

Vanessa Martins Ferreira

**ASPECTOS HISTOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E  
IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR  
*Leishmania (Leishmania) major* NO MODELO DE  
IMPLANTE DE PARAFINA EM CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte  
2008

Vanessa Martins Ferreira

**ASPECTOS HISTOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E  
IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR  
*Leishmania (Leishmania) major* NO MODELO DE  
IMPLANTE DE PARAFINA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia

Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr Wagner Luiz Tafuri

Colaboradores:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Leda Q. Vieira

Departamento de Bioquímica e Imunologia – Instituto de Ciências Biológicas / UFMG

Prof. Dr. David Mosser

Department of Cell Biology and Molecular Genetics – University of Maryland - USA

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Belo Horizonte

2008

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental (NIPE) do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

*“Seja qual for o seu sonho, comece. Ousadia tem genialidade, poder e magia.”*

J.W. von Goethe

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida;

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo e Luíza pelas alegrias;

Ao Fábio, por ser assim, tão essencial para mim;

Aos meus sogros Geraldo e Romilda e meu cunhado Fabrício pela torcida;

Ao meu orientador Wagner L. Tafuri, pelo apoio, encorajamento e disponibilidade;

À professora Leda Q.Vieira pela colaboração;

À professora Denise, pelo acolhimento e aconselhamentos;

Ao prof. David Mosser, Ricardo Gonçalves e Xia Zhang pela valiosa colaboração na realização do qRT- PCR;

Aos colegas do NIPE;

Aos meus queridos amigos: Maria, Sandra, Luana, Mirna, Frank, Marta, Maria Letícia, Eliane, Cláudia, sem vocês, nem sei...

Aos colegas do Depto de Bioquímica e Imunologia: Cláudia, Juan, Virgínia e Fernanda;

Às técnicas pelo apoio: Vânia, Olinda, Jaqueline, Lucélia;

Ao Wanderson, pela oportunidade e apoio;

Aos colegas e professores da Pós-Graduação em Patologia que estiveram presentes nessa caminhada;

À Universidade Federal de Minas Gerais por ter possibilitado esse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	viii
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	ix.
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>SUMMARY</b> .....	xii
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1. Modelo murino e perfis imunológicos .....	15
1.1.1 – As quimiocinas.....	17
1.2. Modelo Parafina: abordagem para estudo da inflamação crônica associada à infecção por <i>L.major</i> .....	22
<b>2 – OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 – Objetivo geral .....	25
2.2 – Objetivos Específicos .....	25
<b>3 – METODOLOGIA</b> .....	26
3.1 – Parasitos .....	26
3.2 – Animais .....	26
3.3 – Confeção dos tabletes de parafina .....	27
3.4 – Implante dos tabletes de parafina .....	27
3.5 – Protocolo Experimental .....	27
3.6 – Coleta, processamento do material e análise histológica .....	28
3.7 – Quantificação do parasitismo tecidual .....	28
3.8 – Quantificação do acúmulo de macrófagos teciduais por medida da atividade da enzima N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).....	29
3.9 – Dosagem de quimiocina por ELISA .....	30
3.10 – Expressão de citocinas e quimiocinas por qRT-PCR .....	31

3.10.1 – Extração de RNAm .....	31
3.10.2 – Síntese de DNAc por reação de transcrição reversa .....	32
3.10.3 – Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RT-PCR).....	32
3.11 – Testes estatísticos .....	34
3.12 – Comitê de Ética .....	34
<b>4 – RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
4.1 – Análise histológica .....	35
4.2 – Quantificação de parasitos .....	37
4.3 – Dosagem de NAG .....	39
4.4 – Análise da expressão de citocinas e quimiocinas por qRT-PCR .....	41
4.5 – Dosagem de quimiocinas pelo método de ELISA .....	46
<b>5 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>6 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida <i>Leishmania major</i> .....	14
Figura 2: Tablete de parafina .....	27
Figura 3: Modelo esquemático da metodologia aplicada .....	28
Figura 4: Aspectos histológicos da pele e cápsula inflamatória de camundongos BALB/c e C57BL/6 .....	36



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: As quimiocinas .....	19
Quadro 2: Receptores, principais ligantes e funções biológicas das quimiocinas .....	20
Quadro 3: Lista de primers utilizados para PCR quantitativo em tempo real ...	33

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Quantificação de parasitos na pele infectada por <i>L. major</i> associado a implante de parafina em camundongos BALB/c e C57BL/6.....	38
<b>Gráfico 2:</b> Quantificação de parasitos na cápsula inflamatória após implante de parafina e infecção experimental com <i>L. major</i> em camundongos BALB/c e C57BL/6 .....	38
<b>Gráfico 3:</b> Avaliação da cinética do recrutamento de macrófagos na pele e na cápsula inflamatória de animais C57BL/6.....	40
<b>Gráfico 4:</b> Expressão de RNAm das citocinas IL-4, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ das peles de camundongos C57BL/6 e BALB/c.....	42
<b>Gráfico 5:</b> Expressão de RNAm das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10 das peles de camundongos C57BL/6 e BALB/c .....	43
<b>Gráfico 6:</b> Expressão de RNAm das citocinas IL-4, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ das cápsulas inflamatórias de camundongos C57BL/6 e BALB/c .....	44
<b>Gráfico 7:</b> Expressão de RNAm das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10 das cápsulas inflamatórias de animais C57BL/6 e BALB/c .....	45
<b>Gráfico 8:</b> Cinética da produção da quimiocina RANTES/CCL5 nas cápsulas inflamatórias de animais C57BL/6 .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS- 2,2'-azino-bis-etilbentiazolina

APC – células apresentadoras de antígeno

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HETAB – hexadecil trimetilamônio bromídeo

IFN- $\gamma$  - interferon gama

IL – interleucina

iNOS – óxido nítrico sintetase induzida

IP-10 - Proteína induzível por interferon

*L.major* - *Leishmania major*

LACK – receptor homólogo de *Leishmania* para ativação da proteína quinase C

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

LVA – Leishmaniose visceral americana

MCP-1 – proteína quimiotática para macrófagos/monócitos

MIG – monoquina induzida por interferon gama

MIP-1 $\alpha$  - proteína inflamatória de macrófagos alfa

NAG - N-acetil- $\beta$ -D- glicosaminidase

NK – células natural killer

NO – óxido nítrico

PBS – tampão fosfato-salina

qRT-PCR / RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real

RANTES - regulated upon activation normal T cell expressed and secreted

SDS – dodecil sulfato de sódio

SMM – Sistema monocítico mononuclear

Th – linfócitos T helper

TNF- $\alpha$ - fator de necrose tumoral alfa

## RESUMO

O modelo de implante de parafina associado à infecção por *L. major*, no tecido subcutâneo de camundongos C57BL/6, é capaz de induzir um quadro de inflamação crônica com intensificação do parasitismo. O objetivo desse trabalho foi o de investigar se há mudanças do perfil imunológico (de Th1 para Th2) nesses animais. Camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram divididos em três grupos distintos (n=5/grupo), sendo que o primeiro grupo (L+P) recebeu o implante de parafina no subcutâneo associado à infecção experimental por *L. major*; o segundo grupo (P) recebeu apenas o implante de parafina e o terceiro grupo (L) recebeu apenas o inóculo de *L. major*. Amostras de pele e cápsula inflamatória foram obtidas após 07, 21 e 30 dias. No grupo L+P, após 07 dias, os fragmentos de pele de todos os animais apresentaram uma discreta reação inflamatória crônica e difusa, com formação de tecido de granulação adjacente (cápsula inflamatória). Após 21 dias, houve intensificação dessa inflamação bem como do parasitismo. Os grupos L e P mostraram reações inflamatórias cutâneas qualitativamente semelhantes, mas com menor intensidade. O aumento da detecção de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) aos 21 dias pós-infecção na cápsula inflamatória não foi associada a uma queda do parasitismo. O aumento da expressão da citocina IL-10 nas cápsulas e peles de animais C57BL/6, no grupo L+P, coincidiu com o pico do parasitismo tecidual, apesar da alta expressão de IFN- $\gamma$ . Assim, células T reguladoras (Treg) podem ser a fonte de IL-10, devido a grande expressão de quimiocina CXCL9 na cápsula inflamatória desses animais. A maior expressão da quimiocina CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) em relação a CCL2 (MCP-1) poderia estar associado ao pico de parasitismo observado nesse intervalo de tempo. Concluímos que não houve alteração do perfil imunológico de Th1 para Th2, nos animais C57BL/6 que apresentaram quadro histológico semelhante ao de animais BALB/c.

## SUMMARY

The paraffin-tablets implantation associated to an experimental *L. major* infection, in the subcutaneous tissue of C57BL/6 mice, is able to produce a chronic inflammatory reaction associate to an increment of the parasitism. The aim of this work was to investigate possible modifications in the immune response (Th1 towards to Th2 response) in C57BL/6 mice. BALB/c and C57BL/6 mice were divided in three groups (n=5 in each group). The first one (L+P) received the paraffin-tablets implantation associated to an experimental infection with *L. major*; the second group (P) received only the implantation and the group 3 (L) received only the parasites. Fragments of dorsal skin tissue and inflammatory capsule were obtained after 07, 21 and 30 days post-infection. In the L+P group, 07 days post-infection, the skin fragments showed a diffuse chronic inflammatory reaction with granulomatous tissue formation (inflammatory capsule). After 21 days, the chronic inflammatory response and the parasite tissue load were higher than 07 days. The groups L and P showed the same histological picture, but the intensity was lower intense than observed in the group L+P. The N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) enzyme activity was higher in 21 days in the inflammatory capsule obtained from C57BL/6 mice, but it was not directly related to a lower parasite load. In despite of IFN-gamma production, a higher IL-10 expression was detected at the same time of the parasite load pick (21 days) in both skin and inflammatory capsule of C57BL/6 animals (L+P group). Thus, regulatory T lymphocytes might be a candidate for IL-10 production, because higher levels of the CXCL9 chemokine expression were detected in inflammatory capsule of these animals. The expression levels of CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) was higher than CCL2 (MCP-1) ant it is could be indicating a strict correlation to the parasite load pick observed at 21 days. We have concluded that C57BL/6 Th1 immune response did not toward to the Th2 response, besides C57BL/6 animals presented the same histological picture of the BALB/c animals.

## 1 - INTRODUÇÃO

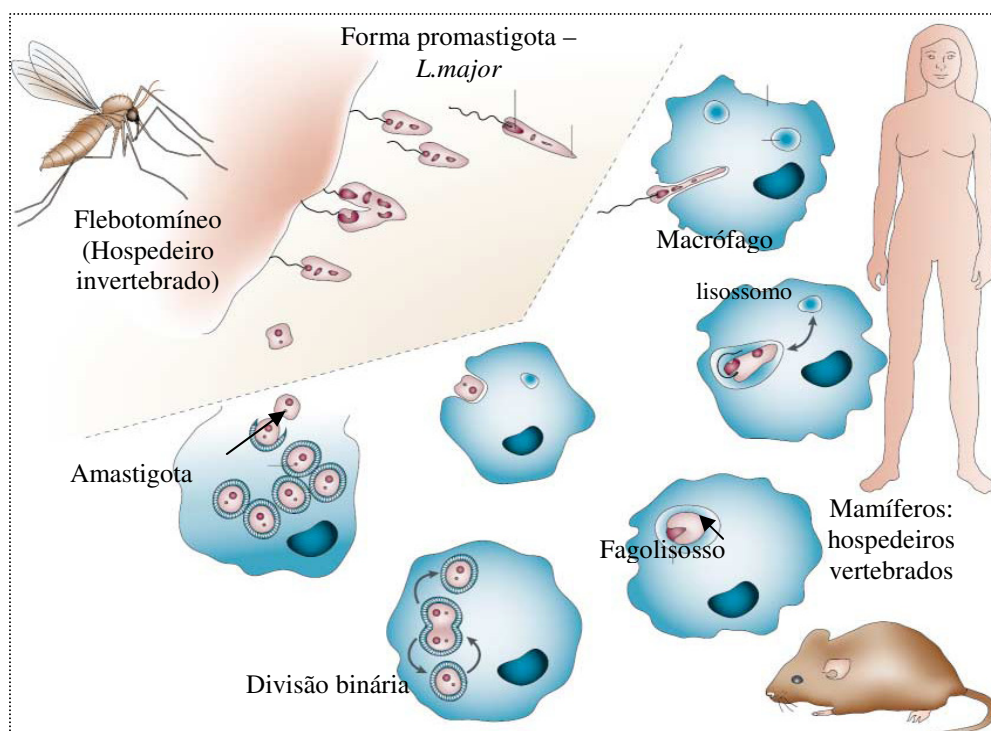
As leishmanioses apresentam distribuição mundial, concentrando-se principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta e são um grave problema de saúde pública causando lesões cutâneas desfigurantes ou formas viscerais fatais caso não tratadas adequadamente. Estima-se que mais de 12 milhões de pessoas estão contaminadas e cerca de 2 milhões de novos casos ocorram anualmente (WHO, 2005). Acredita-se que os dados epidemiológicos oficiais sobre as leishmanioses sejam subestimados devido a erros de diagnóstico, grande número de casos de indivíduos assintomáticos e ainda pelo fato de apenas 32 dos 88 países endêmicos declararem os casos compulsoriamente (PHO, 2007).

Nas últimas décadas, o número de casos tem aumentado significativamente devido a alguns fatores como: (1) controle inadequado dos reservatórios e vetores dos parasitos, (2) aumento da detecção da leishmaniose associada a infecções oportunistas (por exemplo, em paciente com síndrome da imunodeficiência adquirida – AIDS), (3) urbanização e desflorestamentos, resistência a drogas leishmanicidas, pobreza, conflitos armados (mais de 600 soldados americanos contraíram leishmaniose no Iraque desde 2003) e turismo (o número de ingleses viajantes diagnosticados com leishmaniose quadruplicou nos últimos dez anos) (Reithinger; Dujardin, 2007).

O gênero *Leishmania* (Família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida) agrupa espécies de protozoários parasitos unicelulares digenéticos, apresentando formas biológicas morfologicamente distintas no seu ciclo de vida – amastigotas e promastigotas. As amastigotas são formas intracelulares obrigatórias que parasitam células do sistema monocítico-mononuclear (SMM), preferencialmente macrófagos, do hospedeiro vertebrado mamífero (roedores, canídeos, bichos-preguiça, humanos). As formas promastigotas, flageladas e móveis, desenvolvem-se no meio extracelular do trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, insetos flebotomíneos. Essas, por sua vez, adquirem aspectos morfológicos e fisiológicos distintos ao passar por regiões anatômicas definidas do tubo gastrointestinal dos flebotomíneos. As formas promastigotas procíclicas diferenciam-se no intestino anterior do flebotomíneo e não são infectantes. Essas se transformam em promastigotas

metacíclicas e migram para a região anterior do intestino e aparelho bucal do inseto e são as responsáveis pela infecção no hospedeiro vertebrado (Almeida et al., 2003).

Assim, durante o repasto sangüíneo, fêmeas de flebotomíneos infectadas (gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no novo Mundo) regurgitam as promastigotas metacíclicas infectantes associadas a mais um elemento biológico, a saliva do inseto vetor, que contém uma série de substâncias farmacologicamente ativas (anticoagulantes, anti-plaquetárias, vasodilatadoras, moléculas imunoreguladoras e antiinflamatórias) que alteram a resposta imune do hospedeiro vertebrado, favorecendo o estabelecimento da infecção (Andrade et al., 2007). Uma vez internalizadas pelos macrófagos, as promastigotas transformam-se em amastigotas que se multiplicam por divisão binária. Os flebotomíneos, por sua vez, contaminam-se ao ingerir macrófagos com amastigotas durante hematofagia em mamíferos infectados, continuando o ciclo de vida do parasito (Figura 1). Ao contrário das formas promastigotas que infectam primariamente macrófagos, as formas amastigotas de *Leishmania* podem aderir e infectar outras células do hospedeiro, como neutrófilos (van Zandbergen et al., 2004) e fibroblastos (Bogdan et al., 2000).



**Figura 1:** Ciclo de vida *Leishmania major* (Sacks; Noben-Trauth, 2002)

Nas Américas (Novo Mundo), países como Brasil, Colômbia, Paraguai, Venezuela, Panamá, Equador e Peru são os mais afetados (PHO, 2007). No Brasil, as leishmanioses têm ampla distribuição geográfica, sendo a região Nordeste a mais afetada, com 92% dos casos notificados. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) está presente em praticamente todos os estados brasileiros e a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) tem sido diagnosticada em 19 estados (Luz et al., 2001). A LVA, também conhecida como calazar, acomete principalmente órgãos como fígado, baço e medula óssea, sendo geralmente fatal quando não tratada. A LTA inclui uma variedade de formas que são classificadas de acordo com aspectos clínicos e patológicos: (1) leishmaniose cutânea, caracterizada por lesões localizadas e, às vezes, auto-resolutivas; (2) leishmaniose muco-cutânea, com lesões ulcerativas e destrutivas das mucosas (nariz, boca e garganta); (3) leishmaniose cutânea difusa, caracterizada por lesões não ulcerativas (Grimaldi; Tesh, 1993) e (4) leishmaniose cutânea disseminada, caracterizada pela presença de lesões ulcerativas distribuídas por todo o organismo (Sousa et al., 2006).

### 1.1 - Modelo Murino e Perfis imunológicos

O modelo experimental murino para estudos da leishmaniose cutânea humana tem sido muito utilizado para elucidar os mecanismos patogênicos da doença, estratégia importante na busca de novas abordagens terapêuticas (Sacks; Noben-Trauth, 2002). A partir desses estudos, foi possível identificar os perfis imunológicos geneticamente determinados, de acordo com a produção de determinados padrões de citocinas nos momentos iniciais da infecção experimental.

Citocinas são proteínas envolvidas na comunicação entre linfócitos T, macrófagos e outras células fundamentais na elaboração da resposta imune adaptativa. As citocinas direcionam a diferenciação dos linfócitos T helper (Th) CD4+ durante a infecção por *L. major* em células do tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) assim classificadas de acordo com o padrão de citocinas que secretam. Assim, células Th1 produzem citocinas como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2) que ativam a resposta imune mediada por células. Já linfócitos da subpopulação Th2 secretam, principalmente, interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13)



que promovem a sinalização para a produção de anticorpos, desencadeando a resposta imune humoral (Rogers et al., 2002).

Na leishmaniose cutânea experimental murina por *L.major*, em algumas linhagens de camundongos, como C57BL/6, C3H e CBA, não há progressão das lesões e verifica-se redução do parasitismo tecidual, resultando, na maioria das vezes, em cura espontânea, além de resistência imunológica a re-infecção (Sacks; Noben-Trauth, 2002). Nesses animais, a resolução da doença é mediada por células Th1 que produzem IFN- $\gamma$ . Por sua vez, IFN- $\gamma$  induz a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos ativados e conseqüente eliminação de grande parte dos parasitos. Já em outras linhagens de camundongos, principalmente BALB/c, há o desenvolvimento de uma resposta imune Th2 com produção de IL-4 em resposta a um antígeno da *Leishmania* conhecido como LACK (receptor homólogo de *Leishmania* para ativação da proteína quinase C). A IL-4 inibe a expressão de receptores para IL-12, o que interfere na produção de IFN- $\gamma$  pelos macrófagos. Conseqüentemente, os parasitos fagocitados não são mortos e a doença progride, causando lesões graves e descontroladas, muitas vezes com visceralização do parasito e morte do animal (Rogers et al., 2002; Awasthi et al., 2004).

Entretanto, alguns trabalhos utilizando modelo de leishmaniose experimental demonstraram que a dicotomia Th1/Th2 não se aplica a todas as situações experimentais. Uzonna e colaboradores (2004) verificaram que infecções feitas com inóculos com baixa dose parasitos de *L. major* ( $10^3$  promastigotas em fase estacionária/mL) em animais C57BL/6 favorece a expansão de células Th2. Já o trabalho de Biedermann e colaboradores (2001) mostra que o aumento da quantidade de IL-4, nos estágios iniciais da infecção por *L.major* em camundongos BALB/c, instrui células dendríticas a produzirem IL-12, induzindo uma resposta Th1 com conseqüente diminuição no tamanho das lesões nesses animais. Além disso, diferentes espécies de parasitos, podem causar diferentes padrões de infecção em uma mesma linhagem de animais. Por exemplo, em animais C57BL/6, há cura espontânea das lesões quando causadas por *L. major*, mas são susceptíveis a infecções por *L.amazonensis* e *L. mexicana* com desenvolvimento de lesões crônicas. Local de infecção, dose do inóculo (altas ou baixas), forma do parasito (promastigotas metacíclicas purificadas ou em fase estacionária) também devem ser

consideradas na avaliação da resposta à infecção (MacMahon-Pratt; Alexander, 2004).

Kidd (2003) ressalta que considerar apenas a dicotomia Th1/Th2 é simplificar demais a resposta imunológica de um organismo. Para compreender melhor como ocorre a elaboração de uma resposta imune, é preciso avaliar a colaboração de vários tipos celulares como células apresentadoras de antígeno (APC), monócitos/macrófagos, granulócitos, células Natural Killer (NK) e células T CD8+.

A cura clínica das lesões nem sempre indica cura parasitológica. No modelo murino, os camundongos C57BL/6 considerados resistentes, apresentam cura clínica, mas a infecção persiste (Trinchieri, 2001). De fato, na leishmaniose tegumentar humana há persistência de parasitos do gênero *Leishmania* após a cura clínica das lesões em tecidos linfóides ou subcutâneos (Ramirez; Guevara, 1997). Estudos revelam que as células responsáveis pela persistência do parasito foram designadas como células T reguladoras CD4+CD25+ produtoras de grandes quantidades de IL-10. Acredita-se que os parasitos *Leishmania* regulam a atividade dessas células como estratégia adaptativa de sobrevivência e de manutenção de seu ciclo de vida, pois a permanência de pequeno número de parasitos na pele já é suficiente para a contaminação dos insetos vetores (Belkaid et al., 2002).

### 1.1.1 – As quimiocinas

Nas últimas três décadas, um grupo de citocinas de baixo peso molecular (8-10 kD) e com propriedades quimioatraentes, denominadas quimiocinas, tem ganhado destaque nos estudos de doenças infecciosas pelo fato de estarem intimamente relacionadas com vários aspectos da imunidade, principalmente ao tráfego de leucócitos. Elas exercem múltiplos papéis tanto em processos inflamatórios como nos homeostáticos. Secretadas por vários tipos de células, desempenham suas funções através da ligação com seus receptores, tais como direcionamento das células imunes ao sítio de lesão, angiogênese, degranulação dos leucócitos (como neutrófilos e eosinófilos), interação endotélio-leucocitária, diferenciação das células T, ativação das células dendríticas, recirculação de linfócitos, direcionamento de linfócitos recém saídos da medula óssea até o timo e baço, linfonodos e placas de Peyer e ainda participam da vigilância imunológica nos

tecidos periféricos (Mackay, 2001; Adams; Lloyd, 1997; Moser et al., 2004; Ward, 2006).

A compreensão dos padrões de quimiocinas secretadas e seus impactos nas manifestações das doenças tem criado expectativas sobre novas abordagens terapêuticas a várias infecções, inclusive as Leishmanioses (Mackay, 2001; Schuluger; Rom, 1997; Moser et al., 2004).

São conhecidas em humanos mais de 50 quimiocinas e cerca de 20 receptores (CRs) (Quadro 1). As quimiocinas são subdivididas em 4 famílias de acordo com o arranjo dos dois primeiros resíduos de cisteínas (Cys) da região NH<sub>2</sub>-terminal dessas moléculas, sendo designadas como **CC** (resíduos Cys adjacentes), **CXC** (resíduos Cys separados por 1 aminoácido), **CX3C** (resíduos Cys separados por 3 aminoácidos) e **C** (possuem apenas um resíduo Cys). As ações das quimiocinas são mediadas pela sua ligação a receptores específicos (Quadro 2) ou não na superfície das células-alvo. Uma mesma quimiocina pode ligar-se a mais de um receptor (Mackay, 2001; Moser et al 2004).

**Quadro 1:** As quimiocinas

<b>Nome oficial</b>	<b>Sinônimos</b>
<b>Família CXC</b> CXCL1 CXCL2 CXCL3 CXCL4 CXCL5 CXCL6 CXCL7 CXCL8 CXCL9 CXCL10 CXCL12 CXCL13 CXCL14	GRO $\alpha$ , KC, MIP-2 (camundongos) GRO $\beta$ , MIP-2 $\alpha$ GRO $\gamma$ , MIP-2 $\beta$ PF-4 (Platelet factor 4) ENA-78 NAP-2 GCP-2 IL-8 Mig IP-10 SDF-1 $\alpha/\beta$ BCA-1 BRAK/bolequina
<b>Família CC</b> CCL1 CCL2 CCL3 CCL4 CCL5 CCL7 CCL8 CCL11 CCL12 CCL13 CCL14 CCL15 CCL16 CCL17 CCL18 CCL19 CCL20 CCL21 CCL22 CCL23 CCL24 CCL25 CCL26 CCL27 CCL28	I-309/TCA3 MCP-1, JE (camundongos) MIP-1 $\alpha$ MIP-1 $\beta$ RANTES MCP-3 MCP-2 Eotaxina MCP-5 MCP-4 CC-1, HCC-1 MIP-5, MIP-1 $\delta$ HCC-4, LEC TARC DC-CK-1, MIP-4 MIP-3 $\beta$ MIP-3 $\alpha$ SLC MDC, ABCD-1 MPIF-1/CK $\beta$ 8 Eotaxina-2/MPIF-2 TECK Eotaxina-3/MPIF-3 CTACK/ILC MEC
<b>Família XC</b> XCL1 XCL2	Linfotactina SCM-1 $\beta$
<b>Família CX3C</b> CX3CL1	Fractalquina/neurotactina

**Quadro 2:** Receptores, principais ligantes e funções biológicas das quimiocinas (Oliveira, 2005)

<b>Receptor</b>	<b>Ligantes</b>	<b>Funções biológicas</b>
<b>Família CXC</b> <i>CXCR1</i>	<i>CXCL8</i>	Migração de leucócitos, imunidade inata e inflamação
<i>CXCR2</i>	<i>CXCL1, 2, 3, 5, 6,7 e 8</i>	Migração de leucócitos, imunidade inata e inflamação e angiogênese
<i>CXCR3</i>	<i>CXCL 9, 10 e 11</i>	Migração de células T, imunidade adaptativa, resposta Th1
<i>CXCR4</i>	<i>CXCL12</i>	Linfopoiese (células B), mielopoise, desenvolvimento do sistema nervoso central e infecção por HIV
<i>CXCR5</i>	<i>CXCL13</i>	Migração de células B e desenvolvimento linfóide
<i>CXCR6</i>	<i>CXCL16</i>	Migração de células T
<b>Família CC</b> <i>CCR1</i>	<i>CCL2, CCL7,CCL8</i>	Migração de monócitos e células T, imunidade inata e adaptativa, resposta Th1
<i>CCR2</i>	<i>CCL13,14 e 15, CCL23 CCL2, CCL7, CCL8, CCL13</i>	Migração de monócitos e células T, imunidade inata e adaptativa, resposta Th1
<i>CCR3</i>	<i>CCL5, CCL7, CCL8, CCL9,CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26</i>	Migração de eosinófilos, basófilos e células T; alergia
<i>CCR4</i> <i>CCR5</i>	<i>CCL17 e CCL23 CCL3, CCL4,CCL5 e CCL8</i>	Migração de monócitos e células; alergia Migração de monócitos e células T, imunidade inata e adaptativa
<i>CCR6</i> <i>CCR7</i>	<i>CCL20 CCL19 , CCL21</i>	Migração de células dendríticas Migração de células dendríticas e células T; desenvolvimento linfóide
<i>CCR8</i>	<i>CCL1, CCL4 CCL17</i>	Migração de células T
<i>CCR9</i>	<i>CCL25</i>	Migração de células T para o trato gastrointestinal
<i>CCR10</i>	<i>CCL27, CCL27 e CCL28</i>	Migração de células T para a pele
<b>Família CX3</b> <i>CX3CR1</i>	<i>CX3CL1</i>	Migração e adesão de células T e NK; imunidade inata e adaptativa, resposta Th1
<b>Família XC</b> <i>XCR1</i>	<i>XCL1 e 2</i>	Migração de células T

Estudos demonstram que os variados quadros clínicos das leishmanioses cutâneas estão intimamente relacionados à forma de expressão das quimiocinas e conseqüentemente na composição do infiltrado inflamatório no sítio da lesão. Essa correlação sugere que elas exercem importante participação na resposta imune aos protozoários parasitas. Nas leishmanioses cutâneas localizadas, com cura espontânea, verifica-se o predomínio de resposta Th1 associada as quimiocinas CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 e pequenas quantidades de CCL3/MIP-1 $\alpha$ . Em quadros crônicos, associados as leishmanioses cutâneas difusas ocorrem o oposto com a expressão de CCL3/MIP-1 $\alpha$  dominando em relação a CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG e CXCL10/IP (Ritter; Körner, 2002).

Além disso, o uso de bloqueadores dos receptores para quimiocinas com anticorpos específicos ou de animais geneticamente modificados (deficientes para quimiocinas e receptores) confirma a relevância e a necessidade de mais estudos para melhor compreensão do papel das quimiocinas nas doenças infecciosas (Matsukawa et al., 2000).

Citocinas estão diretamente envolvidas com a produção de quimiocinas. Nas leishmanioses, TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e IL-1 $\beta$  estimulam a produção de CCL3 (MIP-1- $\alpha$ ) enquanto IL-12 induz a secreção de quimiocinas relacionadas ao recrutamento de macrófagos, como CXCL-10 (IP-10) e CCL2 (MCP-1); IFN- $\gamma$  induz CXCL9 (MIG) e também CXCL-10. A atuação sinérgica entre citocinas e quimiocinas tem fator decisivo na eliminação de parasitos dos sítios de lesão. Infecções com *L. major* induzem aumento de CCL5 (RANTES), CCL2, CCL3 e CXCL10 em peles e linfonodos regionais de camundongos resistentes à leishmaniose cutânea (Teixeira et al., 2006).

A primeira quimiocina relacionada à atração de macrófagos foi CCL2 (também conhecida como proteína quimiotática para monócitos/macrófagos 1 (MCP-1) e está intrinsecamente associada à infiltração de macrófagos e estimulação na atividade leishmanicida e seu principal receptor CCR2 está presente em macrófagos, células dendríticas, células NK e linfócitos T de memória (Luther; Cyster, 2001; Conrad et al., 2007). Carollo e colaboradores (2001) demonstraram que CCL2/MCP-1 teve uma alta ação pró-fibrótica, estimulando deposição de fibras colágenas, proliferação de fibroblastos e fibrose em modelo de reação inflamatória granulomatosa experimental.

A quimiocina inflamatória de macrófagos 1 (MIP-1  $\alpha$ ) ou CCL3 juntamente com CCL2 participa ativamente do recrutamento de monócitos/macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas imaturas através da ligação dos receptores CCR1 e CCR5, localizado nesses tipos celulares. Nesse mesmo modelo, CCL3/MIP-1 $\alpha$  também foi associado ao mecanismo de reparo tecidual, mas foi relacionado a uma fase mais inicial da inflamação com grande atuação sobre degranulação de mastócitos (Carollo et al., 2001).

A correlação dos diferentes padrões de expressão de quimiocinas e a variação nos quadros clínicos das leishmanioses cutâneas demonstra que a atividade desses mediadores químicos são importantes na resposta imune do hospedeiro frente essa doença.

#### 1.2 - Modelo Parafina: abordagem para estudo da inflamação crônica associada à infecção por *L. major*

Tafari e colaboradores (2000) utilizaram um modelo de inflamação crônica (Raso, 1976), por vezes granulomatosa, induzido pelo implante de um agente inerte (tablete de parafina), no subcutâneo de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 associado à infecção por *L. major*. A parafina é uma partícula imunologicamente inerte capaz de sustentar um influxo de células mononucleares para o sítio da inflamação formando, após alguns dias, uma cápsula fibrosa ao seu redor.

Em estudos realizados com implante subcutâneo de discos de esponja de poliéster-poliuretano ocorre a infiltração contínua de células mononucleares, proliferação fibroblástica, angiogênese e destruição tecidual. O aumento da angiogênese provocado pela liberação de fatores pró-angiogênicos promove o transporte de células inflamatórias e maior aporte nutricional (Ferreira, et al. 2004, Brown, et al. 1997). Além do acúmulo de leucócitos, a produção da citocina TNF $\alpha$  e das quimiocinas CXCL1 (KC) e CCL2 (MCP-1/JE), contribuem de forma importante para o aumento da angiogênese e, conseqüentemente dos efeitos patológicos relacionados a sua ação persistente e não regulada (Barcelos, et al. 2004).

No estudo de Tafuri e colaboradores (2000), os camundongos foram divididos em três grupos distintos: o primeiro recebeu o implante de parafina no subcutâneo na região dorsal, o segundo recebeu a infecção de  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. major* em fase estacionária também na região dorsal e o terceiro recebeu a infecção associada ao implante de parafina no mesmo local anatômico. Os animais foram sacrificados aos 15, 21, 30 e 45 dias após a infecção experimental com ou sem o implante de tablete de parafina para avaliação histológica da cinética da reação inflamatória. Foram coletados fragmentos de pele e também a cápsula conjuntiva (inflamatória) que se formou ao redor do tablete de parafina. Os autores demonstraram que os camundongos com o implante de parafina associado à infecção por *L. major* apresentaram resposta inflamatória nitidamente mais intensa, associada a um maior parasitismo cutâneo. Essas observações aconteceram principalmente nos intervalos de 21 a 30 dias para ambos os animais BALB/c e C57BL/6. Com esses resultados os autores indicaram que a lesão provocada pela infecção com *L. major* era mais intensa quando associada ao implante de parafina em ambas as linhagens de camundongos. Entretanto, os animais C57BL/6, após 45 dias, resolveram a infecção com carga parasitária reduzida, mesmo com a parafina, diferentemente dos camundongos BALB/c cuja carga parasitária sempre foi intensa. Os autores concluíram que nas três e quatro primeiras semanas de infecção, com o implante de parafina, a migração de monócitos-macrófagos tornou o processo inflamatório mais intenso, o que perpetuou a infecção por *L. major*. Esses achados corroboram com os de Soong e colaboradores (1997), no modelo de leishmaniose cutânea experimental em camundongos infectados com *Leishmania amazonensis*. Os autores demonstraram que a migração (exsudação) de monócitos-macrófagos para o foco inflamatório favorece o crescimento dos parasitos, ou seja, sugerem que monócitos-macrófagos seriam células que permitem “um crescimento intracelular ótimo” de formas amastigotas de *Leishmania* perpetuando a infecção. Contrariamente, no modelo visceral., utilizando-se hamsters e/ou camundongos como modelo de infecção experimental para *L. chagasi* e *L. donovani*, Murray e colaboradores (1994) demonstraram que monócitos são efetores em eliminar leishmanias dos tecidos, especialmente no fígado.

O modelo de implante de parafina associado à infecção por *L. major*, produz então um quadro de inflamação crônica, tanto em camundongos BALB/c quanto em



C57BL/6 (Tafari et al., 2000). Além disso, há a formação de uma cápsula fibrosa ao redor da parafina constituída por grande número de macrófagos, linfócitos e vasos sanguíneos recém-formados e hiperemiados, caracterizando o tecido de granulação. O intenso parasitismo foi associado a um grande número de macrófagos. Esses resultados também foram observados em outro trabalho realizado pelo mesmo grupo, porém em animais deficientes para a quimiocina proteína inflamatória de macrófagos 1- $\alpha$  (MIP-1  $\alpha$  -/-), do receptor p55 para TNF- $\alpha$  (TNFRp55-/-) e da citocina IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  -/-) (Martins et al., 2002).

Nesse trabalho pretendemos responder a algumas questões:

- Há uma inversão da resposta imunológica temporal nos animais C57BL/6 do tipo Th1 para o tipo Th2 no modelo animal infectado com *L.major* e associado ao implante de parafina em relação aos animais que somente foram infectados com *L.major*?
- A parafina induz a produção de IL-10 com conseqüente regulação inibitória da ação de macrófagos em amostras de pele e principalmente de cápsula inflamatória de animais C57BL/6?
- As quimiocinas CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 predominariam sobre CCL3/MIP-1 $\alpha$  nas cápsulas inflamatórias dos animais C57BL/6 ou o contrário?

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo Geral

Comparar aspectos imunológicos envolvidos em camundongos da linhagem C57BL/6 em resposta ao implante de parafina, associado ou não à infecção por *Leishmania major*.

### 2.2 – Objetivos Específicos

- Realizar estudo das alterações histológicas das amostras de pele e cápsula inflamatória dos animais em experimentação com um inóculo de parasitos ( $1 \times 10^6$  leishmanias/ mL);
- Quantificar parasitos no sítio de inoculação dos animais experimentalmente infectados com e sem implante de parafina.
- Avaliar bioquimicamente a ativação de macrófagos através da dosagem da enzima lisossômica NAG (N-acetil- $\beta$ -D- glicosaminidase).
- Avaliar o perfil imunológico, a partir da análise da expressão de algumas quimiocinas (MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, RANTES/CCL5, CXCL10/IP10, CXCL9/MIG) e citocinas (IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12) relacionadas principalmente à migração de macrófagos e linfócitos em animais experimentalmente infectados por *L.major* e associado a um quadro de inflamação crônica, causado pelo implante de parafina aos 21 dias pós-infecção.

### 3 – METODOLOGIA

#### 3.1. Parasitos:

Parasitos da espécie *Leishmania major* (MHOM/IL/80/Friedlin) foram cultivados em meio de cultura Grace's (insect cell culture medium, GIBCO laboratories, Grand Island NY, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (inativado para proteínas do complemento), 2 mM L-glutamina (Sigma Chemical Co.) e 100 µg/mL de penicilina, à temperatura de 25°C. As formas promastigotas foram coletadas na fase estacionária (5º dia de cultura), por centrifugação do meio a 2000 x g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ressuspenso em 5,0 mL de salina tamponada com 0,1 M de fosfato de sódio pH 7,2 (PBS) e, em seguida novamente centrifugado. Novamente o sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao sedimento 1,0 mL de PBS. Foi retirada uma alíquota, diluída 1:10 em PBS, contendo formalina a 4% e o número de parasitos contado em Câmara de Neubauer, para acerto da concentração desejada para inóculo,  $1 \times 10^6$  leishmanias/mL (Santiago et al., 2004). Foram utilizados 0,1 mL por camundongo.

Os parasitos foram fornecidos pelo Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (ICB/UFMG), coordenado pela prof<sup>a</sup> Leda Q. Vieira.

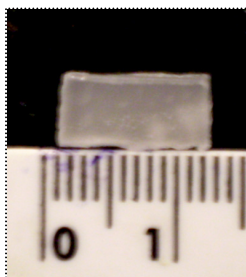
#### 3.2. Animais:

Camundongos machos das linhagens C57BL/6 e BALB/c, com idade entre 5-6 semanas, foram obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram vermifugados na semana anterior ao início dos experimentos, via oral., com solução de Ivermectina (Ivomec – Merial., Paulínea, SP, Brasil), na concentração de 1:100, durante 07 dias consecutivos. A serragem das gaiolas foi trocada a cada 03 dias durante o processo.

Os animais receberam ração convencional para camundongos e água *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas, com no máximo 05 animais em cada, no biotério experimental do Departamento de Patologia Geral., no ICB/UFMG.

### 3.3. Confecção dos "Tabletes de Parafina"

A parafina foi dissolvida em estufa à temperatura de 60°C e em seguida colocada sobre uma placa de vidro liso, previamente lubrificada com vaselina líquida. Depois de solidificada, a parafina foi cortada em tabletes homogêneos, de superfície lisa e de mesmo tamanho e espessura (massa: 220 mg; medidas de 1 cm de comprimento x 0,5 cm de largura x 0,2 cm de espessura) (Figura 2).



**Figura 2** : Tablete de parafina, utilizado para implante no subcutâneo de camundongos

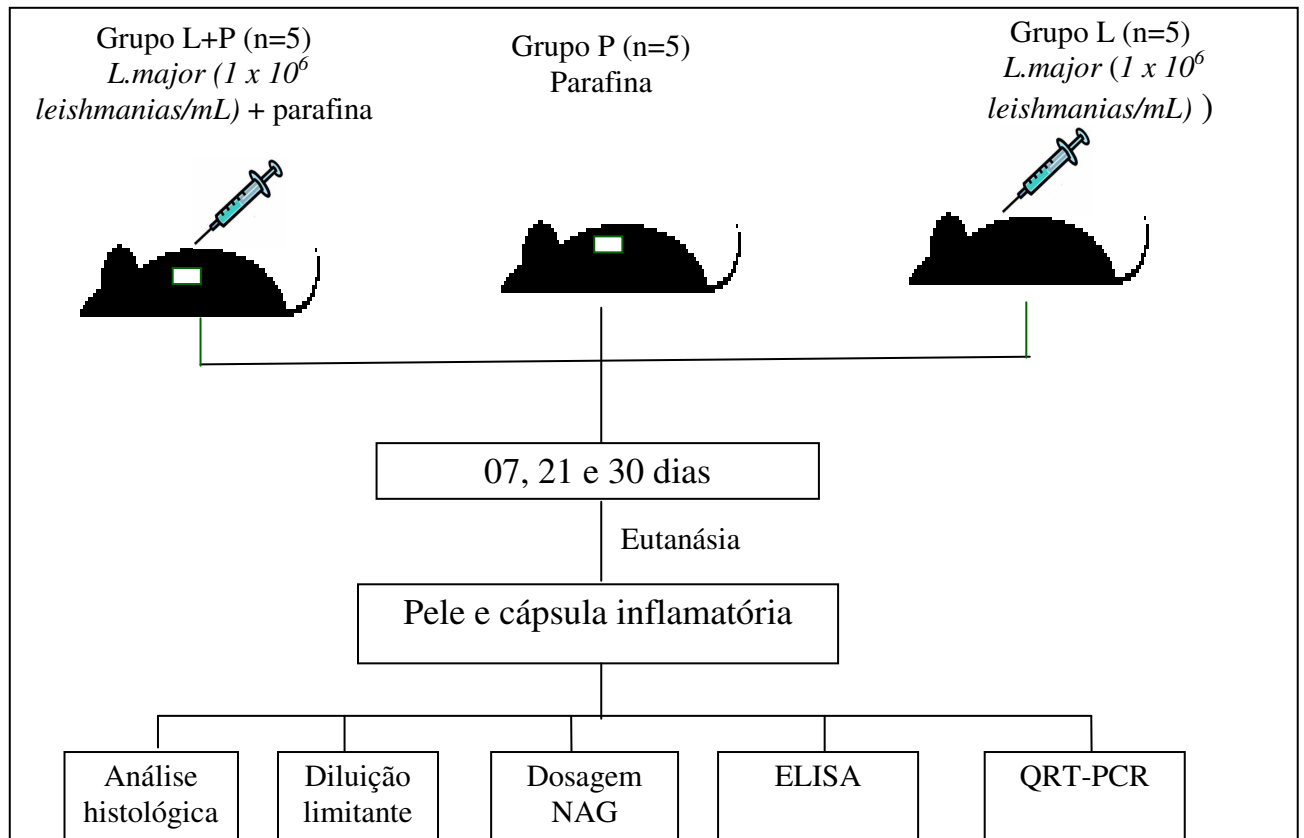
### 3.4. Implante dos "Tabletes de Parafina"

Inicialmente os animais foram anestesiados, via peritoneal., com uma solução de Ketamina a 5% (200mg/Kg), Xilasina a 2% (10mg/Kg), diluídos em salina fisiológica. Utilizou-se 0,2 ml dessa solução por 100g de peso vivo do animal. Após procedimento anestésico, seguiu-se a cuidadosa raspagem dos pêlos e assepsia da região dorso caudal dos camundongos. Foi realizado o implante de um tablete de parafina no subcutâneo da região dorsal dos animais e em seguida sutura da incisão conforme protocolo experimental previamente definido (Tafari et al., 2000).

### 3.5 Protocolo Experimental

Os animais foram divididos em três grupos distintos, com cinco animais cada. O primeiro grupo recebeu o implante de parafina no subcutâneo associado à infecção experimental por *L. major* ( $1 \times 10^6$  promastigotas/mL), imediatamente realizada após o implante; o segundo grupo recebeu apenas o implante de parafina e o terceiro grupo recebeu apenas o inóculo de promastigotas de *L. major* ( $1 \times 10^6$  promastigotas/mL). Após esse procedimento, amostras teciduais de pele e cápsula inflamatória foram obtidas para vários estudos (Fig.3). Exames histológicos,

dosagem da carga parasitária mediante técnicas de diluições limitantes (Vieira et al., 1996), dosagem da atividade da enzima N-acetil- glucosaminidase (NAG), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real) para estudo da expressão de quimiocinas e citocinas foram realizados e serão descritos em detalhes a seguir.



**Figura 3:** Modelo esquemático da metodologia aplicada

### 3.6 Coleta, Processamento do material e Análise Histológica

Posteriormente ao procedimento experimental., os animais foram sacrificados em intervalos de 7, 21 e 30 dias. Foram retiradas regiões da pele e a cápsula inflamatória, fixados em formol 10% tamponado e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para histopatologia.

### 3.7 - Quantificação do parasitismo tecidual

O número de parasitos presentes, na pele da região dorsal e na cápsula inflamatória dos animais infectados por *L. major*, foi determinado pela técnica de

diluição limitante (Vieira et al., 1996), a partir da suspensão de células obtida a partir da lesão. A lesão foi removida, pesada em microtubo estéril, homogeneizada em triturador de vidro e centrifugada a 50 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 200 x g a 4° C por 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em meio Grace's completo e plaqueado em placas de 96 poços, em duplicata, numa diluição sucessiva 1:10. As placas foram incubadas a 25°C, durante 07 dias, após o início da cultura. Foi feita uma média entre as duplicatas, correspondendo ao log<sub>10</sub> negativo do título de parasita. O título de parasitos corresponde à última diluição que apresentou parasito.

### 3.8 – Quantificação do acúmulo de macrófagos teciduais por medida da atividade da enzima N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

Os animais foram eutanasiados com sobredose (1 mL) de solução anestésica<sup>1</sup>. Amostras das peles e cápsulas inflamatórias retiradas cuidadosamente, pesadas e homogeneizadas com solução gelada (4 °C) de tampão fosfato (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO<sub>4</sub>, 0,015 M NaEDTA, pH 4,7) na proporção de 1,9mL/100mg de tecido, homogeneizadas com Vortex e centrifugadas a 4°C por 22 minutos a 85 x g. O sobrenadante foi recolhido para realização do ensaio de ELISA para quimiocinas.

Os precipitados foram ressuspenso em solução de NaCl 0,2% gelado (4 °C) na proporção de 1,5 mL/100mg de tecido. Após 30 segundos, adicionou-se solução de NaCl 1,6% com glicose 5% gelada na mesma proporção, homogeneizadas em Vortex e centrifugadas por 22 minutos a 4°C a 10.000 x g. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se tampão fosfato à temperatura ambiente (0,05 M NaPO<sub>4</sub>, 0,5% hexadecil-trimetilamonio bromidio (HETAB), pH 5,4), na proporção de 1,9 mL/100 mg de tecido (peso inicial). Foi homogeneizado rapidamente usando Vórtex e adicionado 2,0 mL de solução salina 0,9% contendo 0,1% v/v Triton X-100 gelada (4 °C). Homogenatos foram centrifugados por 10 minutos a 4 °C a 1.500 x g e sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático de NAG.

---

<sup>1</sup> Solução 50% de Ketamina e Xilasina diluídos em salina fisiológica na proporção 1:2).

Em uma placa de 96 poços, foi adicionado 100 µl do sobrenadante das amostras processadas em duplicata. A reação foi iniciada com a adição de 100 µl do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida (Sigma) diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4,5) na concentração final de 2,24 mM e incubação a 37 °C por 30 minutos.

A reação foi terminada pela adição de 100 µl de tampão glicina 0,2 M (glicina 0,8 M, NaCl 0,8 M e NaOH, pH 10,6). A placa foi lida em espectrofotômetro (Emax, Molecular Devices) à 405 nm. O conteúdo dos macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão baseada na expressão da atividade de NAG feita de ensaio de macrófagos peritoniais estimulados com 3% de tioglicolato (dados não mostrados).

### 3.9 – Dosagem de quimiocinas por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Os sobrenadantes recolhidos no processamento das amostras da cápsula inflamatória para o ensaio de NAG, conforme mencionado anteriormente, foram utilizados para o ensaio de ELISA.

Para a dosagem das quimiocinas CCL2/MCP-1/JE, CCL3/MIP-1α e CCL5/RANTES foram utilizados kits comerciais específicos (PREPOTECH, INC.) e seguidas instruções do fabricante. Basicamente, 100 µl de anticorpo de captura (1 µg/mL) foi colocado em cada poço de uma placa com 96 poços (NUNC Maxishorp) e incubada a 4 °C por aproximadamente dezoito horas. O conteúdo de cada placa foi aspirado e esta foi lavada por 4 vezes (300 µl/ poço) com tampão de lavagem (PBS/TWEEN-20 0,05%). Após esse procedimento, adicionou-se 300 µl /poço de tampão de bloqueio (BSA 1% em PBS) e a placa foi incubada por no mínimo 1 hora à temperatura ambiente. Repetiu-se o procedimento de lavagem e foi adicionado 100 µl do sobrenadante das amostras em cada poço, em duplicata, e padrões diluídos em tampão de diluição (BSA 0,1% TWEEN-20 0,05% em PBS 1X). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por duas horas. Repetiu-se o procedimento de lavagem e foram adicionados 100 µl/poço de anticorpo de detecção biotínido (0,25 µg/mL) diluído em tampão de diluição (o mesmo utilizado para amostras e padrões). As placas foram novamente incubadas por duas horas à temperatura

ambiente. Após mais um procedimento de aspiração e lavagem, acrescentou-se 100 µl/poço de conjugado de avidina – HRP 1:2000 diluído em tampão de diluição e as placas foram incubadas por trinta minutos à temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas e adicionado 100 µl/poço do substrato ABTS (2,2"-azino-bis-etilbenthiazolina - SIGMA) (diluído em tampão citrato-fosfato, com adição de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)). As placas foram incubadas, protegidas da luz, à temperatura ambiente por cerca de 20 minutos. Durante esse tempo a formação de cor foi monitorada e para interromper a reação, foram adicionados 50 µl/poço de solução SDS (dodecil sulfato de sódio) 1%. As placas foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) à 405 nm.

A sensibilidade do ensaio para a dosagem de CCL2 é de 8 pg/mL, para CCL3 de 16 pg/mL e para CCL5 de 32 pg/mL.

### 3.10 - Expressão de citocinas e quimiocinas pela Reação em cadeia da polimerase em quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para análise da expressão gênica, as amostras de peles e cápsulas inflamatórias foram retiradas dos animais BALB/c e C57BL/6 e imediatamente colocadas em solução tampão estabilizadora de RNA (RNAlater®, Quiagen) para prevenir degradação.

#### 3.10.1 -Extração de RNAm

O RNAm foi extraído usando solução de TRIZOL® (Invitrogen, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram homogeneizadas rapidamente em solução de TRIZOL® usando triturador *PowerGen* (Fisher Scientifics, USA). 0.25 mL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram adicionados para cada 1 mL de homogenato. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para novo tubo e 0,7mL de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi adicionado para a precipitação do RNAm. Os precipitados de RNAm foram lavados uma única vez com etanol a 70% e colocados sobre papel filtro para secagem, à temperatura ambiente por no máximo 10 minutos. O pellet de RNAm foi dissolvido em DNase livre de RNase diluído em 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 contendo 1 mM MgCl<sub>2</sub> por 30 min à temperatura ambiente. Solução de TRIZOL® foi



adicionada para encerrar a reação de extração do RNA. As amostras de RNA foram dissolvidas em água livre de RNase. A quantificação do RNA foi realizada utilizando alíquotas diluídas. As leituras foram feitas em placas de quartzo de 96 poços em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A razão das leituras 260/280 (ácido nucléico/proteína) foi utilizada para avaliação da qualidade do RNA extraído das amostras.

### 3.10.2 -Síntese de DNAc por reação de transcrição reversa

A síntese de DNAc foi realizada nas amostras obtidas acima. A primeira fita de DNAc foi gerada pelo kit de transcrição reversa ThermoScript® (Invitrogen, CA, USA). Foram utilizados 5 µg de amostra de RNA livre de DNA genômico e Oligo (dT) 20 primer de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante (Invitrogen, CA, USA).

### 3.10.3 – Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RT-PCR)

A amplificação específica por RT-PCR foi realizada utilizando-se o termociclador LightCycler®480 System (Roche Applied Science, USA). Esse método é quantitativo em tempo real e mede a fluorescência emitida durante a reação como um indicador da produção de amplificado em cada ciclo de PCR.

Usando reagentes SYBR Green PCR (Bio-Rad) (Syber green - emite grande fluorescência após ligar-se a DNA de dupla fita), a análise de curva de dissociação foi realizada para garantir um único produto evitando amplificação de fragmentos de genes não alvos, obtendo uma curva de dissociação do *primer* específico. A quantificação relativa do produto foi determinada pelo método comparativo de ciclos limiares. Por este método, utiliza-se como controle da reação a quantificação da expressão de um gene constitutivo subtraída da quantificação da expressão do gene de interesse. O gene constitutivo escolhido foi o GAPDH. Para diferenças relativas entre as amostras foram avaliadas usando o método delta-delta Ct, como previamente descrito (Zhang et al., 2006). A expressão do gene de interesse foi subtraída da expressão do gene de animais implantados unicamente com parafina, a qual foi padronizado em valor 1,0. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos pelo teste T de *student*.

**Quadro 3:** Lista de primers utilizados para PCR quantitativo em tempo real

<b>Primer</b>		<b>Seqüência</b>
<b>HPRT1</b>	sense 5´	ACT GAT TAT GGACAG GAC TGA AAG AC
	Anti-sense 3´	CCC CGT TGA CTG ATC ATT ACA GTA G
<b>CXCL10 (IP-10)</b>	sense 5´	GAG ATC ATT GCC ACG ATG AA
	Anti-sense 3´	AGT TAA GGA GCC CTT TTA GAC CTT TT
<b>CXCL9 (MIG-1)</b>	sense 5´	ACTGAAATCATTGCTACACTGAAGA
	Anti-sense 3´	CCCCTCTTTTGCTTTTTCTTTT
<b>CCL5 (RANTES)</b>	sense 5´	ATCTTGCAGTCGTGTTTGTCAC
	Anti-sense 3´	GGAAGCGTATACAGGGTCA
<b>CCL3 (MIP-1<math>\alpha</math>)</b>	sense 5´	AGCCAGGTGTCATTTTCCTGAC
	Anti-sense 3´	AGACTCTCAGGCATTCAGTTCC
<b>CCL2 (MCP-1)</b>	sense 5´	AGCTGTAGTTTTTGTACCAAGCTC
	Anti-sense 3´	GGTTCTGATCTCATTTGGTTCC
<b>IL-4</b>	sense 5´	TCAACCCCCACGTAGTTGTC
	Anti-sense 3´	ACGTTTGGCACATCCATCTC
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	sense 5´	GCGTCATTGAATCACACCTC
	Anti-sense 3´	TGAGCTCATTGAATGCTTGG
<b>IL-10</b>	sense 5´	GACTTTAAGGGTACTTGGGTTGC
	Anti-sense 3´	TCTTATTTTCACAGGGGAGAAATCG
<b>IL12/23p40</b>	sense 5´	AAGACGTTTATGTTGTAGAGGTGGAC
	Anti-sense 3´	ACTGGCCAGCATCTAGAAACTCTTT
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	sense 5´	AAAGGGATGAGAAGTTCCCAAAT
	Anti-sense 3´	GTCTTTGAGATCCATGCCGTTG
<b>GAPDH</b>	sense 5´	AAGGTCGGTGTGAACGGATT
	Anti-sense 3´	AATTTGCCGTGAGTGGAGTCATAC

### 3.11 - Testes estatísticos

Foi realizada análise de variância ANOVA (Tuckey) para diferença na resposta de todos os grupos. As análises das diferenças nas respostas entre todos os pares foram utilizadas teste T de Student. Considerado nível de significância para  $p < 0,05$ .

### 3.12 – Comitê de Ética

Procedimento experimental aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG), protocolo nº 163/2005.

## 4 - RESULTADOS

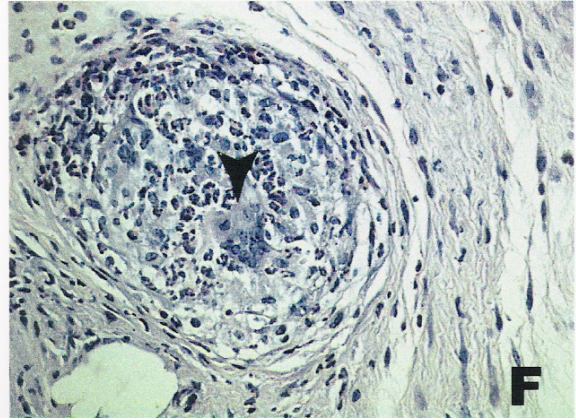
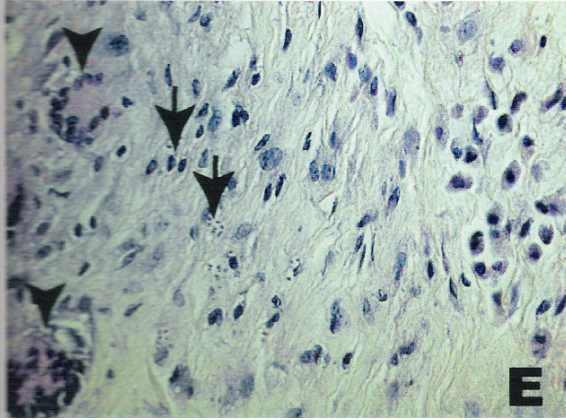
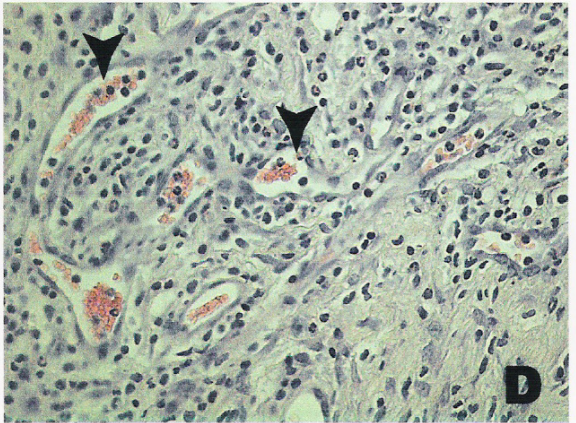
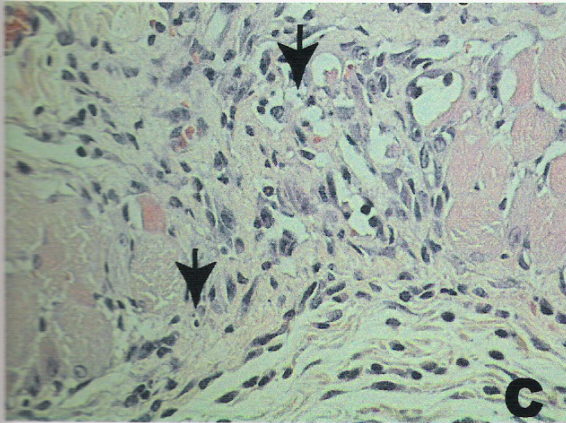
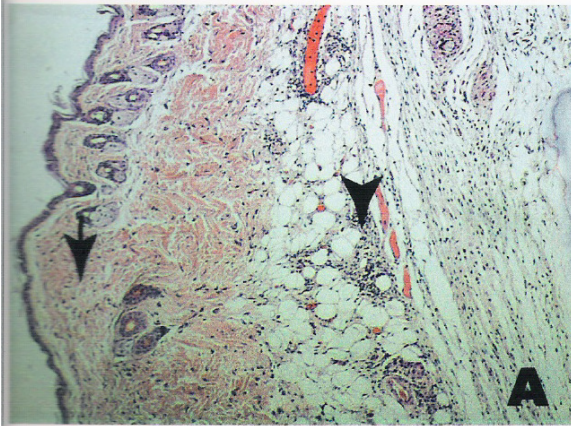
### 4.1 - Análise Histológica

Em geral, camundongos C57BL/6 apresentaram aspectos histológicos semelhantes aos apresentados pelos camundongos BALB/c, em todas as diferentes condições experimentais, com a exceção dos 30 dias, como descreveremos a seguir:

No grupo L+P, após 07 dias do implante e infecção por *L. major*, os fragmentos de pele de todos os animais apresentaram uma discreta reação inflamatória crônica, difusa e localizada, principalmente na derme profunda. O exsudado celular era principalmente composto por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e alguns neutrófilos de permeio. Nesse intervalo de tempo já foi observada a formação do tecido de granulação, adjacente aos fragmentos de pele analisados, composto de células inflamatórias mononucleares, fibroblastos, colágeno e vasos sanguíneos neoformados (cápsula inflamatória). Após 21 dias, os fragmentos de pele apresentaram processo inflamatório crônico e difuso, porém mais intenso que o observado aos 7 dias. (Figura 4A, B, C). Conseqüentemente, o tecido de granulação (cápsula inflamatória) adjacente era mais desenvolvido, sendo o exsudato celular mais intenso (Figura 4D). Os grupos de animais infectados unicamente com *L. major* (grupo L) ou implantados com a parafina (grupo P) mostraram reações inflamatórias cutâneas qualitativamente semelhantes, mas com menor intensidade que o grupo L+P.

Foi observado um menor parasitismo nas peles de animais apenas infectados com *L. major* (L) se comparado com o grupo L+P aos 7 e 21 dias pós-infecção. Macrófagos parasitados e células gigantes foram especialmente observados na cápsula inflamatória de animais C57BL/6 (Figura 4E). Além disso, por vezes, granulomas puderam ser observados nos fragmentos dessas cápsulas inflamatórias, também em especial do grupo L+P (Figura 4F).

Aos 30 dias, como citado no início dessa secção, houve uma regressão da inflamação e do número de parasitos nas peles e cápsulas inflamatórias de animais C57BL/6, ao contrário dos animais BALB/c.



**Figura 4: Aspectos histológicos da pele e da cápsula inflamatória de camundongos C57BL/6 e BALB/c. Coloração H&E.**

A: Fragmento de pele obtido do dorso de camundongo C57BL/6. Grupo infectado com *L.major*, 21 dias. Presença de infiltrado inflamatório difuso na derme profunda (seta) e tecido adiposo adjacente (cabeça de seta). Aumento: 100x

B: Fragmento de pele obtido do dorso de camundongo C57BL/6. Grupo infectado com *L.major* e com implante de parafina no subcutâneo, 21 dias. Presença de infiltrado inflamatório difuso na derme superficial e profunda. Observar infiltrado celular presente na camada muscular (cabeça de seta). Aumento: 100x

C: Fragmento de pele obtido do dorso de camundongo C57BL/6. Grupo infectado com *L.major* e com implante de parafina no subcutâneo, 21 dias. Detalhe da figura (B) evidenciando o exsudato inflamatório crônico de células mononucleares. Presença de formas amastigotas de *L.major* (setas) no interior de macrófagos. Aumento: 400x

D: Cápsula inflamatória induzida pelo implante de parafina no subcutâneo de camundongo C57BL/6 associada a infecção experimental por *L. major* após 21 dias. Observar formação de tecido de granulação composto por infiltrado celular de mononucleares, fibroblastos, colágeno e vasos sanguíneos neoformados (setas). Aumento 400x.

E: Cápsula inflamatória induzida pelo implante de parafina no subcutâneo de camundongo C57BL/6 associado a infecção experimental por *L. major*, 21 dias. Presença de formas amastigotas intracelulares de *L.major* (setas) e de células gigantes multinucleadas (cabeças de seta). Aumento: 400x

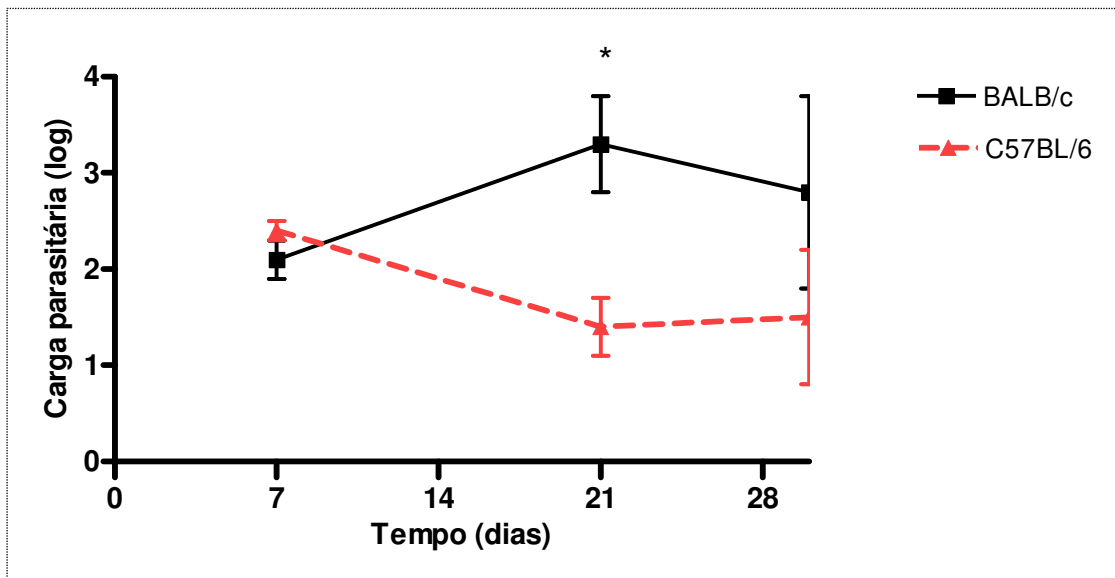
F: Cápsula inflamatória induzida pelo implante de parafina no subcutâneo de camundongo C57BL/6 associado a infecção experimental por *L. major*, 21 dias. Notar a formação de um granuloma com presença de células gigantes no centro (cabeça de seta). Aumento: 400x



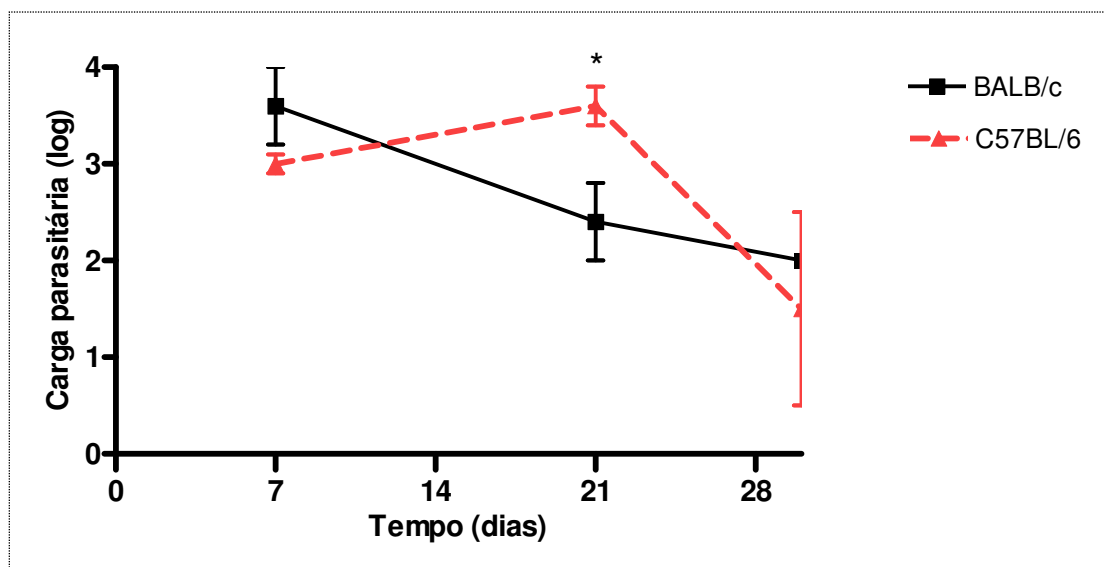
#### 4.2 - Quantificação dos parasitos

Foi realizada quantificação dos parasitos na pele e na cápsula inflamatória de animais BALB/c e C57BL/6 pelo método de diluição limitante (Vieira et al., 1996) nos três tempos estudados. Verificou-se que pele e cápsula exibem aspectos histológicos e de parasitismo distintos. Apesar do exsudato inflamatório ser qualitativamente semelhante, predominantemente composto de células mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos), foi mais intenso na cápsula que na pele, em todas as lâminas analisadas, assim como o parasitismo e será descrito a seguir.

Nos animais da linhagem BALB/c o parasitismo na pele teve pico aos 21 dias pós-infecção e depois apresentou um decréscimo aos 30 dias. Já os animais C57BL/6 exibiram parasitismo na pele que era decrescente até os 21 dias pós-infecção, com pouca diferença aos 30 dias (Gráfico 1). Entretanto, a cápsula inflamatória exibiu comportamento contrário ao da pele, principalmente nos animais C57BL/6, conforme representado no Gráfico 2. Observou-se que em animais C57BL/6 com implante de parafina ocorreu o pico de parasitismo aos 21 dias, diferente do que se verificou na pele. Entretanto, após esse tempo, o parasitismo diminuiu e não houve, aos 30 dias, diferença significativa em relação aos animais BALB/c.



**Gráfico 1: Quantificação de parasitos na pele infectada por *L. major* associado a implante de parafina em camundongos BALB/c e C57BL/6.** As peles foram retiradas dos animais após 7, 21 e 30 dias de infecção para determinação da carga parasitária. A quantificação de parasitos foi determinada individualmente e as médias das diluições máximas de cada grupo foram expressas em logaritmo negativo do título (última diluição positiva para *L. major*). Cada símbolo representa a média e o erro padrão de 04 animais por grupo. \* Índice de significância estatística ( $p < 0,05$ ).

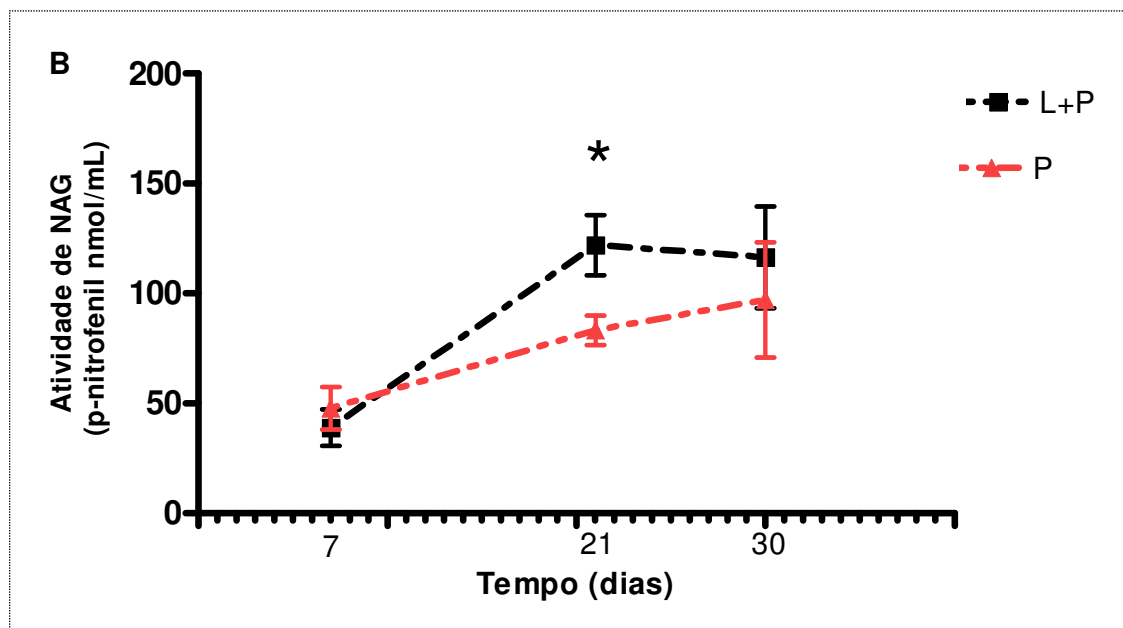
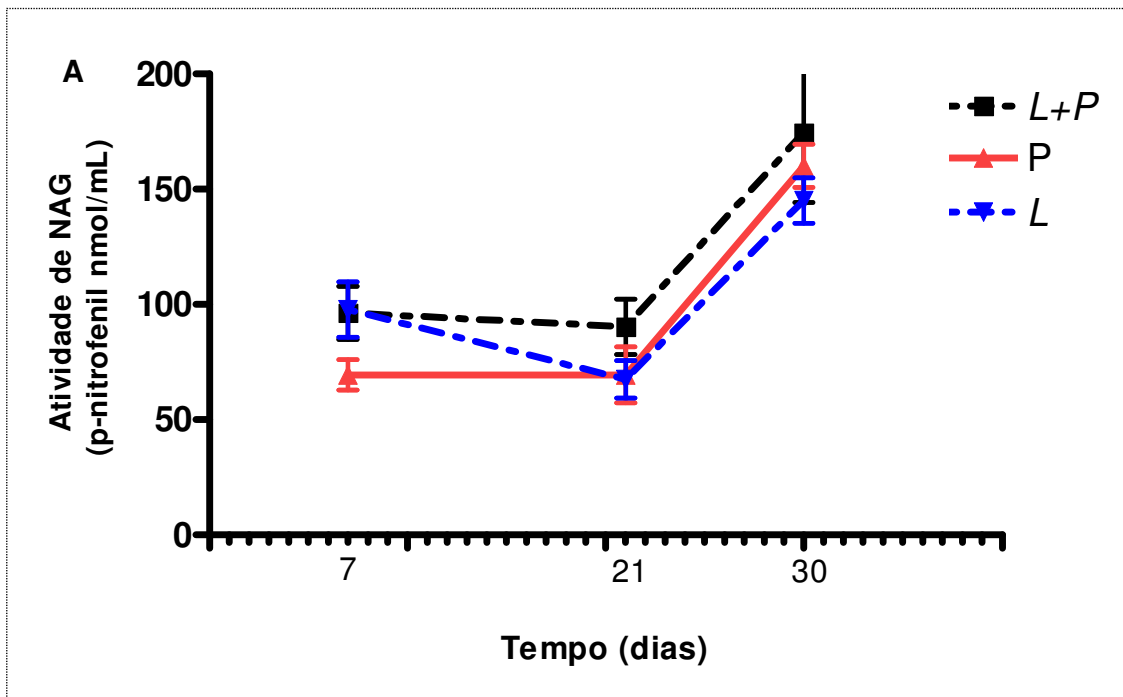


**Gráfico 2 : Quantificação de parasitos na cápsula inflamatória após implante de parafina e infecção experimental com *L. major* em camundongos BALB/c e C57BL/6.** As cápsulas inflamatórias formadas ao redor do tablete de parafina foram retiradas dos animais aos 7, 21 e 30 dias pós-infecção para determinação da carga parasitária. A quantificação de parasitos foi determinada individualmente e as médias das diluições máximas de cada grupo foram expressas em logaritmo negativo do título (última diluição positiva para *L. major*). Cada símbolo representa a média e o erro padrão de 04 animais por grupo. \* Índice de significância estatística ( $p < 0,05$ ).



### 4.3 Dosagem da NAG

Considerando as diferenças histológicas e o grau do parasitismo entre a pele e a cápsula inflamatória, principalmente dos animais da linhagem C57BL/6, comparamos a atividade da enzima N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) nessas amostras biológicas, para avaliar a atividade dos macrófagos. A enzima NAG é uma forma indireta de verificar o acúmulo de macrófagos no sítio da lesão. Como mostram os gráficos 3 A e B, os níveis de NAG na pele aumentaram no decorrer dos tempos avaliados, tanto nos grupos com *L.major* associada à parafina (L+P), como no grupo somente com parafina (P) ou apenas infectado com *L.major* (L). Na cápsula inflamatória houve um aumento estatisticamente significativo na atividade da NAG aos 21 dias quando associado à infecção por *L.major*, sugerindo grande número de macrófagos.

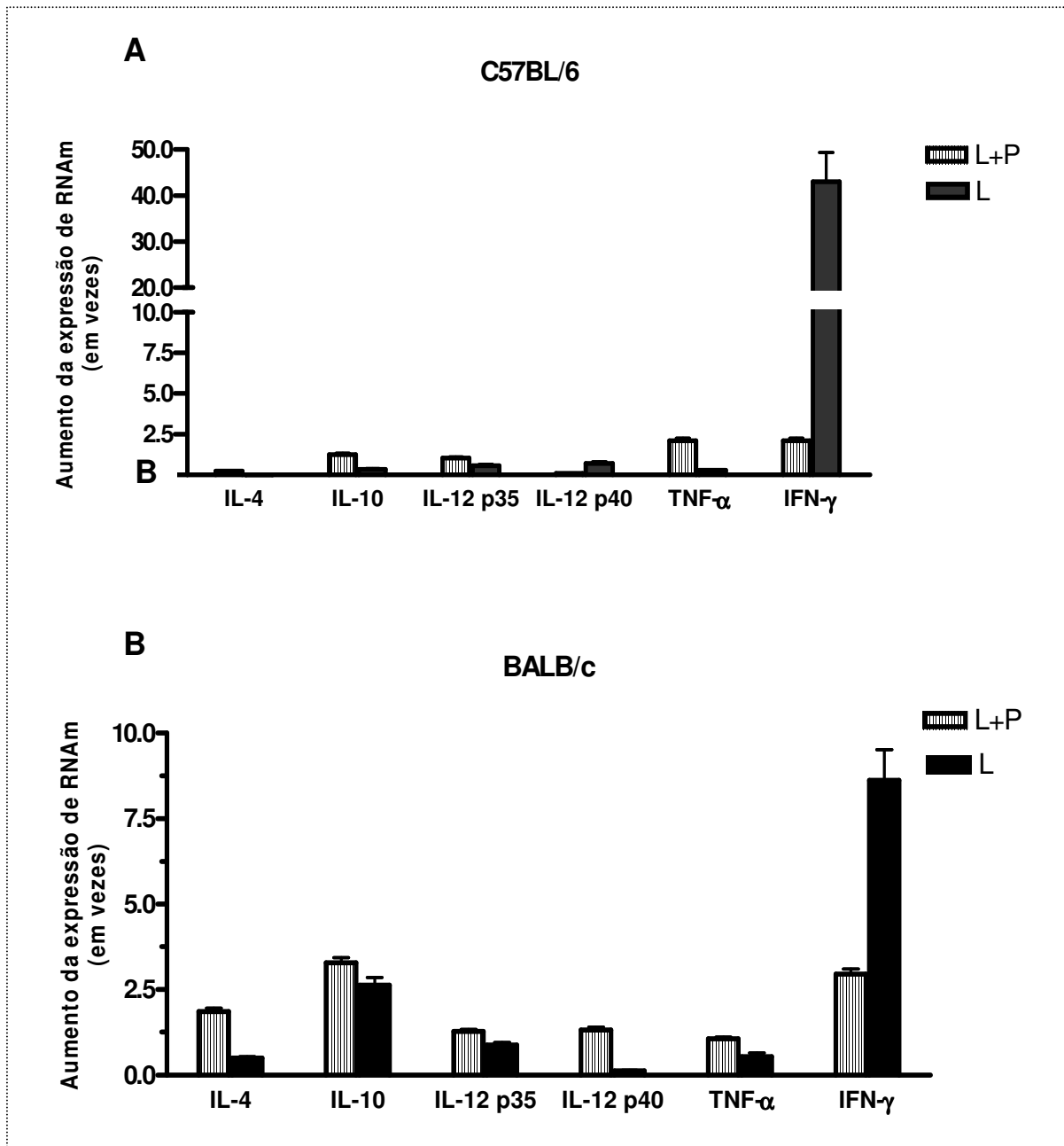


**Gráfico 3: Avaliação da cinética do recrutamento de macrófagos na pele (A) e na cápsula inflamatória (B) de animais C57BL/6.** Não foram apresentadas diferenças estatísticas entre as peles dos três grupos experimentais avaliados. Já nas cápsulas, na presença do parasito, houve maior produção de NAG, com diferença estatística aos 21 dias pós-infecção. Legenda: grupo com infecção por *L. major* e implante de parafina (*L+P*), somente com implante de parafina (*P*) e somente infectado com *L. major* (*L*). \* Índice de significância estatística ( $p < 0,05$ ).

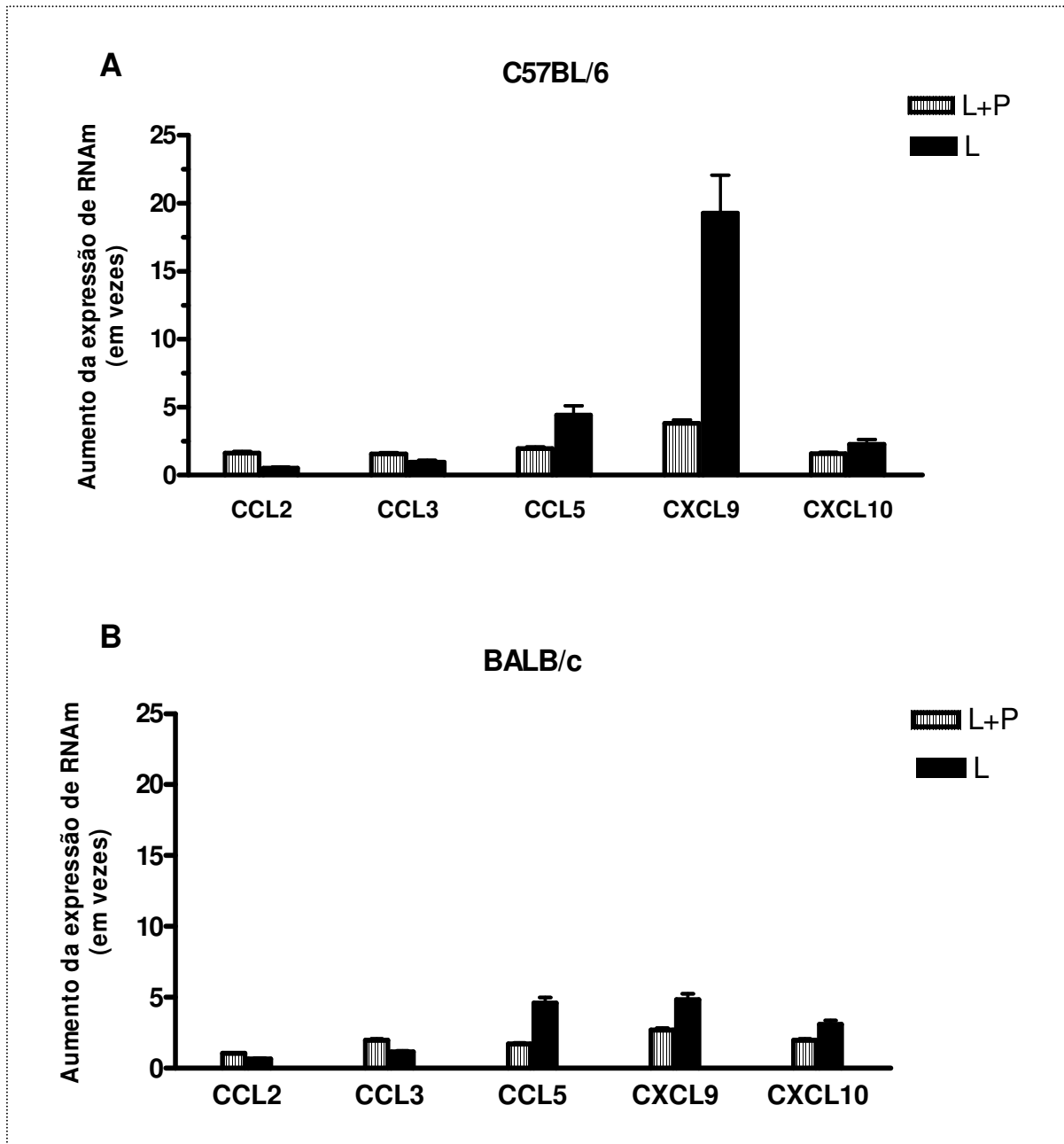
#### 4.4 – Análise da expressão de citocinas e quimiocinas por RT-PCR

Camundongos C57BL/6 são resistentes à infecção por *L.major*. Entretanto nossos resultados mostrados anteriormente e de Tafuri e colaboradores (2000), demonstraram que quando o parasito é associado a implante de tablete de parafina, a lesão, após 21 dias, assemelha-se histologicamente aquelas encontradas em animais susceptíveis BALB/c, na mesma situação experimental. Foram realizadas as análises das expressões de citocinas das peles (Gráfico 4) e cápsulas inflamatórias (Gráfico 5) no tempo de infecção supra citado, de animais BALB/c e C57BL/6, associadas à resposta imune Th1 como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  assim como as associadas a resposta Th2, IL-4 e IL-10 para sabermos se haveria uma inversão da resposta imune, de Th1 para Th2, a fim de compararmos o perfil imunológico da lesão a sua histologia.

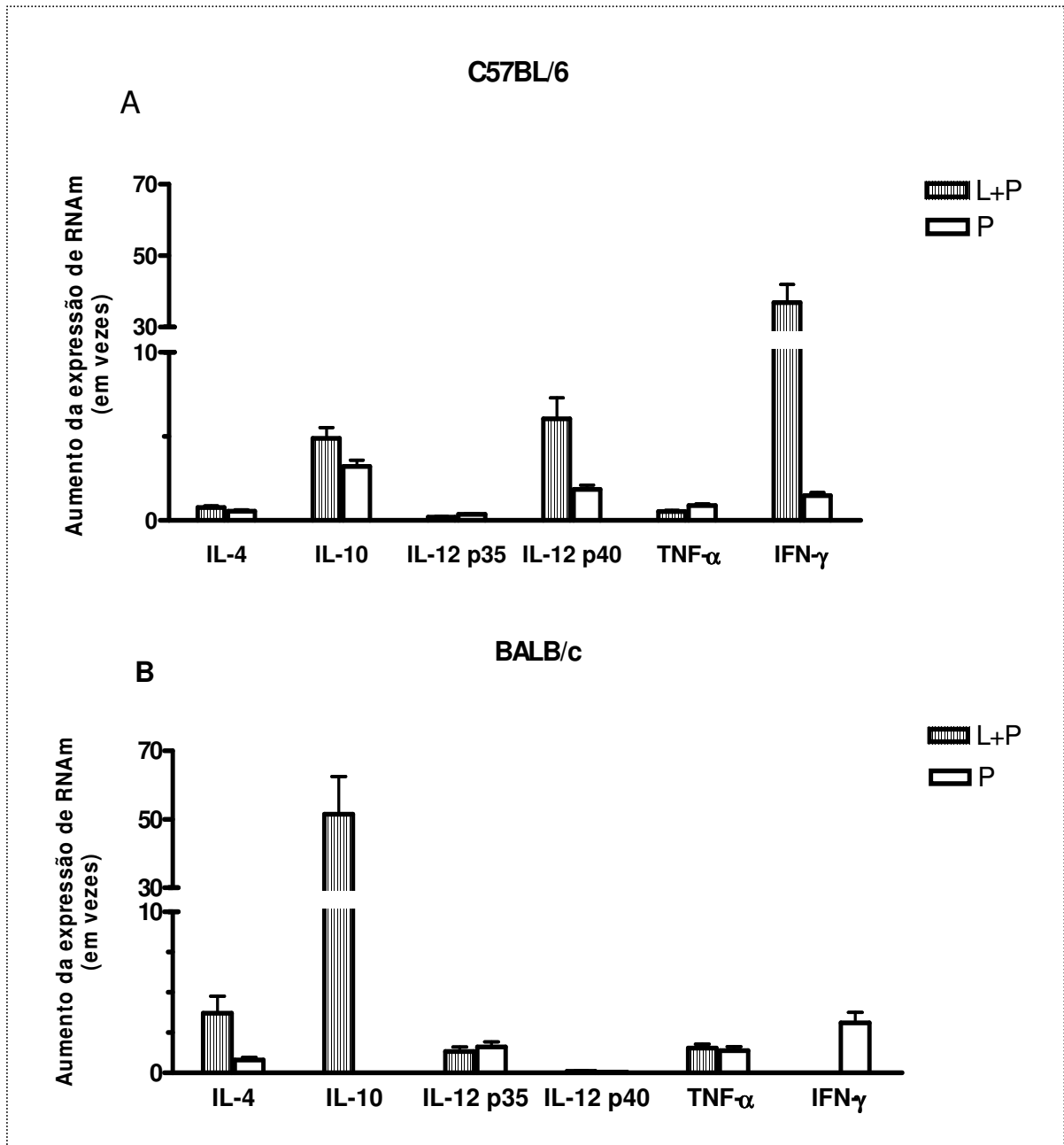
Dessas mesmas amostras biológicas, também foram avaliadas as expressões de algumas quimiocinas da pele (Gráfico 6) e cápsula inflamatória (Gráfico 7), para caracterizarmos o grau de recrutamento de algumas populações de leucócitos, principalmente as quimiocinas diretamente relacionadas a quimiotaxia de macrófagos (CCL2, CCL3 e CCL5) e de linfócitos (CXCL9 e CXCL10).



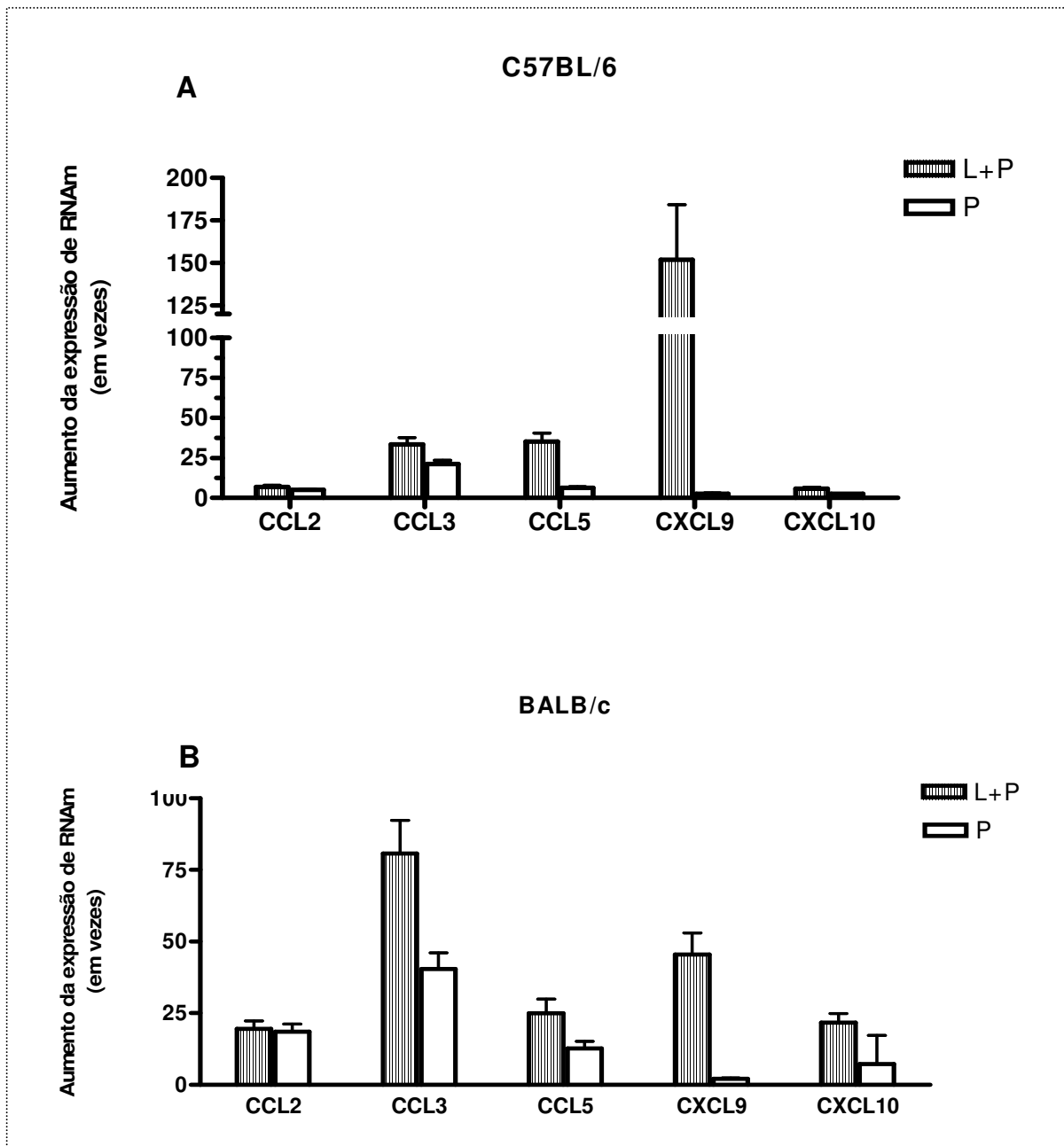
**Gráfico 4: Expressão de RNAm das citocinas IL-4, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, TNF-α e IFN-γ das peles de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B).** As peles foram retiradas dos animais eutanasiados aos 21 dias após infecção. Os resultados foram expressos em aumento do número de vezes em relação às amostras de pele de animais que receberam apenas implante de parafina (considerado como valor 1,0). Legenda: **L+P** (animais infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. major* -1x10<sup>6</sup> leishmanias/mL -associado a implantes de parafina) e **L** (animais infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. major* - 1x10<sup>6</sup> leishmanias/mL). Cada barra representa a média ± erro padrão de cinco animais por grupo.



**Gráfico 5: Expressão de RNAm das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10 das peles de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B).** As peles foram retiradas dos animais eutanasiados aos 21 dias após infecção. Os resultados foram expressos em aumento do número de vezes em relação às amostras de pele de animais que receberam apenas implante de parafina (considerado como valor 1,0). Legenda: **L+P** (animais infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. major* -1x10<sup>6</sup> leishmanias/mL -associado a implantes de parafina) e **L** (animais infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. major* -1x10<sup>6</sup> leishmanias/mL). Cada barra representa a média ± erro padrão de cinco animais por grupo.



**Gráfico 6: Expressão de RNAm das citocinas IL-4, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, TNF-α e IFN-γ das cápsulas inflamatórias de camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B).** As cápsulas inflamatórias retiradas dos animais eutanasiados após 21 dias. Os resultados foram expressos em aumento do número de vezes em relação às amostras de pele de animais que receberam apenas implante de parafina (considerado como valor 1,0). Legenda: **L+P** (animais infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. major*  $-1 \times 10^6$  leishmanias/mL e associado a implantes de parafina) e **P** (animais que receberam apenas implante de parafina). Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão de cinco animais por grupo.



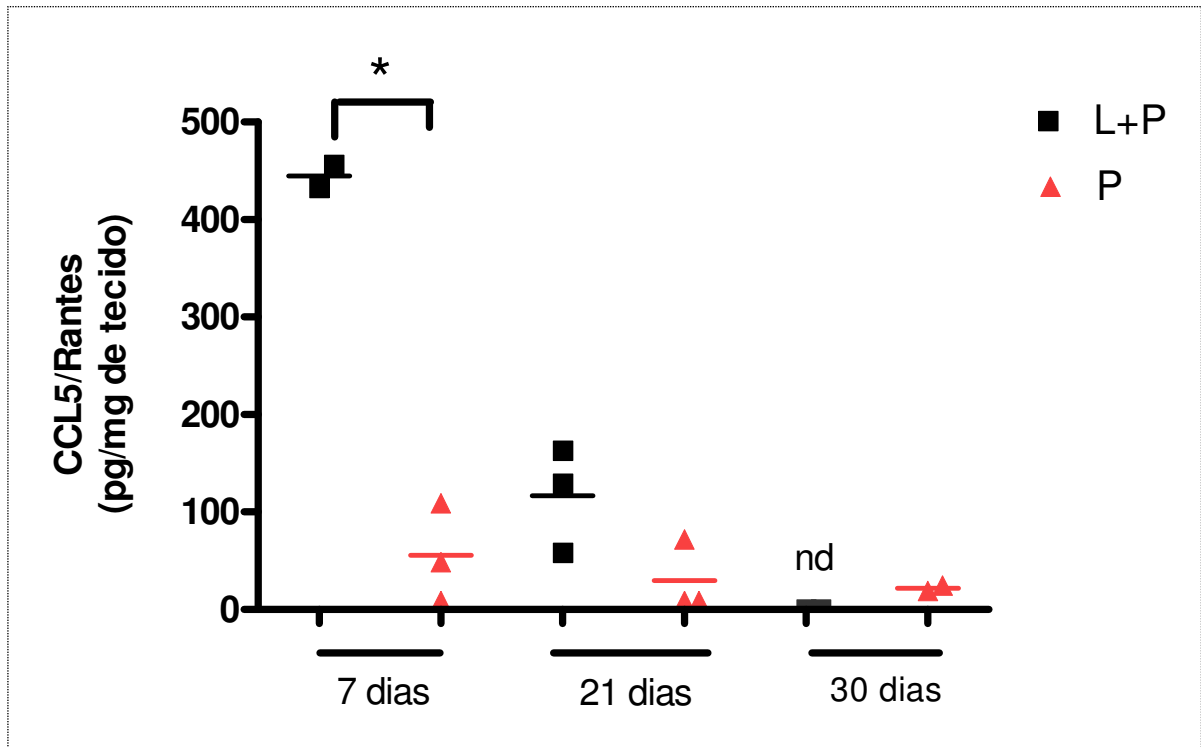
**Gráfico 7: Expressão de RNAm das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10 das cápsulas inflamatórias de animais C57BL/6 (A) e BALB/c (B).** As peles foram retiradas dos animais eutanasiados após 21 dias após infecção. Os resultados foram expressos em aumento do número de vezes em relação às amostras de pele de animais que receberam apenas implante de parafina (considerado como valor 1,0). Legenda: **L+P** (animais infectados com promastigotas em fase estacionária de *L. major* -1x10<sup>6</sup> leishmanias/mL -associado a implantes de parafina) e **P** (animais que receberam apenas implante de parafina). Cada barra representa a média ± erro padrão de cinco animais por grupo.

#### 4.5– Dosagem de quimiocinas pelo método ELISA

A detecção de RNAm para certa quimiocina não significa necessariamente em sua expressão. Por isso, avaliou-se a presença das proteínas CCL2, CCL3 e CCL5 nas cápsulas inflamatórias de animais C57BL/6 nos tempos de 7, 21 e 30 dias após implante de parafina e infecção, através de ensaio imunoenzimático. Para tanto, utilizou-se o extrato proteico de fragmentos das cápsulas, conforme detalhado na metodologia.

Não foram detectadas as quimiocinas CCL2 e CCL3 na diluição utilizada (1:3). Em relação a quimiocina CCL5, foram obtidas leituras de algumas amostras, verificando-se que após 7 dias, os grupos que tinham a infecção associada a implante (L+P) tiveram dosagens significativamente mais elevadas que o grupo que tinha apenas implante de parafina (P). No tempo de 21 dias, as leituras para o grupo L+P foram mais altas, mas não houve diferença estatística em relação ao grupo P. Não foi possível avaliar os grupos após 30 dias, pois apenas foram detectados valores relativos ao grupo P. Esses resultados foram mostrados no Gráfico 8.





**Gráfico 8: Cinética da produção da quimiocina RANTES/CCL5 nas cápsulas inflamatórias de animais C57BL/6.** Os níveis de CCL5 foram dosados nas cápsulas inflamatórias dos grupos de animais infectados com promastigotas em fase estacionária de *L.major*  $1 \times 10^6$  leishmanias/mL -associado a implante de parafina (**L+P**) e somente com implante de parafina (**P**). As linhas horizontais representam as medianas dos valores encontrados. nd (não detectado)  
\* Índice de significância ( $p < 0,05$ )

## 5. DISCUSSÃO

A leishmaniose experimental murina é um bom modelo para a investigação da diversidade de mecanismos regulatórios que medeiam a susceptibilidade e resistência à doença e suas possíveis implicações relacionadas a outras doenças infecciosas (Tapia et al., 1996). São considerados resistentes camundongos (linhagem C57BL/6) que conseguem eliminar grande parte dos parasitos pelo favorecimento da atividade microbicida dos macrófagos guiada pela produção de citocinas como IL-2 e IFN- $\gamma$  (resposta Th1), apresentando cura espontânea. Já em animais ditos susceptíveis, como os da linhagem BALB/c, verifica-se o predomínio das citocinas IL-4 e IL-10 (resposta Th2) no sítio de lesão e o desenvolvimento de uma resposta imune humoral e ineficiente controle da replicação dos parasitos. Nesses animais as lesões são progressivas, podendo ser fatais (Awasthi et al., 2004; Almeida et al., 2003; Sacks; Noben-Trauth, 2002).

Tafuri e colaboradores (2000) utilizaram o modelo inflamatório experimental induzido por tablete de parafina implantado no subcutâneo de camundongos C57BL/6 e BALB/c. A parafina é considerada um agente inflamatório inerte e não-imunogênico e leva à formação de um tecido de granulação ao seu redor (cápsula inflamatória), caracterizado pela prevalência de células mononucleadas, presença de células gigantes multinucleadas (derivadas da fusão de macrófagos), vasos sangüíneos e células epitelióides. Com o passar do tempo, o número de células diminui e há aumento de fibras colágenas (Raso, 1976). O objetivo foi avaliar a influência dessa resposta inflamatória no curso da infecção por *L.major*.

A partir da observação de Tafuri e colaboradores (2000) de que animais C57BL/6, que receberam implantes de parafina associados à infecção por *L.major*, apresentaram um quadro inflamatório intenso e elevado grau de parasitismo semelhante ao de animais BALB/c, aos 21 dias pós-infecção, o presente estudo se propôs a investigar alguns aspectos imunológicos associados a essa “susceptibilidade”, pelo menos transitória, de animais C57BL/6, conhecidos como resistentes à infecção. Além disso, averiguamos se uma dose menor de parasitos causava o mesmo cenário histológico. Assim, utilizamos uma dose dez vezes menor ( $1 \times 10^6$  leishmanias/mL) que no trabalho de Tafuri e colaboradores (2000). Foi constatado, em todos os animais, após análise histológica qualitativa que as

mesmas características inflamatórias foram mantidas nos dois experimentos, ou seja, o processo inflamatório induzido pelo tablete de parafina associado à infecção por *L.major* foi maior que aquele provocado somente pelo tablete de parafina ou somente pela infecção por *L.major*.

Comparando as peles dos três grupos experimentais de BALB/c e C57BL/6, as amostras dos animais BALB/c apresentaram sempre um maior parasitismo em relação às de animais C57BL/6, portanto mais susceptíveis à infecção, tanto nos grupos com implante de parafina ou sem, confirmando os dados da literatura. Ressaltamos que, nos grupos infectados com *L.major* e implantados com parafina, observou-se pico de parasitismo estatisticamente relevante em peles de BALB/c aos 21 dias pós-infecção. Todavia, o que mais nos chamou a atenção foi o aumento de parasitismo tecidual das amostras histológicas de cápsulas inflamatórias em relação aos da peles, aos 7 e 21 dias, de ambas as linhagens, confirmado pela análise quantitativa realizada pelo método de diluição limitante (Vieira et al., 1996). Além disso, aos 21 dias pós-infecção, em animais que receberam implante de parafina, o parasitismo dessas cápsulas obtidas dos animais C57BL/6 foi significativamente maior que das amostras obtidas dos camundongos BALB/c. Assim, foi percebido transitoriamente (aos 21 dias) que animais C57BL/6 apresentavam perfil histológico e parasitário de “susceptibilidade”. Denominamos isto como uma susceptibilidade transitória porque aos trinta dias pós-infecção houve queda acentuada do parasitismo nas cápsulas inflamatórias de animais C57BL/6.

Então a fim de verificarmos se houve uma mudança do perfil imunológico de animais C57BL/6 infectados com *L.major* e com implante de parafina (L+P), que justificasse o alto parasitismo das cápsulas inflamatórias nesse grupo de animais após 21 dias, foram analisados os aumentos da expressão do RNAm de algumas citocinas envolvidas na resposta Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ ) e Th2 (IL-4 e IL-10) através da técnica de real time RT-PCR em relação à pele do grupo de animais que receberam somente o implante de parafina (P). Consideramos essa amostra como controle pelo fato de termos um estímulo não-imunogênico, capaz de promover uma resposta imune mais moderada se comparada ao estímulo imunogênico provocado pela *L.major*.

Com relação às peles de animais C57BL/6 foi verificado que a expressão de IFN- $\gamma$  é muito maior nos grupos apenas infectados com *L.major* (*L*) (aumento de 43 vezes) se comparado ao grupo L+P (aumento de 2 vezes). Em animais BALB/c ocorre o aumento de apenas 8 vezes em relação ao controle, sob a mesma condição experimental. Já nas cápsulas inflamatórias de animais C57BL/6, do grupo L+P, IFN- $\gamma$  também tem um aumento considerado (36 vezes mais expressão de RNAm em relação ao controle), notando-se a importância da presença da *L.major* para a produção dessa citocina.

Analisamos a expressão da citocina IL-10 e notou-se que estava mais aumentada (cerca de 4 vezes) em relação ao grupo somente com *L.major*. Inicialmente IL-10 foi descrita como uma citocina especificamente secretada por células Th2 CD4+, tendo ação supressora ou reguladora nas doenças auto-imunes, rejeição a enxertos e doenças parasitárias (Awasthi et al., 2004). Além disso, células Th1 e Th2 podem secretar IL-10, assim como células T reguladoras (Treg) naturais ou Treg induzidas (Tr1) na tentativa de limitar a exacerbação da resposta imune e prevenir maiores danos aos tecidos (Trichieri, 2007). Kane e Mosser (2001) investigaram a participação de IL-10 na progressão da leishmaniose *in vitro* e demonstrou-se que uma pequena dose (10ng/mL) dessa citocina é capaz de inibir a produção de IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , além de inibir a ativação de macrófagos. Portanto, o aumento da expressão de RNAm de IL-10 verificado nos grupos L+P de animais C57BL/6 pode ser responsável pela inibição da atividade de macrófagos e pelo aumento do parasitismo observado nas análises histológicas, mesmo na presença de IFN- $\gamma$ . Nas cápsulas inflamatórias de animais BALB/c, do grupo L+P, há um aumento de 51 vezes na produção de IL-10 em relação ao seu controle. Assim, nossos resultados mostraram-se coerentes com os achados na literatura (Trichieri, 2007, Kane; Mosser, 2001; Awasthi et al., 2004).

A presença de IL-10 no sítio da lesão também pode interferir na produção de NO pelos macrófagos, principal via de eliminação de parasitos *L.major* (von Stebut, 2007). Em artigo de revisão, Sacks e Anderson (2004), mencionam que infecções experimentais por *L. mexicana* ou *L.amazonensis* em animais BALB/c deficientes para IL-10 não alteram a progressão da lesão. A redução expressiva de parasitos no local de inoculação seria decorrente do aumento da produção de IFN- $\gamma$  e NO.

Alguns trabalhos discutem que nas fases iniciais de infecção experimental murina por protozoários do gênero *Leishmania*, há um acúmulo de células Treg no local do inóculo de parasitos. Esse aumento de células Treg naturais pode limitar a eficácia da resposta Th1, através da produção de IL-10, promovendo a persistência do parasito na lesão, potencial transmissão a outros hospedeiros e manutenção de seu ciclo de vida. Por outro lado, outros autores mostraram que a remoção de células Treg pode levar a uma “cura estéril”, não possibilitando imunidade à re-infecções (Belkaid; Rouse, 2005; von Stebut, 2007). Entretanto, há muitas questões a serem respondidas sobre as células Treg, como são originadas, ativadas e capazes de modular a resposta imune. Tem se tornado claro que, as ações dessas células, no que tange inflamação e tolerância, ocorrem por diferentes vias e são específicos para cada tipo de tecido (Izcue; Powrie, 2008).

A citocina IL-4 é conhecida como principal iniciador da resposta Th2 e envolvida em casos de leishmanioses cutâneas crônicas (Sacks; Noben-Trauth, 2002; Awasthi et al., 2004). Verificando-se os resultados da expressão RNAm de IL-4, em todos os grupos avaliados, os valores foram menores aos da expressão de IL-10. Entretanto alguns trabalhos demonstram que o foco da susceptibilidade do organismo à leishmaniose pode sair de uma produção inicial de IL-4 com posterior indução na produção de IL-10 (Biedermann et al., 2001; Awasthi et al., 2004). Assim, a persistência da lesão pode estar relacionada a uma desregulação dos mecanismos de controle da inflamação, por aumento de IL-10, com conseqüente diminuição da ação de células Th1 e não pela exacerbação da resposta Th2 (Anderson et al., 2005).

A citocina IL-12 (p40) esteve mais aumentada na cápsula inflamatória que na pele dos animais C57BL/6 do grupo L+P, mas com pequena expressão em cápsulas de animais BALB/c. Em acordo com esses resultados, Scharton-Kersten e Scott (1995) discutem que a diminuição da capacidade desses animais em promover uma resposta Th1, nos estágios iniciais da infecção, seja devido a fatores genéticos. Apesar de formas promastigotas de *L. major* serem capazes de induzir a produção de IL-12 p40 em animais BALB/c, os níveis dessa citocina não seriam sustentados durante a progressão da doença. Sem IL-12, a produção de IFN- $\gamma$  ficaria prejudicada assim como a citotoxicidade das células NK.

As citocinas exercem um papel importante na modulação das quimiocinas. As quimiocinas têm sido reconhecidas como fundamentais no recrutamento de células e na promoção da reação inflamatória relacionada a numerosos agentes infecciosos. Cada grupo de quimiocinas atrai determinado tipo de célula para o sítio inflamatório. As da família CXC, atraem principalmente neutrófilos e as da CC atuam em vários tipos celulares, através de receptores específicos para cada tipo de quimiocina, tais como monócitos, basófilos, eosinófilos, e linfócitos, mas não neutrófilos. São secretadas por vários tipos celulares como leucócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais (Matte; Olivier, 2002). *L.major* pode modular a habilidade do tecido em recrutar e reter células T produtoras de citocinas (Katzman; Fowell, 2008), inclusive alterar expressão de receptores de quimiocinas em células dendríticas (DC) afetando sua capacidade migratória dos tecidos para linfonodos regionais (Steigerwald; Moll, 2005). Além disso, o padrão de quimiocinas depende não só do hospedeiro, mas da linhagem de uma mesma espécie de parasito infectante (Teixeira et al., 2005).

Nas cápsulas inflamatórias, em comparação com as peles, observou-se um aumento da expressão de todas quimiocinas analisadas (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10), especialmente aquelas induzidas por IFN- $\gamma$  e diretamente envolvidas com a resposta Th1, como CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CXCL9 (MIG) e CXCL10 (IP-10). Estas duas últimas são quimioatraentes para linfócitos T, que possuem receptores do tipo CXCR3, ligantes para tais quimiocinas (Farber, 1997). É possível que o aumento da expressão de CXCL9 e CXCL10 possa estar relacionado ao recrutamento de células Treg produtoras de IL-10. Para verificarmos essa hipótese, seriam necessários novos experimentos que sinalizassem a presença de células Treg. Uma possibilidade é a marcação do fator de transcrição Foxp3, (transcription factor forkhead box protein) somente presente nas células Treg (Peters; Sacks, 2006).

Luther e Cyster (2001) sugeriram que a neutralização de CCL5 (RANTES) reduziria a formação de determinados granulomas, por exemplo, identificando uma possível associação entre CCL5 e resposta celular do tipo Th1. Adicionalmente, Santiago et al. (2004) mostraram que CCL5 participa de uma cascata de eventos que levam a um eficiente controle do parasitismo, pois o tratamento com anticorpos

anti-CCL5 ou substâncias agonistas como MET-RANTES provoca aumento de susceptibilidade a *L.major* em C57BL/6. Em nosso trabalho observamos uma expressão bastante significativa de CCL5 na cápsula inflamatória de animais C57BL/6 quando comparada à cápsula formada sem a presença da *L.major*. Por outro lado, as dosagens de CCL5 aos 7, 21 e 30 dias, pela técnica de ELISA, foram principalmente detectadas nos dois primeiros intervalos de tempos. Notou-se que a produção de CCL5 nas cápsulas inflamatórias de animais C57BL/6 infectadas por *L.major* foi estatisticamente maior aos 7 dias em comparação às cápsulas não infectadas. Contudo, os níveis dessa quimiocina decrescem aos 21 dias e não foi detectado aos 30 dias no grupo L+P. Assim, a diminuição dos níveis de CCL5 coincide com a resolução da infecção e da inflamação no local da lesão de animais C57BL/6 (Santiago et al., 2004).

Em nossos experimentos houve uma grande expressão de RNAm de CCL2 nas cápsulas inflamatórias de animais BALB/c (~20 vezes) em relação ao controle. Entretanto, não houve diferença estatística entre cápsulas formadas na presença ou ausência do parasito. O papel de CCL2 nas infecções causadas por *L. major* tem papel biológico diversificado. A neutralização de CCL2 leva a um aumento da produção de IL-12 por macrófagos associados a formação de granulomas intralobulares hepáticos murinos (Murray, 2001). A atuação sinérgica entre CCL2 e IFN- $\gamma$  contribui para a eliminação de parasitos *L. major* enquanto que IL-4 antagoniza a produção dessa quimiocina (Teixeira et al., 2007). Por outro lado, CCL2 pode atuar na diferenciação de células T virgens em Th2, ao induzir o aumento de IL-4 (Luther; Cyster, 2001). Já Quinones e colaboradores (2007) ressaltam a importância do receptor de CCL2. Camundongos C57BL/6 deficientes para CCR2 falham ao gerar uma resposta Th1 enquanto que animais BALB/c deficientes para CCL2 são resistentes à *L.major* e exibem uma reduzida resposta Th2. Embora CCL2 não seja o único ligante para CCR2, parece que essa ligação favorece mais eficientemente o recrutamento de monócitos sangüíneos, se considerarmos apenas esse receptor. Dependendo das concentrações de quimiocinas presentes nas lesões, pode haver populações celulares diferentes a cada tempo da infecção. Estudos têm demonstrado que monócitos sangüíneos periféricos, tanto de humanos quanto de camundongos, exibem morfologias diferentes, incluindo tamanhos diferentes, tamanho do núcleo e grau de granulosidade. Além disso, podem exibir diferentes

expressões de receptores de quimiocinas refletindo diferentes graus de especialização (Gordon; Taylor, 2005). Por exemplo, em camundongos a maioria dos monócitos sanguíneos exibe o receptor CCR2 que apresenta alta afinidade por CCL2 que é muito importante na atração dessas células para o sítio de lesão. Uma pequena parcela (~2%) desses monócitos apresenta o receptor CXCR3 (ligantes CXCL9 e CXCL10) (Muller, 2001).

A expressão de CCL3 nas cápsulas inflamatórias dos animais BALB/c, do grupo L+P, foi significativamente maior que o controle (~80 vezes), mas um aumento também ocorreu nas cápsulas dos animais C57BL/6. Brenier-Pinchart e colaboradores (2001) sinalizam que a expressão da quimiocina CCL3 predomina em pacientes que sofrem de leishmaniose cutânea difusa. Além disso, os autores descrevem que enquanto CCL2 estimula a explosão respiratória em macrófagos, CCL3 parece não exercer tal função.

Nossos resultados mostraram que, mesmo temporariamente, os macrófagos dos animais C57BL/6 presentes na cápsula inflamatória, parecem falhar na contenção da replicação da *L.major*, apesar de se mostrarem enzimaticamente ativos. De fato, ao avaliarmos a atividade dos macrófagos, através da cinética da produção da enzima NAG nas diversas condições experimentais, verificamos que a produção dessa enzima foi ligeiramente maior aos 7 do que aos 21 dias, mas aumenta após 30 dias. Houve aumento significativo de NAG nos grupos de animais C57BL/6 que receberam implante de parafina e infectado com *L. major* em relação ao grupo apenas implantado com parafina. Concluímos que apesar dos parasitos potencializarem a atividade dos macrófagos, os mesmos não foram capazes de eliminá-los. Uma possível interpretação seria que os macrófagos não estariam produzindo quantidades suficientes de sua principal substância leishmanicida o óxido nítrico (NO), mesmo com grande expressão de IFN- $\gamma$ , essencial para na indução da síntese da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Scott, 1991; Rogers et al., 2002). Para testar essa hipótese fizemos algumas marcações imunistoquímicas para iNOS em cortes histológicos das amostras de pele e cápsula inflamatória dos animais C57BL/6. Análises qualitativas prévias indicaram a marcação para iNOS nos macrófagos presentes tanto na pele quanto nas cápsulas.



O trabalho de Camarero e colaboradores (1990) demonstra que células epitelióides e “pré-epitelióides” presentes em granulomas, induzidos por implantes de lamínulas de vidro no subcutâneo de camundongos Swiss, secretam fatores que bloqueiam a produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ )<sup>2</sup> por macrófagos inflamatórios, a partir do 14º dia de implantação. Esses dados sugerem que há diferentes modulações metabólicas dos macrófagos aderidos às lamínulas de acordo com a evolução da lesão. Assim, em nosso estudo, talvez a parafina possa interferir na atividade leishmanicida dos macrófagos, assim como o vidro. Essa interferência seria transitória (aos 21 dias pós-infecção), mas depois sua atividade microbicida seria reconstituída, resultando na queda do parasitismo observada nos animais C57BL/6. Novos estudos precisam ser aprofundados para uma melhor compreensão dos mecanismos que levam a essa “ineficiência temporária” dos macrófagos, especificamente após 21 dias, em animais infectados e implantados com tablete de parafina.

Nesse trabalho foram mostradas as diferenças quantitativas na indução de quimiocinas/citocinas no sítio de infecção, *in vivo*, com *L.major* induzindo a expressão de determinado painel de mediadores químicos, na presença ou não a um estímulo não-imunogênico (parafina). Parece que *L.major* pode induzir um forte efeito local em determinado microambiente tecidual que altera o recrutamento ou retenção de sinais para uma variedade de efeitos imunes. Além disso, o estímulo inflamatório causado pela parafina pode exercer efeito modulador na infecção por *L. major*, interferindo na resposta leishmanicida dos macrófagos, principalmente nos animais C57BL/6.

---

<sup>2</sup> Espécies reativas de oxigênio, como  $O_2^-$ , são importantes substâncias microbicidas produzidas por macrófagos ativados.

## 6 - CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram que:

1. A parafina foi capaz de induzir uma inflamação crônica e parasitismo mais intenso nas amostras de peles e cápsulas inflamatórias tanto em animais BALB/c quanto em C57BL/6. O inóculo de  $1 \times 10^6$  leishmanias/mL causou um quadro histológico semelhante, porém um pouco menos intenso, àquele observado com inóculo de  $1 \times 10^7$  leishmanias/mL, confirmado quantitativamente;
2. Não houve uma inversão da resposta imunológica temporal nos animais C57BL/6 do tipo Th1 para o tipo Th2 no modelo animal infectado com *L.major* e associado ao implante de parafina em relação aos animais que somente foram infectados com *L.major* ;
3. A parafina induziu a produção de IL-10 com conseqüente regulação inibitória da ação de macrófagos em amostras de pele e principalmente de cápsula inflamatória de animais C57BL/6;
4. Houve um predomínio das quimiocinas CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 sobre CCL3/MIP-1 $\alpha$  nas cápsulas inflamatórias dos animais C57BL/6.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, D.H; Lloyd, A.R (1997) Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 349 (9050), 490-495

Almeida, M. C. de et al. (2003) *Leishmania* infection: analysis of its first steps. A review. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz.* 98(7), 861-870

Anderson, C.F., Mendez, S.; Sacks, D.L. (2005) Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol*, 174, 2934-41

Andrade, B.B et al. (2007) Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand J Immunol* 66 (2-3) 122-7

Awasthi, A.; Mathur, R.K.; Saha, B. (2004) Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J.Med Res.*119 (6), 238-258

Barcelos, L.S et al. (2004) Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm Res.* 53, 576-84

Belkaid, Y et al. (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507

Belkaid, Y.; Rouse, B.T. (2005) Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 6 (4), 353-60

Biederman, T. et al. (2001) IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol* 2 (11), 1054-60

Bogdan, C. et al. (2000) Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *J. Exp. Med.* 191 (12), 2121-30

Brenier-Pinchart, M.P et al. (2001) Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol* 17(6), 292-6

- Brown, L. F et al. (1997) Vascular permeability factor vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *Experientia Supplementum (Basel)* 79, 233-269
- Camarero, V.C et al. (1990) Epithelial macrophages secrete a deactivating factor for superoxide release. *J Cell Physiol* 145 (3), 481-7
- Carollo, M. et al. (2001) Analysis of the temporal expression of chemokines and chemokine receptors during experimental granulomatous inflammation: role and expression of MIP-1alpha and MCP-1. *Br J Pharmacol* 134 (6), 1166-79
- Conrad S. M. et al. (2007) Leishmania-derived murine monocyte chemoattractant protein 1 enhances the recruitment of a restrictive population of CC chemokine receptor 2-positive macrophages. *Infect Immun* 75 (2), 653-65
- Farber, J.M. (1997) Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J. Leukoc Biol*, 61 (3), 246-57
- Ferreira A. N. D et al. (2004) Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO) *Br J Pharmacol* 141, 1185-1192
- Gordon, S.; Taylor, P.R (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity *Nat Rev Immunol* 5, 953-64
- Grimaldi G.; Tesh, R.B. (1993) *Leishmaniasis* of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Reviews* 6, 230-250
- Izcue, A.; Powrie, F. (2008) Special regulatory T-cell review: regulatory T cells and the intestinal tract – patrolling and frontier. *Immunol*, 123, 6-10
- Kane, M.M.; Mosser, D.M. (2001) The role of IL-10 in promoting disease progression in Leishmaniasis. *J. Immunol* 166, 1141-47.
- Katzman, S.D.; Fowell, D.J. (2008) Pathogen-imposed skewing of mouse chemokine and cytokine expression at the infected tissue site. *J Clin Invest*.118 (2), 801-11

Kidd, P. (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Ver* 8 (3), 223-46

Luther, S.A.; Cyster, J.G. (2001) Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2 (2),102-7

Luz, Z.M.P.da et al. (2001) A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34, 249-254

Mackay, C.R. (2001) Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2(2), 95-101

Martins, T. (2002) Histopatologia da cinética da reação inflamatória induzida por *Leishmania major* em camundongos deficientes para a quimiocina MIP-1alfa, para a citocina IFN- $\gamma$  e para o receptor p55 da citocina TNF- $\alpha$ , associado ao implante de tabletes de parafina no subcutâneo. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da UFMG. 53p

McMahon-Pratt, D.; Alexander, J. (2004) Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev* 206-24

Matsukawa A. et al. (2000) Chemokines and innate immunity. *Rev Immunogenet.* 2 (3) 339-58

Matte, C.; Olivier, M. (2002) *Leishmania* – induced cellular recruitment during the early inflammatory response: Modulation of Proinflammatory mediators. *J Infect Dis* 185 (5), 673-81

Moser, B.M. et al. (2004) Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25(2), 75-84

Muller, W.A. (2001) New mechanisms and pathways for monocyte recruitment *J.Exp.Med* 194 (9), F47-F51

Murray, H.W. (1994) Blood Monocytes: Differing effector role in experimental visceral versus cutaneous leishmaniasis. *Parasitology Today* 10, 220-223

Murray, H.W. (2001) Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int Exp. Pathol.* 82 (5), 249-67

Oliveira, C.F. (2005) Papel dos receptores p55 de TNF em processos inflamatórios induzidos por *Leishmania major*. Dissertação de Mestrado. ICB/UFMG. 81p

Pan American Health Organization (PHO) (2007) Leishmaniasis : 2007 Update. Disponível em : <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/leish-2007.pdf>. Acesso em 23/10/2007.

Peters, N.; Sacks, D. (2006) Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Reviews* 213, 159-79

Quinones, M.P et al. (2007) CCL2-independent role of CCR2 in immune responses against *Leishmania major* . *Paras Immunol*, 29 211-17

Ramirez, J. L.; Guevara, P. (1997). Persistent infections by *Leishmania (viannia) braziliensis* . *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 92, 333-338.

Raso P. (1976) Estudo quantitativo e qualitativo das células do tecido conjuntivo reacional a corpos estranhos (tabletes de parafina-cera implantados em ratos) sob a influência de alguns hormônios (ACTH, Acetado de Cortone e DOCA). Tese de concurso para professor Titular. UFOP. 110p.

Reithinger, R.; Dujardin, J.C. (2007) Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *J Clin Microbiol* 45(1), 21-25

Ritter, U.; Körner, H. (2002) Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 24(6), 295-301

Rogers, K.A. et al. (2002) Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major* *FEMS Microbiol Lett* 209 (1), 1-7

- Sacks, D.; Noben-Trauth, N. (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2(11), 845-858
- Sacks, D.; Anderson, C. (2004) Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice.
- Santiago, H.C et al. (2004) Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. *Infect Immun* 72(8), 4918-4923
- Scharton-Kersten, T.; Scott, P (1995) The role of the innate response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *J. Leukoc. Biol.* 57, 515-22
- Schluger, N.W ; Rom, W.N. (1997) Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. *Curr Opin Immunol* 9(4), 504-508
- Scott, P. (1991) IFN- $\gamma$  gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 147(9), 3149-55
- Soong, L. et al. (1997) Role of CD4<sup>+</sup> T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 158(11), 5374-5383
- Sousa, A.Q. et al.. (2006) Disseminated Cutaneous Leishmaniasis: A Patient with 749 Lesions. *Braz J Infect Dis.* 10(3), 230
- Steigerwald, M.; Moll, H. (2005) *Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. *Infect Immun* 73 (4) 2564-7
- Tafari, W.L. et al. (2000) Kinetics of an experimental inflammatory reaction induced by *Leishmania major* during the implantation of paraffin tablets in mice. *Virchows Arch* 437(4), 429-435
- Tapia, F.J. Dittmar-Cáceres, G. Sanchez M.A. (1996) Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. Medical Intelligence Unit. R.G. Landes Company. Austin, Texas. EUA. 240p

Teixeira, M.J. et al. (2005) Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. . *Infect Immun*, 73(2), 1191-95

Teixeira, M.J et al. (2006) Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends in Parasitol* 22 (1), 32-40

Trinchieri, G. (2001). Regulatory role of T Cells producing both interferon- $\gamma$  and interleukin 10 in persistent infection. *J. Exp. Med.* 194, F53-F57.

Trinchieri, G. (2007) Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J. Exp. Med*, 204 (2) 239-43

Uzonna, J.E. et al. (2004) Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon-gamma producing CD8+ T. *J Exp Med* 199 (11) 1559-66

van Zandbergen, G. et al. (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173 (11) 6521-5

Vieira, L.Q. et al. (1996) Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J Immunol* 157(2), 827-835

von Stebut, E. (2007) Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy *Exp Dermatol* 16 (4) 340-46

Ward, S.G. (2006) T lymphocytes on the move: chemokines gene expression during the early immune response to *Leishmania major*. *Infect Immun*, 71(3), 1587-1589

World Health Organization (WHO) (2005) Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr17/leishmaniasis.pdf>. Acesso em 03/06/2007.

Zhang, X. et al. (2006) Dynamic and Transient Remodeling of the macrophage IL-10 promoter during transcription. *J Immunol* 177 (2), 1282-88