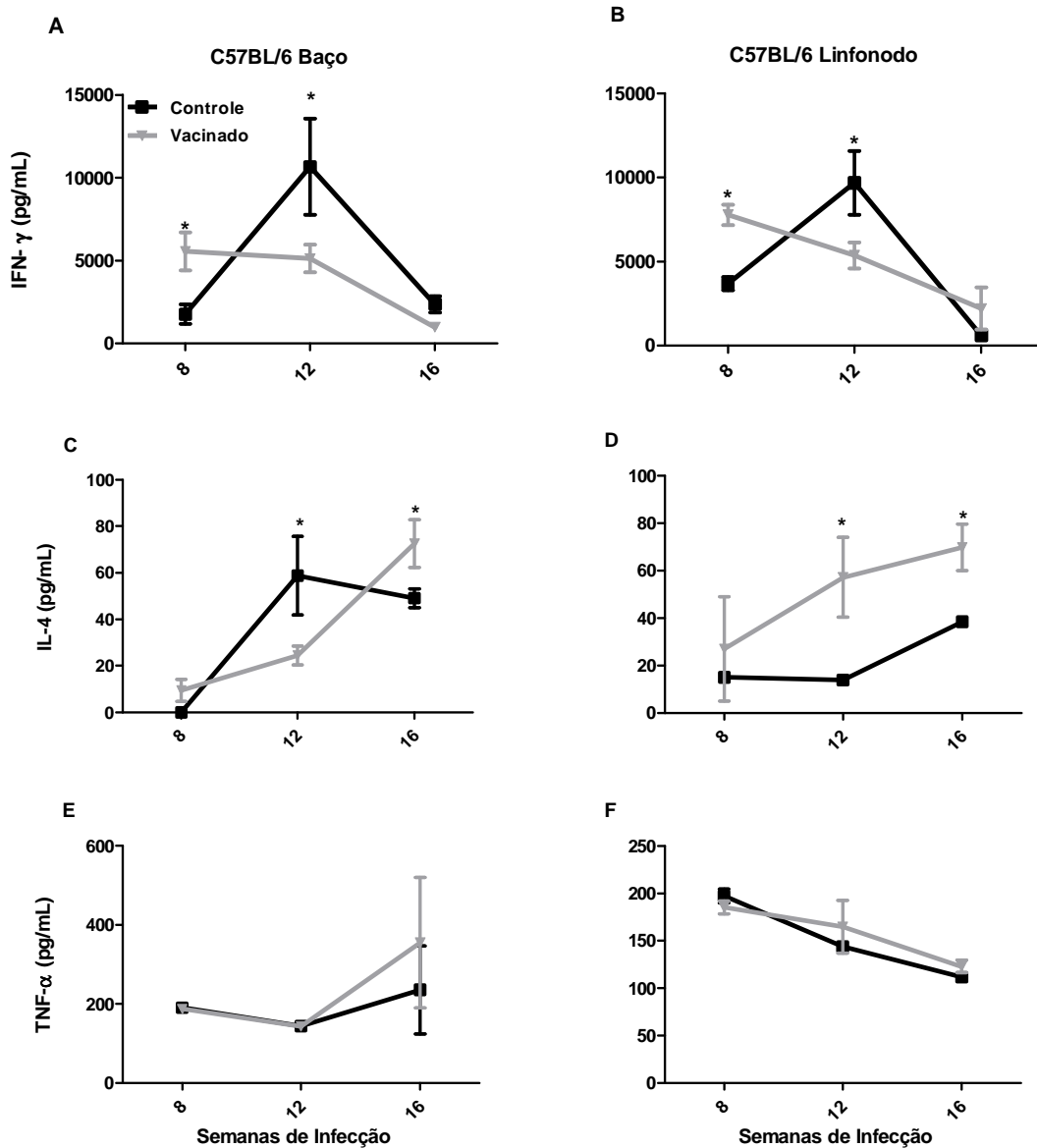
**Gráfico 11. (A, C, D) Curso de Infecção:** Camundongos C57BL/6 e IFN- $\gamma$  -/- controle e vacinados foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas, na fase estacionária, de *L. amazonensis* na pata traseira direita. O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente até o tempo de 16 semanas após a infecção. O eixo Y expressa a média das diferenças de espessura entre as patas infectadas e as não infectadas  $\pm$  desvio padrão de cinco camundongos por grupo. **(B) Quantificação de parasitos:** Quantificação de parasitos por diluição limitante do macerado da pata infectada dos camundongos. Análise estatística feita por teste *t* de Student ( $P < 0,05$ ). \* indica diferença estatística para camundongos de mesma linhagem, mas tratamento diferente. & indica diferença estatística entre camundongos de linhagens diferentes, mas que receberam mesmo tratamento.

#### **4.8– Camundongos imunizados apresentam maior produção de IFN- $\gamma$ após oito semanas de infecção**

Uma vez que o IFN- $\gamma$  é essencial para a imunização, determinamos a cinética de produção desta citocina nos camundongos imunizados. Observamos que a vacina induz uma maior produção de IFN- $\gamma$  nestes camundongos após oito semanas de infecção (Gráficos 12A e 12B). Porém, esta produção aumentada não se sustenta. Desta forma, após 12 semanas de infecção, estes apresentam uma pequena queda na produção desta citocina, que se acentua após 16 semanas de infecção. Este perfil foi observado tanto no baço quanto no linfonodo. Já os camundongos não imunizados, embora apresentem menor produção de IFN- $\gamma$  com oito semanas de infecção, acentuam a produção desta citocina após 12 semanas, produzindo, inclusive níveis maiores que camundongos vacinados. Entretanto, assim como os camundongos imunizados, passam a produzir baixa quantidade desta citocina após 16 semanas.

A perda da alteração da imunidade nos camundongos vacinados no final do curso de infecção nos fez questionar quais citocinas poderiam estar envolvidas neste processo; além disso, se outras citocinas poderiam estar associadas com a proteção temporária conferida pela vacina. Em relação à produção de IL-4, novamente, níveis muito baixos desta citocina foram detectados. Após oito semanas de infecção nenhuma diferença foi encontrada. Após 12 semanas de infecção, porém, camundongos controle apresentaram maior produção da mesma no baço, e a situação se inverte após 16 semanas. No linfonodo desde 12 semanas após a infecção os camundongos vacinados apresentam maior produção desta citocina (Gráficos 12C e 12D). Para a produção de TNF- $\alpha$  a vacina não se mostrou eficaz na indução desta citocina em nenhum momento da infecção, para os pontos analisados (Gráficos 12E e 12F).

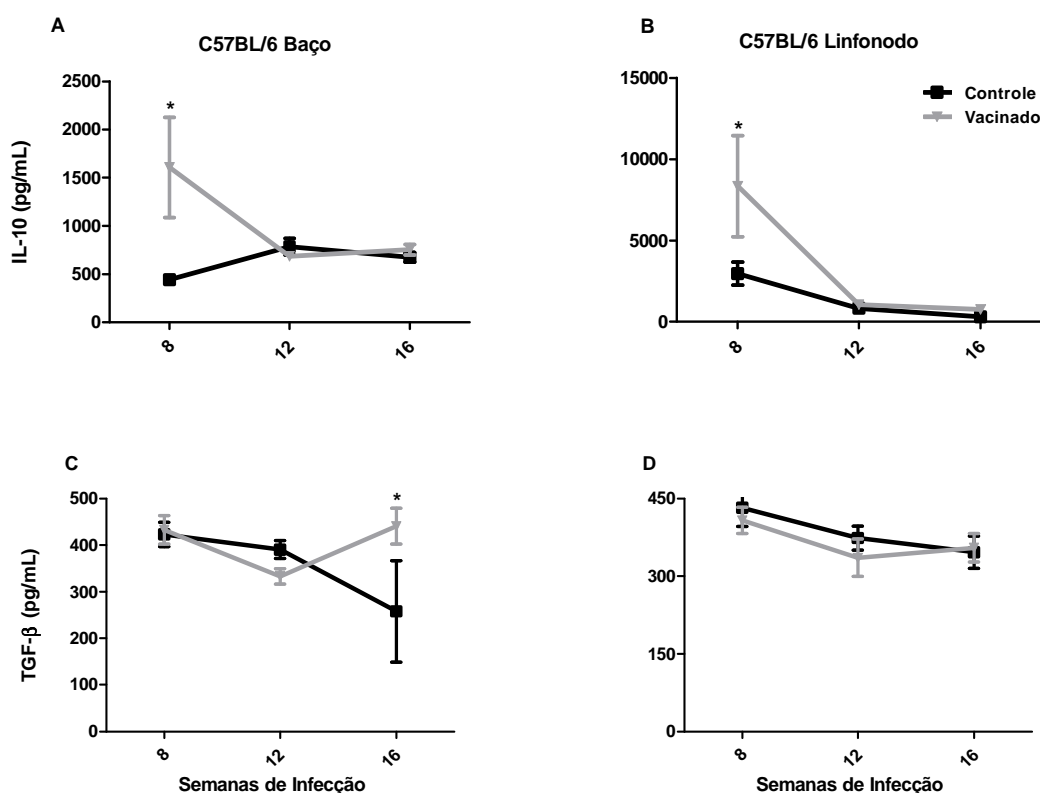




**Gráfico 12. Cinética de produção de IFN- $\gamma$  (A) e (B) IL-4 (C) e (D) e TNF- $\alpha$  (E) e (F) no baço e linfonodo poplíteo de camundongos C57BL/6 controle e imunizados.** Camundongos (cinco por grupo) foram infectados subcutaneamente na pata com  $1 \times 10^5$  formas promastigotas de *L. amazonensis* e nos tempos indicados os baços e linfonodos poplíteos foram coletadas e os níveis das citocinas mencionadas foram determinadas por ELISA. As células foram estimuladas com antígeno homólogo. \* indica diferença significativa estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).

#### 4.9– Altos níveis de IL-10 são induzidos pela vacina oito semanas após o desafio

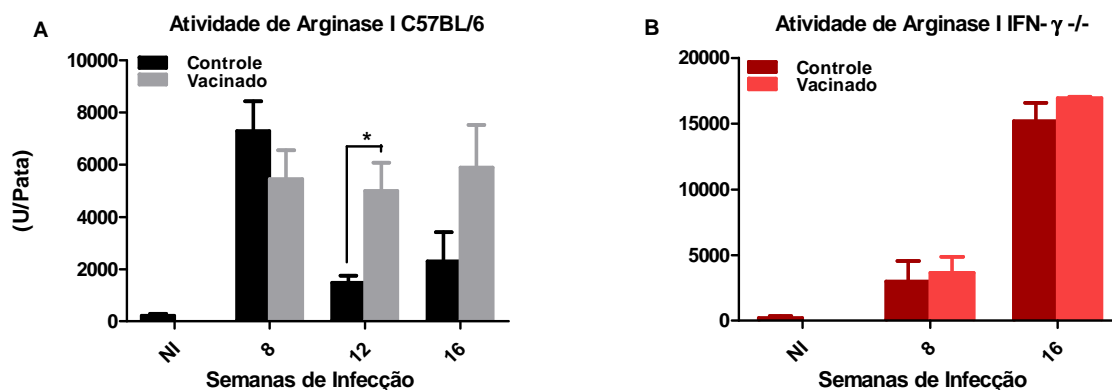
Assim como a imunização foi capaz de induzir a produção de IFN- $\gamma$ , o mesmo pôde ser observado para a citocina IL-10. Desta forma, após oito semanas de infecção, uma maior produção de IL-10 pôde ser observada nos camundongos vacinados. Curiosamente, uma queda na produção desta citocina ocorre após este período (Gráficos 13A e 13B). Em relação à produção de TGF- $\beta$  não encontramos qualquer diferença entre os grupos para células do linfonodo. Já no baço, após 16 semanas de infecção os camundongos vacinados apresentaram maior produção da mesma (Gráficos 13C e 13D)



**Gráfico 13. Cinética de produção de IL-10 (A) e (B) e TGF- $\beta$  (C) e (D) no baço e linfonodo poplíteo de camundongos C57BL/6 controle e vacinados.** Camundongos (cinco por grupo) foram infectados subcutaneamente na pata com  $1 \times 10^5$  formas promastigotas de *L. amazonensis* e nos tempos indicados as células dos baços e linfonodos poplíteos foram coletadas e os níveis das citocinas mencionadas foram determinados por ELISA. As células foram estimuladas com antígeno homólogo. \* indica diferença significativa estatisticamente ( $p < 0,05$  pelo teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).

#### 4.10– A imunidade conferida por Leishvacin é independente de modulação da atividade de arginase I

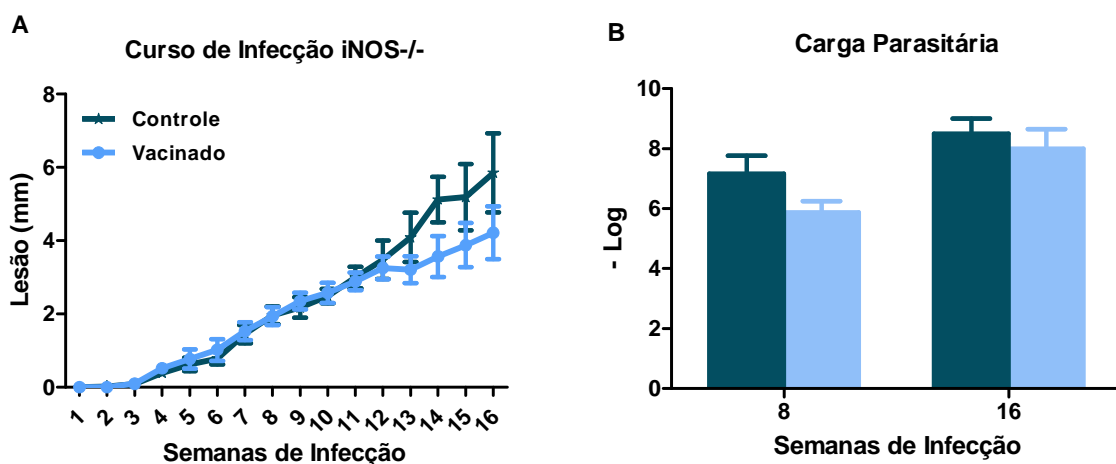
Camundongos C57BL/6 controle apresentaram uma queda na atividade de arginase I na pata ao longo do curso de infecção. Esta tendência de queda não pôde ser observada para os camundongos vacinados, que mantiveram a atividade desta enzima em níveis estáveis ao longo da infecção. Quando comparamos os dois grupos, observamos diferença apenas 12 semanas após a infecção, quando camundongos vacinados, surpreendentemente, apresentaram maior atividade de arginase I que camundongos controle (Gráfico 14A). Camundongos IFN- $\gamma$  -/- apresentaram um aumento na atividade de arginase I ao longo da infecção. Assim, após 16 semanas de infecção apresentam altíssima atividade desta enzima na pata. A imunização nestes camundongos não alterou este perfil (Gráfico 14B).



**Gráfico 14. Atividade da enzima arginase I:** Determinação da atividade de arginase a partir do lisado de células das patas infectadas para os tempos indicados de infecção. \* indica diferença significativa estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste  $t$  de Student.

#### 4.11– iNOS é essencial para imunização

Assim como o IFN- $\gamma$  é essencial para a imunização, o mesmo acontece para a enzima iNOS. Desta forma, é impossível imunizar camundongos iNOS  $-/-$ . Não observamos quaisquer diferenças no desenvolvimento da lesão (Gráfico 15A) ou na carga parasitária (Gráfico 15B) destes camundongos após imunização.

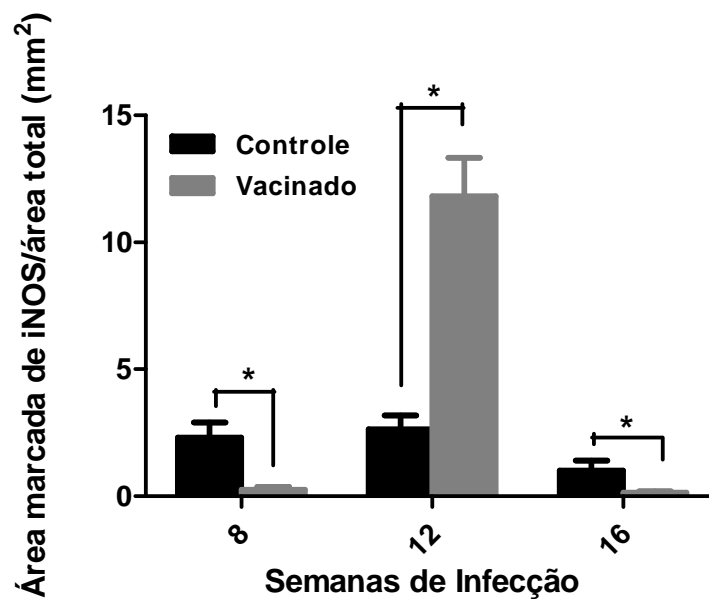


**Gráfico 15. Curso de Infecção:** Camundongos iNOS  $-/-$  controle e vacinados foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas, na fase estacionária, de *L. amazonensis* na pata traseira direita. O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente até o tempo de 16 semanas após a infecção. O eixo Y expressa a média das diferenças de espessura entre as patas infectadas e as não infectadas  $\pm$  desvio padrão de cinco camundongos por grupo. **(B) Quantificação de parasitos:** Quantificação de parasitos por diluição limitante do macerado da pata infectada dos camundongos. Análise estatística feita por teste *t* de Student ( $P < 0,05$ ).

#### 4.12– Camundongos imunizados apresentam pico de expressão de iNOS 12 semanas após o desafio.

Para elucidar em que momento do curso de infecção a expressão de iNOS é relevante para imunização, analisamos, novamente por imunohistoquímica, a expressão da mesma na pata de camundongos C57BL6 controle e vacinados. Os camundongos vacinados apresentam cinética interessante, com um pico de expressão após 12 semanas de infecção. Este foi o único ponto do período analisado em que estes camundongos apresentaram

maior expressão que camundongos não imunizados. Oito e 16 semanas após a infecção, camundongos controle apresentaram maior expressão que os imunizados. Os camundongos controle, como já descrito, apresentaram uma expressão relativamente constante da proteína ao longo da infecção (Gráfico 16).



**Gráfico 16. Expressão da proteína iNOS por imunohistoquímica.** Camundongos C57BL/6 controle e vacinados foram infectados com  $1 \times 10^5$  promastigotas, na fase estacionária, de *L. amazonensis* (A) na pata traseira direita. O resultado é expresso pela razão entre a área marcada de iNOS pela área total do campo analisado. Análise estatística feita por teste *t* de Student onde \* =  $P < 0,05$ . Os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos desenvolvidos independentemente.

## 5 – DISCUSSÃO

O papel do IFN- $\gamma$  durante infecções por parasitos intracelulares é bem estabelecido para diversos modelos experimentais. A ativação de macrófagos por esta citocina, e conseqüente produção de NO, é essencial para a resolução destas infecções. Camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  apresentam alta taxa de mortalidade e grande disseminação parasitária para infecção por *M. tuberculosis*. A administração de IFN- $\gamma$  recombinante reduz a gravidade da doença nos mesmos (COOPER *et al.*, 1993; FLYNN *et al.*, 1993). Além disso, já foi constatado que mutações no gene do receptor desta citocina estão relacionadas com maior suscetibilidade humana a esta infecção (NEWPORT *et al.*, 1996). A administração de anti-IFN- $\gamma$  torna a infecção por *T.gondii* letal, ao passo que os camundongos que não recebem este tipo de tratamento sobrevivem e desenvolvem uma doença crônica (SUZUKI *et al.*, 1988). Para infecção por *L. major*, os camundongos também se tornam mais susceptíveis na ausência de IFN- $\gamma$ . Neste caso, camundongos deficientes da citocina polarizam resposta do tipo 2, enquanto que camundongos deficientes do receptor de IFN- $\gamma$  não polarizam esta resposta, mas também apresentam maior lesão e carga parasitária (SWIHART *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1994). Surpreendentemente, a infecção por *L. amazonensis* é uma exceção dentre as doenças citadas. Nesta infecção camundongos deficientes de IFN- $\gamma$  apresentam suscetibilidade aumentada apenas nos tempos finais da infecção (PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007). Ainda mais instigante, esta citocina estimula a proliferação de formas amastigotas do parasito *in vitro* (QI *et al.*, 2004). Já se sabe que o mecanismo pelo qual esse fenômeno ocorre é mediado pelo aumento da expressão de CAT-2B (WANASEN *et al.*, 2007), porém, ainda não está bem esclarecido na literatura qual o papel do IFN- $\gamma$  na infecção *in vivo* por este parasito. Visando esclarecer um pouco mais esta questão, neste trabalho utilizamos camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  como ferramenta para avaliar o papel desta citocina na infecção por *L. amazonensis*; assim como avaliamos sua relevância para geração de imunidade. Vale destacar que os camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  são saudáveis e férteis na ausência de patógenos.

Além disso, nenhuma anormalidade histológica é observada nos tecidos linfóides. Estes animais apresentam mesma quantidade de células no baço e no timo que camundongos selvagens. Também, nenhuma diferença é encontrada para populações CD3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> no sangue dos mesmos. Desta forma, estes camundongos constituem bom modelo de estudo, uma vez que o IFN- $\gamma$  não é requerido para o desenvolvimento do sistema imune, assim como não é essencial para a sobrevivência do animal (DALTON *et al.*, 1993).

Nossos resultados estão de acordo com o já observado para outras cepas de *L. amazonensis* (COLMENARES *et al.*, 2003; PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007). Assim, observamos tanto um desenvolvimento tardio na lesão dos camundongos deficientes de IFN- $\gamma$  quanto da replicação dos parasitos. É interessante notar que camundongos C57BL/6 apresentam maior carga parasitária após oito semanas de infecção, o que reforça a idéia de que neste modelo, o IFN- $\gamma$  parece estimular de fato a replicação do parasito. Esta constatação já havia sido feita para infecção *in vitro* (QI *et al.*, 2004), mas é a primeira vez que observamos mesmo efeito para infecção *in vivo* por *L. amazonensis*. A análise da expressão e atividade da enzima arginase I no sítio de infecção, oito semanas após a mesma, nos revelou que camundongos deficientes de IFN- $\gamma$ , apresentam menor expressão de mRNA para a enzima, e embora, sem diferença estatística, uma tendência para menor atividade de arginase I. Este dado é intrigante e poderia nos levar a pensar, erroneamente, que esta citocina poderia estimular a expressão e atividade desta enzima. É improvável que seja esse o caso, uma vez que já foi mostrado que esta citocina não apresenta efeito modulador sobre a atividade de arginase I, seja inibindo ou estimulando a mesma (MODELELL *et al.*, 1995; MUNDER *et al.*, 1999; MUNDER; EICHMANN; MODELELL, 1998). Isto posto, acreditamos na possibilidade de que a infecção em camundongos IFN- $\gamma$  <sup>-/-</sup> possa induzir mecanismos moduladores diferentes do observado em camundongos C57BL/6. De fato, observamos menor produção de IL-10 no linfonodo de camundongos IFN- $\gamma$  <sup>-/-</sup>, e sabemos que esta citocina é capaz de estimular a expressão de arginase I (MUNDER; EICHMANN; MODELELL, 1998). Em relação à produção de IL-4 e TGF- $\beta$ , também importantes para expressão desta enzima (BOUTARD *et al.*, 1995; INIESTA *et al.*, 2002), não encontramos diferenças

entre os grupos. Quando resolvemos estender o período de análise do tempo de infecção constatamos um aumento da lesão nos camundongos IFN- $\gamma$  -/-, após 11 semanas de infecção, em relação à infecção nos camundongos C57BL/6. Este aumento se mostrou exacerbado e constante até o período analisado de 16 semanas após infecção. Um aumento evidente também foi observado para atividade de arginase I na pata destes animais. É interessante notar que o oposto ocorre com os camundongos C57BL/6, que após 11 semanas, mostraram um controle parcial da infecção, com queda da lesão, assim como uma redução da carga parasitária. Este quadro está em pleno acordo com uma queda na atividade de arginase I observada nestes camundongos no período final da infecção. A percepção de que nos camundongos IFN- $\gamma$  -/- ocorreu um aumento da carga parasitária paralelo ao aumento da atividade desta enzima ao longo do curso de infecção nos fez questionar se haveria uma correlação entre o aumento simultâneo destes dois parâmetros. Fizemos então uma análise de correlação entre os mesmos e observamos uma clara correlação positiva entre aumento da atividade de arginase I e da carga parasitária. Observamos a mesma tendência para camundongos C57BL/6, neste caso, ao longo do tempo observamos uma queda da carga parasitária, assim como da atividade de arginase I. Não encontramos correlação estatística para estes animais, porém vale destacar que a variação, ao longo do curso de infecção, da carga parasitária e da atividade de arginase I nestes animais se deu de maneira muito mais discreta do que o observado para camundongos IFN- $\gamma$  -/-. Estes dados nos sugerem que a atividade desta enzima pode estar relacionada com a replicação do parasito, e conseqüente perfil de suscetibilidade à infecção, como já mostrado para infecções por *L. major* (INIESTA *et al.*, 2005; KROPF *et al.*, 2005). É relevante destacar que uma atividade exacerbada desta enzima não somente favorece a replicação do parasito como também pode modular diversos eventos imunológicos. O consumo de L-arginina por macrófagos, quando estes expressam altos níveis de arginase I, e não de iNOS, leva a uma depleção da disponibilidade deste aminoácido no ambiente extracelular. Esta depleção inibe a expressão da cadeia  $\zeta$  CD3 de linfócitos T, comprometendo a proliferação deste tipo celular (MUNDER *et al.*, 2006; RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Além disso, outros aspectos relacionados à ativação de linfócitos T se encontram



comprometidos nesta situação, como a produção de citocinas, tais quais: IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 (CHOI *et al.*, 2009). Além de macrófagos e linfócitos T, células NK também requerem disponibilidade de L-arginina no meio para proliferação e produção de IFN- $\gamma$ , embora não necessitem do mesmo para exercerem sua função citotóxica (OBERLIES *et al.*, 2009). Esse conjunto de evidências mostra que a expressão desta enzima está associada à fenômenos de imunossupressão, e estes eventos apresentam relevância para imunidade frente infecção por *L. major* (MODOLELL *et al.*, 2009).

Como a infecção por *L. amazonensis* se mostrou atípica nos camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$ , resolvemos infectá-los com mesma dose do parasito *L. major*. Como esperado a infecção por este parasito se mostrou mais grave nestes camundongos, de forma que desde os tempos iniciais de infecção observamos uma lesão considerável. Nossos resultados obtidos para infecção com *L. major* corresponde ao descrito na literatura (WANG *et al.*, 1994). É interessante notar que não encontramos uma alta produção de IL-4 nos camundongos infectados com *L. amazonensis*, ao contrário do que já foi relatado para infecção por *L. major* (WANG *et al.*, 1994). A polarização de resposta  $T_H2$  encontrada na infecção por *L. major* explica a maior suscetibilidade observada nestes animais, ao passo que a ausência de polarização deste tipo de resposta na infecção por *L. amazonensis* pode ser um dos fatores que contribuem para um desenvolvimento de lesão tão lento encontrado nestes camundongos.

A determinação da cinética de produção de IFN- $\gamma$  nos camundongos C57BL/6, infectados com *L. amazonensis*, é fundamental para esclarecermos as diferenças encontradas no desenvolvimento da lesão e replicação dos parasitos nos camundongos deficientes para esta citocina. Desta forma nossos resultados indicam um perfil de produção de IFN- $\gamma$  similar do ponto de vista local (linfonodo) e sistêmico (baço). Observamos um pico de produção desta citocina 12 semanas após a infecção. Este pico de produção está relacionado com o momento de queda da lesão e carga parasitária nestes camundongos observados nos tempos finais da infecção. Curiosamente, a cinética de expressão de mRNA de IFN- $\gamma$  na pata destes camundongos foi diferente. Observamos uma queda contínua na expressão desta citocina ao longo da infecção. É relevante dizer que a expressão do mRNA não indica,

necessariamente, a expressão da proteína, o que pode explicar esta diferença encontrada. Além disso, o curso de infecção observado nos camundongos IFN- $\gamma$  -/- sugere importante papel do IFN- $\gamma$  na contenção da lesão e da proliferação do parasito justamente nos tempos finais da infecção. Desta forma, a constatação de que ocorre um pico de produção desta citocina 12 semanas após a infecção, período em que se consolida a diferença na lesão entre os camundongos C57BL/6 e IFN- $\gamma$  -/-, nos sugere importante participação desta citocina neste controle tardio da infecção.

O fato de que camundongos IFN- $\gamma$  -/- apresentam um desenvolvimento de lesão similar aos camundongos C57BL/6 durante grande parte do curso de infecção (até a 10<sup>a</sup> semana) nos sugere duas possibilidades: que durante este período o IFN- $\gamma$  não apresenta papel relevante para o controle da carga parasitária, pelo contrário, e conseqüentemente da lesão; ou que estes camundongos apresentam mecanismos que compensem a falta desta citocina. Na tentativa de elucidar melhor este quadro analisamos a produção de outras citocinas que apresentam importante papel em infecções por este parasito. O TGF- $\beta$  é uma citocina que tem sido associada constantemente como fator de suscetibilidade à infecções por *Leishmania*. O tratamento de camundongos CB6F1 com anti-TGF- $\beta$  promove a cura na infecção por *L. major* (LI; HUNTER; FARRELL, 1999). Além disso, macrófagos infectados por *L. amazonensis* são estimulados a produzirem altos níveis desta citocina, sugerindo mecanismo de evasão do sistema imune (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992). Como dito anteriormente, a atividade de arginase I também é estimulada por esta citocina (BOUTARD *et al.*, 1995). Interessantemente, não encontramos diferenças na produção de TGF- $\beta$ . Mais do que isso, também não houve diferença na produção de IL-4 e TNF- $\alpha$ . Dentre as citocinas avaliadas observamos diferença apenas para a produção de IL-10. Neste caso, foi constatada maior produção desta citocina em camundongos C57BL/6, no baço após 16 semanas de infecção e no linfonodo após oito semanas. Além do efeito modulador sobre a atividade de arginase I, já descrito para esta citocina, a IL-10 inibe a produção de NO, e assim, a eliminação deste parasito (GAZZINELLI *et al.*, 1992; KANE; MOSSER, 2001). Desta forma, a maior produção desta citocina nos camundongos C57BL/6 pode estar associada à maior atividade de arginase I observada nestes animais; assim como com uma possível inibição na produção

de NO. Todos esses fatores podem estar associados à maior carga parasitária observada nestes camundongos oito semanas após a infecção. Curiosamente, a produção de IL-10 nos linfonodos destes camundongos 16 semanas após a infecção é drasticamente menor do que o observado com oito semanas. Esta queda, embora não constatada no baço destes animais, pode estar relacionada, e mesmo ser uma das causas da queda da carga parasitária, assim como da atividade de arginase I nestes camundongos para este tempo de infecção.

Uma vez que o perfil de citocinas analisadas não explica de maneira contundente o progresso da lesão nos camundongos IFN- $\gamma$  -/- nos questionamos se estes camundongos poderiam estar controlando o seu desenvolvimento precoce através de mecanismo dependente de NO. Para respondermos esta questão utilizamos camundongos iNOS -/-, que constitui boa ferramenta para análise da influência da geração de NO em respostas imunes. Este camundongo, na ausência de patógenos, é saudável e fértil, não apresentando diferenças histológicas para maioria dos órgãos analisados. Além disso, este camundongo, como esperado, apresenta maior suscetibilidade à infecção por *L. major*. É interessante relatar que esta suscetibilidade é evidente após seis semanas de infecção, período em que a lesão nos mesmos se torna maior que a lesão de camundongos C57BL/6. De forma intrigante estes camundongos apresentam maior proliferação de linfócitos T estimulados com antígeno de *L. major*; assim como maior produção de IFN- $\gamma$  e menor produção de IL-4 (WEI *et al.*, 1995).

O mecanismo de morte do parasito pelo qual o NO atua parece ser através da indução de apoptose celular. O perfil de fragmentação de DNA observado para amastigotas de *L. amazonensis* axênicas incubadas com doadores de NO é o mesmo encontrado para células apoptóticas (HOLZMULLER *et al.*, 2002). A ocorrência deste mesmo perfil já foi mostrada no baço e fígado de hamsters infectados com parasitos causadores da forma visceral da doença. Assim, a fragmentação de DNA foi observada também para *L. chagasi* (LINDOSO; COTRIM; GOTO, 2004). Observações similares também já foram constatadas em cães (HOLZMULLER *et al.*, 2005). Afora o papel efetor direto mediado pela produção de NO, a expressão de iNOS parece estar envolvida com outros eventos imunológicos relevantes. Já foi observado que a

expressão desta enzima, e conseqüente produção de NO, é importante para regular resposta imune inata na infecção por *L. major*. NO extracelular, oriundo da expressão e atividade de iNOS, atua em sinergismo com IL-12 na indução de produção de IFN- $\gamma$  por células NK nos tempos iniciais da infecção por este parasito (DIEFENBACH *et al.*, 1998; DIEFENBACH *et al.*, 1999). Este evento é importante para geração e manutenção da resposta T<sub>H</sub>1 nesta infecção (NIEDBALA *et al.*, 1999)

Quando infectamos os camundongos iNOS *-/-* com *L. amazonensis* observamos que estes camundongos apresentam uma maior suscetibilidade à infecção desde tempos mais iniciais que o controle. Assim, desde seis semanas após a infecção já apresentam lesão maior do que os camundongos C57BL6. Este dado é coerente com a relevância da produção de NO para a morte do parasito, e este perfil de desenvolvimento de lesão é semelhante ao observado para camundongos iNOS *-/-* infectados por *L. major* (DIEFENBACH *et al.*, 1998; WEI *et al.*, 1995). Um dado interessante se refere à quantificação de parasitos realizada oito semanas após a infecção. Embora os camundongos iNOS *-/-* apresentem uma lesão aumentada, não observamos maior carga parasitária nestes animais. Estes dados nos alertam para o fato de que outros mecanismos podem ser relevantes para a contenção da replicação deste parasito, especialmente nos tempos mais iniciais da infecção. Destacamos a possível participação dos ROS; dados não publicados do nosso grupo de pesquisa apontam que as espécies reativas de oxigênio são importantes para a morte deste parasito *in vitro*, e apresentam mais relevância para o efeito protetor na infecção *in vivo* nos tempos iniciais da mesma. É relevante dizer que camundongos iNOS *-/-* exacerbam a produção de ROS na infecção por *L. amazonensis* (MACEDO, 2010). É interessante notar que a relevância dos ROS na infecção por *L. donovani* já foi relatada. Neste modelo de infecção estes radicais de oxigênio também apresentam efeito protetor apenas nos períodos iniciais da infecção, e são dispensáveis para a resolução da infecção (MURRAY; NATHAN, 1999; MURRAY; XIANG; MA, 2006). Em suma, a literatura aponta que os ROS podem atuar juntamente com o NO na eliminação de parasitos do gênero *Leishmania* nos tempos iniciais da infecção. Desta forma não descartamos a participação dos mesmos na contenção da replicação de *L. amazonensis* nos camundongos iNOS *-/-*. Quando analisamos

a atividade de arginase I, curiosamente, não encontramos diferença estatística em relação à atividade desta enzima nos camundongos C57BL/6, embora possa ser observado que a mesma é claramente aumentada nos camundongos deficientes de iNOS. Nos tempos finais da infecção fica claro a importância da iNOS neste modelo de infecção. Assim, camundongos iNOS  $-/-$  apresentam um crescimento exacerbado da lesão ao longo da infecção, assim como maior carga parasitária e atividade de arginase I após 16 semanas. Desta forma, fica evidente o papel crucial do NO para o controle da infecção por *L. amazonensis*. É intrigante observar que o desenvolvimento da lesão de camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  e iNOS  $-/-$  não ocorre da mesma maneira, uma vez que a principal via de indução de iNOS é mediada por IFN- $\gamma$  nos modelos de infecção por *Leishmania major* (LYKENS *et al.*, 2010; STENGER *et al.*, 1994). IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  são capazes de induzir iNOS (DIEFENBACH *et al.*, 1998; MATTNER *et al.*, 2000), porém camundongos deficientes destas duas citocinas não apresentam suscetibilidade maior que camundongos selvagens (BUXBAUM, 2010); ao contrário de camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$ , o que reforça a importância do IFN- $\gamma$  neste modelo de infecção. Constatamos que a lesão nos camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  e iNOS  $-/-$  se equiparam somente 11 semanas após a infecção, e depois desde tempo permanecem iguais, assim como a carga parasitária e atividade de arginase I. Não encontramos diferença na cinética de produção de IL-10, IL-4 ou TNF- $\alpha$  entre as duas linhagens. Os camundongos iNOS  $-/-$  apresentam produção de IFN- $\gamma$  similar ao encontrado para animais C57BL/6 (dados não mostrados). A comparação entre os cursos de infecção destas duas linhagens, assim como a constatação de que não havia diferença na produção de citocinas durante a infecção, reforçou nossa hipótese de que camundongos deficientes de IFN- $\gamma$  pudessem exibir uma via independente desta citocina para a indução de iNOS e produção de NO. Este mecanismo teria importante participação na contenção do desenvolvimento da lesão e carga parasitária nos camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  pelo período considerável de 11 semanas. Para responder esta questão avaliamos por imunohistoquímica a expressão de iNOS nas patas destes camundongos oito, 12 e 16 semanas após a infecção. Oito semanas após a infecção observamos que os camundongos C57BL/6 e IFN- $\gamma$   $-/-$  apresentaram uma expressão similar de iNOS na pata. Com o progresso da lesão observamos uma queda drástica contínua na expressão de

iNOS nos camundongos “knockout”. Ao mesmo tempo, os camundongos C57BL/6 apresentam uma expressão contínua da enzima 12 semanas após a infecção e uma queda menos drástica após 16 semanas. Animais deficientes para IFN- $\gamma$  apresentam expressão de iNOS na infecção por *L. major*. Mas neste caso, esta expressão só é encontrada em tempos bem iniciais da infecção, 24hs, e está associada a um aumento na produção de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , que só é observada em tempos iniciais (DIEFENBACH *et al.*, 1998). Assim, ao longo da infecção isso não é mais observado, como constatamos, quando analisamos a expressão de iNOS oito semanas após infecção por *L. major*. Acreditamos que a expressão desta enzima, e possível produção de NO possa estar associada ao controle da replicação do parasito encontrado oito semanas após a infecção nos camundongos IFN- $\gamma$  -/- por *L. amazonensis*. Também acreditamos que a expressão contínua desta enzima nos camundongos C57BL/6 possa estar associada ao controle parcial da lesão e carga parasitária observado nos tempos finais da infecção.

Uma questão intrigante surge quando constatamos que após oito semanas de infecção ambos os camundongos, selvagens e “knockout”, expressam mesma quantidade de iNOS. O IFN- $\gamma$  seria o responsável direto pela expressão desta enzima nos camundongos C57BL/6 nos tempos iniciais da infecção? Ou os fatores indutores de iNOS independentes de IFN- $\gamma$ , ainda não identificados, estariam exercendo um papel mais crucial neste momento? Caso esse seja o caso, isso reforçaria a idéia de que realmente o IFN- $\gamma$  é importante para a proteção apenas nos tempos finais da infecção, período em que assumiria a função de induzir a expressão da iNOS. A utilização de anticorpo anti-IFN- $\gamma$  nos camundongos C57BL/6 pode nos ajudar a responder este questionamento.

O balanço entre a expressão de iNOS e arginase I, além da produção de IL-10, parecem ser mecanismo chave que explicam o curioso fato de que o IFN- $\gamma$  é relevante apenas nos tempos finais da infecção por *L. amazonensis*. Nossos dados não sugerem qual citocina poderia estar envolvida na expressão de iNOS em camundongos deficientes de IFN- $\gamma$ . Já foi relatado na literatura que a citocina IL-2, quando na presença de IFN- $\gamma$ , induz a produção de TNF- $\alpha$ , que em sinergismo com IFN- $\gamma$  medeia a morte de amastigotas de *L. major*. O estímulo isolado de IL-2 não é suficiente para gerar este quadro (BELOSEVIC

*et al.*, 1988; BELOSEVIC *et al.*, 1990; NACY *et al.*, 1991). Apesar disto, a IL-2 também pode atuar em cooperação com o TNF- $\alpha$ . Este fenômeno foi relatado para infecção *in vitro* por *Mycobacterium avium*, e neste caso é dependente de IL-2, uma vez que não foi observado efeito protetor na presença de IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ . Nestes trabalhos, infelizmente, não há dados em relação à produção de NO (BERMUDEZ *et al.*, 1989; BERMUDEZ; YOUNG, 1988). Desta forma, cogitamos a possibilidade desta citocina sinalizar em conjunto com TNF- $\alpha$  a expressão de iNOS na infecção por *L. amazonensis*. Outra citocina que pode estar envolvida nesta indução é a IL-1 $\beta$ . Embora, isoladamente, não ative mecanismos efetores em macrófagos para a morte de *L. major* (BELOSEVIC *et al.*, 1988), esta citocina induz a expressão de iNOS e produção de NO na ilhotas de Langerhans, assim como em hepatócitos (CORBETT *et al.*, 1993; KITADE *et al.*, 1996; TESHIMA *et al.*, 2004). Além disso, esta citocina induz atividade anti-tumoral em macrófagos em efeito aditivo com TNF- $\alpha$  (SODHI; SINGH; PAI, 1990). Dito isto, também cogitamos a participação de IL-1 $\beta$ , em sinergismo com outras citocinas, para indução de iNOS no nosso modelo experimental. Duas quimiocinas, MCP-1 e IP-10, também podem estar relacionadas com esta expressão de iNOS independente de IFN- $\gamma$ . Ambas são capazes de induzir a produção de NO, isoladamente, em infecção *in vitro* de macrófagos por *L. amazonensis* ou *L. donovani* (BHATTACHARYYA *et al.*, 2002; VASQUEZ; SOONG, 2006).

Nossos dados apontam que, durante a resposta imune à infecção por *L. amazonensis*, o IFN- $\gamma$  apresenta papel crucial nos tempos finais da infecção; e que existe um mecanismo indutor de iNOS independente desta citocina que pode estar relacionado com o não agravamento precoce da lesão em camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$ . Diante disso resolvemos analisar qual a influência do IFN- $\gamma$  em protocolo de imunização mediado por Leishvacin. Como nossos dados apontam, neste protocolo de imunização, ocorre aumento de IFN- $\gamma$  nos camundongos vacinados. E esta indução é fundamental para o efeito protetor observado nestes camundongos, uma vez que em animais IFN- $\gamma$   $-/-$  não é possível observar nenhum efeito protetor. O curso de infecção, carga parasitária e atividade de arginase I são idênticos entre camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  imunizados ou não. Da mesma forma, não encontramos diferenças na

produção de IL-4, TNF- $\alpha$  ou TGF- $\beta$  e expressão de iNOS entre esses camundongos (dados não mostrados).

Em relação à imunização de camundongos C57BL/6, observamos um efeito protetor temporário mediado pela Leishvacin. Após oito semanas de infecção, os camundongos vacinados apresentaram maior produção de IFN- $\gamma$ , assim como menor lesão e carga parasitária. Curiosamente estes dados não se relacionam com uma expressão aumentada de iNOS na pata, pelo contrário, foi observada uma inibição da expressão desta enzima. Também não foi encontrada diferença na atividade de arginase I entre camundongos imunizados ou não. Após 12 semanas de infecção, entretanto, observamos um aumento evidente na expressão de iNOS, e neste tempo continuamos a observar menor lesão nestes camundongos, embora não ocorra aumento na produção de IFN- $\gamma$  correspondente no baço, e, pelo contrário, ocorra uma queda no linfonodo. O efeito protetor conferido pela imunização cessa após 13 semanas de infecção. Essa perda da diferença em relação à lesão nos camundongos não imunizados ocorre em virtude do controle parcial observado nos animais não imunizados, e que pode estar relacionado ao aumento de IFN- $\gamma$  observado 12 semanas após a infecção. Paralelo a isso, observamos um aumento contínuo da lesão nos camundongos vacinados, o que nos sugere que talvez o que esteja ocorrendo nestes animais seja um atraso no desenvolvimento da lesão. O fato da imunização não gerar um efeito protetor duradouro pode estar relacionado à qualidade da resposta efetora gerada nestes animais. Os camundongos imunizados não apresentaram produção aumentada de TNF- $\alpha$  ao longo da infecção, e esta citocina é importante para a geração de imunidade (DARRAH *et al.*, 2007). Além disso, observamos nos camundongos imunizados uma alta produção de IL-10 oito semanas após a infecção. Esta alta produção pode estar relacionada com um efeito antiinflamatório; assim teríamos um efeito combinado entre a IL-10, reduzindo a inflamação, e a presença de IFN- $\gamma$  gerando mecanismos efetores de eliminação do parasito. É possível, inclusive, que a imunização tenha gerado a diferenciação de células T<sub>H</sub>1 produtoras de IL-10 e IFN- $\gamma$  (ANDERSON *et al.*, 2007; O'GARRA; VIEIRA, 2007). Porém, o papel da IL-10 em protocolos de imunização é controverso. É considerada essencial para geração de células CD8<sup>+</sup> de memória na infecção por *Listeria monocytogenes* (FOULDS; ROTTE;



SEDER, 2006), mas é determinante para a não eficácia, ou uma eficácia efêmera, em desafios por *L. major* (DARRAH *et al.*, 2010; STOBBER *et al.*, 2005). Como observamos que camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  imunizados apresentaram aumento na produção de IL-10, como os camundongos C57BL/6, (dados não mostrados), não podemos afirmar que este efeito da IL-10, como mediadora da inflamação, é de fato relevante em nosso modelo. Além disso, a maioria dos relatos associa esta citocina com um perfil de suscetibilidade, seja pela infecção por *L. major*, seja por *L. amazonensis* (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005; JONES *et al.*, 2002; KANE; MOSSER, 2001; RNET *et al.*, 2010; YANG; MOSSER; ZHANG, 2007). Desta forma, é mais provável que a IL-10 esteja exercendo um papel no sentido de limitar a geração de uma resposta efetora eficaz para a geração de uma imunidade duradoura (DARRAH *et al.*, 2010). Uma produção aumentada de TGF- $\beta$  também foi constatada 16 semanas após a infecção no baço dos camundongos imunizados. Esta citocina também pode estar relacionada a esta perda da resposta protetora, e mesmo com o aumento lento, mas progressivo, da lesão observada nestes camundongos (PINHEIRO *et al.*, 2005). É relevante notar que esta indução de IL-10 parece ser uma característica do estímulo pelo antígeno da cepa PH8, uma vez que os camundongos C57BL/6, IFN- $\gamma$   $-/-$  e iNOS  $-/-$  vacinados apresentaram aumento na produção da mesma. Este aumento também já havia sido relatado por outro protocolo de imunização com PH8, neste caso uma imunização intramuscular (PINHEIRO *et al.*, 2005).

Por fim, da mesma maneira que o IFN- $\gamma$  é essencial para a imunidade parcial conferida pela Leishvacin, a iNOS também o é. Isso porque também não conseguimos imunizar camundongos iNOS  $-/-$ . Assim, a forte expressão de iNOS observada 12 semanas após infecção parece ser importante para a imunização. É relevante dizer que, como não analisamos a expressão de iNOS em todos os pontos da infecção, este pico possa ocorrer antes deste período, e mesmo em maiores níveis. Podemos deduzir também que o mecanismo pelo qual o IFN- $\gamma$  é crucial para a imunidade é dependente de iNOS.

Em suma, nossos resultados aprofundam o entendimento acerca da relevância do IFN- $\gamma$ , citocina chave na resistência contra parasitos intracelulares, e revela indícios de mecanismos que possam suprir a ausência da mesma, mesmo que temporariamente. Ademais, revela possível papel

tempo-dependente desta citocina. Os fatores não identificados que estão relacionados com a expressão de iNOS seriam apenas um mecanismo compensatório, ou também seriam importantes, mesmo que temporariamente, na infecção de camundongos selvagens? Nossos dados sugerem que por um período considerável da infecção, 11 semanas, o IFN- $\gamma$  é dispensável. Apesar disso, é crucial para imunização em mecanismo dependente de iNOS e ainda deve ser alvo de interesse dos protocolos de imunização.

## 6 – CONCLUSÃO

Nossos dados mostram que de fato, o papel do IFN- $\gamma$  na infecção por *L. amazonensis* difere do usualmente encontrado para outros modelos de infecção. Nos tempos iniciais da doença parece estar envolvido com uma maior carga parasitária, porém é indispensável para um controle parcial, significativo, da lesão nos tempos finais da infecção; assim como para a eliminação do parasito nestes pontos. Camundongos IFN- $\gamma$   $-/-$  apresentam um balanço na expressão de iNOS e arginase I favorável para a eliminação do parasito. É possível que este balanço se reflita no desenvolvimento da lesão nestes animais, que só se torna maior que nos camundongos selvagens nos tempos finais da infecção. Uma baixa produção de IL-10, além da ausência do próprio IFN- $\gamma$ , também pode estar associada à favorável eliminação do parasito, uma vez que, oito semanas após a infecção, estes camundongos apresentam menor carga parasitária que os camundongos selvagens. A expressão de iNOS independente de IFN- $\gamma$  por um período tão prolongado de infecção é um dado novo e instigante, mas não elucidamos de que maneira esta expressão é induzida. Esta constatação nos aponta para a participação de fatores, citocinas ou quimiocinas, por exemplo, que podem estar relacionadas também com a imunomodulação observada nestes camundongos no que se refere à produção de IL-10 e expressão de arginase I. O papel do IFN- $\gamma$  para imunização por Leishvacin parece ser mais claro, é indispensável para o desenvolvimento da imunidade, em um mecanismo depende de iNOS. Por fim, nossos dados sugerem que um balanço entre produção de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$  pode ser crucial para o desenvolvimento de uma vacina eficaz que confira imunidade duradoura. Este balanço deve refletir em uma expressão contínua de iNOS e uma inibição da atividade de arginase I. A identificação dos fatores que compensam a ausência de IFN- $\gamma$  nos camundongos “knockout” pode ser uma ferramenta valiosa para a geração de protocolos de imunização que visem este equilíbrio.

## 7- BIBLIOGRAFIA

AFONSO, L. C.; SCHARTON, T. M.; VIEIRA, L. Q.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*, v. 263, n. 5144, p. 235-237, 1994

AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect.Immun.*, v. 61, n. 7, p. 2952-2959, 1993

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.*, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006

ANDERSON, C. F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J.Immunol.*, v. 174, n. 5, p. 2934-2941, 2005

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. *J.Exp.Med.*, v. 204, n. 2, p. 285-297, 2007

ARANHA, F. C.; RIBEIRO, U., Jr.; BASSE, P.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D. Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigote and macrophage infection. *Scand.J.Immunol.*, v. 62, n. 4, p. 334-341, 2005

ASSREUY, J.; CUNHA, F. Q.; EPPERLEIN, M.; NORONHA-DUTRA, A.; O'DONNELL, C. A.; LIEW, F. Y.; MONCADA, S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur.J.Immunol.*, v. 24, n. 3, p. 672-676, 1994

BAGGIOLINI, M.; BOULAY, F.; BADWEY, J. A.; CURNUTTE, J. T. Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *FASEB J.*, v. 7, n. 11, p. 1004-1010, 1993

BALESTIERI, F. M.; QUEIROZ, A. R.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M.; BARRAL-NETTO, M.; ABRAHAMSOHN, Ide A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes.Infect.*, v. 4, n. 1, p. 23-29, 2002

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A.; ELLINGSWORTH, L. R.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*, v. 257, n. 5069, p. 545-548, 1992

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 Trop.*, v. 60, n. 4, p. 237-250, 1996

BATES, P. A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp.Parasitol.*, v. 79, n. 2, p. 215-218, 1994

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int.J.Parasitol.*, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature*, v. 420, n. 6915, p. 502-507, 2002

BELOSEVIC, M.; DAVIS, C. E.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. Regulation of activated macrophage antimicrobial activities. Identification of lymphokines that cooperate with IFN-gamma for induction of resistance to infection. *J.Immunol.*, v. 141, n. 3, p. 890-896, 1988

BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D. S.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. IL-2. A cofactor for induction of activated macrophage resistance to infection. *J.Immunol.*, v. 145, n. 3, p. 831-839, 1990

BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D. S.; VAN DER MEIDE, P. H.; SLAYTER, M. V.; NACY, C. A. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J.Immunol.*, v. 143, n. 1, p. 266-274, 1989

BERMUDEZ, L. E.; STEVENS, P.; KOLONOSKI, P.; WU, M.; YOUNG, L. S. Treatment of experimental disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in mice with recombinant IL-2 and tumor necrosis factor. *J.Immunol.*, v. 143, n. 9, p. 2996-3000, 1989

BERMUDEZ, L. E.; YOUNG, L. S. Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN-gamma, is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J.Immunol.*, v. 140, n. 9, p. 3006-3013, 1988

BHATTACHARYYA, S.; GHOSH, S.; DASGUPTA, B.; MAZUMDER, D.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J.Infect.Dis.*, v. 185, n. 12, p. 1704-1708, 2002

BIEDERMANN, T.; ZIMMERMANN, S.; HIMMELRICH, H.; GUMY, A.; EGETER, O.; SAKRAUSKI, A. K.; SEEGMULLER, I.; VOIGT, H.; LAUNOIS, P.; LEVINE, A. D.; WAGNER, H.; HEEG, K.; LOUIS, J. A.; ROCKEN, M. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat.Immunol.*, v. 2, n. 11, p. 1054-1060, 2001

BOTELHO, A. C.; MAYRINK, W.; OLIVEIRA, R. C. Alterations in phenotypic profiles of peripheral blood cells from patients with human American cutaneous leishmaniasis following treatment with an antimonial drug and a vaccine. *Acta Trop.*, v. 112, n. 2, p. 143-148, 2009

BOUTARD, V.; HAVOUIIS, R.; FOUQUERAY, B.; PHILIPPE, C.; MOULINOX, J. P.; BAUD, L. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J.Immunol.*, v. 155, n. 4, p. 2077-2084, 1995

BUXBAUM, L. U. Type I IFNs promote the early IFN-gamma response and the IL-10 response in *Leishmania mexicana* infection. *Parasite Immunol.*, v. 32, n. 2, p. 153-160, 2010

CARDOSO, S. R.; DA SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S.; LIU, I. A.; FUJIWARA, R. T.; NASCIMENTO, E. Identification and purification of immunogenic proteins from nonliving promastigote polyvalent *Leishmania* vaccine (Leishvacin ). *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*, v. 36, n. 2, p. 193-199, 2003

CHATELAIN, R.; MAUZE, S.; VARKILA, K.; COFFMAN, R. L. *Leishmania major* infection in interleukin-4 and interferon-gamma depleted mice. *Parasite Immunol.*, v. 21, n. 8, p. 423-431, 1999

CHOI, B. S.; MARTINEZ-FALERO, I. C.; CORSET, C.; MUNDER, M.; MODOLELL, M.; MULLER, I.; KROPF, P. Differential impact of L-arginine deprivation on the activation and effector functions of T cells and macrophages. *J.Leukoc.Biol.*, v. 85, n. 2, p. 268-277, 2009

COELHO, E. A.; TAVARES, C. A.; CARVALHO, F. A.; CHAVES, K. F.; TEIXEIRA, K. N.; RODRIGUES, R. C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen,

are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect.Immun.*, v. 71, n. 7, p. 3988-3994, 2003

COLMENARES, M.; KIMA, P. E.; SAMOFF, E.; SOONG, L.; MCMAHON-PRATT, D. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect.Immun.*, v. 71, n. 6, p. 3172-3182, 2003

COLPITTS, S. L.; DALTON, N. M.; SCOTT, P. IL-7 receptor expression provides the potential for long-term survival of both CD62L<sup>high</sup> central memory T cells and Th1 effector cells during *Leishmania major* infection. *J.Immunol.*, v. 182, n. 9, p. 5702-5711, 2009

COOPER, A. M.; DALTON, D. K.; STEWART, T. A.; GRIFFIN, J. P.; RUSSELL, D. G.; ORME, I. M. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J.Exp.Med.*, v. 178, n. 6, p. 2243-2247, 1993

CORBETT, J. A.; KWON, G.; TURK, J.; MCDANIEL, M. L. IL-1 beta induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochemistry*, v. 32, n. 50, p. 13767-13770, 1993

CORRALIZA, I. M.; CAMPO, M. L.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J.Immunol.Methods*, v. 174, n. 1-2, p. 231-235, 1994

CORRALIZA, I. M.; SOLER, G.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE<sub>2</sub>) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 206, n. 2, p. 667-673, 1995

COURRET, N.; LANG, T.; MILON, G.; ANTOINE, J. C. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int.J.Parasitol.*, v. 33, n. 12, p. 1373-1383, 2003

DA COSTA, C. A.; AFONSO, L. C.; TOLEDO, V. P.; GUIMARAES, T. M.; NASCIMENTO, E.; TAVARES, C. A.; MAYRINK, W. Immune responses and protection induced in mice by an industrialized vaccine against American cutaneous leishmaniasis. *Parassitologia*, v. 34, n. 1-3, p. 45-51, 1992

DALTON, D. K.; PITTS-MEEK, S.; KESHAV, S.; FIGARI, I. S.; BRADLEY, A.; STEWART, T. A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*, v. 259, n. 5102, p. 1739-1742, 1993

DARNELL, J. E., Jr.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, v. 264, n. 5164, p. 1415-1421, 1994

DARRAH, P. A.; HEGDE, S. T.; PATEL, D. T.; LINDSAY, R. W.; CHEN, L.; ROEDERER, M.; SEDER, R. A. IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform. *J.Exp.Med.*, v. 207, n. 7, p. 1421-1433, 2010

DARRAH, P. A.; PATEL, D. T.; DE LUCA, P. M.; LINDSAY, R. W.; DAVEY, D. F.; FLYNN, B. J.; HOFF, S. T.; ANDERSEN, P.; REED, S. G.; MORRIS, S. L.; ROEDERER, M.; SEDER, R. A. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat.Med.*, v. 13, n. 7, p. 843-850, 2007

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin.Dermatol.*, v. 14, n. 5, p. 417-423, 1996

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.*, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004

DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; DONHAUSER, N.; LORENZ, E.; LASKAY, T.; MACMICKING, J.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSER, I.; BOGDAN, C. Type 1 interferon (IFN $\alpha$ / $\beta$ ) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity.*, v. 8, n. 1, p. 77-87, 1998

DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; ROLLINGHOFF, M.; YOKOYAMA, W. M.; BOGDAN, C. Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. *Science*, v. 284, n. 5416, p. 951-955, 1999

DULEU, S.; VINCENDEAU, P.; COURTOIS, P.; SEMBALLA, S.; LAGROYE, I.; DAULOUEDE, S.; BOUCHER, J. L.; WILSON, K. T.; VEYRET, B.; GOBERT, A. P. Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect. *J.Immunol.*, v. 172, n. 10, p. 6298-6303, 2004

EDWARDS, J. P.; ZHANG, X.; FRAUWIRTH, K. A.; MOSSER, D. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J.Leukoc.Biol.*, v. 80, n. 6, p. 1298-1307, 2006

FAVALI, C.; TAVARES, N.; CLARENCO, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKY, C. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *J.Leukoc.Biol.*, v. 82, n. 6, p. 1401-1406, 2007



FLAISHON, L.; TOPILSKI, I.; SHOSEYOV, D.; HERSHKOVIZ, R.; FIREMAN, E.; LEVO, Y.; MARMOR, S.; SHACHAR, I. Cutting edge: anti-inflammatory properties of low levels of IFN-gamma. *J.Immunol.*, v. 168, n. 8, p. 3707-3711, 2002

FLYNN, J. L.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K. J.; DALTON, D. K.; STEWART, T. A.; BLOOM, B. R. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J.Exp.Med.*, v. 178, n. 6, p. 2249-2254, 1993

FOULDS, K. E.; ROTTE, M. J.; SEDER, R. A. IL-10 is required for optimal CD8 T cell memory following Listeria monocytogenes infection. *J.Immunol.*, v. 177, n. 4, p. 2565-2574, 2006

GAJEWSKI, T. F.; GOLDWASSER, E.; FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. II. IFN-gamma inhibits the proliferation of murine bone marrow cells stimulated with IL-3, IL-4, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J.Immunol.*, v. 141, n. 8, p. 2635-2642, 1988

GAUR, U.; ROBERTS, S. C.; DALVI, R. P.; CORRALIZA, I.; ULLMAN, B.; WILSON, M. E. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 179, n. 12, p. 8446-8453, 2007

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; JAMES, S. L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J.Immunol.*, v. 148, n. 6, p. 1792-1796, 1992

GENARO, O.; DE TOLEDO, V. P.; DA COSTA, C. A.; HERMETO, M. V.; AFONSO, L. C.; MAYRINK, W. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. *Clin.Dermatol.*, v. 14, n. 5, p. 503-512, 1996

GIBSON-CORLEY, K. N.; BOGGIATTO, P. M.; MUKBEL, R. M.; PETERSEN, C. A.; JONES, D. E. A deficiency in the B cell response of C57BL/6 mice correlates with loss of macrophage-mediated killing of Leishmania amazonensis. *Int.J.Parasitol.*, v. 40, n. 2, p. 157-161, 2010

GICHERU, M. M.; OLOBO, J. O.; ANJILI, C. O.; ORAGO, A. S.; MODABBER, F.; SCOTT, P. Vervet monkeys vaccinated with killed Leishmania major parasites and interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection. *Infect.Immun.*, v. 69, n. 1, p. 245-251, 2001

GIORGIO, S.; LINARES, E.; ISCHIROPOULOS, H.; VON ZUBEN, F. J.; YAMADA, A.; AUGUSTO, O. In vivo formation of electron paramagnetic

resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infect.Immun.*, v. 66, n. 2, p. 807-814, 1998

GOBERT, A. P.; MCGEE, D. J.; AKHTAR, M.; MENDZ, G. L.; NEWTON, J. C.; CHENG, Y.; MOBLEY, H. L.; WILSON, K. T. Helicobacter pylori arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 98, n. 24, p. 13844-13849, 2001

GONZALEZ-LOMBANA, C. Z.; SANTIAGO, H. C.; MACEDO, J. P.; SEIXAS, V. A.; RUSSO, R. C.; TAFURI, W. L.; AFONSO, L. C.; VIEIRA, L. Q. Early infection with Leishmania major restrains pathogenic response to Leishmania amazonensis and parasite growth. *Acta Trop.*, v. 106, n. 1, p. 27-38, 2008

GRATCHEV, A.; KZHYSHKOWSKA, J.; KOTHE, K.; MULLER-MOLINET, I.; KANNOOKADAN, S.; UTIKAL, J.; GOERDT, S. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology*, v. 211, n. 6-8, p. 473-486, 2006

GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.*, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, 1990a

GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B., Jr.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J.Immunol.*, v. 144, n. 1, p. 278-283, 1990b

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J.Exp.Med.*, v. 169, n. 1, p. 59-72, 1989

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with Leishmania major. *J.Exp.Med.*, v. 177, n. 5, p. 1505-1509, 1993

HERNANDEZ SANABRIA, M. X.; AFONSO, L. C.; GOLGHER, D.; TAFURI, W. L.; VIEIRA, L. Q. CD8+ T cells are not required for vaccine-induced immunity against Leishmania amazonensis in IL-12/23P40(-/-) C57BL/6 mice. *Microbes.Infect.*, v. 9, n. 9, p. 1124-1134, 2007

HERNANDEZ, M. X.; BARCANTE, T. A.; VILELA, L.; TAFURI, W. L.; AFONSO, L. C.; VIEIRA, L. Q. Vaccine-induced protection against *Leishmania amazonensis* is obtained in the absence of IL-12/23p40. *Immunol.Lett.*, v. 105, n. 1, p. 38-47, 2006

HOLZMULLER, P.; CAVALEYRA, M.; MOREAUX, J.; KOVACIC, R.; VINCENDEAU, P.; PAPIEROK, G.; LEMESRE, J. L. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, v. 106, n. 3-4, p. 247-257, 2005

HOLZMULLER, P.; SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; MANGOT, I.; DAULOUEDE, S.; VINCENDEAU, P.; LEMESRE, J. L. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infect.Immun.*, v. 70, n. 7, p. 3727-3735, 2002

HOTEZ, P. J. One world health: neglected tropical diseases in a flat world. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 3, n. 4, p. e405-2009

IGARASHI, K.; GAROTTA, G.; OZMEN, L.; ZIEMIECKI, A.; WILKS, A. F.; HARPUR, A. G.; LARNER, A. C.; FINBLOOM, D. S. Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J.Biol.Chem.*, v. 269, n. 20, p. 14333-14336, 1994

INIESTA, V.; CARCELEN, J.; MOLANO, I.; PEIXOTO, P. M.; REDONDO, E.; PARRA, P.; MANGAS, M.; MONROY, I.; CAMPO, M. L.; NIETO, C. G.; CORRALIZA, I. Arginase I induction during *Leishmania* major infection mediates the development of disease. *Infect.Immun.*, v. 73, n. 9, p. 6085-6090, 2005

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; MOLANO, I.; MOHEDANO, A.; CARCELEN, J.; MIRON, C.; ALONSO, C.; CORRALIZA, I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.*, v. 24, n. 3, p. 113-118, 2002

JI, J.; MASTERSON, J.; SUN, J.; SOONG, L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J.Immunol.*, v. 174, n. 11, p. 7147-7153, 2005

JI, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 66, n. 4, p. 338-345, 2002

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect.Immun.*, v. 71, n. 8, p. 4278-4288, 2003

JONES, D. E.; ACKERMANN, M. R.; WILLE, U.; HUNTER, C. A.; SCOTT, P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect.Immun.*, v. 70, n. 4, p. 2151-2158, 2002

JONES, D. E.; BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J.Immunol.*, v. 165, n. 1, p. 364-372, 2000

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, 2001

KITADE, H.; SAKITANI, K.; INOUE, K.; MASU, Y.; KAWADA, N.; HIRAMATSU, Y.; KAMIYAMA, Y.; OKUMURA, T.; ITO, S. Interleukin 1 beta markedly stimulates nitric oxide formation in the absence of other cytokines or lipopolysaccharide in primary cultured rat hepatocytes but not in Kupffer cells. *Hepatology*, v. 23, n. 4, p. 797-802, 1996

KROPF, P.; FUENTES, J. M.; FAHNRICH, E.; ARPA, L.; HERATH, S.; WEBER, V.; SOLER, G.; CELADA, A.; MODOLELL, M.; MULLER, I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J.*, v. 19, n. 8, p. 1000-1002, 2005

LANGERMANS, J. A.; VAN DER HULST, M. E.; NIBBERING, P. H.; HIEMSTRA, P. S.; FRANSEN, L.; VAN, Furth R. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.*, v. 148, n. 2, p. 568-574, 1992

LEMOS, de Souza, V; ASCENCAO, Souza J.; CORREIA SILVA, T. M.; SAMPAIO, Tavares, V; RODRIGUES DE-FREITAS, L. A. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes.Infect.*, v. 2, n. 15, p. 1807-1815, 2000

LI, J.; HUNTER, C. A.; FARRELL, J. P. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *J.Immunol.*, v. 162, n. 2, p. 974-979, 1999

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J.Immunol.*, v. 145, n. 12, p. 4306-4310, 1990

LINDOSO, J. A.; COTRIM, P. C.; GOTO, H. Apoptosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigotes in hamsters infected with visceral leishmaniasis. *Int.J.Parasitol.*, v. 34, n. 1, p. 1-4, 2004

LIU, Y.; JANEWAY, C. A., Jr. Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *J.Exp.Med.*, v. 172, n. 6, p. 1735-1739, 1990

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951

LYKENS, J. E.; TERRELL, C. E.; ZOLLER, E. E.; DIVANOVIC, S.; TROMPETTE, A.; KARP, C. L.; ALIBERTI, J.; FLICK, M. J.; JORDAN, M. B. Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. *J.Immunol.*, v. 184, n. 2, p. 877-885, 2010

MACEDO, J. P. O papel do superóxido na infecção por *Leishmania amazonensis*. v. 1-78, 2010

MATTHEWS, D. J.; EMSON, C. L.; MCKENZIE, G. J.; JOLIN, H. E.; BLACKWELL, J. M.; MCKENZIE, A. N. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J.Immunol.*, v. 164, n. 3, p. 1458-1462, 2000

MATTNER, J.; SCHINDLER, H.; DIEFENBACH, A.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSER, I.; BOGDAN, C. Regulation of type 2 nitric oxide synthase by type 1 interferons in macrophages infected with *Leishmania major*. *Eur.J.Immunol.*, v. 30, n. 8, p. 2257-2267, 2000

MAYRINK, W.; SANTOS, G. C.; TOLEDO, Vde P.; GUIMARAES, T. M.; MACHADO-COELHO, G. L.; GENARO, O.; DA COSTA, C. A. Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous leishmaniasis using killed promastigotes of different strains and species of *Leishmania*. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*, v. 35, n. 2, p. 125-132, 2002

MENDEZ, S.; RECKLING, S. K.; PICCIRILLO, C. A.; SACKS, D.; BELKAID, Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J.Exp.Med.*, v. 200, n. 2, p. 201-210, 2004

MENON, J. N.; BRETSCHER, P. A. Characterization of the immunological memory state generated in mice susceptible to *Leishmania major* following exposure to low doses of *L. major* and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. *Eur.J.Immunol.*, v. 26, n. 1, p. 243-249, 1996

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J.; HILL, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J.Immunol.*, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000

MODOLELL, M.; CHOI, B. S.; RYAN, R. O.; HANCOCK, M.; TITUS, R. G.; ABEBE, T.; HAILU, A.; MULLER, I.; ROGERS, M. E.; BANGHAM, C. R.; MUNDER, M.; KROPF, P. Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 3, n. 7, p. e480-2009

MODOLELL, M.; CORRALIZA, I. M.; LINK, F.; SOLER, G.; EICHMANN, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur.J.Immunol.*, v. 25, n. 4, p. 1101-1104, 1995

MORAES, M. A.; SILVEIRA, F. T. [Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*]. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo*, v. 36, n. 5, p. 459-463, 1994

MORRIS, S. M., Jr.; BILLIAR, T. R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am.J.Physiol*, v. 266, n. 6 Pt 1, p. E829-E839, 1994

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.*, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008

MUKBEL, R.; PETERSEN, C. A.; JONES, D. E. Soluble factors from *Leishmania major*-specific CD4+T cells and B cells limit *L. amazonensis* amastigote survival within infected macrophages. *Microbes.Infect.*, v. 8, n. 9-10, p. 2547-2555, 2006

MUKBEL, R. M.; PATTEN, C., Jr.; GIBSON, K.; GHOSH, M.; PETERSEN, C.; JONES, D. E. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 76, n. 4, p. 669-675, 2007

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J.Immunol.*, v. 160, n. 11, p. 5347-5354, 1998

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MORAN, J. M.; CENTENO, F.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J.Immunol.*, v. 163, n. 7, p. 3771-3777, 1999

MUNDER, M.; MALLO, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J.Exp.Med.*, v. 187, n. 12, p. 2103-2108, 1998

MUNDER, M.; SCHNEIDER, H.; LUCKNER, C.; GIESE, T.; LANGHANS, C. D.; FUENTES, J. M.; KROPF, P.; MUELLER, I.; KOLB, A.; MODOLELL, M.; HO, A. D. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood*, v. 108, n. 5, p. 1627-1634, 2006

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J.Exp.Med.*, v. 189, n. 4, p. 741-746, 1999

MURRAY, H. W.; XIANG, Z.; MA, X. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 74, n. 6, p. 1013-1015, 2006

NACY, C. A.; MEIEROVICS, A. I.; BELOSEVIC, M.; GREEN, S. J. Tumor necrosis factor-alpha: central regulatory cytokine in the induction of macrophage antimicrobial activities. *Pathobiology*, v. 59, n. 3, p. 182-184, 1991

NEWPORT, M. J.; HUXLEY, C. M.; HUSTON, S.; HAWRYLOWICZ, C. M.; OOSTRA, B. A.; WILLIAMSON, R.; LEVIN, M. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N.Engl.J.Med.*, v. 335, n. 26, p. 1941-1949, 1996

NIEDBALA, W.; WEI, X. Q.; PIEDRAFITA, D.; XU, D.; LIEW, F. Y. Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells. *Eur.J.Immunol.*, v. 29, n. 8, p. 2498-2505, 1999

NOBEN-TRAUTH, N.; KROPF, P.; MULLER, I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science*, v. 271, n. 5251, p. 987-990, 1996

NOBEN-TRAUTH, N.; LIRA, R.; NAGASE, H.; PAUL, W. E.; SACKS, D. L. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J.Immunol.*, v. 170, n. 10, p. 5152-5158, 2003

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 7, n. 6, p. 425-428, 2007

OBERLIES, J.; WATZL, C.; GIESE, T.; LUCKNER, C.; KROPF, P.; MULLER, I.; HO, A. D.; MUNDER, M. Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase. *J.Immunol.*, v. 182, n. 9, p. 5259-5267, 2009

OKWOR, I.; KURIAKOSE, S.; UZONNA, J. Repeated inoculation of killed *Leishmania major* induces durable immune response that protects mice against virulent challenge. *Vaccine*, v. 2010

OKWOR, I.; LIU, D.; UZONNA, J. Qualitative differences in the early immune response to live and killed *Leishmania major*: Implications for vaccination strategies against Leishmaniasis. *Vaccine*, v. 27, n. 19, p. 2554-2562, 2009

OLIVEIRA, M. R.; TAFURI, W. L.; AFONSO, L. C.; OLIVEIRA, M. A.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, E. C.; SCOTT, P.; MELO, M. N.; VIEIRA, L. Q. Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. *Parasitology*, v. 131, n. Pt 4, p. 477-488, 2005

PADIGEL, U. M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J. P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J.Immunol.*, v. 171, n. 7, p. 3705-3710, 2003

PAKPOUR, N.; ZAPH, C.; SCOTT, P. The central memory CD4+ T cell population generated during *Leishmania major* infection requires IL-12 to produce IFN-gamma. *J.Immunol.*, v. 180, n. 12, p. 8299-8305, 2008

PETERS, W.; BRYCESON, A.; EVANS, D. A.; NEAL, R. A.; KAYE, P.; BLACKWELL, J.; KILLICK-KENDRICK, R.; LIEW, F. Y. *Leishmania* infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 8. The influence of prior infection with *Leishmania arabica* on challenge with *L. major* in man. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, v. 84, n. 5, p. 681-689, 1990



PINHEIRO, R. O.; PINTO, E. F.; LOPES, J. R.; GUEDES, H. L.; FENTANES, R. F.; ROSSI-BERGMANN, B. TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes.Infect.*, v. 7, n. 13, p. 1317-1323, 2005

PINHEIRO, R. O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 1, p. 79-82, 2007

PINTO, E. F.; DE MELLO, Cortezia M.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, v. 21, n. 25-26, p. 3534-3541, 2003

PRINA, E.; ABDI, S. Z.; LEBASTARD, M.; PERRET, E.; WINTER, N.; ANTOINE, J. C. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J.Cell Sci.*, v. 117, n. Pt 2, p. 315-325, 2004

QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect.Immun.*, v. 72, n. 2, p. 988-995, 2004

QI, H.; POPOV, V.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. *J.Immunol.*, v. 167, n. 8, p. 4534-4542, 2001

RAMER, A. E.; VANLOUBBEECK, Y. F.; JONES, D. E. Antigen-responsive CD4+ T cells from C3H mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* are impaired in the transition to an effector phenotype. *Infect.Immun.*, v. 74, n. 3, p. 1547-1554, 2006

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect.Dis.*, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007

ROBERTS, S. C.; TANCER, M. J.; POLINSKY, M. R.; GIBSON, K. M.; HEBY, O.; ULLMAN, B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J.Biol.Chem.*, v. 279, n. 22, p. 23668-23678, 2004

RODRIGUEZ, P. C.; ZEA, A. H.; DESALVO, J.; CULOTTA, K. S.; ZABALETA, J.; QUICENO, D. G.; OCHOA, J. B.; OCHOA, A. C. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J.Immunol.*, v. 171, n. 3, p. 1232-1239, 2003

RONET, C.; HAUYON-LA, Torre Y.; REVAZ-BRETON, M.; MASTELIC, B.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOUIS, J.; LAUNOIS, P. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J.Immunol.*, v. 184, n. 2, p. 886-894, 2010

ROSA, F. M.; COCHET, M. M.; FELLOUS, M. Interferon and major histocompatibility complex genes: a model to analyse eukaryotic gene regulation? *Interferon*, v. 7, n. 47-87, 1986

SAD, S.; MARCOTTE, R.; MOSMANN, T. R. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity.*, v. 2, n. 3, p. 271-279, 1995

SADICK, M. D.; HEINZEL, F. P.; HOLADAY, B. J.; PU, R. T.; DAWKINS, R. S.; LOCKSLEY, R. M. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J.Exp.Med.*, v. 171, n. 1, p. 115-127, 1990

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.*, v. 155, n. 3, p. 1151-1164, 1995

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; FORSTER, R.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, v. 401, n. 6754, p. 708-712, 1999

SANABRIA, M. X.; VARGAS-INC; XIN, L.; SOONG, L. Role of natural killer cells in modulating dendritic cell responses to *Leishmania amazonensis* infection. *Infect.Immun.*, v. 76, n. 11, p. 5100-5109, 2008

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J.Exp.Med.*, v. 178, n. 2, p. 567-577, 1993

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J.Exp.Med.*, v. 168, n. 5, p. 1675-1684, 1988

SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. *J.Immunol.*, v. 139, n. 1, p. 221-227, 1987

SILVA, Sde O.; WU, A. A.; EVANS, D. A.; VIEIRA, L. Q.; MELO, M. N. Leishmania sp. isolated from human cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil characterized as Leishmania major-like. *Acta Trop.*, v. 112, n. 3, p. 239-248, 2009

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, v. 236, n. 4804, p. 944-947, 1987

SODHI, A.; SINGH, R. K.; PAI, K. Activation of murine macrophages by tumor necrosis factor, interleukin-1, interferon-gamma and cisplatin. *Immunol.Lett.*, v. 26, n. 1, p. 45-50, 1990

SOONG, L.; CHANG, C. H.; SUN, J.; LONGLEY, B. J., Jr.; RUDDLE, N. H.; FLAVELL, R. A.; MCMAHON-PRATT, D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with Leishmania amazonensis infection. *J.Immunol.*, v. 158, n. 11, p. 5374-5383, 1997

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to Leishmania major. *J.Exp.Med.*, v. 180, n. 3, p. 783-793, 1994

STEVENSON, M. M.; TAM, M. F.; WOLF, S. F.; SHER, A. IL-12-induced protection against blood-stage Plasmodium chabaudi AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J.Immunol.*, v. 155, n. 5, p. 2545-2556, 1995

STOBER, C. B.; LANGE, U. G.; ROBERTS, M. T.; ALCAMI, A.; BLACKWELL, J. M. IL-10 from regulatory T cells determines vaccine efficacy in murine *Leishmania major* infection. *J.Immunol.*, v. 175, n. 4, p. 2517-2524, 2005

STOBIE, L.; GURUNATHAN, S.; PRUSSIN, C.; SACKS, D. L.; GLAICHENHAUS, N.; WU, C. Y.; SEDER, R. A. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 97, n. 15, p. 8427-8432, 2000

STOUT, R. D.; JIANG, C.; MATTA, B.; TIETZEL, I.; WATKINS, S. K.; SUTTLES, J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J.Immunol.*, v. 175, n. 1, p. 342-349, 2005

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, v. 240, n. 4851, p. 516-518, 1988

SWAIN, S. L.; HU, H.; HUSTON, G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science*, v. 286, n. 5443, p. 1381-1383, 1999

SWIHART, K.; FRUTH, U.; MESSMER, N.; HUG, K.; BEHIN, R.; HUANG, S.; DEL, Giudice G.; AGUET, M.; LOUIS, J. A. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *J.Exp.Med.*, v. 181, n. 3, p. 961-971, 1995

SYPEK, J. P.; CHUNG, C. L.; MAYOR, S. E.; SUBRAMANYAM, J. M.; GOLDMAN, S. J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S. F.; SCHAUB, R. G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J.Exp.Med.*, v. 177, n. 6, p. 1797-1802, 1993

TAUB, D. D.; COX, G. W. Murine Th1 and Th2 cell clones differentially regulate macrophage nitric oxide production. *J.Leukoc.Biol.*, v. 58, n. 1, p. 80-89, 1995

TESHIMA, S.; NAKANISHI, H.; NISHIZAWA, M.; KITAGAWA, K.; KAIBORI, M.; YAMADA, M.; HABARA, K.; KWON, A. H.; KAMIYAMA, Y.; ITO, S.; OKUMURA, T. Up-regulation of IL-1 receptor through PI3K/Akt is essential for the induction of iNOS gene expression in hepatocytes. *J.Hepatol.*, v. 40, n. 4, p. 616-623, 2004

TORRICO, F.; HEREMANS, H.; RIVERA, M. T.; VAN, Marck E.; BILLIAU, A.; CARLIER, Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute

Trypanosoma cruzi infection in mice. *J.Immunol.*, v. 146, n. 10, p. 3626-3632, 1991

VANLOUBBEECK, Y. F.; RAMER, A. E.; JIE, F.; JONES, D. E. CD4+ Th1 cells induced by dendritic cell-based immunotherapy in mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* do not promote healing. *Infect.Immun.*, v. 72, n. 8, p. 4455-4463, 2004

VASQUEZ, R. E.; SOONG, L. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. *Infect.Immun.*, v. 74, n. 12, p. 6769-6777, 2006

VERAS, P.; BRODSKYN, C.; BALESTIERI, F.; FREITAS, L.; RAMOS, A.; QUEIROZ, A.; BARRAL, A.; BEVERLEY, S.; BARRAL-NETTO, M. A dhfr-ts-*Leishmania major* knockout mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 4, p. 491-496, 1999

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect.Immun.*, v. 62, n. 11, p. 5177-5182, 1994

WANASEN, N.; MACLEOD, C. L.; ELLIES, L. G.; SOONG, L. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *Infect.Immun.*, v. 75, n. 6, p. 2802-2810, 2007

WANASEN, N.; XIN, L.; SOONG, L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int.J.Parasitol.*, v. 38, n. 3-4, p. 417-429, 2008

WANG, Z. E.; REINER, S. L.; ZHENG, S.; DALTON, D. K.; LOCKSLEY, R. M. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J.Exp.Med.*, v. 179, n. 4, p. 1367-1371, 1994

WEI, X. Q.; CHARLES, I. G.; SMITH, A.; URE, J.; FENG, G. J.; HUANG, F. P.; XU, D.; MULLER, W.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, v. 375, n. 6530, p. 408-411, 1995

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol.Immunol.*, v. 45, n. 12, p. 3371-3382, 2008

XIN, L.; LI, Y.; SOONG, L. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD45RB- dendritic cell subset and priming Leishmania amazonensis-specific CD4+ T cells in vitro and in vivo. *Infect.Immun.*, v. 75, n. 10, p. 5018-5026, 2007

YAMEY, G.; TORREELE, E. The world's most neglected diseases. *BMJ*, v. 325, n. 7357, p. 176-177, 2002

YANG, Z.; MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of the MAPK, ERK, following Leishmania amazonensis infection of macrophages. *J.Immunol.*, v. 178, n. 2, p. 1077-1085, 2007

ZANIN, F. H.; COELHO, E. A.; TAVARES, C. A.; MARQUES-DA-SILVA, E. A.; SILVA COSTA, M. M.; REZENDE, S. A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against Leishmania chagasi and Leishmania amazonensis experimental infections. *Microbes.Infect.*, v. 9, n. 9, p. 1070-1077, 2007

ZAPH, C.; UZONNA, J.; BEVERLEY, S. M.; SCOTT, P. Central memory T cells mediate long-term immunity to Leishmania major in the absence of persistent parasites. *Nat.Med.*, v. 10, n. 10, p. 1104-1110, 2004