

RESUMO

O desenvolvimento adequado da resposta imune é essencial para a resistência do hospedeiro contra microorganismos invasores. Neste trabalho, demonstramos que a combinação de diferentes TLRs é necessária para um reconhecimento adequado do patógeno e uma resposta imune em níveis ótimos com alta produção de IFN- e óxido nítrico (NO). NO é considerado o mais importante anti-microbiano induzido por IFN- na resistência a *L. major* e *T. cruzi*. Entretanto, recentemente Cummings et al (2004) demonstraram que enquanto camundongos deficientes para IFN- (*ifn- KO*) são extremamente susceptíveis ao *T. cruzi*, camundongos deficientes para NOS2 (*nos2 KO*) são resistentes. Resultados semelhantes podem também ser observados na leishmaniose, nossos dados demonstram que animais *ifn- KO* morrem com 11 semanas após a infecção com *L. major*, enquanto animais *nos2 KO* sobrevivem por até 30 semanas de acompanhamento. Além disso, a patologia e a visceralização do parasita para o fígado e baço foram muito mais graves nos camundongos *ifn- KO* quando comparados aos camundongos *nos2 KO*. Tais resultados claramente demonstram que, semelhante à infecção por *T. cruzi*, mecanismos adicionais induzidos por IFN- são importantes para o controle da *L. major*. Assim, o papel de ROS foi estudado como um possível mecanismo complementar na imunidade a *L. major* e *T. cruzi*. Em nenhum desses modelos a ação de ROS na contenção da replicação parasitária foi considerada relevante. Todavia, nossos resultados sugerem que ROS podem ter um papel na restrição dos efeitos sistêmicos do NO induzido na infecção por *T. cruzi*. Nós demonstramos que animais deficientes para NADPH oxidase (*phox KO*) atingiam 100% de mortalidade até o dia 21 após a infecção apresentando um controle adequado no parasitismo nos tecidos e no sangue, níveis aumentados de NO no soro e instabilidade pressórica, embora os mecanismos envolvidos com a susceptibilidade dos animais *phox KO* ante a infecção com *T. cruzi* ainda estejam em estudo. Estudos adicionais demonstraram que as recentemente descritas p47GTPases, uma famílias de proteínas induzidas por IFNs, podem ser o elo entre a imunidade dependente de IFN- e independente de NO a tais parasitas. Animais selvagens (WT) e *nos2 KO* infectados com *L. major* expressam níveis bem mais altos de LRG-47, IRG-47 e IGTP na pata, linfonodo, baço e fígado que aqueles apresentados por camundongos *ifn- KO*. Encontramos também que LRG-47 tem sua expressão aumentada durante a infecção por *T. cruzi*. Para melhor investigar o papel da LRG-47 a tal patógeno, infectamos camundongos WT e LRG-47 KO com 1000 formas tripomastigotas e avaliamos a parasitemia, sobrevivência e resposta imuno-patológica. Os animais LRG-47 KO apresentaram uma parasitemia muito próxima ao selvagem até o dia 12 de infecção com a perda do controle do parasita no sangue após essa data. O aumento do parasitismo sanguíneo esteve associado a mortalidade de 100% até o dia 19 após a infecção. Apesar disso, os animais LRG-47 KO exibiram resposta pró-inflamatória preservada ao longo da infecção. Estudos *in vitro* revelaram que macrófagos deficientes em LRG-47 apresentavam uma capacidade reduzida de matar o *T. cruzi* até mesmo quando estimulados com IFN-. Tal deficiência, entretanto, não esteve associada a uma expressão prejudicada de TNF ou NOS2. A inibição de NOS2 em macrófagos LRG-47 KO e o silenciamento genético de LRG-47 em macrófagos NOS2 KO revelaram que ambos mecanismos são independentes. Assim, sugerimos que cooperam para uma ótima resposta induzida por IFN- no controle da replicação do parasita.

ABSTRACT

An adequate immune response is essential for optimal host resistance against invading microorganisms. Here we show that a combination of different Toll Like Receptors (TLRs) are required for adequate recognition of pathogen and optimal immune response with high production of IFN- and nitric oxide (NO). NO is considered the major IFN--induced killing agent against *L. major* and *T. cruzi* and its production depends on adequate immune response activation through a combination of different Toll Like Receptors. Recently, new data challenged such assertion. Cummings et al (2004) showed that while IFN- deficient (KO) mice are extremely susceptible to *T. cruzi*, NOS2 deficient KO mice can be resistant. Similar results can be also observed in leishmaniasis, we found that IFN- KO animals died 11 weeks after infection with *L. major*, while NOS2 KO mice survived up to 30 weeks. In addition, pathology and visceralization of parasites were dramatic in IFN- KO mice, with high levels of tissue parasitism in liver and spleen, sites barely affected in NOS2 KO. Such results clearly demonstrate that, similarly to infection with *T. cruzi*, additional IFN--induced mechanisms are important to control *L. major*. ROS was investigated as a possible mechanism associated to NO in inducing host resistance to *L. major* or *T. cruzi*, but in none of these parasites, ROS was found to play major role in containment of parasite replication. However, our results suggest that ROS may have a role in restricting systemic effects of high levels of NO induced by *T. cruzi* infection since *phox* KO animals displayed 100% of mortality till day 21 post-infection. Such mortality was found to be associated to a good control of parasite in tissues and blood, and augmented levels of NO in serum. The mechanisms involved in enhanced susceptibility of *phox* KO mice to *T. cruzi* infection are still under investigation. Our further investigation demonstrates that recently described IFN--induced p47GTPases might be the connecting key between IFN--dependent and NO-independent effector mechanisms. Infected wild-type (WT) and NOS2 KO mice were found to express higher levels of LRG-47, IRG and IGTP in the footpad, lymph node, spleen and liver than IFN- KO animals. Coherently, unpublished data by Belkaid et al. show that both LRG-47 KO and IGTP KO mice are highly susceptible to *L. major*. We also found LRG-47 was up regulated in the spleen during *T. cruzi* infection. To better investigate the role of p47GTPase LRG-47 in response this pathogen, we infected WT and LRG-47 KO animals with 100 blood trypomastigotes and evaluated parasitemia, survival and immune-pathologic responses. LRG-47 KO mice displayed almost similar parasitemia to WT control till 12 days of infection. Thereafter, control of parasites in the blood and tissues was lost in LRG-47 KO mice. This enhanced parasitism was associated with 100% of mortality at day 19 of infection. LRG-47 KO mice exhibited unimpaired inflammatory responses throughout the infection. In vitro studies revealed that LRG-47-deficient macrophages present impaired killing of *T. cruzi* even when stimulated with IFN- and that such deficiency was not associated with reduced TNF or NOS2 expression. Inhibition of NOS2 in LRG-47 KO macrophages and gene silencing LRG-47 expression in NOS2 deficient macrophages revealed that both mechanisms are independent of each other. We suggest that both mechanisms cooperate for optimal IFN--induced control of parasite replication.