

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Infecções com baixas doses de *Leishmania amazonensis*: um modelo para o estudo de leishmaniose tegumentar americana

Denise Fonseca Côrtes

Belo Horizonte - Minas Gerais
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Denise Fonseca Côrtes

Infecções com baixas doses de *Leishmania amazonensis*: um modelo para o estudo de leishmaniose tegumentar americana

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Leda Quercia Vieira

Belo Horizonte- Minas Gerais
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Denise Fonseca Côrtes

Infecções com baixas doses de *Leishmania amazonensis*: um modelo para o estudo de leishmaniose tegumentar americana

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Leda Quercia Vieira

Aprovado em _____

BANCA EXAMINADORA

COLABORADORES

Profa. Maria Leticia Ramos Jorge – Faculdade de Odontologia, UFMG

Profa. Cláudia Martins Carneiro – Laboratório de Imunopatologia – NUPEB/UFOP

Dra. Tatiani Uceli Maioli – Laboratório - ICB/UFMG

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser um amigo presente em todos os momentos de minha vida. Que seria de mim sem Ele!

À Vida por inúmeras oportunidades de recomeço em busca da realização de meus sonhos nunca me deixando desistir deles.

À professora Leda Quercia Vieira, pela acolhida em seu laboratório ao longo destes oito anos. Sua contribuição científica e pessoal foi fundamental para meu amadurecimento profissional e pessoal. Obrigada pela paciência e pela compreensão!

À professora Claudia Martins Carneiro, do NUPEB-UFOP, pela realização das histologias e pela sua ajuda incondicional, sempre disponível para discutir resultados e pelas valiosas sugestões. Obrigada por tudo e pela força nos últimos momentos antes da defesa!

À professora Cristina Bonorino, da PUC-RS, que me recebeu tão bem em seu laboratório. Foram apenas dois meses, porém, o enorme aprendizado foi como se tivessem sido anos. Obrigada por me fazer sentir em casa, apesar de tão distante dela.

Ao professor Luís Carlos Crocco Afonso, do NUPEB-UFOP, pela disponibilização dos reagentes de ELISA e socorros de última hora com as culturas de *Leishmania*.

À professora Maria Letícia Jorge Ramos, da Escola de Odontologia da UFMG, pela realização das análises estatísticas.

Ao departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG por sua acolhida durante todos estes anos de trabalho.

A todas as gerações de amigos do Laboratório de Gnotobiologia pela paciência e amizade. Foi muito bom conhecer cada um de vocês!

À Liliane, ao Matheus e a Talita que conviveram tão de perto comigo. Obrigada pela ajuda inestimável e pela paciência e amizade. Sem vocês seria muito difícil a realização dos trabalhos!

Às irmãs que fiz em Ouro Preto e que estão ao meu lado em todos os momentos de minha vida! Obrigada por tudo!

À minha amiga Tatiani por acompanhar de forma tão presente minhas tristezas e alegrias. Sempre me apoiando e incentivando nos momentos mais difíceis.

À Micheline, uma irmã tão especial, que sempre me deu força e nunca me permitiu desistir! Obrigada!

À minha mãe e irmãos por compreenderem tantos momentos de ausência e ao meu inesquecível pai (*in memoriam*), saudades imensas, tenho certeza que sempre olha por mim.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para meu crescimento pessoal. Com certeza nestes oito anos foram muitos os que passaram por mim trazendo um aprendizado imprescindível à minha formação!

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Leishmaniose experimental: Imunologia	5
1.2- Infecção com alta dose de <i>L. major</i>	7
1.2.1- Participação das células T e células B na infecção por <i>L. major</i>	7
1.2.2- Participação das citocinas e quimiocinas na infecção por <i>L. major</i>	9
1.2.3- Mecanismos efetores dos macrófagos na infecção por <i>L. major</i>	14
1.3- Infecção com alta dose de <i>L. amazonensis</i>	16
1.3.1- Função das células T e células B na infecção por <i>L. amazonensis</i>	16
1.3.2- Papel das citocinas e quimiocinas na infecção por <i>L. amazonensis</i>	19
1.3.3- Mecanismos de ação dos macrófagos na infecção por <i>L. amazonensis</i>	22
1.4- Infecção com baixa dose de <i>L. major</i>	24
1.5- Infecção com baixa dose de <i>L. amazonensis</i>	28
2- OBJETIVOS	30
2.1- Objetivos gerais	31
2.2- Objetivos específicos.....	31
3- MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1- Animais	33
3.2- Parasitos e infecção	33
3.3- Preparo dos antígenos	33
3.4- Quantificação dos parasitos nas orelhas.....	34
3.5- Histologia	34
3.5.1- Hematoxilina-Eosina.....	35
3.5.2- Imuno-histoquímica	35
3.6- Cultura de células e dosagens de citocinas.....	36
3.7- Obtenção de macrófagos	37
3.8- Dosagem de produção de óxido nítrico.....	37
3.9- Ensaio de atividade de arginase	37
3.10- Análise estatística.....	38
4- RESULTADOS	39
4.1- Curso de infecção	40
4.2- Carga parasitária e sua relação com o curso de infecção	47
4.3- Processo inflamatório.....	53
4.4- Cinética de produção das citocinas TNF, IFN- γ e IL-10	653
4.5- Produção de NO e arginase por macrófagos peritoneais coletados de animais infectados.....	73
5- DISCUSSÃO	81
6- CONCLUSÃO	95
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Camundongos C57BL/6 inoculados com a mesma dose de *L. major* ou *L. amazonensis* apresentam diferentes perfis de desenvolvimento de lesão. Animais C57BL/6 foram inoculados intradermicamente, em ambas as orelhas, com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis*..... 44
- Figura 2: Baixa dose de inóculo retarda o início do desenvolvimento da lesão causada por *L. major* e por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6. 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis* foram inoculadas intradermicamente, em ambas as orelhas de animais C57BL/6. 45
- Figura 3: Aspecto das lesões durante o curso de infecção. Animais C57BL/6 foram inoculados intradermicamente, em ambas as orelhas, com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis*. 46
- Figura 1: Número de parasitos nas orelhas de camundongos C57BL/6 inoculados intradermicamente com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis*..... 51
- Figura 5: Comparação entre o desenvolvimento da lesão e o número de parasitos de uma mesma espécie de *Leishmania* e inóculos diferentes ao longo do tempo estudado. 52
- Figura 6: Parasitismo e processo inflamatório na orelha de camundongos C57BL/6 infectados com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis*. A relação entre o índice de inflamação e o índice de carga parasitária em camundongos infectados com 10^3 ou 10^6 *L. major* ou *L. amazonensis* está representada. 59
- Figura 7: Cinética do aparecimento de células T, células T CD4⁺ e macrófagos em camundongos infectados com 10^3 ou 10^6 *L. major* ou *L. amazonensis*..... 60
- Figura 8: Comparação da cinética de células T, células T CD4⁺ e macrófagos em camundongos infectados com 10^3 ou 10^6 *L. major* ou *L. amazonensis* durante o curso de infecção..... 61
- Figura 9: Produção das citocinas TNF e IFN- γ durante o curso de infecção de camundongos C57BL/6 infectados intradermicamente na orelha com 10^3 ou 10^6 parasitos das espécies *L. major* ou *L. amazonensis*. 71
- Figura 10: Produção de IL-10 por células de baço e linfonodo de camundongos C57BL/6 infectado com *L. major* ou *L. amazonensis* e inoculados com 10^3 ou 10^6 parasitos intradermicamente na orelha em pontos do curso de infecção..... 72
- Figura 11: Produção de NO e atividade de arginase por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados intradermicamente na orelha com 10^3 ou 10^6 parasitos das espécies *L. major* ou *L. amazonensis* estimulados por IFN- γ 79
- Figura 12: Produção de NO e atividade de arginase por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados intradermicamente na orelha com 10^3 ou 10^6 parasitos das espécies *L. major* ou *L. amazonensis* estimulados por IL-4. 80

LISTA DE PRANCHAS

Prancha 1: Fotomicrografias do infiltrado inflamatório na orelha de camundongos C57BL/6 inoculados intradermicamente com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i>	62
Prancha 2: Fotomicrografias da orelha de camundongos C57BL/6 inoculados intradermicamente com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i> . Distribuição de macrófagos.....	63
Prancha 3: Fotomicrografias da orelha de camundongos C57BL/6 inoculados intradermicamente com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de <i>L. major</i> ou <i>L. amazonensis</i> . Distribuição de linfócitos T CD4 ⁺	64

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC:** Célula apresentadora de antígeno
- CCL:** Ligantes de receptores de quimiocinas CC
- CXCL:** Ligantes de receptores de quimiocinas CXC
- DC:** Células dendríticas
- DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- ELISA:** Ensaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay)
- ERK:** Cinase regulada por sinais extracelulares
- FcR γ :** Receptor para a fração Fc da imunoglobulina G
- GKO:** Animais deficientes no gene para interferon-gama
- IFN- γ :** Interferon-gama
- Ig:** Imunoglobulina
- IGF:** Fator de crescimento semelhante à insulina
- IL:** Interleucina
- iNOS:** Óxido nítrico sintase induzível
- LCD:** Leishmaniose cutânea difusa
- LCDB:** Leishmaniose cutânea disseminada “borderline”
- LCL:** Leishmaniose cutânea difusa
- LFA:** Antígeno associado à função leucocitária
- LPG:** Lipofosfoglicano
- LPS:** Lipopolissacarídeo
- LTA:** Leishmaniose tegumentar americana
- MCP:** Proteína quimioatraente de monócitos
- MIP:** Proteína inflamatória de macrófagos
- MHC:** Complexo de histocompatibilidade principal
- NO:** Óxido nítrico
- PBS:** Salina tamponada com fosfato 0,1 M, pH 7,3 (phosphate buffered saline)
- PGE:** Prostaglandina
- RNA m :** Ácido ribonucléico mensageiro
- SBF:** Soro bovino fetal
- SCID:** Imunodeficiência severa combinada
- TCR:** Receptor de célula T
- TGF:** Fator de crescimento transformante
- TNF:** Fator de necrose tumoral

RESUMO

Um modelo de infecção com *L. amazonensis* na pele, com baixa dose (10^3) de parasitos, é comparado à infecção com alta dose (10^6) de *L. amazonensis* e baixa e alta dose de *L. major*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^3 ou 10^6 parasitos na orelha e o curso de infecção foi acompanhado. O surgimento de lesões em camundongos infectados com 10^3 parasitos foi mais lento, quando comparado aos camundongos infectados com 10^6 *Leishmania* e parasitos foram detectados no sítio de infecção mesmo antes do surgimento das lesões. Camundongos infectados com *L. amazonensis* apresentaram lesões persistentes, enquanto a infecção com *L. major* curou espontaneamente em ambos os grupos, apesar de linfócitos persistirem no sítio de infecção, mesmo depois da cura. Macrófagos persistiram apenas nos camundongos infectados com *L. amazonensis*. Camundongos infectados com este parasito produziram níveis mais baixos de IFN- γ que os camundongos infectados com *L. major*. Nenhuma correlação entre persistência do parasito e níveis de IL-10 ou produção de óxido nítrico ou atividade de arginase por macrófagos foi encontrada. Concluiu-se que a infecção com baixa dose de *L. amazonensis* na derme alterou o curso de infecção atrasando o surgimento da lesão, mas não alterou o fenótipo de suscetibilidade e produção de citocinas descritas após infecção subcutânea com alto número de parasitos.

ABSTRACT

A model of infection with *Leishmania amazonensis* in the skin, with low doses of parasites, was compared to infection with high doses of *L. amazonensis* and low and high doses of *L. major*. C57BL/6 mice were infected with 10^3 or 10^6 parasites in the ear and the outcome of infection was assessed. The appearance of lesions in mice infected with 10^3 parasites was delayed compared to mice infected with 10^6 *Leishmania* and parasites were detectable at the infection site even before lesions were. Mice infected with *L. amazonensis* displayed persistent lesions, while infection with *L. major* spontaneously healed in all groups, albeit lymphocytes persisted at the site of infection even after healing. Macrophages persisted only in *L. amazonensis*-infected mice. *L. amazonensis* infected mice produced lower levels of IFN- γ than mice infected with *L. major*. No correlation between persistence of parasites and IL-10 levels or the production of nitric oxide or activity of arginase by macrophages was found. We conclude that infection with low doses of *L. amazonensis* in the dermis changes the course of infection by delaying the appearance of lesions, but does not change the outcome of susceptibility and cytokine production described for the subcutaneous infection with high numbers of parasites.

1- INTRODUÇÃO

A leishmaniose tem uma grande distribuição geográfica, tanto no Velho Mundo como no Novo Mundo, ocorrendo em muitos países tropicais e subtropicais. De acordo com dados estatísticos mundiais, esta doença ocorre em 88 países e sua notificação é compulsória em apenas 30 deles. Estima-se uma prevalência de aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas e um índice global de 350 milhões de pessoas no mundo que correm o risco de adquirir a leishmaniose (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990). Esta protozoose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das seis doenças infecto-parasitárias de maior notabilidade, distribuída amplamente no continente americano.

A doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, apresenta um espectro de formas clínicas como as formas cutâneas (cutânea localizada, mucocutânea e cutânea difusa) e visceral. O desenvolvimento de uma destas formas é direcionado pela espécie do parasito e resposta imune do hospedeiro (SARAVIA *et al.*, 1989). A leishmaniose cutânea é a forma clínica mais freqüentemente encontrada na Europa, África e Ásia. Nestes continentes esta forma clínica é causada pela *L. major* enquanto no continente americano é mais freqüentemente causada pela *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (BERMAN, 1997). Do total de casos já registrados de leishmaniose cutânea, 90% ocorreram em apenas seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria e Afeganistão no Velho Mundo e Brasil e Peru no Novo Mundo (DESJEUX, 1999).

A leishmaniose cutânea constitui um problema de Saúde Pública. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo.

No Velho Mundo a infecção por *L. major* de reservatórios roedores e hospedeiros humanos leva invariavelmente ao desenvolvimento de uma lesão cutânea localizada que eventualmente cura, e gera imunidade à reinfecção (HEPBURN, 2000).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil é causada por pelo menos sete espécies do gênero *Leishmania*, membros dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (SHAW, 1994). Trata-se de uma doença que vem apresentando um número crescente de casos e uma ampliação de sua ocorrência geográfica, sendo encontrada atualmente em todos os estados brasileiros. Estima-se que de 1985 a 2003 ocorreram 523.975 casos de leishmaniose tegumentar (BASANO; CAMARGO, 2004). Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou média anual de 35 mil novos casos da LTA no país (CENEPI/ Ministério da Saúde – notas de dados estatísticos, 1999).

A *L. amazonensis*, inserida no subgênero *Leishmania*, tem uma vasta distribuição, principalmente pelas florestas tropicais da região amazônica, estendendo-se à região nordeste, centro-oeste e sudeste (LAINSON, 1983). Esta espécie é responsável por casos de leishmaniose cutânea localizada (LCL - forma ulcerada, simples), com prognóstico sempre favorável à terapia, menos frequentemente de leishmaniose cutânea difusa (LCD - forma não ulcerada, nodular-infiltrada), uma forma clínica de leishmaniose tegumentar extremamente grave (CONVIT; PINARDI; RONDÓN, 1972) capaz de produzir lesões mutilantes extensas nos pacientes e resistentes a todos os tipos de terapia (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2005). Recentemente, uma nova forma intermediária foi descrita, a leishmaniose cutânea disseminada “borderline:” (LCDB), na qual a disseminação do parasito acontece apenas seis meses após a lesão cutânea primária, o número de lesões secundárias é limitado e a resposta terapêutica satisfatória (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). No Brasil a LCD está associada à *L. amazonensis* (LEON *et al.*, 1990) e o encontro de casos desta forma clínica em novas áreas de transmissão mostra que esta espécie está aumentando sua distribuição (AZEREDO-COUTINHO *et al.*, 2007).

A *Leishmania* é um parasito dimórfico. Multiplica-se como promastigota no intestino do flebotomíneo e amastigota nos macrófagos do hospedeiro vertebrado. O vetor responsável pela disseminação deste protozoário é um inseto hematófago (Ordem *Diptera*, Classe *Insecta*), primitivamente descrito no gênero *Phlebotomus*, e do qual foram já identificadas várias espécies conforme a região em que é encontrado. Na Europa, Ásia e África, prevalece ainda essa mesma denominação, *Phlebotomus*, para esse agente vetor. No Brasil e na América o vetor é incluído no gênero *Lutzomyia*, existindo 350 espécies catalogadas, distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina. Destas, pelo menos 200 espécies ocorrem na bacia amazônica (GIL *et al.*, 2003). Na realidade, com base nos trabalhos já efetuados no Brasil, parece existir mais de uma espécie capaz de transmitir a doença, assim como na América em geral. Esta variedade de espécies resulta em diferentes ciclos de transmissão nas várias regiões geográficas. Devido à sua ampla distribuição apresentam vários nomes populares, variando segundo os países, estados e regiões onde são encontrados. Entre eles: mosquito palha, asa dura, asa branca, birigui, cangalhinha, arrupiado. Nos Estados Unidos e países de língua inglesa, esse vetor é conhecido como "sandfly".

Tais vetores, ou flebotomíneos, tem hábitos noturnos, realizando seu repasto sangüíneo em geral no entardecer e começo da noite. Durante a picada, sugam junto com o sangue as formas amastigotas de um animal infectado, que se aloja em partes de

seu intestino levando-as a se transformar em promastigotas. Esta forma é alongada e apresenta um longo flagelo livre. No sistema digestivo de seus vetores, pelo menos dois estágios de desenvolvimento seqüencial foram definidos, a forma procíclica, não infectante, e a forma metacíclica, infectante (DA SILVA; SACKS, 1987; SACKS, 1989; SACKS; PERKINS, 1984). Neste processo de diferenciação, denominado metaciclogênese, ocorrem modificações na morfologia e expressão acentuada e diferenciada de fatores de virulência tais como a metaloprotease gp63 e o lipofosfoglicano (LPG) de superfície. O polimorfismo desta última estrutura vem sendo explorado em técnicas de separação destes dois estágios de desenvolvimento. Conseqüentemente, o LPG seria um importante fator de virulência da *Leishmania* (SPATH *et al.*, 2000).

Durante a multiplicação das promastigotas no intestino do inseto, as formas infectantes migram para a probóscida causando obstrução mecânica ou dificultando a ingestão de sangue quando o inseto tenta se alimentar. Assim, o flebótomo faminto é levado a picar e a sugar muitas vezes e depois de cada esforço para ingerir o sangue, os músculos encarregados da sucção relaxam e causam regurgitação do material ingerido. Neste momento, é inoculado um pequeno número (10 a 1000) de formas promastigotas metacíclicas em novo hospedeiro vertebrado. Estas formas são rapidamente fagocitadas por macrófagos onde diferenciam em amastigotas, estruturas arredondadas ou ovaladas sem flagelos (ANTOINE *et al.*, 1998; COURRET *et al.*, 2001). Estas amastigotas se multiplicam por divisão binária até romperem as células, disseminando-se pela via hematogênica e linfática, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando a atração de outros macrófagos iniciando um ciclo. Desta forma inicia-se o desenvolvimento da doença.

No momento, é impossível combater a leishmaniose, utilizando-se um único enfoque. As principais estratégias de controle são: o combate ao vetor, quando viável, diagnóstico e tratamento dos infectados e em focos zoonóticos o controle do reservatório animal (DESJEUX, 2004a; DESJEUX, 2004b). O desenvolvimento de uma vacina segura, eficaz, estável, de baixo custo e que poderia ser utilizada de forma profilática, proporcionando imunidade e impedindo a disseminação da doença (KEDZIERSKI; ZHU; HANDMAN, 2006) é o objetivo de vários pesquisadores. No entanto, apesar da abundância de estudos neste sentido, e de alguns resultados otimistas, não se espera, a curto prazo, a disponibilização deste importante instrumento, continuando a ser problemático o controle da endemia.

Baseados na observação de que, após a cura da lesão primária da leishmaniose cutânea, desenvolve-se uma imunidade duradoura contra reinfecção, estudos iniciais em busca de uma vacina tornaram tradicional a prática da leishmanização com *L. major*. Esta consiste na exposição de certas partes do corpo ao parasito vivo. Entretanto, a variabilidade no tamanho e duração das lesões resultantes da inoculação de cepas virulentas fez com que a prática fosse abandonada (GREENBLATT *et al.*, 1985; KHAMESIPOUR *et al.*, 2005; NADIM; JAVADIAN, 1988). Vários tipos de vacina, como por exemplo, vacinas com parasitos atenuados ou mortos, peptídeos recombinantes ou sintéticos e vacinas de DNA, acrescidos ou não de citocinas ou outros adjuvantes vem sendo investigadas.

Muitas descobertas sobre a imunorregulação foram feitas utilizando modelos murinos de leishmaniose, mas a complexidade de suas formas clínicas torna necessária a realização de estudos adicionais. Infecções experimentais com *Leishmania* têm sido usadas para melhor caracterizar o tipo de resposta imune específica desenvolvida pelo hospedeiro, para definir fatores que podem gerar cura ou processo patogênico crônico sem cura e monitorar resistência ou susceptibilidade do hospedeiro a um desafio secundário em local distante.

O conhecimento do mecanismo de imunorregulação responsável pela imunidade desenvolvida após infecção primária possibilitará o desenvolvimento de terapias e vacinas através da manipulação do sistema imune.

1.1- Leishmaniose experimental: Imunologia

O modelo experimental de infecção murina em diferentes constituições genéticas com diferentes espécies de *Leishmania* reproduz com grande similaridade as características distintas do espectro clínico visto em pacientes com leishmaniose cutânea (BEHIN; MAUEL; SORDAT, 1979; MITCHELL *et al.*, 1981). Muitos estudos foram realizados com *L. major*, a qual a maioria das linhagens de camundongos é resistente (entre elas C57BL/6, C3H e CBA), desenvolvendo pequenas lesões com cura espontânea no local do inóculo, enquanto os camundongos BALB/c e DBA/2 são suscetíveis e desenvolvem lesões progressivas (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Em contraste, a maioria das linhagens de camundongos mostra graus variáveis de suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis* e desenvolvem lesões crônicas que não curam (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). A infecção por *L. major* exemplifica o paradigma de desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 ou

Th2, no qual o desenvolvimento da doença é determinado pela natureza e magnitude da resposta das células T CD4⁺ e produção de citocinas no início da infecção (MOSMANN; COFFMAN, 1989). A resistência de camundongos à infecção por *L. major* está relacionada a uma diferenciação e expansão de células Th1 específicas para *Leishmania* direcionada pela citocina IL-12 (HEINZEL *et al.*, 1991; HEINZEL *et al.*, 1993; HEINZEL *et al.*, 1989). Este subgrupo de linfócitos produz interferon (IFN)- γ , o qual contribui para a ativação de macrófagos e conseqüente produção de óxido nítrico (NO) responsável pela morte do parasito (BELOSEVIC *et al.*, 1988b; STENGER *et al.*, 1994). Por outro lado, a suscetibilidade a *L. major* está correlacionada ao desenvolvimento de uma resposta de células Th2 e inabilidade de gerar uma resposta celular Th1 (REINER; LOCKSLEY, 1995). Nestes casos, a produção de citocinas tais como IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β , que inibem ou diminuem a ativação de macrófagos, participa do desenvolvimento da doença (GROUX *et al.*, 1999; KANE; MOSSER, 2001; MATTHEWS *et al.*, 2000; NOBEN-TRAUTH; PAUL; SACKS, 1999).

Infecções similares com *L. amazonensis* mostram um perfil diferente. A maioria das linhagens de camundongos resistentes à *L. major* são suscetíveis à *L. amazonensis*. O desenvolvimento de lesões em camundongos C57BL/6 e C57BL/10 infectados com esse parasito não foi associado a uma resposta Th2, mas, sim a uma fraca resposta Th1 (AFONSO; SCOTT, 1993; SOONG *et al.*, 1996). Foi demonstrado que a inabilidade de montar uma resposta Th1 eficiente, independente de uma resposta Th2 induzida por IL-4 está associada a uma inabilidade de produzir ou responder à IL-12 através da inibição da expressão da cadeia beta do receptor de IL-12 (IL-12R β 2) (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000). É possível que o nível de resposta Th1 à infecção seja inadequado para a erradicação do parasito, mas permita o recrutamento de macrófagos e células T. Um exame do sítio de infecção revelou um infiltrado de células T e macrófagos. Muitos destes macrófagos são vacuolados e altamente infectados. Ainda neste estudo foi mostrado que linfócitos T CD4⁺ reativos a *L. amazonensis* contribuem para o desenvolvimento da lesão e não para sua cura (QI; POPOV; SOONG, 2001; SOONG *et al.*, 1997). Assim, este ambiente se torna altamente favorável à replicação do parasito e desenvolvimento da lesão.

1.2- Infecção com alta dose de *L. major*

1.2.1- Participação das células T e células B na infecção por *L. major*

A capacidade das células T CD4⁺ mediarem proteção ou exacerbação de uma infecção por *Leishmania* foi demonstrada em vários estudos. No modelo de infecção com alta dose de *L. major*, 10⁵ a 10⁷ parasitos, foi encontrado que camundongos deficientes de células T (nude, RAG2^{-/-} - deficiente de gene de ativação de recombinação ou MHC II^{-/-} - deficiente do complexo de histocompatibilidade principal) apresentaram multiplicação, disseminação de parasitos e exacerbação da doença (ERB *et al.*, 1996; GUY; BELOSEVIC, 1995; HOLADAY *et al.*, 1993; HOLADAY *et al.*, 1991; MITCHELL, 1983). Holaday *et al.* (1993) demonstraram que enquanto camundongos SCID reconstituídos com uma linhagem de células Th1 controlaram a infecção, os camundongos reconstituídos com uma linhagem de células tipo Th2 apresentaram uma exacerbação da doença. Resultados similares foram encontrados utilizando linhagens de células e clones derivados de camundongos BALB/c imunizados (SCOTT *et al.*, 1988; SCOTT; CASPAR; SHER, 1990). Assim, as características diferentes das sub-populações Th1 e Th2 implicam em funções diferentes no curso da elaboração da resposta imune.

Apesar de várias evidências apontarem para a participação das células T CD4⁺ no controle desta infecção, a função das células T CD8⁺ ainda não foi bem definida. Estas células iniciam sua resposta ao patógeno quando reconhecem antígenos específicos apresentados por moléculas MHC I em associação com sinais co-estimulatórios das células apresentadoras de antígeno (BOURGEOIS *et al.*, 2002; SCHOENBERGER *et al.*, 1998). Para se tornarem totalmente ativadas, as células T CD8⁺ dependem das células T CD4⁺ e de células dendríticas (DCs) (MELIEF, 2003). Na leishmaniose, as células T CD8⁺ têm sido associadas com padrão de cura em humanos e camundongos, mas, a rota de ativação destas células ainda não é clara. Não se sabe como o conteúdo do vacúolo parasitóforo, onde se encontra o parasito, chega ao citosol para ser processado e apresentado por moléculas de classe I. Estudos mostram mecanismos indiretos e diretos de apresentação cruzada favorecendo este processo (FONTENEAU *et al.*, 2003; GUERMONPREZ; AMIGORENA, 2005; HOUDE *et al.*, 2003; KOVACSOVICS-BANKOWSKI; ROCK, 1995).

As células T CD8⁺ podem produzir quantidades substanciais de IFN- γ (SALGAME *et al.*, 1991) e podem participar da regulação inicial das respostas de citocinas produzidas por células T CD4⁺. O modelo murino de leishmaniose sugere que as células T CD8⁺ participam do controle da infecção através da produção de IFN- γ e de sua capacidade citotóxica. Seu efeito citotóxico é exercido através da exocitose de grânulos líticos e da expressão de FasL/CD95L ambos mecanismos indutores de apoptose (TRAPANI; SMYTH, 2002).

A primeira evidência da participação de células T CD8⁺ na imunidade à infecção por *L. major* veio da observação que um maior número de células T CD8⁺ específicas para o parasito foram ativadas em camundongos resistentes quando comparados a camundongos suscetíveis (MILON *et al.*, 1986). Reforçando este dado, estudos adicionais demonstraram que a depleção destas células em camundongos resistentes acentuou o desenvolvimento da lesão primária mesmo não modificando o fenótipo de cura (TITUS *et al.*, 1987). Foi observado também que camundongos deficientes em CD8 ou β 2-microglobulina mantiveram sua capacidade de resolver infecções primárias com *Leishmania* (HUBER *et al.*, 1998). Ainda, foi demonstrado que estas células participam através da produção de IFN- γ , bem como através da regulação da produção desta citocina por células T CD4⁺, o que sugere uma resposta cruzada entre estes dois subtipos de linfócitos (HERATH; KROPF; MULLER, 2003).

Além da participação das citocinas, mecanismos de citotoxicidade também parecem envolvidos no controle da *Leishmania*. Alguns resultados contraditórios foram encontrados para a participação da granzima A. Enquanto alguns estudos mostram que camundongos resistentes apresentam maior expressão e produção da granzima A que camundongos suscetíveis (CONCEICAO-SILVA *et al.*, 1998; EISERT *et al.*, 2002), outros demonstram que camundongos C57BL/6 deficiente de granzima A ou B ainda foram capazes de controlar a infecção por *L. major* (FRISCHHOLZ; ROLLINGHOFF; MOLL, 1994; MOLL *et al.*, 1991).

A função das células B e anticorpos na infecção por *Leishmania* parece depender de múltiplos fatores, entre eles, da linhagem do camundongo, dose e local de infecção e fatores de virulência utilizados por cada espécie de parasito a fim de evitar o sistema imune do hospedeiro. Em infecções por *L. major* os dados encontrados são variáveis. Alguns estudos sugerem que nem as células B e nem os anticorpos apresentam funções protetoras na leishmaniose humana e murina. Ao contrário, as células B parecem contribuir para a progressão da doença. Camundongos deficientes em células B comparados a camundongos BALB/c mostraram um atraso no curso de infecção com *L.*

major, o qual foi revertido pelo tratamento com IL-7 (HOERAUF *et al.*, 1995). Também a fagocitose de parasitos opsonizados via receptores do Fc da cadeia γ (Fc γ Rs) foi um forte estímulo para a produção de citocinas anti-inflamatórias com função na suscetibilidade a infecção por *L. major* (PADIGEL; FARRELL, 2005). Ainda, em um estudo com camundongos SCID que apresentam resistência a *L. major* após reconstituição com células T, o acréscimo de células B conferiu suscetibilidade ao parasito (VARKILA *et al.*, 1993). Por outro lado, camundongos BALB/c e C57BL/6 deficientes de células B infectados com alta dose de promastigotas de *L. major* mostraram que nem as células B e nem os anticorpos são necessários para a suscetibilidade a este parasito. Ambas as linhagens de camundongos deficientes de células B desenvolveram mesmo fenótipo de infecção que os camundongos selvagens (BROWN; REINER, 1999).

1.2.2- Participação das citocinas e quimiocinas na infecção por *L. major*

Diferentes parâmetros influenciam a via de diferenciação das células T CD4⁺ precursoras, incluindo o tipo de células apresentadoras de antígeno (APC), natureza dos sinais co-estimulatórios (KUCHROO *et al.*, 1995), extensão da interação do receptor de células T (TCR) (CONSTANT *et al.*, 2002), dose de antígeno (HOSKEN *et al.*, 1995), rota de administração do antígeno (GUERY *et al.*, 1996) e número de divisões celulares (BIRD *et al.*, 1998). Entre estes diferentes sinais polarizadores de células T, as citocinas são reconhecidas como indutores cruciais da diferenciação em células Th1 e Th2. Os resultados acumulados nos últimos anos têm esclarecido alguns aspectos funcionais das citocinas nesta diferenciação.

Uma citocina crítica para o desenvolvimento de resistência mediada por células Th1 é a IL-12. Camundongos BALB/c tratados com IL-12 exógena durante a primeira semana de infecção com *L. major* apresentaram o desenvolvimento de uma resposta mediada por células CD4⁺ do subtipo Th1 associada ao controle das lesões (HEINZEL *et al.*, 1993; SYPEK *et al.*, 1993). Observou-se também que camundongos resistentes após a neutralização de IL-12 ou deficientes na subunidade p35 ou p40 da IL-12 apresentaram um fenótipo de suscetibilidade com desenvolvimento de lesões progressivas (HEINZEL *et al.*, 1993; MATTNER *et al.*, 1996; SYPEK *et al.*, 1993).

Alguns estudos implicam a IL-12 também na manutenção da resposta Th1 uma vez que tenha sido estabelecida. Lesões de camundongos C57BL/6 controladas, porém apresentando parasitos persistentes, foram reativadas após tratamento com anticorpos

anti-IL12 (STOBIE *et al.*, 2000). Ainda, células Th1 de camundongos curados não transferiram imunidade a camundongos deficientes de IL-12 (PARK; HONDOWICZ; SCOTT, 2000).

A produção inicial de IL-12 é também importante para a produção de quimiocinas durante a infecção por *L. major* (ZAPH; SCOTT, 2003). A neutralização da IL-12 em camundongos suscetíveis resultou na diminuição da expressão de quimiocinas, enquanto sua administração em camundongos suscetíveis produziu um aumento no nível de expressão de quimiocinas específicas durante a resposta imune inicial à infecção por *L. major*.

Outra citocina com função crucial na resistência à infecção à *L. major* é o IFN- γ . Sua participação na diferenciação de células Th1, eliminação do parasito e recrutamento celular foi demonstrada em vários estudos. A administração de anticorpos anti-IFN- γ em linhagens de camundongos resistentes nos dois primeiros dias de infecção fez com que estes camundongos fossem incapazes de controlar a lesão e levou ao desenvolvimento de uma resposta Th2 (BELOSEVIC *et al.*, 1989; LAUNOIS *et al.*, 2002; MATTNER *et al.*, 1996; SCOTT, 1991). Resultados semelhantes foram obtidos quando camundongos de constituição genética resistente, mas deficientes no IFN- γ ou receptor para IFN- γ , foram incapazes de controlar o crescimento do parasito (LAUNOIS *et al.*, 2002; SWIHART *et al.*, 1995; WAKIL *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1994). Estes dados sugerem um papel do IFN- γ na inibição do desenvolvimento de uma resposta Th2. Tem sido demonstrada também sua participação na diferenciação das células Th1 através da otimização da produção de IL-12 e promoção da expressão da cadeia IL-12R β 2 (MA *et al.*, 1996; SZABO *et al.*, 1997).

A ativação de macrófagos a um estado parasiticida por IFN- γ é o principal mecanismo efetor anti-*Leishmania*. Esta citocina aumenta a síntese da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) levando à produção, a partir de L-arginina, de radicais reativos de nitrogênio tóxicos para o parasito (ASSREUY *et al.*, 1994; GREEN *et al.*, 1990c; GREEN *et al.*, 1990a; LIEW; LI; MILLOTT, 1990b). A ativação de macrófagos por IFN- γ pode ser regulada por outras citocinas produzidas pelas células Th2, tais como IL-4 e IL-10 (LIEW *et al.*, 1989).

O IFN- γ também exerce efeito indireto sobre o recrutamento de leucócitos, por meio da indução da expressão de vários genes de quimiocinas (FARBER, 1997). Portanto, o IFN- γ pode ser responsável pelo balanço entre recrutamento de macrófagos e o nível de ativação, o qual é crítico para o controle da infecção.

Enquanto a resistência contra infecção está claramente associada a uma resposta Th1 induzida por IL-12 e IFN- γ , estudos usando vários modelos experimentais, entre eles camundongos geneticamente deficientes, têm questionado a importância da IL-4 no desenvolvimento de lesões crônicas e investigado outros mediadores alternativos. Estudos *in vivo*, estabeleceram que a IL-4, durante o estágio inicial da infecção, tem uma função importante no desenvolvimento de células Th2. A primeira evidência foi que a administração de anticorpos anti-IL-4 a camundongos BALB/c no início da infecção eliminava a polarização Th2, permitindo uma expansão de células Th1 e conseqüente cura da lesão (SADICK *et al.*, 1990). Launois *et al.* (1995) mostraram que camundongos BALB/c, em contraste a camundongos resistentes, produzem um aumento de produção de IL-4 extremamente rápido em resposta à infecção por *L. major*. Análise do TCR de células T CD4⁺ produtoras de IL-4 no primeiro dia de infecção por *L. major* demonstraram que todo o RNAm de IL-4 expresso neste tempo foi produzido por células T CD4⁺ que expressavam as cadeias V β 4 e V α 8 em seu TCR. Resultados de experimentos utilizando camundongos BALB/c deficientes seletivamente nesta população de células TCD4⁺ V β 4 α 8 e infectados por *L. major* mostraram que estes camundongos não eram mais capazes de gerar transcritos de IL-4 no início da infecção por células T CD4⁺. Ao contrário, desenvolveram uma resposta Th1 e foram resistentes à infecção (LAUNOIS *et al.*, 1997). Foi mostrado também que esta produção inicial de IL-4 por esta população de células acontecia após estímulo com o antígeno LACK de *L. major*. O tratamento desta linhagem de camundongo com proteína LACK alterada antagonizou a produção inicial de IL-4, inibiram o desenvolvimento de células Th2, redirecionaram a expansão de células Th1 e geraram uma proteção duradoura (PINGEL *et al.*, 1999). O camundongo C57BL/6 e outras linhagens resistentes, entretanto, não montaram uma resposta inicial com produção de altos níveis de IL-4 seguinte à infecção por *L. major* ou injeção de LACK (LAUNOIS *et al.*, 1995).

Sugeriu-se que um mecanismo responsável pelo perfil de suscetibilidade em camundongos seria a inibição da produção de IL-12 pela IL-4. Alguns trabalhos mostram que a IL-4 produzida logo após a infecção por *L. major* inibe a expressão da cadeia IL-12R β 2 nas células T CD4⁺, resultando em um estado de não responsividade à IL-12 e no desenvolvimento de células Th2 (LAUNOIS *et al.*, 1995). Em contraste, camundongos resistentes não apresentam esta produção inicial de IL-4 após infecção com *L. major* e mantêm a expressão da cadeia IL-12R β 2 em células T CD4⁺ (HIMMELRICH *et al.*, 1998). Entretanto, camundongos BALB/c transgênicos expressando IL-12R β 2 apresentaram lesões progressivas e montaram uma resposta de

células Th2 depois de infecção por *L. major* de forma semelhante ao BALB/c selvagem. Portanto, a função exata na diminuição da expressão da cadeia IL-12R β 2 na diferenciação em Th2 necessita de maiores estudos (NISHIKOMORI *et al.*, 2001).

Embora tenha sido demonstrado o efeito do IL-4 na diferenciação de células Th2, recentemente mostrou-se que esta citocina promove o desenvolvimento de células Th1 e a hipersensibilidade do tipo tardia. Alguns resultados mostraram que, quando disponível durante o período inicial de ativação das DCs precedente à estimulação das células T, a IL-4 direciona as DCs a produzirem IL-12 e conseqüentemente induz o desenvolvimento de resposta Th1 (BIEDERMANN *et al.*, 2001; EBNER *et al.*, 2001; HOCHREIN *et al.*, 2000; KALINSKI *et al.*, 2000). Então, os efeitos opostos exercidos pela IL-4 na diferenciação de célula T CD4⁺ dependem da célula alvo estimulada. Desta forma, a IL-4 poderia ser considerada como uma citocina potencialmente envolvida no desenvolvimento de células Th1.

O papel da IL-10 no desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2 também foi abordado. O tratamento de camundongos resistentes e suscetíveis com anticorpo anti-IL-10 não alterou o fenótipo destes camundongos. Foi encontrada uma produção similar de IL-10 na fase crônica de infecção em ambas as linhagens de camundongos, em contraste com uma produção significativamente mais elevada nos camundongos suscetíveis na fase inicial de infecção (CHATELAIN; MAUZE; COFFMAN, 1999).

Outros estudos revelaram que camundongos transgênicos que expressam mais IL-10, em fundo genético resistente, são mais suscetíveis à infecção por *L. major* mesmo ainda apresentando uma resposta Th1 (GROUX *et al.*, 1999). Em oposição, camundongos BALB/c deficientes em IL-10 são mais resistentes à infecção por este parasito do que a linhagem selvagem (KANE; MOSSER, 2001).

A inabilidade dos camundongos BALB/c IL-4R α ^{-/-} de responderem a IL-4 e IL-13 e mesmo assim desenvolverem uma lesão progressiva e sem cura sugere que outros fatores, além destas duas citocinas, podem contribuir para a suscetibilidade do camundongo BALB/c à *L. major*. Estes camundongos IL4R α ^{-/-} quando tratados com anticorpos anti-IL10 apresentaram uma diminuição no tamanho da lesão e no número de parasitos em relação ao grupo não tratado, indicando assim que a IL-10 pode ter um papel na suscetibilidade à infecção por *L. major* (NOBEN-TRAUTH *et al.*, 2003).

Ainda, vários estudos mostram que a IL-10 inibe a atividade citotóxica dos macrófagos (MOORE *et al.*, 1993; MOSMANN, 1994). A adição de IL-10 a culturas de macrófagos inibiu quase completamente a morte dos parasitos intracelulares (VIETH *et al.*, 1994). Além disto, a interação da *Leishmania* com receptores na superfície do

macrófago induziu preferencialmente a produção de altos níveis de IL-10. A IL-10 produzida pelos macrófagos infectados inibiu a ativação dos mesmos e diminuiu sua produção de citocinas inflamatórias (KANE; MOSSER, 2001).

Recentemente, mostrou-se que a IL-10 derivada de células Treg está também implicada na persistência da *Leishmania* em lesões curadas de camundongo C57BL/6, pois a eliminação completa dos parasitos ocorreu nesta linhagem apenas quando a via de sinalização da IL-10 foi inibida com anticorpo anti-receptor de IL-10 (BELKAID *et al.*, 2001). A função inibitória da ativação de macrófagos da IL-10 pode ser um provável mecanismo responsável por esta persistência, pois sua produção pelas células Treg na fase crônica da doença domina o mecanismo efetor de produção de IFN- γ (BELKAID *et al.*, 2002a).

O TGF- β é uma citocina pleiotrópica com múltiplas funções regulatórias no sistema imune. Ente elas, a inibição de funções anti-parasitárias dos macrófagos e a inibição da diferenciação de células T efectoras (LETTERIO; ROBERTS, 1998). Vários trabalhos vêm mostrando que o TGF- β inibe a produção de IL-12 (SKEEN *et al.*, 1996; TAKEUCHI; ALARD; STREILEIN, 1998) a ativação dos macrófagos por IFN- γ , a expressão de iNOS e a produção de NO (BOGDAN *et al.*, 1992; VODOVOTZ *et al.*, 1993), eventos estes críticos para o controle do parasito. Ainda, em uma infecção por *L. major* células produtoras de TGF- β eram mais proeminentes em lesões de camundongos BALB/c comparados com camundongos C57BL/6 e que, *in vitro*, a produção de NO por macrófagos de camundongo C57BL/6 foi maior que por macrófagos de BALB/c após estímulo com IFN- γ (STENGER *et al.*, 1994). Esta menor produção de NO nos camundongos suscetíveis pode ser uma consequência da inibição da ativação do macrófago pelo TGF- β e reduzida capacidade de responder ao IFN- γ . Resultados similares foram encontrados quando camundongos CB6F1, linhagem com suscetibilidade intermediária à *L. major*, tratados com anticorpo anti-TGF- β apresentaram um aumento na produção de NO, uma diminuição no número de parasitos e cura mais rápida (LI; HUNTER; FARRELL, 1999). Os mecanismos de inibição de diferenciação das células Th1 por TGF- β ainda não são bem conhecidos, mas estudos demonstram que o TGF- β pode atuar diretamente nas células T através da inibição da expressão de T-bet, um fator de transcrição central na diferenciação Th1 (GORELIK; CONSTANT; FLAVELL, 2002). Desta forma, o TGF- β pode também ter um efeito inibidor da diferenciação de células no subtipo Th1 durante a infecção por *L. major*.

1.2.3- Mecanismos efetores dos macrófagos na infecção por *L. major*

Os macrófagos possuem funções críticas para o controle da infecção por *Leishmania*. Eles são a segunda onda de células que entram no sítio de infecção. Estas células possuem funções múltiplas: servem como células hospedeiras para a replicação do parasito, como células apresentadoras de antígeno e como fonte de citocinas moduladoras da resposta imune mediada por células. Além do mais, depois de ativação apropriada por células Th1, eles servem como células efetoras para a morte intracelular do parasito (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1999).

Estudos *in vitro* com macrófagos murinos mostraram que a ativação do macrófago por IFN- γ (BELOSEVIC *et al.*, 1988a) e TNF (LIEW *et al.*, 1989) provoca a produção de NO resultando na morte da *L. major*. O TNF é uma citocina pleiotrópica que participa de funções protetoras contra diversos patógenos mas também pode estar associada com patologia (VASSALLI, 1992). Suas ações são mediadas por dois receptores, TNFRp55 e TNFRp75. O primeiro parece envolvido na maioria dos efeitos conhecidos do TNF. Esta citocina possui ação pró-inflamatória na fase inicial de infecção e função antinflamatória e de reparo após controle do parasitismo. Foi demonstrada sua participação na indução de expressão de moléculas de adesão (MACKAY *et al.*, 1993), na eliminação de parasitos (FLYNN *et al.*, 1995; GREEN *et al.*, 1990a; LIEW *et al.*, 1989; PFEFFER *et al.*, 1993) e na indução de apoptose (LEIST *et al.*, 1995; TARTAGLIA *et al.*, 1993; WONG; GOEDDEL, 1994).

Trabalhos com camundongos deficientes no receptor p55 de TNF (TNFRp55-/-) demonstraram que estes animais, quando infectados com *L. major*, eram incapazes de controlar a lesão embora desenvolvessem uma resposta Th1 e controlassem o parasitismo, apesar de seus macrófagos não terem produzido NO (VIEIRA *et al.*, 1996). Estudos adicionais mostraram que células T, através das moléculas co-estimulatórias CD40L e LFA-1, podiam ativar macrófagos na ausência de TNF (NASHLEANAS; SCOTT, 2000) levando assim à eliminação do parasito. Estes resultados sugerem que a sinalização através do receptor p55 de TNF é necessária para induzir apoptose de células T na lesão uma vez o parasito tendo sido eliminado, pois na sua ausência as lesões não regrediram (KANALY *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 1996). Estes dados sugerem também que o TNF atua como um co-fator no desenvolvimento da imunidade protetora à *Leishmania* sendo dispensável para o controle da infecção. Diferente disto, outros resultados demonstraram, entretanto, que esta citocina é essencial para o controle do parasito, pois camundongos resistentes deficientes na produção de TNF, B6.TNF-/-,

desenvolveram a forma visceral da leishmaniose que foi fatal para estes animais. O parasito disseminou rapidamente e a maioria dos camundongos morreu com seis a nove semanas de infecção (WILHELM *et al.*, 2001).

O macrófago murino ativado metaboliza a L-arginina por duas vias. Uma delas é a produção de NO catalizada pela enzima iNOS, a qual oxida L-arginina em NO e citrulina. A outra é a via alternativa de ativação do macrófago onde ocorre a metabolização da L-arginina em L-ornitina e uréia pela ação da enzima arginase. A indução destas enzimas são alternativamente induzidas por citocinas Th1 e Th2 (CORRALIZA *et al.*, 1995; MODOLELL *et al.*, 1995; MUNDER *et al.*, 1999; MUNDER; EICHMANN; MODOLELL, 1998). O IFN- γ induz a expressão da iNOS enquanto a IL-4, a IL-10 e o TGF- β induzem a atividade da arginase. As atividades destas enzimas, iNOS e arginase, são dependentes da disponibilidade da L-arginina, substrato comum. Este substrato do meio extracelular é necessário para a síntese de NO dependente de iNOS (STEVENS *et al.*, 1996). O mesmo foi também documentado para a atividade da arginase (YERAMIAN *et al.*, 2006). Assim, parece que o transporte de L-arginina do meio extracelular para o interior da célula é importante para o crescimento do parasito dentro da célula hospedeira.

Evidência direta para a função crítica do NO em infecção murina por *L. major* foi obtida pelo uso de camundongo deficiente de iNOS (WEI *et al.*, 1995) e pelo uso de inibidores com forte seletividade para iNOS (STENGER *et al.*, 1995). O tratamento de macrófagos com inibidores de iNOS diminuiu a atividade leishmanicida e aumentou a sobrevivência do parasito indicando que o NO produzido pelo macrófago poderia inibir a replicação do parasito (HUANG *et al.*, 1998a; LIEW *et al.*, 1990a). Ainda, foi mostrado que a atividade da iNOS é muito importante para o controle do parasita persistente em hospedeiro imunocompetente depois da resolução da infecção primária (STENGER *et al.*, 1996). Além disto, parece que o parasito pode regular a expressão da iNOS, favorecendo assim sua sobrevivência (PROUDFOOT *et al.*, 1996). O LPG de promastigotas de *Leishmania* foi capaz de estimular macrófagos a expressar iNOS apenas em sinergia com o IFN- γ , sendo este efeito sinérgico tempo-dependente. A incubação de macrófagos com LPG por 4 a 18hs antes do estímulo com IFN- γ resultou em uma expressão diminuída de RNAm de iNOS e menor produção de NO em relação as células incubadas apenas com meio de cultura.

Em contradição com os dados acima, outros trabalhos demonstram que a indução de iNOS e produção de NO parece não ser suficiente para a função microbicida pois camundongos deficiente em Fas (CD95) ou FasL não conseguem eliminar o

parasita, apesar da produção acentuada de NO (CONCEICAO-SILVA *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 1998b). Assim, parece que a apoptose de macrófagos infectados através desta via pode contribuir para o controle do parasitismo.

A possível função da arginase na patologia e replicação do parasita ainda não está clara. Estudos iniciais *in vitro* mostraram que o crescimento de *L. major* dentro dos macrófagos foi aumentado na presença da arginase (INIESTA *et al.*, 2002). Foi demonstrado também que a arginase é induzida em camundongos suscetíveis e resistentes durante o desenvolvimento da doença. Na lesão dos camundongos suscetíveis, a indução desta enzima ocorreu paralela ao tempo de infecção, enquanto que nos camundongos resistentes a enzima apresentou aumento na atividade apenas durante período em que as lesões eram aparentes. Além disto, a inibição da arginase reduziu o número de parasitos e atrasou o desenvolvimento da doença no camundongo, enquanto o tratamento com L-ornitina aumentou a suscetibilidade no camundongo resistente (INIESTA *et al.*, 2005). Estes resultados reforçam a participação da arginase na mediação do crescimento do parasito e do desenvolvimento da lesão.

1.3- Infecção com alta dose de *L. amazonensis*

1.3.1- Função das células T e células B na infecção por *L. amazonensis*

A maioria das linhagens de camundongos é suscetível à infecção por *L. amazonensis*, desenvolvendo lesões crônicas na pele, que não curam e são diferentes nos estágios iniciais e crônicos da doença. Existem inúmeras evidências de que a resposta imune do hospedeiro à infecção por esse parasito é diferente da resposta imune do hospedeiro infectado por *L. major*.

As células T em uma infecção com alta dose de *L. amazonensis*, por exemplo, apresentam ações diferentes das observadas para infecção por *L. major* (previamente descrita no item 1.2.1). Estudos iniciais com camundongos C57BL/6 RAG2^{-/-}, MHC II^{-/-} ou nude infectados com *L. amazonensis* mostraram poucos parasitos no sítio de infecção e desenvolvimento de lesão muito lento por um período de cinco meses de infecção. Entretanto, quando os camundongos RAG2^{-/-} infectados por *L. amazonensis* foram reconstituídos com células T CD4⁺ a progressão da lesão foi restaurada. Estes resultados mostram que as células T CD4⁺ contribuem para a suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis* (SOONG *et al.*, 1997).

Uma das características importantes na leishmaniose cutânea é o desenvolvimento de nódulos seguido de úlceras no local da infecção. Camundongos infectados por *L. amazonensis* mostram lesões ulcerativas similares. Como camundongos SCID desenvolvem nódulos não ulcerativos, a função das células T CD4⁺ na ulceração foi estudada nestes camundongos com experimentos de reconstituição celular. Apenas os camundongos que receberam esplenócitos depletados de células T CD4⁺ não mostraram ulceração. As evidências obtidas neste trabalho mostraram então que as células T CD4⁺ são essenciais para a ulceração em lesões causadas por *L. amazonensis* (TERABE *et al.*, 2000). Desta forma, foi estabelecida mais uma importante função das células T CD4⁺ na patologia causada por este parasito.

Outra importante função das células T CD4⁺ é o recrutamento dos macrófagos e monócitos para o sítio de infecção. Foi demonstrado que camundongos MHC II^{-/-} apresentavam poucos macrófagos no local da infecção. Como estas células são críticas para a manutenção da infecção, a função das células T no processo de recrutamento dos macrófagos parece então ser essencial para os parasitos do complexo “Leishmania Mexicana” (STEINBRINK *et al.*, 2000; SUNDERKÖTTER *et al.*, 1993). Situação diferente foi observada para infecção por *L. major*, onde os mecanismos de recrutamento de monócitos e macrófagos parecem ocorrer na ausência de células T.

Para entender melhor a especificidade antigênica das células T CD4⁺ na infecção por *L. amazonensis* foi investigada a expansão de um subgrupo em particular de célula T CD4⁺ envolvido na suscetibilidade a doença como foi observado para infecção por *L. major*. Os resultados não revelaram uma tendência significativa na expansão de células T CD4⁺ expressando algum subgrupo específico de TCR em camundongos BALB/c, bem como em C57BL/6 (JI *et al.*, 2002).

Recentemente, há muito interesse em uma subpopulação de células T CD4⁺ supressoras especializadas nas infecções por *Leishmania*, denominadas Treg. Pesquisadores investigaram se o grau de suscetibilidade a infecção por *L. amazonensis* era regulado por uma dinâmica entre células Treg e células T efetoras (JI *et al.*, 2005). Os resultados obtidos mostraram um aumento de células Treg CD4⁺CD25⁺CD86⁺, bem como um aumento na expressão de TGF-β e IL-10R no sítio de infecção e linfonodos drenantes após infecção com *L. amazonensis*. A transferência de células Treg derivadas da lesão para camundongos RAG1^{-/-} restringiu o desenvolvimento da doença, enquanto a transferência de esplenócitos depletados de células T CD25⁺ deixou os camundongos RAG1^{-/-} mais suscetíveis à infecção que os camundongos que receberam toda a população de esplenócitos. Este estudo sugere que estas células podem limitar a

imunopatogênese causada pela infecção por *L. amazonensis* e enfatiza o balanço entre células Treg e células Th1 efetoras na determinação do resultado da infecção (JI *et al.*, 2005).

Evidências em infecções murinas com *L. major* indicam que as células T CD8⁺ contribuem para o controle da infecção em camundongo imune (FARRELL; MULLER; LOUIS, 1989; MULLER *et al.*, 1994). Esta mesma capacidade de proteção por este tipo celular foi observada também em infecção com *L. amazonensis* (COLMENARES *et al.*, 2003) pois, camundongos deficientes em β 2-microglobulina ou perforina imunizados não foram capazes de controlar a infecção com *L. amazonensis*. Neste estudo, foi demonstrado que as células T CD8⁺ protetoras produzem IFN- γ e perforina no sítio de infecção, sugerindo que ambas as moléculas são efetoras em animais vacinados infectados por *L. amazonensis*. Ainda, um exame do sítio de infecção no camundongo selvagem revelou um infiltrado de células T CD8⁺. Em contraste, foi demonstrado que na ausência de células T CD4⁺ existe uma capacidade limitada das células T CD8⁺ restrita a classe I em responder contra a *L. amazonensis* e uma infiltração mínima dessas células. A falha na migração das células T CD8⁺ para o sítio de infecção parece estar relacionada a uma deficiência em sinais seletivos necessários para o recrutamento destas células (SOONG *et al.*, 1997). Em contraste ao que ocorre com camundongos infectados por *L. major* (OVERATH; HARBECKE, 1993; WANG *et al.*, 1993), as células T CD8⁺ podem modular o curso de infecção por *L. amazonensis*, pois na ausência destas células as lesões foram significativamente menores (SOONG *et al.*, 1997). Em oposição a estes resultados recentemente foi demonstrado que as células T CD8⁺ não são necessárias na imunidade contra *L. amazonensis*. Camundongos deficientes na cadeia p40 da IL-12 e IL-23 (IL-12/23p40^{-/-}) depletados de células T CD8⁺ ou camundongos deficientes de β 2-microglobulina imunizados apresentaram lesões e parasitismo menores que o grupo controle não imunizado após infecção com *L. amazonensis* (HERNANDEZ SANABRIA *et al.*, 2007).

A função das células B e anticorpos na suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis* é mais clara que na infecção por *L. major*. Resultados da literatura mostraram que camundongos deficientes de células B e anticorpos infectados por *L. amazonensis* apresentaram lesões menores quando comparados à linhagem selvagem (KIMA *et al.*, 2000). Um outro estudo também mostrou a participação de anticorpos na fagocitose de amastigotas de *L. amazonensis* por macrófagos via Fc γ R. Este processo gerou a produção de IL-10 pelo macrófago infectado, que contribuiria para a exacerbação da doença (YANG; MOSSER; ZHANG, 2007). Ainda, em outro estudo

recente, foi sugerido que as células B e sua produção de anticorpos acentuam a infecção por *L. amazonensis*, parcialmente por promover a ativação das células T e a migração celular para o sítio de infecção (WANASEN; XIN; SOONG, 2007).

1.3.2- Papel das citocinas e quimiocinas na infecção por *L. amazonensis*

A suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis* parece relacionada a falhas na indução de citocinas que são importantes para o desenvolvimento de células Th1 e funções efetoras dos macrófagos. Estudos iniciais demonstraram que a polarização da resposta celular em Th1 e Th2 encontrada no modelo de infecção murina por *L. major* não se repetia em infecções por *L. amazonensis*. Camundongos C57BL/6 ou C57BL/10 infectados com *L. amazonensis* produziram pouco ou nenhum IFN- γ e uma produção de IL-4 foi observada apenas nas primeiras semanas de infecção (AFONSO; SCOTT, 1993; JI *et al.*, 2002), sugerindo uma fraca resposta imune mediada por células T ou uma resposta celular mista, como a encontrada na leishmaniose humana (PIRMEZ *et al.*, 1993; SILVEIRA *et al.*, 1991). Ainda, o tratamento com anti-IL-4 ou anti-IFN- γ não mostrou efeito significativo no curso de infecção por *L. amazonensis* (AFONSO; SCOTT, 1993). Estes estudos sugerem que mecanismos múltiplos podem contribuir para a suscetibilidade do camundongo a esta espécie de *Leishmania*.

Devido a importante função da IL-12, IFN- γ e TNF- α no mecanismo de resistência a leishmaniose várias pesquisas avaliam a participação destas duas citocinas na infecção por *L. amazonensis*. O desenvolvimento de uma resposta Th1 é dependente da presença de IL-12 bem como da habilidade das células T responderem a esta citocina. A infecção de camundongos C3H por *L. amazonensis* resultou em uma baixa produção desta citocina por células T CD4⁺ antígeno específicas e a administração exógena de IL-12 não teve efeito no curso de infecção. Um prejuízo na expressão de IL-12R β 2 e a conseqüente ativação insuficiente da resposta Th1 é, em parte, responsável pela suscetibilidade do camundongo frente à infecção por este parasita (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000). Foi demonstrado também que camundongos infectados com *L. amazonensis* apresentaram um atraso e uma expressão diminuída da IL-12 no sítio de infecção e linfonodos drenantes quando comparados com o controle infectado com *L. major* (JI; SUN; SOONG, 2003). Estudos com camundongos deficientes IL-12/23p40^{-/-} reforçam o papel desta citocina na resistência à infecção, pois, estes camundongos foram mais suscetíveis à infecção por *L. amazonensis*, apresentando uma maior lesão e carga parasitária, que os controles selvagens. Entretanto, uma proteção

parcial contra este parasito foi obtida na ausência de IL-12 funcional e uma resposta Th1 típica induzida por um protocolo de vacinação (HERNANDEZ *et al.*, 2006). Portanto, o desenvolvimento de uma doença crônica causada por *Leishmania* do complexo mexicana parece envolver uma diminuição na expressão de IL12R β 2 e menor capacidade de responder à IL-12.

A participação do IFN- γ na resistência à infecção por *L. major* é bem estabelecida, como foi discutido acima. Sua função em infecção por *L. amazonensis*, entretanto, ainda é controversa. O IFN- γ produzido pelas células T CD4⁺ durante a infecção com *L. amazonensis* seria consistente com o perfil Th1. Entretanto, células T CD4⁺ promovem lesões em camundongos infectados com *L. amazonensis* (SOONG *et al.*, 1997; TERABE *et al.*, 2000). Os mecanismos que permitem a persistência da *L. amazonensis* em face desta resposta Th1 são paradoxais. O IFN- γ possui uma função inflamatória associada ao recrutamento e retenção celular (FARBER, 1997; KAPLAN *et al.*, 1989; KULIDJIAN; ISSEKUTZ; ISSEKUTZ, 2002). Consistente com a produção de IFN- γ e retenção celular observada, um exame do sítio de infecção em humanos, camundongos C57BL/6 e 129Sv revelou altos níveis de expressão de moléculas de adesão e infiltrado de células T (CD4⁺ e CD8⁺), monócitos e macrófagos. O recrutamento de monócitos e macrófagos é fundamental para a sobrevivência e persistência da *Leishmania* (SCOTT, 1985; SCOTT; SACKS; SHER, 1983). Ainda, alguns resultados demonstraram que o IFN- γ não é essencial durante a fase inicial da infecção. Nestes estudos, camundongos C57BL/6 deficientes no gene para IFN- γ (GKO) infectados por *L. amazonensis* desenvolveram lesões similares à linhagem selvagem durante as dez primeiras semanas de infecção. Em contraste, possui um papel crítico na resolução tardia da lesão, pois a partir da 10^a semana de infecção as lesões dos camundongos GKO se tornaram significativamente maiores que as do grupo controle (COLMENARES *et al.*, 2003; PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007). Estudos sobre vacinas contra infecção por *L. amazonensis* reforçam a importância do IFN- γ no mecanismo de proteção à infecção. Nestes estudos camundongos imunizados e desafiados por *L. amazonensis* que controlaram a infecção revelaram um aumento na produção de IFN- γ (AEBISCHER *et al.*, 2000; COLMENARES *et al.*, 2003; GONZÁLEZ-LOMBANA *et al.*, 2008; HERNANDEZ *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2004). Além do mais, a imunização de camundongos GKO não forneceu proteção (COLMENARES *et al.*, 2003). É possível, então, que o nível de resposta Th1 à infecção por *L. amazonensis* seja inadequado para a erradicação do

parasita, mas permita o recrutamento de macrófagos por células T, favorecendo um meio adequado para a replicação do parasito.

Vários estudos demonstram que a suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis* é independente de IL-4. A neutralização de IL-4 endógena não promoveu a resolução da lesão (AFONSO; SCOTT, 1993) e a deleção do gene para IL-4 também não alterou o curso de infecção e carga parasitária na infecção por *L. amazonensis* (JONES *et al.*, 2002).

A inibição da expressão de IL-12R β 2, independente de IL-4, previne uma resposta Th1 eficaz e cura de infecção por *L. amazonensis*. Foi demonstrado em infecção com *L. mexicana* que a inibição da expressão de IL-12R β 2 foi dependente de IL-13 (ALEXANDER *et al.*, 2002). Além disto, uma resistência acentuada frente a infecção por *L. amazonensis* ou *L. mexicana* em camundongos BALB/c IL-4R α -/- comparada com o camundongo IL-4-/- reforça uma função da IL-13 na promoção da doença durante a infecção por estas espécies. Um possível mecanismo pode ser através do aumento de prostaglandina E₂ (PGE₂) pela IL-13 (ALEXANDER *et al.*, 2002; REY *et al.*, 1999). A PGE₂ inibe a expressão de IL-12R β 2 (ALEXANDER *et al.*, 2002; WU *et al.*, 1998). Conseqüentemente, mecanismos alternativos resultando no aumento na produção de PGE₂ parecem levar a uma não responsividade ao IL-12 em diferentes espécies de *Leishmania*.

A IL-10 apresenta uma função imunomoduladora em diversos sistemas, limitando a produção de IFN- γ por células T via inibição da produção de IL-12 por macrófagos e DC e inibição de apresentação de antígeno (ALEXANDER *et al.*, 2002; FIORENTINO *et al.*, 1991b; FIORENTINO *et al.*, 1991a; MACATONIA *et al.*, 1993). Experimentos com camundongos BALB/c deficientes em IL-10 sugerem que esta citocina, embora não seja mediadora determinante de suscetibilidade à infecção com *L. amazonensis*, tem uma função significativa em regular o desenvolvimento de uma resposta protetora Th1. Entretanto, a infecção de camundongos C57BL/6 deficientes de IL-10 com *L. amazonensis* demonstrou que, embora a IL-10 tenha uma função limitante na resposta Th1 durante a fase aguda da infecção, outros fatores imunomodulatórios são responsáveis pela limitação da resposta Th1 durante a fase crônica (JONES *et al.*, 2002).

Diferente do observado para a IL-4 e IL-10, o TGF- β tem uma função importante na diferenciação de células T na infecção por *L. amazonensis*. A administração desta citocina em camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* ou *L. brasiliensis* resultou em progressão da doença enquanto sua neutralização em

camundongo BALB/c induziu resistência (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992). O controle da lesão nos camundongos BALB/c tratados foi associada a um aumento na produção de IFN- γ e redução na produção de IL-4.

Foi demonstrado que algumas espécies de *Leishmania* podem evitar a resposta imune do hospedeiro inibindo a produção inicial de quimiocinas e receptores de quimiocinas, prejudicando, assim, o desenvolvimento de células Th1 específicas para o antígeno. Camundongos infectados com *L. amazonensis* apresentaram atraso e redução na expressão das quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β , CCL5, MIP-2 e dos receptores para quimiocinas CCR1, CCR2 e CCR5 nos estágios iniciais da infecção comparados com camundongos infectados com *L. major*. Estas alterações foram correlacionadas a um prejuízo na capacidade das células T responderem ao parasito (JI; SUN; SOONG, 2003). Estes resultados implicam a participação das quimiocinas na suscetibilidade a *L. amazonensis*.

1.3.3- Mecanismos de ação dos macrófagos na infecção por *L. amazonensis*

Camundongos infectados por *L. amazonensis* apresentam, no sítio da infecção, muitos macrófagos, a maioria dos quais vacuolados e altamente infectados (LEMOS, V *et al.*, 2000; SOONG *et al.*, 1997). Muitos pesquisadores investigam a função dos macrófagos na suscetibilidade à *L. amazonensis*.

Os macrófagos são importantes células apresentadoras de antígenos necessários para a ativação de linfócitos T específicos para *Leishmania*. Experimentos iniciais mostraram uma capacidade reduzida de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* apresentarem antígeno nativo para a maioria dos hibridomas de células T testados. Este fato foi devido a uma menor expressão, na membrana plasmática das células apresentadoras de antígenos de complexos estimulatórios (Ia-peptídeo) (PRINA *et al.*, 1993).

A *L. amazonensis* parece ter a capacidade de inibir a ativação de macrófagos ou resistir aos mecanismos leishmanicidas destas células. Um importante fator para a sobrevivência do parasito é uma menor resposta dos macrófagos à ativação por citocinas. Existem evidências que indicam que em infecções por *L. amazonensis* concentrações inadequadas de IFN- γ podem reverter sua ação protetora facilitando a replicação acentuada das amastigotas nos macrófagos murinos. Entretanto, quando associado ao LPS, o IFN- γ foi capaz de estimular os macrófagos e limitar a replicação das amastigotas (QI *et al.*, 2004; WANASEN *et al.*, 2007).

Em um estudo seguinte, este mesmo grupo demonstrou que a disponibilidade de L-arginina parece ser um regulador chave do crescimento acentuado das amastigotas de *L. amazonensis* mediado por IFN- γ e propuseram que este mecanismo é devido a uma via metabólica independente de arginase e iNOS (WANASEN *et al.*, 2007).

O fator de crescimento tipo insulina I (IGF-I) parece favorecer o desenvolvimento do parasito dentro dos macrófagos (GOMES *et al.*, 1997; GOTO *et al.*, 1998). Estudos mostraram que o IGF-I favoreceu o crescimento do parasita dentro do macrófago *in vitro*, afetando o metabolismo da L-arginina dentro destas células, promovendo principalmente a expressão e ativação da arginase do parasita, mas sem descartar seu efeito na arginase do macrófago (VENDRAME *et al.*, 2007).

Dados da literatura mostram que a adição de TNF- α a macrófagos ativados com IFN- γ acentua a atividade leishmanicida destes macrófagos (GOMES *et al.*, 2003). Embora a *L. amazonensis* seja mais resistente à morte por mecanismos induzidos por IFN- γ que a *L. major*, estes parasitas podem ser destruídos quando os macrófagos são ativados por ambos, IFN- γ e TNF- α . Foi demonstrado também, em experimentos *in vivo*, que o estabelecimento e disseminação da infecção por *L. amazonensis* não estavam relacionados a uma inabilidade do macrófago produzir NO, mas que, em comparação a *L. major*, *L. amazonensis* é mais resistente sendo morta por maiores níveis de NO ou outros mecanismos produzidos na fase inicial de infecção (LEMOS, V *et al.*, 2000). Reforçando estes dados, outros estudos demonstraram que a infecção por *L. amazonensis* não inibe a produção sistêmica de NO promovida por LPS (LINARES *et al.*, 2000). Ainda, a resistência apresentada pela *L. amazonensis* à morte por NO pôde ser observada também nesta espécie de parasita isolado de pacientes. Foi demonstrado que estes isolados diferiam na suscetibilidade à morte por NO *in vitro*. Alguns isolados foram mortos por níveis mais baixos de NO comparados a outros isolados (chamados isolados suscetíveis e resistentes, respectivamente). Esta divisão foi biologicamente relevante, pois, nos pacientes cujo isolado era resistente à morte por NO, as úlceras foram significativamente maiores que nos pacientes cujo isolado era suscetível ao NO (GIUDICE *et al.*, 2007).

Recentemente, observou-se que as amastigotas de *L. amazonensis* não foram mortas tão eficientemente por macrófagos ativados por LPS e IFN- γ quanto amastigotas de *L. major* apesar dos níveis equivalentes de iNOS e NO produzidos por estes macrófagos (MUKBEL *et al.*, 2007). Em um sistema *in vitro*, este grupo demonstrou que o aumento acentuado na mortalidade das amastigotas de *L. amazonensis* por macrófagos ativados por LPS e IFN- γ e tratados com um inibidor da EKR, uma proteína

quinase ativada por mitógeno associada à inibição da função do macrófago (FENG *et al.*, 1999), foi revertido na presença de um inibidor de superóxido (PD98059). Este estudo sugere que o NO atua como um agente citostático contra *L. amazonensis*, e que a presença de NO e superóxido é necessária para morte eficiente de amastigotas e *L. amazonensis* dentro de macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ .

Outros estudos demonstraram uma inibição na produção de NO induzida por LPS em macrófagos infectados por promastigotas de *L. amazonensis*. O tratamento de macrófagos *in vitro* com anticorpos anti-IL-4, anti-IL10 e anti-TGF- β falhou em aumentar os níveis de produção de NO por macrófagos infectados por promastigotas de *L. amazonensis*. Entretanto, a adição de IFN- γ à cultura resultou em aumento na produção de NO por macrófagos infectados estimulados com LPS (BALESTIERI *et al.*, 2002).

As citocinas IL-10 e TGF- β parecem ter um papel importante na limitação da atividade parasiticida dos macrófagos. Foi demonstrada uma produção acentuada de TGF- β por macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* e em tecidos de patas em camundongos infectados com *L. amazonensis* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992). Dados recentes mostraram que a fosfatidilserina na superfície das amastigotas inibem a atividade leishmanicida dos macrófagos infectados por *L. amazonensis*, por aumentar a secreção de TGF- β 1 e mensagem de IL-10 (WANDERLEY *et al.*, 2006).

Assim, apesar da resposta imune contra *L. amazonensis* ser diferente da resposta à *L. major*, os resultados descritos geram um consenso de que a produção de IFN- γ e NO são críticos no controle da infecção por *L. amazonensis*.

1.4- Infecção com baixa dose de *L. major*

A maior parte dos modelos experimentais de camundongos com leishmaniose cutânea descritos utiliza altos números de formas promastigotas do parasito (10^5 a 10^7), obtidos de fase estacionária de culturas, em sítios subcutâneos (pata ou base da cauda). Entretanto, estes modelos descritos previamente ainda não esclarecem totalmente o desenvolvimento da imunidade e refletem pobremente o que acontece em condições naturais de infecção para perpetuação da *Leishmania*. O número de parasitos, seu estágio de infecção bem como o sítio e a forma de inóculo foram ainda pouco usados como modelo de indução de leishmaniose experimental.

Assim, a fim de estabelecer um modelo experimental mais parecido com a infecção natural, pesquisadores começaram a usar como inóculo formas metacíclicas em números próximos ao inoculado pelo vetor. Estima-se que apenas 10 a 1000 promastigotas metacíclicas são inoculadas pelo flebótomo no local de infecção no momento do repasto sanguíneo (WARBURG; SCHLEIN, 1986). Recentemente, estes dados foram confirmados utilizando-se flebótomos infectados com *L. mexicana*, os quais deixaram aproximadamente 1000 promastigotas por picada, dos quais mais que 80% são metacíclicas (ROGERS *et al.*, 2004). A este modelo chamamos então de modelo de baixa dose de infecção.

A via de inóculo intradérmica também aproxima este modelo da infecção natural. A orelha de camundongos como sítio de infecção oferece a vantagem da possibilidade de monitoração da dinâmica dos eventos que ocorrem no sítio da infecção, bem como os compartimentos interconectados da epiderme e linfonodos drenantes.

Estes trabalhos iniciais mostraram que o curso de infecção por *L. major* no modelo murino difere quando baixa dose de formas promastigotas metacíclicas são administradas em comparação com o modelo tradicional de infecção com alta dose de parasitos de fase estacionária. No modelo de alta dose, a formação da lesão foi geralmente associada com um aumento no número de parasitos no sítio de infecção, enquanto a cura foi associada com ativação imune de macrófagos e morte do parasito no local da infecção. Entretanto, o modelo de baixa dose de infecção com *L. major* em camundongos C57BL/6 revelou duas fases na patogênese da leishmaniose cutânea que não haviam sido previamente encontradas: uma fase silenciosa, que durava de quatro a cinco semanas, favorecendo a amplificação do parasito na derme sem formação de lesão, seguida pelo desenvolvimento de lesão cutânea, associada com infiltração de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, que coincide com a morte do parasito no sítio (BELKAID *et al.*, 2000b). Resultados obtidos em camundongos BALB/c infectados com baixa dose de *L. major* mostraram, mais uma vez, uma fase discreta de infecção onde as lesões foram observadas após três semanas de infecção. Entretanto, em contraste com os camundongos C57BL/6, a formação da lesão coincidiu com o aumento no número de parasitos e não com sua eliminação (LANG *et al.*, 2003).

Pesquisadores, utilizando o modelo de baixa dose com *L. major* em BALB/c, também demonstraram um aumento no número de parasitos antes da detecção de sinais clínicos. Em acordo com esses dados, neste estudo o início da patologia correlacionou-se com a multiplicação do parasito no sítio do inóculo e nos linfonodos. Entretanto, o parasitismo diminuiu drasticamente na orelha infectada e nos linfonodos mostrou uma

redução de 100 vezes no período entre 23 e 40 semanas de infecção (COURRET *et al.*, 2003).

O uso de camundongos C57BL/6 imunodeficientes demonstrou que os mecanismos imunes responsáveis para o controle da infecção por alta dose de *L. major* permaneceram funcionais no modelo de infecção natural. A necessidade da IL-12 para a diferenciação das células T CD4⁺, produção de IFN- γ e morte do parasito mediada por NO foram confirmados. Experimentos com camundongos SCID também sugerem a participação das células B na patologia. O início da imunidade foi correlacionado com produção de IL-12 e IFN- γ no local da infecção e IFN- γ no linfonodo. Camundongos tratados com anti-CD4, SCID, ou C57BL/6 deficientes em IL-12/23p40, IFN- γ , CD40L, ou iNOS não controlaram a infecção. Em alguns casos, como os camundongos tratados com anti-CD4, camundongos IL12p40^{-/-}, CD40L^{-/-} e SCID, a alta carga parasitária foi associada a pouca ou nenhuma patologia. Estes resultados estendem ao modelo natural de infecção uma função para as células Th1 na resistência adquirida e formação da lesão, e documentam sua importância (BELKAID *et al.*, 2000b). Estes dados contrastam com o modelo de alta dose onde os efeitos do tratamento com anti-IL-12 e anti-IFN- γ em termos de desenvolvimento de lesão e números de parasitos tornou-se aparente dentro de três semanas de infecção (HEINZEL *et al.*, 1995; SYPEK *et al.*, 1993) e com início relativamente rápido de produção de IL-12 e IFN- γ descrito em camundongos C57BL/6 (DOHERTY; COFFMAN, 1996; HEINZEL *et al.*, 1995; REINER *et al.*, 1994).

Há um aumento no número de células produtoras de IL-4 no local da infecção e linfonodos drenantes nos camundongos C57BL/6 inoculados com baixa dose de *L. major* em torno da terceira semana de infecção. Entretanto, após o controle da lesão esta produção já havia caído sensivelmente, mantendo um nível residual. Camundongos deficientes em IL-4 apresentaram um desenvolvimento de lesão parecido com camundongos selvagens, mostrando um controle na décima semana de infecção (BELKAID *et al.*, 2000b). Em contraste, outro estudo demonstrou que camundongos BALB/c inoculados com baixa dose de *L. major* apresentaram células T CD4⁺ reativas produtoras de IL-4 e IFN- γ depois de três semanas de infecção, sugerindo que sob certas condições estas duas citocinas podem ser produzidas durante a infecção por *L. major* de forma não exclusiva (LANG *et al.*, 2003). Outros estudos também mostraram uma produção mista de citocinas Th1 e Th2 por camundongos BALB/c infectados com baixa dose de *L. major*. A produção de citocinas foi associada com o desenvolvimento da lesão e multiplicação do parasito. Foram produzidos altos níveis de IFN- γ , IL4, IL-10 e

IL-13 por células de linfonodos e baço. Alguns experimentos revelaram que grande parte destas citocinas foram provenientes de células T CD4⁺. Assim, em contraste ao observado em infecções com alta dose de *L. major* em certas condições, este modelo revelou uma produção mista de citocinas Th1 e Th2 durante a infecção (COURRET *et al.*, 2003; LANG *et al.*, 2003).

A grande maioria dos estudos realizados sobre as células Treg na infecção por *L. major* utiliza o modelo de baixa dose de infecção. Alguns estudos mostraram que as células Treg acumulam rapidamente no sítio dérmico de infecção por *L. major* onde estas células suprimem a resposta de células T CD4⁺, favorecendo a persistência do parasito, a patologia, e conseqüentemente um controle por imunidade concomitante (BELKAID *et al.*, 2002b; MENDEZ *et al.*, 2004).

O papel das células T CD8⁺ também foi revisto neste modelo de infecção intradérmica com baixa dose do parasito (BELKAID *et al.*, 2002b). Neste estudo, camundongos deficientes em células CD8⁺ ou cujas células foram removidas por tratamento com anticorpos, não controlaram o crescimento do parasito, a lesão foi menor e seu desenvolvimento foi atrasado. O início da formação da lesão e a morte dos parasitos nos camundongos selvagens foram associados ao acúmulo de células T CD8⁺ na pele e capacidade destas células produzirem IFN- γ . A reconstituição da resistência a *L. major* a camundongos RAG^{-/-} usando células T de doadores não infectados foi eficiente apenas quando ambas as células T CD4⁺ e CD8⁺ foram transferidas, enquanto a reconstituição com células T CD8⁺ provenientes de camundongos C57BL/6 durante fase aguda de infecção foi capaz transferir apenas resistência parcial. Este modelo sugere, então, uma função para as células T CD8⁺ na patogênese e imunidade durante uma infecção primária (BELKAID *et al.*, 2002b).

Outro estudo também reforça a função das células T CD8⁺ no modelo de infecção com baixa dose de *L. major*. Seus resultados demonstraram que a baixa dose de parasitos promove a expansão de células Th2. Entretanto, a *L. major* induziria concomitantemente a produção de IFN- γ por células T CD8⁺, a qual promove uma troca de resposta Th2 para uma protetora Th1 (UZONNA; JOYCE; SCOTT, 2004). Estes dados sugerem então que, em condições similares à natural, as células T CD8⁺ participam do controle da lesão primária pela alteração do perfil de resposta inicialmente Th2 para Th1 (BELKAID *et al.*, 2002b; UZONNA; JOYCE; SCOTT, 2004). Estes dados contrastam com os obtidos no modelo de infecção com alta dose de *L. major* (HUBER *et al.*, 1998; TITUS *et al.*, 1987; WANG *et al.*, 1993).

1.5- Infecção com baixa dose de *L. amazonensis*

Assim como demonstrado para *L. major*, algumas diferenças em relação ao modelo de alta dose foram observadas no modelo de infecção com baixa dose com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*.

Em um estudo realizado com camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com 10^4 formas metacíclicas de *L. amazonensis*, o período pré-patente foi de seis a sete semanas para ambas as linhagens e a formação da lesão ocorreu após um período de multiplicação do parasito no local da infecção. O parasitismo dos camundongos BALB/c foi maior que o observado nos camundongos C57BL/6 e, apesar de uma diminuição acentuada na carga parasitária no último tempo analisado, os camundongos C57BL/6 ainda apresentavam uma lesão crônica e parasitos no sítio de inóculo. Foi observada uma persistência da *L. amazonensis* nos camundongos C57BL/6 examinados seis meses depois da infecção (FELIZARDO *et al.*, 2007).

Quando comparam-se infecções com inóculos de 10^4 promastigotas metacíclicas e 10^7 parasitos de fase estacionária de *L. amazonensis* em camundongos BALB/c e C57BL/6, o curso geral de infecção e o padrão de suscetibilidade não diferiu muito. O camundongo BALB/c não apresentou diferença na carga parasitária do local de infecção e linfonodo, entretanto o grupo inoculado com menor dose de parasitos possuía menor parasitismo no baço e linfonodos distantes. Já os camundongos C57BL/6 apresentaram maior carga parasitária na pata quando inoculados com alta dose de parasitos de cultura na fase estacionária, entretanto, não houve diferença no baço e linfonodos (FELIZARDO *et al.*, 2007).

Um outro resultado com infecção de 10^3 formas metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha de camundongos BALB/c também demonstrou uma multiplicação do parasito antes da formação da lesão. O início da patologia foi associado com o aumento no número de parasitos no sítio de inóculo e linfonodos. O número de parasitos se manteve estável na orelha e aumentou no linfonodo no período entre 23 e 40 semanas de infecção (COURRET *et al.*, 2003).

O atraso no desenvolvimento da lesão observado nos dois estudos acima, encontrado também nos animais infectados com baixa dose de *L. major*, difere do modelo de infecção com alta dose com ambas as espécies de *Leishmania*.

Os camundongos BALB/c inoculados com baixa dose de *L. amazonensis* por via intradérmica revelaram uma mistura de citocinas Th1 e Th2 por células de linfonodo e baço. Depois da infecção, as concentrações de IFN- γ e IL-10 produzidas por células de

linfonodos foram máximas na sexta semana de infecção, enquanto os níveis de IL-4 e IL-13 apresentaram um pico na décima semana. No fim do período analisado, foi observada uma diminuição na produção de IL-4 e IL-10 (COURRET *et al.*, 2003).

A produção de citocinas por células de linfonodo de camundongos BALB/c e C57BL/6 inoculados na pata com 10^7 parasitos de fase estacionária ou 10^4 metacíclicas apresentou diferenças significativas entre as linhagens. A produção de IFN- γ foi maior em camundongos C57BL/6, enquanto IL-4 e IL-10 apareceram em maiores concentrações em camundongos BALB/c. Entretanto, não houve diferença entre na produção destas citocinas em relação às doses usadas (FELIZARDO *et al.*, 2007).

A análise destes resultados realça importantes diferenças entre os modelos de alta e baixa dose de infecção por metacíclicas de *L. amazonensis*. Além disto, ressaltam o pequeno número de informações obtidas até o momento neste modelo de infecção. Portanto, resolvemos re-examinar a relação básica entre crescimento do parasita, formação de lesão e produção de fatores protetores, comparando estes aspectos ao modelo de alta dose da mesma espécie de parasito e de alta e baixa dose de *L. major* previamente descritos.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos gerais

Caracterizar a infecção com baixa dose de *L. amazonensis* por via intradérmica em um modelo murino de infecção crônica, comparando com infecções com alta dose de *L. amazonensis* e com o modelo já caracterizado de baixa dose com *L. major*.

2.2- Objetivos específicos

Para alcançarmos nossos objetivos avaliamos nos camundongos C57BL/6 infectados com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis*, intradermicamente, na orelha, os seguintes parâmetros:

- curso de infecção, através de medida semanal da lesão por um período de 22 semanas;
- cinética de multiplicação dos parasitos no local de infecção, nos tempos de três dias, uma, três, seis, nove, 12 e 22 semanas após infecção, utilizando o método de quantificação de parasitos por diluição limitante e análise histopatológica;
- aspecto inflamatório e necrose no local da infecção, nos tempos acima, através da técnica de hematoxilina-eosina;
- cinética de migração de macrófagos, linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos B no local da infecção, quantitativamente e qualitativamente, nos tempos acima, utilizando a técnica de imuno-histoquímica;
- dosagem da produção das citocinas IFN- γ , IL-10, por ELISA, e TNF, por bioensaio, em sobrenadantes de cultura de células de baço e linfonodo drenante da infecção, estimuladas ou não com antígeno homólogo;
- dosagem da produção de NO₂⁻, pelo método de Griess, em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais dos camundongos infectados não estimulados ou estimulados com IFN- γ , IL-4 e antígeno *in vitro* nos tempos estabelecidos;
- atividade da arginase em lisado celular de macrófagos peritoneais de camundongos infectados não estimulados ou estimulados com IFN- γ , IL-4 e antígeno homólogo *in vitro* nos tempos estabelecidos.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Os camundongos C57BL/6 foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os animais, entre 6 e 12 semanas de idade, foram mantidos em condições ambientais controladas e alimentados com dieta comercial para roedores *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela comissão de ética para experimentação animal da UFMG, protocolo número CETEA 040/04.

3.2- Parasitos e infecção

Foram utilizadas *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania (L.) major* (MHOM/IL/80/Friedlin) mantidas em meio de Grace (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) com 20% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2mM de L-glutamina, 100 U do antibiótico penicilina e 100µg estreptomicina por ml (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA). Para infecção foram usadas formas promastigotas metacíclicas obtidas de culturas de fase estacionária por centrifugação em gradiente de Ficoll (Ficoll[®] 400, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). Rapidamente, os parasitos em cultura de fase estacionária foram centrifugados a 50 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1540 x g por 15 minutos. A seguir o *pellet* foi ressuspendido em 2 ml de PBS estéril e acrescentado sobre um gradiente de 2 ml de Ficoll 20% e 2 ml de Ficoll 10%. Este gradiente foi centrifugado a 800 g por 10 min e as camadas superficiais de PBS e Ficoll 10% foram coletadas e lavadas com PBS estéril. Após a contagem das formas metacíclicas obtidas após a separação, o inóculo foi preparado nas concentrações de 10³ parasitos/ 10µl de PBS / orelha ou 10⁶ parasitos/ 10µl PBS/ orelha. Acompanhamos o desenvolvimento da lesão semanalmente, através da medida da espessura e do diâmetro das lesões com paquímetro digital (Starrett[®] 727, Itu, SP, Brasil).

3.3- Preparo dos antígenos

Os antígenos de *L. major* ou *L. amazonensis* foram obtidos de promastigotas na fase logarítmica lavadas em PBS. A suspensão dos parasitos foi submetida a 7 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido seguido de descongelamento em banho maria a 37°C. Os antígenos particulados foram ajustados para concentração de 1mg/ ml pelo

método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) e estocados a -70°C até a hora do uso em culturas de células.

3.4- Quantificação dos parasitos nas orelhas

A quantificação dos parasitos foi realizada por análise de diluição. Para determinação do número de parasitos nas orelhas, as mesmas foram coletadas e desinfectadas em etanol 70% por aproximadamente 5 minutos. Após este período foram deixadas expostas para secar o álcool e a seguir os dois folhetos das orelhas foram separados. O lado da derme foi colocado para baixo em RPMI contendo 100 U de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina por ml (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) e 125 U/ ml de colagenase A (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) e incubado por 2 horas a 37°C e 5 % de CO_2 . Os folhetos foram cortados em pequenos pedaços, homogeneizados em triturador de vidro contendo meio de Grace e centrifugado a $50 \times g$ por 4 minutos para retirar os *debris* do tecido. A seguir o sobrenadante foi coletado e centrifugado a $1540 \times g$ por 15 minutos. O sedimento foi ressuscitado em 0,5 ml de meio de Grace contendo 20% de soro fetal bovino inativado, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina (GIBCO) e 2 mM de L-glutamina. Esta suspensão foi plaqueada em duplicata, 200 μl / poço, em diluição sucessiva 1:10. As ponteiros foram descartadas após cada diluição impedindo o transporte dos parasitos aderidos para o poço seguinte. O resultado, calculado 10 dias após o início da cultura a 25°C , foi expresso como a média de $-\log$ do título do parasito da diluição correspondente ao último poço positivo.

3.5- Histologia

Foram avaliados quatro camundongos de cada tempo totalizando 96 amostras da orelha. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. A orelha foi coletada e congelada a -70°C até o momento da realização da criotomia sendo obtidos sete cortes seriados de cada amostra, depositados em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram corados pela Hematoxilina-Eosina e submetidos às reações imuno-histoquímicas anti-macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e suas sub-populações, T CD4^+ e T CD8^+ . O último corte foi utilizado como controle negativo das reações imuno-histoquímicas.

3.5.1- Hematoxilina-Eosina

O processo de coloração se iniciou com a imersão das lâminas em banhos de álcool absoluto, álcool 90%, álcool 80%, álcool 70%, e água sendo cada um dos banhos de 3 minutos cada para hidratação. Após a hidratação, as lâminas foram imersas no corante Hematoxilina (corante ácido) por 10 minutos, em seguida lavadas em água corrente por 5 minutos. A seguir foi feita a diferenciação com a passagem rápida das lâminas em álcool-acidulado. Novamente as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram imersas no corante Eosina (corante básico), por 30 segundos, e em seguida lavadas em água corrente por 1 minuto. Logo após, as lâminas foram imersas em três banhos de álcool absoluto rapidamente e levadas à estufa a 60° C por alguns minutos para secagem. Depois de secas, as lâminas foram imersas em xilol e montadas com Entellan (Merck®, Darmstadt, Alemanha) e lamínula.

A coloração de rotina HE (Hematoxilina-Eosina) foi realizada para observação geral das alterações histopatológicas. O processo inflamatório e o parasitismo foram avaliados utilizando a objetiva de 10 e 40, sendo classificados em discreto, moderado e acentuado de acordo com o grau de comprometimento /parasitismo tecidual.

3.5.2- Imuno-histoquímica

Após a criotomia, as lâminas com as amostras permaneceram à temperatura ambiente por 12 horas e posteriormente foram fixadas em acetona a 4°C. Em seguida os cortes foram lavados em tampão Tris salina 0,05 M pH 7,6 (TBS) por 5 minutos e submetidos ao bloqueio da atividade da peroxidase endógena com uma solução de H₂O₂ a 1% em TBS, por 10 minutos. Novamente os cortes foram lavados por 5 minutos em TBS e em seguida incubados com albumina bovina sérica a 5%, por trinta minutos, para o bloqueio de ligações inespecíficas. Após nova lavagem em Tween-20 0.05% em TBS por 5 minutos, as amostras foram incubadas durante uma hora com anticorpos para as seguintes moléculas de superfície: anti-CD3 (linfócitos T), anti-CD4, anti-CD8, anti-mac3 (macrófago) e anti-CD40 (linfócitos B), todos da BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA). Os cortes foram novamente lavados em TBS por 5 minutos e incubados com o anticorpo secundário biotilado (ABC kit, Vector, Sydney, NSW, Austrália) seguido pelo complexo avidina-biotina por trinta minutos cada a temperatura ambiente em câmara úmida. A revelação da reação da peroxidase foi obtida através da incubação em solução de DAB (50 mg de diaminobenzidina em 250 mL de PBS e 500

µl de Peróxido de Hidrogênio 30%) durante 5 minutos. No intuito de interromper a revelação os cortes foram mergulhados em TBS por três vezes. Posteriormente foram lavados em água corrente por 5 minutos, contracorados com Hematoxilina de Harris por dez segundos, lavados em água corrente por 5 minutos e desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e montados em Entellan (Merck[®], Darmstadt, Alemanha).

Para a avaliação da imunomarcação para linfócitos T (Total e subpopulações CD4 e CD8), linfócitos B e macrófagos foi quantificado o número de células marcadas em 10 campos utilizando a objetiva de imersão. Os dados foram apresentados como: número de células/campo ± desvio padrão.

3.6- Cultura de células e dosagens de citocinas

Em tempos determinados do curso de infecção os animais foram sacrificados e culturas de células do baço e linfonodo foram obtidas como descrito anteriormente (AFONSO; SCOTT, 1993). As células foram ajustadas para 5×10^6 células/ml em RPMI contendo 10% soro fetal bovino inativado, 2 mM de L-glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 5×10^{-5} M de β -mercaptoetanol (2-ME) e 100 U penicilina e 100 µg de estreptomicina (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA). As células foram cultivadas em meio sem estímulo ou na presença de antígeno homólogo (50 µg/ml) por 24hs para dosagem de TNF ou 72hs para dosagem de IFN- γ e IL-10.

Para a dosagem de IFN- γ foi utilizado um anticorpo monoclonal (R46A2) para cobertura, um soro policlonal de coelho como segundo anticorpo, um conjugado anti-IgG de coelho-peroxidase (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA) para detecção e ABTS (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA) para revelação. O limite de detecção foi de 0,03 ng/ml.

A dosagem da produção de IL-10 foi feita conforme orientação do Kit (Peprotech Inc., Princeton Business Park, NJ, USA). O limite de detecção foi de 0,03 ng/ml.

TNF foi quantificado por um bioensaio usando uma linhagem de célula sensível ao TNF, WEHI-164 (LATTIME; STOPACCIARO; STUTMAN, 1988). A sensibilidade deste método foi de 0,01pg/ml.

Para dosagem das citocinas IFN- γ e TNF foram utilizadas, como padrões, moléculas recombinantes obtidas da R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA.

3.7- Obtenção de macrófagos

Camundongos em diferentes tempos de infecção com *L. major* ou *L. amazonensis* foram injetados na cavidade intraperitoneal com 2 ml de tioglicolato a 3% (Tioglicolato, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA). Após 3 dias os camundongos foram sacrificados e 10 ml de RPMI foram injetados na cavidade peritoneal. As células inflamatórias foram recolhidas ao aspirar de volta o meio injetado. A seguir as células foram contadas e ajustadas para plaqueamento. A dosagem de NO e arginase foram feitas na mesma cultura. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de NO e as células restantes foram lisadas para a dosagem de atividade da arginase.

3.8- Dosagem de produção de óxido nítrico

As células peritoneais obtidas de camundongos infectados foram incubadas em placas de 24 poços, por 48 hs, na concentração de 1×10^6 células por ml, na presença ou ausência de 50 µg do antígeno homólogo ou na presença de IFN- γ 50 U/ml, (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA) ou IL-4 40 U/ml com ou sem o antígeno homólogo. A produção de NO foi dosada como nitrito no sobrenadante usando o reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982).

3.9- Ensaio de atividade de arginase

A atividade de arginase de lisado de macrófagos peritoneais foi medida como previamente descrita (CORRALIZA *et al.*, 1995) com algumas modificações. Brevemente, os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos com diferentes tempos de infecção, como descrito acima, e plaqueados, por 48 hs, em placas de 24 poços na concentração de 1×10^6 células por ml. Depois da remoção do sobrenadante as células foram incubadas com 100 µl de Triton X-100 por 30 min em agitação. A arginase foi ativada com 100 µl de MnCl₂ 10 mM e Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) a 55°C por 10 min. A seguir a amostra foi transferida para outra placa de 24 poços em duas concentrações diferentes. Em um poço foram colocados 50 µl da amostra e em outro foi diluída 1:10 (VF da amostra 50 µl). Para reação da enzima foram adicionados às amostras 50 µl de L-arginina 0,5 mM (pH 9,7) e incubadas a 37°C por 60 min. A reação

foi parada com 400 μl de uma mistura de ácido $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ (1:3:7). Subseqüentemente, 25 μl de uma solução 9% de 1-fenil-1,2-propanodiona-2-oxime em 100% de etanol foi adicionada e a placa foi incubada a 95°C por 45 min para o desenvolvimento da cor. Depois de 10 min de incubação no escuro, 200 μl de cada amostra foi transferida para uma placa de 96 poços e a leitura foi feita a 540 nm. A curva padrão foi feita usando uma solução de uréia a 1mg/ml diluída 1:2, sucessivamente. Uma unidade de atividade da enzima é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol uréia/min.

3.10- Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados com distribuição normal onde comparamos dois grupos independentes foram analisados pelo teste t de Student não-pareado. Para comparação de três ou mais grupos utilizamos a análise de variância (ANOVA) e se houve uma diferença significativa estes grupos foram comparados através do teste t de Bonferroni. Para os dados com distribuição não-normal utilizamos o teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. As análises foram feitas utilizando o programa estatístico Spss.

4- RESULTADOS

4.1- Curso de infecção

Uma infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6 promove o desenvolvimento de uma lesão que cicatriza ao longo do tempo (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002) enquanto uma infecção por *L. amazonensis* desencadeia o desenvolvimento de uma lesão crônica (AFONSO; SCOTT, 1993). Em nosso estudo comparamos a infecção por estas duas espécies de *Leishmania* na orelha de camundongos C57BL/6 utilizando 10^3 ou 10^6 parasitos. A primeira dose simula o número dos parasitos na infecção natural pelo flebótomo e a segunda é aquela usada na maioria dos trabalhos publicados.

Para avaliar o desenvolvimento da lesão utilizamos a medida da espessura (Figs. 1A e 1B) e do diâmetro da mesma (Figs. 1C e 1D). Curiosamente, na segunda e terceira semanas de infecção encontramos uma lesão maior nos animais infectados com 10^6 *L. major* em relação aos animais infectados com a mesma dose de *L. amazonensis* (Fig. 1B). Entretanto, a partir da sexta semana de infecção este perfil se modificou e a lesão causada por 10^6 *L. major* passou a ser menor que a lesão causada por *L. amazonensis*, assim permanecendo até a última semana estudada (Fig. 1B). A redução mostrada no tamanho da lesão durante o curso de infecção por *L. amazonensis* foi devido à ulceração e necrose da orelha e não à cicatrização da mesma (Figs. 1B, 3M e 3Q).

Quando comparamos o curso de infecção entre estas duas espécies de *Leishmania* com inóculo de 10^3 parasitos (Fig. 1A) obtivemos resultados parecidos com os relatados acima em relação ao perfil das lesões. Também no início do estudo, quatro e seis semanas após infecção, os camundongos inoculados com *L. major* apresentaram uma lesão maior que a encontrada nos animais infectados com *L. amazonensis* e após 13 semanas de infecção esta cinética se modificou. A partir deste ponto, os animais infectados com *L. amazonensis* apresentaram maior lesão que os infectados com *L. major*.

O desenvolvimento da lesão nos animais inoculados com alta dose de *L. amazonensis* acompanhou o curso de infecção do grupo infectado com a mesma dose de *L. major* até cinco semanas após a infecção. Por outro lado, quando avaliado o inóculo com baixa dose de parasitos, apenas a partir da 11^a semana de infecção a lesão apresentada pelo grupo infectado com *L. amazonensis* foi maior que a encontrada nos animais infectados com *L. major*.

Os resultados encontrados para medida do diâmetro das lesões foram semelhantes aos descritos acima para medida da espessura das lesões (Figs. 1C e 1D). Nestas Figuras mostramos o desenvolvimento de lesão por *L. amazonensis* apenas até 16ª semana de infecção, pois a ulceração e necrose nas orelhas após este período levaram a redução do tamanho das mesmas.

Para verificarmos o efeito da dose do inóculo no desenvolvimento de lesão comparamos as diferentes doses utilizadas em relação à mesma espécie de *Leishmania* (Fig. 2) e observamos algumas diferenças pertinentes. O grupo infectado com 10^6 *L. major* apresentou uma lesão maior que a do grupo infectado com 10^3 parasitos no período de duas a cinco semanas de infecção (Fig. 2A). A partir deste tempo o tamanho das lesões de ambos os grupos se igualaram e assim permaneceram até o último momento estudado. Interessantemente, nos animais inoculados com 10^6 *L. major* a lesão já pode ser visualizada na segunda semana de infecção enquanto que no grupo infectado com 10^3 *Leishmania* esta visualização só foi possível quatro semanas após o inóculo. Também o pico do tamanho da lesão demorou um pouco mais para acontecer. Enquanto os animais infectados com 10^6 parasitos apresentaram um pico de lesão entre a quarta e sexta semana de infecção o grupo inoculado com 10^3 *L. major* apresentou este pico no período de oito a dez semanas de infecção. Desta forma observamos que para as infecções com *L. major*, o desenvolvimento de lesão é mais demorado com a utilização de uma menor dose de inóculo. Este atraso visto no início do desenvolvimento da lesão com esta espécie de *Leishmania* está em acordo com dados demonstrados na literatura (BELKAID *et al.*, 2000a; LIRA *et al.*, 2000).

Era de nosso interesse verificar se a dose também interferiria na infecção por *L. amazonensis* em animais C57BL/6 (Fig. 2). Observamos que uma maior lesão foi apresentada pelo grupo infectado com 10^6 parasitos entre a segunda e nona semana de infecção (Fig. 2B). No restante do curso de infecção o tamanho das lesões não foi semelhante. Curiosamente, no grupo infectado com alta dose de parasitos a lesão foi observada já na 2ª semana de infecção e seu tamanho aumentou rapidamente, enquanto nos animais infectados com baixa dose de *L. amazonensis* esta visualização só foi possível cinco semanas após o inóculo e seu desenvolvimento foi bem mais lento. Ulceração e necrose nas orelhas infectadas com 10^6 parasitos diminuíram o tamanho aparente da lesão a partir da 11ª semana de infecção sendo estes os motivos iniciais destas lesões estarem semelhantes às infectadas com 10^3 parasitos (Fig. 2B). Apesar da lesão apresentada pelos animais inoculados com 10^3 *L. amazonensis* também se mostrarem com tamanho considerável esta não ulcerou e necrosou com tanta

intensidade como ocorreu com o inóculo de 10^6 parasitos até o último tempo observado (Figs. 3L, 3P e 3M, 3Q). Assim, a infecção por *L. amazonensis* com inóculo mais semelhante ao que ocorreria na natureza também leva ao desenvolvimento mais lento da lesão. Além disto, é importante ressaltar que as lesões observadas neste grupo apresentaram aspecto menos grave quando comparado ao grupo infectado com 10^6 parasitos. Assim como observado para infecção por *L. major*, os resultados encontrados para medida do diâmetro das lesões foram semelhantes aos descritos acima para medida da espessura das lesões (Figs. 1C e 1D).

Na Figura 3 documentamos por fotografias a cinética do curso de infecção representada graficamente nas Figuras 1 e 2. Comparando as Figuras 3A, 3E e 3B, 3F visualizamos claramente o atraso descrito para o desenvolvimento da lesão quando a infecção foi realizada com 10^3 *L. major*. Nesta infecção com baixa dose de parasitos as orelhas não mostraram lesões aparentes na terceira semana enquanto que no inóculo com 10^6 *Leishmania* já podemos visualizá-las. Quanto ao pico da lesão, verificamos que ele também acontece mais tardiamente nos animais infectados com 10^3 *L. major*, em torno da nona semana de infecção, enquanto para o inóculo de 10^6 ele ocorre por volta da sexta semana (Figs. 3I e 3F, respectivamente). Em contraste ao grupo infectado com menor dose de parasitos, os animais inoculados com 10^6 *L. major* já mostravam uma diminuição no tamanho da lesão na nona semana de infecção, o que veremos para o inóculo de 10^3 apenas em torno de 12 semanas após infecção (Fig. 3J e dado não mostrado para 12 semanas de infecção). Já a cicatrização ocorrida nas orelhas dos dois grupos foi semelhante 22 semanas após o inóculo. Desta forma, acompanhamos o atraso ocorrido no desenvolvimento, no pico e diminuição das lesões dos animais infectados com 10^3 *L. major* em comparação aos infectados com 10^6 destes parasitos.

Em uma infecção por *L. amazonensis*, o menor inóculo de parasitos também causou um atraso no desenvolvimento inicial da lesão. Com três semanas de infecção o grupo inoculado com 10^6 *Leishmania* apresentou lesão bem aparente enquanto nos animais infectados com 10^3 parasitos nenhum sinal da mesma era ainda visível (Figs. 3C e 3D). Na sexta semana de infecção observamos um aumento da lesão no grupo infectado com 10^6 *L. amazonensis* e só então um início de lesão nas orelhas dos animais inoculados com 10^3 parasitos (Figs 3G e 3H). O tamanho da lesão no grupo infectado com 10^6 *Leishmania* aumentou rápida e constantemente de forma que na nona semana após a infecção estes animais já apresentavam enormes lesões ulceradas e necrosadas (Fig. 3M). Já o desenvolvimento das lesões nos animais inoculados com 10^3 parasitos foi mais lento, mas também constante e neste mesmo tempo, apesar de também mostrar

grandes lesões, estas raramente evoluíram para úlceras ou necrose (Figs. 3L e 3M). Mesmo após 22 semanas de infecção este grupo inoculado com 10^3 *L. amazonensis* mostrou lesões grandes mas com poucas ulcerações e focos de necroses, quando existiam. Entretanto, os animais infectados com 10^6 parasitos apresentaram ulcerações e necroses extensas e muitos deles perderam toda a porção externa de cartilagem das orelhas (Figs 3P, 3Q e dado não mostrado). Portanto, um inóculo com *L. amazonensis* semelhante ao realizado pelo flebótomo tornou o desenvolvimento de lesão mais lento e estas lesões se apresentaram menos exacerbadas.

Assim, observamos que uma menor dose de inóculo de *L. major* promoveu um atraso no desenvolvimento, no pico e na diminuição da lesão e que em uma infecção por *L. amazonensis*, também com menor inóculo do parasito, ocorreu um atraso no desenvolvimento e diminuição da gravidade da lesão. Esta se apresenta com pouca ou nenhuma ulceração e necrose durante o período estudado.

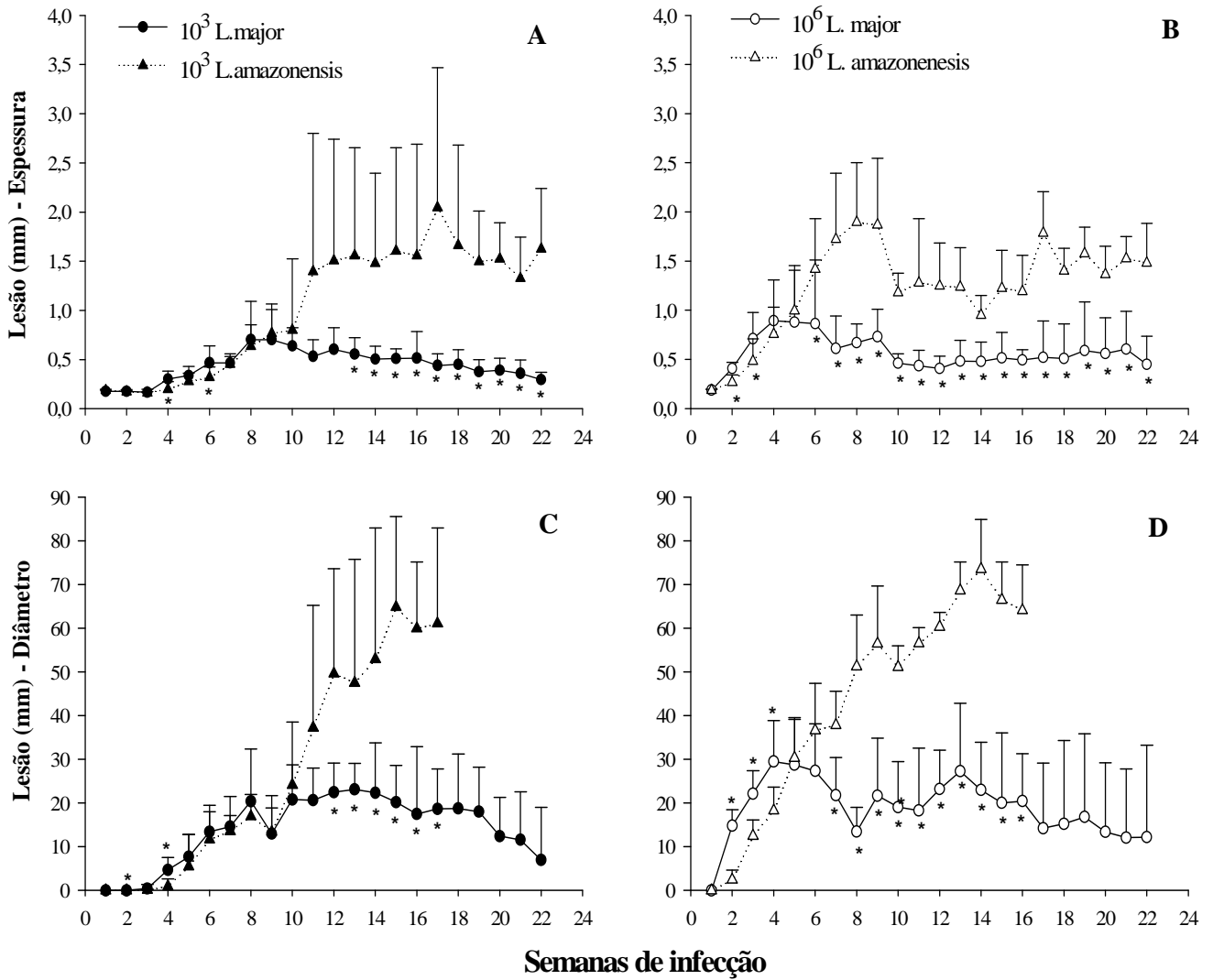


Figura 2: Camundongos C57BL/6 inoculados com a mesma dose de *L. major* ou *L. amazonensis* apresentam diferentes perfis de desenvolvimento de lesão. Animais C57BL/6 foram inoculados intradermicamente, em ambas as orelhas, com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis*. O curso da infecção foi acompanhado através de medidas de espessura (A, B) e diâmetro (C, D) das lesões nas orelhas. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de 12 orelhas por grupo até a 9ª semana de infecção e 6 orelhas por grupo a partir de 10ª semana de infecção. Estes resultados são representativos de pelo menos 4 experimentos feitos independentemente. Foi realizado teste *t* de Student para os pontos com distribuição normal e Mann-Whitney para os pontos com distribuição não-normal. (* $p \leq 0,05$)

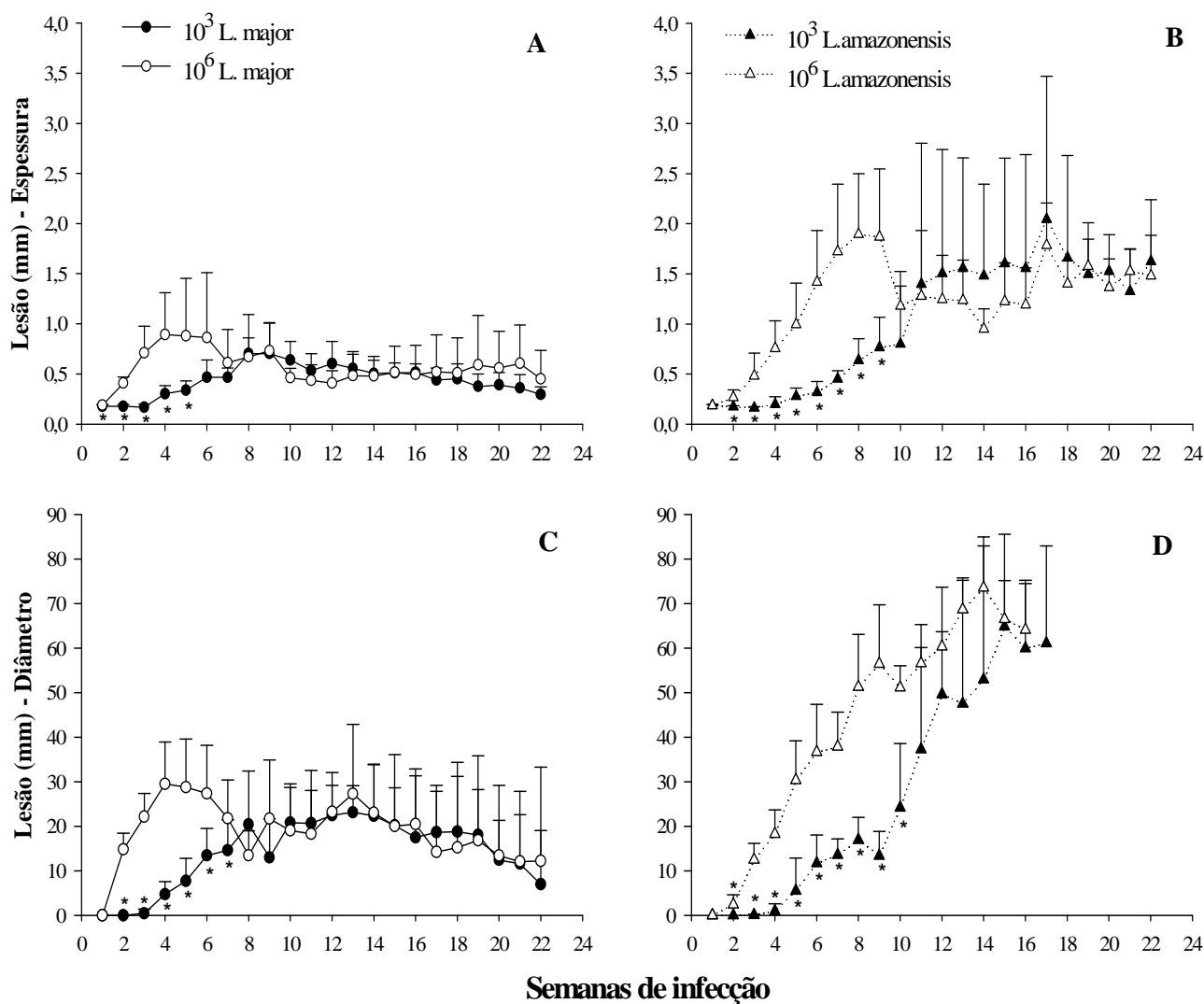


Figura 3: Baixa dose de inóculo retarda o início do desenvolvimento da lesão causada por *L. major* e por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6. 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis* foram inoculadas intradermicamente, em ambas as orelhas de animais C57BL/6. O curso da infecção foi acompanhado através de medidas de espessura (A, B) e diâmetro (C, D) das lesões nas orelhas. Cada ponto representa a média e desvio padrão de 12 orelhas por grupo até a 9ª semana de infecção e 6 orelhas por grupo a partir de 10ª semana de infecção. Estes resultados são representativos de pelo menos 4 experimentos feitos independentemente. Foi realizado teste *t* de Student para os pontos com distribuição normal e Mann-Whitney para os pontos com distribuição não-normal. (* $p \leq 0,05$)

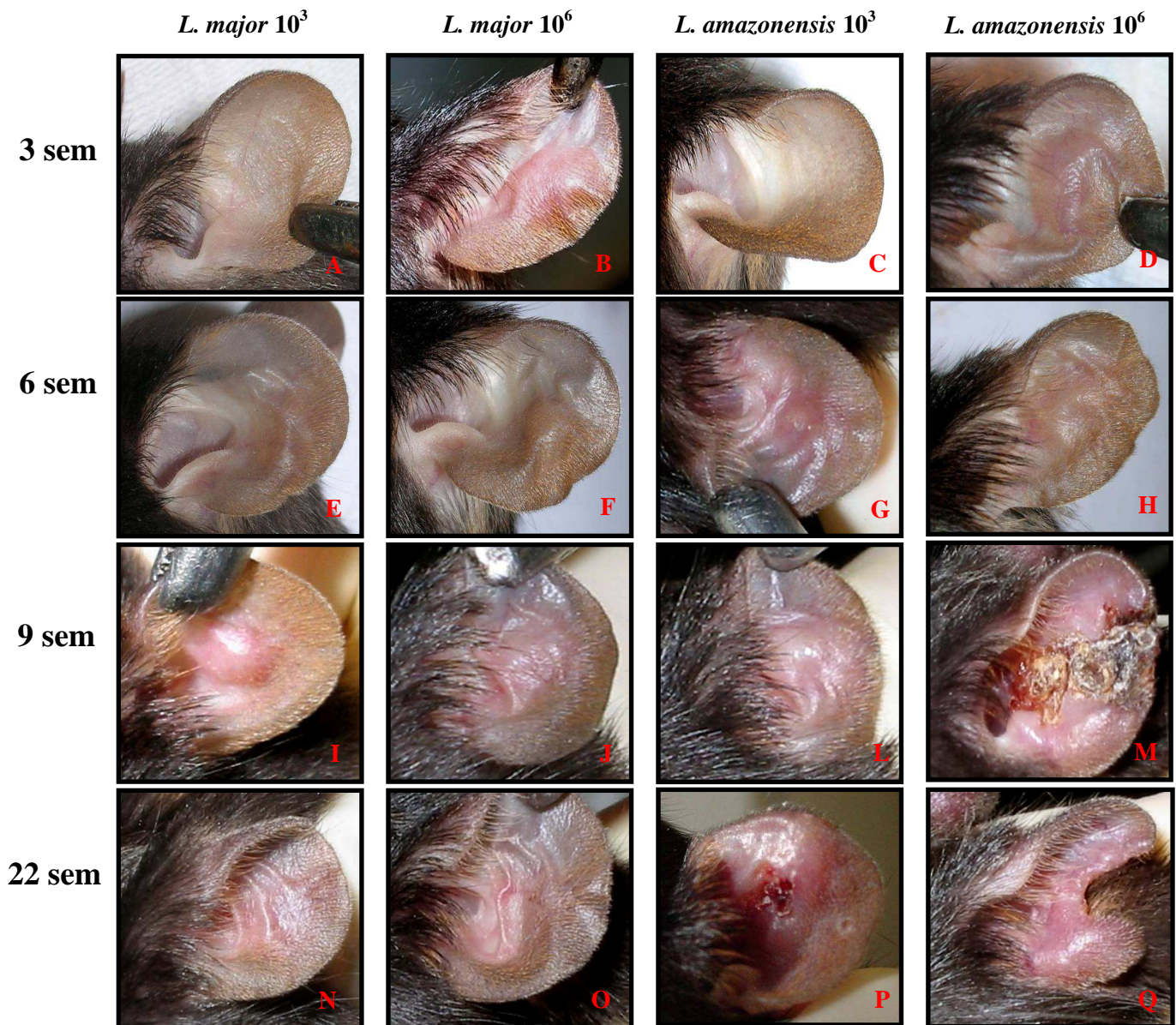


Figura 4: Aspecto das lesões durante o curso de infecção. Animais C57BL/6 foram inoculados intradermicamente, em ambas as orelhas, com 10³ ou 10⁶ promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis*. As fotos mostram o aspecto das orelhas inoculadas com 10³ *L. major*, 10⁶ *L. major*, 10³ *L. amazonensis* ou 10⁶ *L. amazonensis* em diferentes pontos durante o curso de infecção.

4.2- Carga parasitária e sua relação com o curso de infecção

A seguir investigamos a cinética de multiplicação da *L. major* e *L. amazonensis* nas doses alta e baixa em camundongos C57BL/6 (Fig. 4).

Nossos resultados mostraram que já com três dias de infecção o grupo com inóculo de 10^6 *L. major* possuía um maior número de parasitos em relação aos animais infectados com 10^3 parasitos. Esta diferença foi observada até seis semanas após a infecção. Na nona semana de infecção, entretanto, este perfil foi alterado. O parasitismo nos animais infectados com 10^3 *L. major* foi em torno de dez vezes maior que no grupo infectado com 10^6 *Leishmania*. Interessantemente, com 12 semanas de infecção vimos uma queda acentuada no número de parasitos nos animais infectados com 10^3 *L. major* o que tornou, de novo, este grupo menos parasitado em relação ao grupo inoculado com maior dose. Contudo, no último ponto observado durante nosso estudo, 22 semanas de infecção, não encontramos mais diferença na carga parasitária entre as doses de inóculo usadas.

Curiosamente, o número de parasitos em uma infecção por 10^6 *L. major* não mostrou grandes variações entre os tempos avaliados. Perfil diferente foi observado para o inóculo com 10^3 *Leishmania*. Os resultados mostraram um aumento lento na carga parasitária até a sexta semana e rápido até a nona semana de infecção, uma queda acentuada na 12^a semana e um novo aumento que aproxima o número de parasitos no tempo de 22 semanas de infecção no grupo infectado com 10^6 *Leishmania*.

Para os animais infectados com *L. amazonensis* encontramos algumas diferenças durante a cinética de multiplicação dos parasitos. Os grupos infectados com esta espécie de *Leishmania* não apresentaram diferença no número de parasitos no terceiro dia de infecção com as doses usadas. Um maior parasitismo foi visto no grupo inoculado com 10^6 *L. amazonensis* no período de uma a seis semanas de infecção em relação aos animais inoculados com baixa dose. Esta diferença deixou de existir na nona e 12^a semana. Inesperadamente, nossos resultados mostraram um maior parasitismo na 22^a semana após infecção para o grupo infectado com 10^6 *L. amazonensis*. Esta surpresa foi devida ao pequeno tamanho de lesão observada nas orelhas deste grupo, já que neste tempo elas já eram praticamente inexistentes devido a ulcerações e necrose causadas pela infecção.

Assim, encontramos também para infecção por *L. amazonensis* uma cinética diferente de multiplicação dos parasitos para as duas doses usadas. No inóculo realizado com 10^6 parasitos observamos aumento rápido na carga parasitária de três dias para uma

semana e de três semanas para seis semanas de infecção. Entre a sexta e a 12^a semana após infecção o número de parasitos foi semelhante, voltando a mostrar aumento na 22^a semana. Já os resultados para a dose de 10³ *L. amazonensis* mostraram uma multiplicação lenta dos parasitos até seis semanas após a infecção e um aumento rápido no parasitismo no período de seis a nove semanas. A partir daí a carga parasitária se manteve até o último momento estudado.

Nossos resultados mostraram algumas situações interessantes para as diferentes espécies estudadas. No terceiro dia de infecção, curiosamente, o inóculo de 10⁶ *L. major* mostrou maior número de parasitos que a infecção pela mesma dose de *L. amazonensis*. Esta diferença deixou de existir a partir de uma semana de infecção e persistiu até a terceira semana. Seis e nove semanas após o inóculo, os animais infectados com *L. amazonensis* apresentaram maior parasitismo que o grupo inoculado com *L. major*. Diferente do esperado, no tempo de 12 semanas de infecção, encontramos quantidades semelhantes de parasitos entre estes dois grupos. Entretanto, na 22^a semana vimos uma maior carga parasitária para os animais infectados por *L. amazonensis*.

Interessantemente, o perfil de multiplicação dos parasitos descritos para o inóculo de 10⁶ *L. major* ou *L. amazonensis* não foi o mesmo encontrado para o inóculo de 10³ parasitos. Curiosamente, uma maior carga parasitária foi encontrada no grupo infectado com 10³ *L. major* em relação ao grupo infectado com *L. amazonensis* mas apenas na nona semana de infecção. Antes deste tempo o número de parasitos se manteve semelhante. A partir de 12 semanas de infecção, entretanto, os animais infectados com *L. amazonensis* mostraram maior parasitismo que o grupo inoculado com *L. major*.

Assim, uma infecção realizada com número de parasitos semelhante ao inoculado pelo flebótomo mostrou uma alteração no perfil de multiplicação destas espécies de *Leishmania* quando comparada a uma infecção por 10⁶ parasitos. No inóculo de 10³ formas metacíclicas observamos uma fase de multiplicação mais lenta do parasito, o que ocorre em um período de aproximadamente seis semanas de infecção para ambas as espécies. Deste ponto para a nona semana o número de parasitos aumentou rapidamente. Para infecção com *L. amazonensis*, a carga parasitária se manteve constante até o fim do período observado. Já para infecção por 10³ *L. major* na 12^a semana, o parasitismo diminuiu drasticamente e voltou a aumentar na 22^a semana de infecção. No entanto, no inóculo de 10⁶ *L. major* encontramos uma variação pequena no número de parasitos durante o tempo estudado e, em relação ao inóculo de *L.*

amazonensis, períodos de multiplicação rápida seguidos por períodos de estabilidade na carga parasitária.

Diante das diferenças descritas acima para o desenvolvimento de lesão e multiplicação dos parasitos com as duas doses de inóculo e diferentes espécies de *Leishmania* utilizadas comparamos estas duas variáveis para verificar a existência de relação entre as mesmas.

Quando usamos o inóculo de 10^6 *L. major* vimos uma carga parasitária com poucas alterações durante as 22 semanas de infecção avaliadas enquanto o curso de infecção mostrou variações durante o desenvolvimento e cicatrização da lesão. Aparentemente, o aumento no número de parasitos encontrado uma semana após a infecção parece estar induzindo o início de desenvolvimento da lesão visto já na segunda semana de infecção. Curiosamente, o aumento gradual do parasitismo visto após três semanas de inóculo, e que se estendeu até a 12^a semana, não foi acompanhado pelo tamanho da lesão. Enquanto o tamanho da lesão apresentou um pico entre a quarta e sexta semana começando a diminuir a partir de então o parasitismo mostrou um pico na 12^a semana após infecção, onde a lesão já havia alcançado seu menor tamanho, tamanho este semelhante ao encontrado na 22^a semana de infecção. Assim, estes resultados mostraram um aumento de parasitismo acompanhado por início de desenvolvimento de lesão e uma diminuição no tamanho da lesão enquanto ainda existia um aumento no parasitismo. Estes dados sugerem um controle mais lento do parasitismo em relação a uma redução mais rápida do tamanho da lesão.

Já para infecção com 10^3 *L. major*, o início da lesão só ocorreu a partir da quarta semana de infecção e pareceu também acompanhar um aumento na carga parasitária. Nesta dose de inóculo o aumento do tamanho da lesão acompanhou o aumento da carga parasitária durante o período de três a nove semanas de infecção. Na nona semana encontramos o pico da lesão e do parasitismo. Curiosamente, nossos resultados mostraram uma queda acentuada no número de parasitos acompanhada por uma diminuição mais lenta no tamanho da lesão na 12^a semana de infecção. Uma diminuição no tamanho da lesão continuou a acontecer de forma gradativa até a 22^a semana, diferente do encontrado para o parasitismo onde foi visto um aumento neste tempo final. Usando menor dose de inóculo observamos então um curso de infecção acompanhando o parasitismo até a nona semana de infecção. Neste período existiu um aumento nestas duas variáveis e a partir daí um controle das mesmas. Entretanto, diferente do curso de infecção a carga parasitária mostrou-se aumentada em 22 semanas.

Relacionando as duas doses, encontramos um atraso tanto no desenvolvimento da lesão quanto na multiplicação do parasito com inóculo de 10^3 *Leishmania* em relação a 10^6 parasitos. Observamos também um controle no tamanho da lesão mais lento que o do inóculo de 10^6 parasitos. Entretanto, com 22 semanas de infecção estes dois grupos apresentaram mesma carga parasitária e tamanho de lesão semelhante.

Na infecção realizada com 10^6 *L. amazonensis* nossos resultados mostraram um aumento na carga parasitária uma semana após o inóculo acompanhado pelo início da lesão na semana seguinte. O número de parasitos mostrou novo aumento apenas na sexta semana de infecção e a partir deste ponto pouco se alterou até a 12^a semana. O desenvolvimento de lesão, entretanto, foi constante e acentuado até a nona semana de infecção. A diminuição observada no tamanho da lesão a partir deste momento foi devido a ulcerações e necrose o que justificou nossa surpresa ao encontrarmos um maior parasitismo na 22^a semana de infecção. Portanto, observamos o desenvolvimento da lesão acompanhando a multiplicação do parasito por aproximadamente nove semanas de infecção e após este tempo, mesmo quando a lesão ulcerou e necrosou, o parasitismo ainda estava aumentado.

Já com inóculo de 10^3 *L. amazonensis* a lesão só se tornou aparente a partir da quarta semana de infecção quando o número de parasitos já mostrava um aumento em relação aos tempos anteriores. O desenvolvimento da lesão foi mais lento até a sexta semana de infecção assim como a multiplicação do parasito. Da sexta a 12^a semana de infecção a lesão mostrou um aumento acentuado e a partir daqui este tamanho pouco variou até a última semana estudada. Já o parasitismo apresentou um aumento nove semanas após a infecção e este se manteve até a 22^a semana.

Encontramos, então, na infecção com menor dose de *L. amazonensis* um atraso no aumento do número de parasitos e no desenvolvimento da lesão e no período entre 12 e 22 semanas de infecção uma lesão menos exacerbada com poucas úlceras e quase sem necrose.

Assim, nossos resultados utilizando a menor dose de infecção mostraram uma multiplicação mais lenta do parasito e um desenvolvimento mais demorado da lesão tanto para a *L. major* quanto para a *L. amazonensis*. Observamos também que enquanto na infecção por *L. major* as diferenças mostradas entre as doses durante o curso de infecção deixaram de existir 22 semanas após o inóculo dos parasitos na infecção por *L. amazonensis* algumas diferenças importantes ainda existiam na última semana observada como, por exemplo, lesões menos exacerbadas sem necrose ou ulcerações e menor carga parasitária.

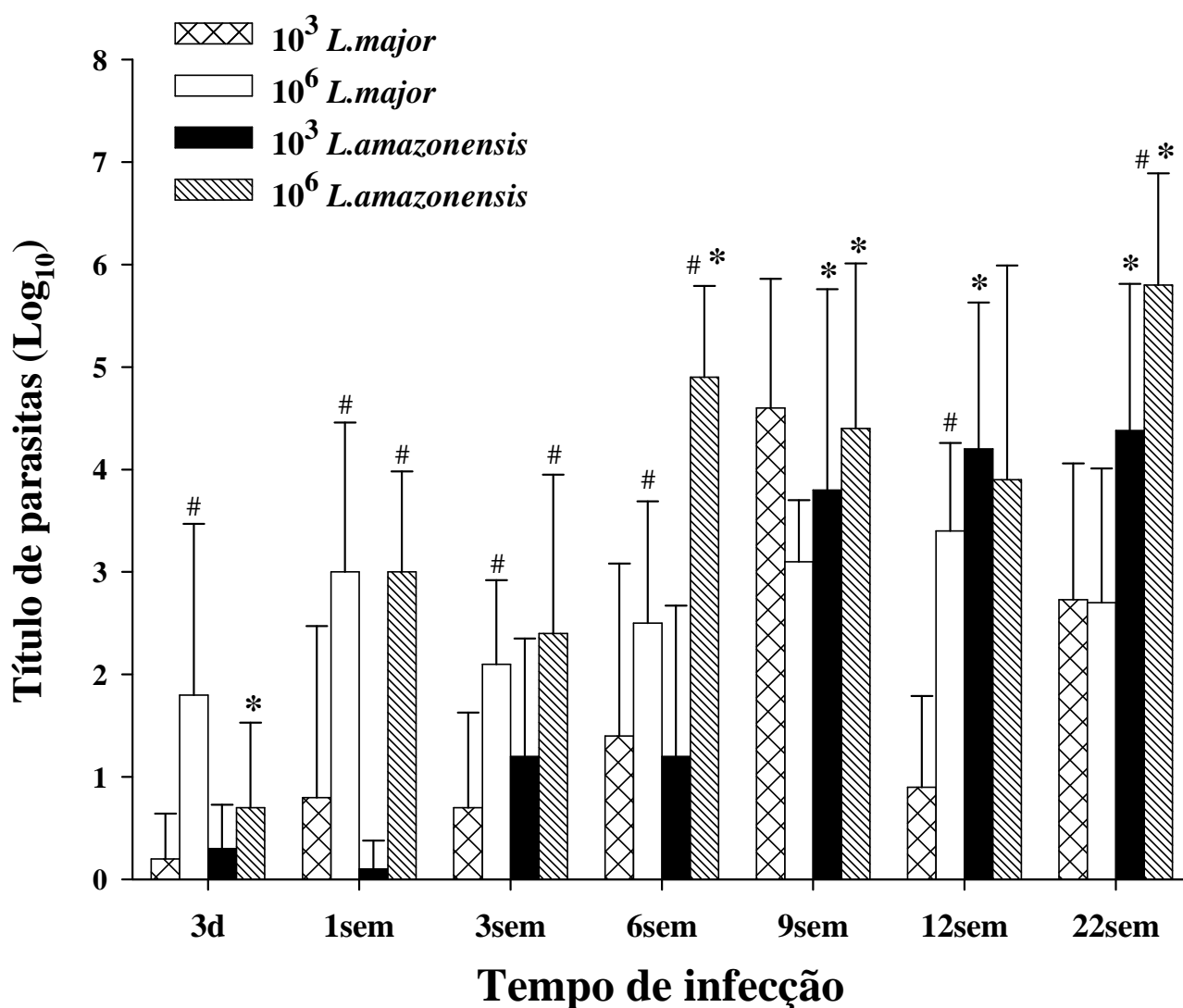


Figura 5: Número de parasitos nas orelhas de camundongos C57BL/6 inoculados intradermicamente com 10^3 ou 10^6 promastigotas meta-cíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis*. O número de parasitos foi estimado usando um ensaio de diluição seriada como descrito em Materiais e Métodos. # indica diferença significativamente a mesma *Leishmania* mas diferente dose de inóculo e * indica diferença entre as espécies de *Leishmania* mas mesma dose de inóculo. Barras e o desvio padrão representam a média do número de parasitos de três – cinco grupos (três animais por grupo). Foi realizado teste *t* de Student para os pontos com distribuição normal e Mann-Whitney para os pontos com distribuição não-normal. (* $p \leq 0,05$)

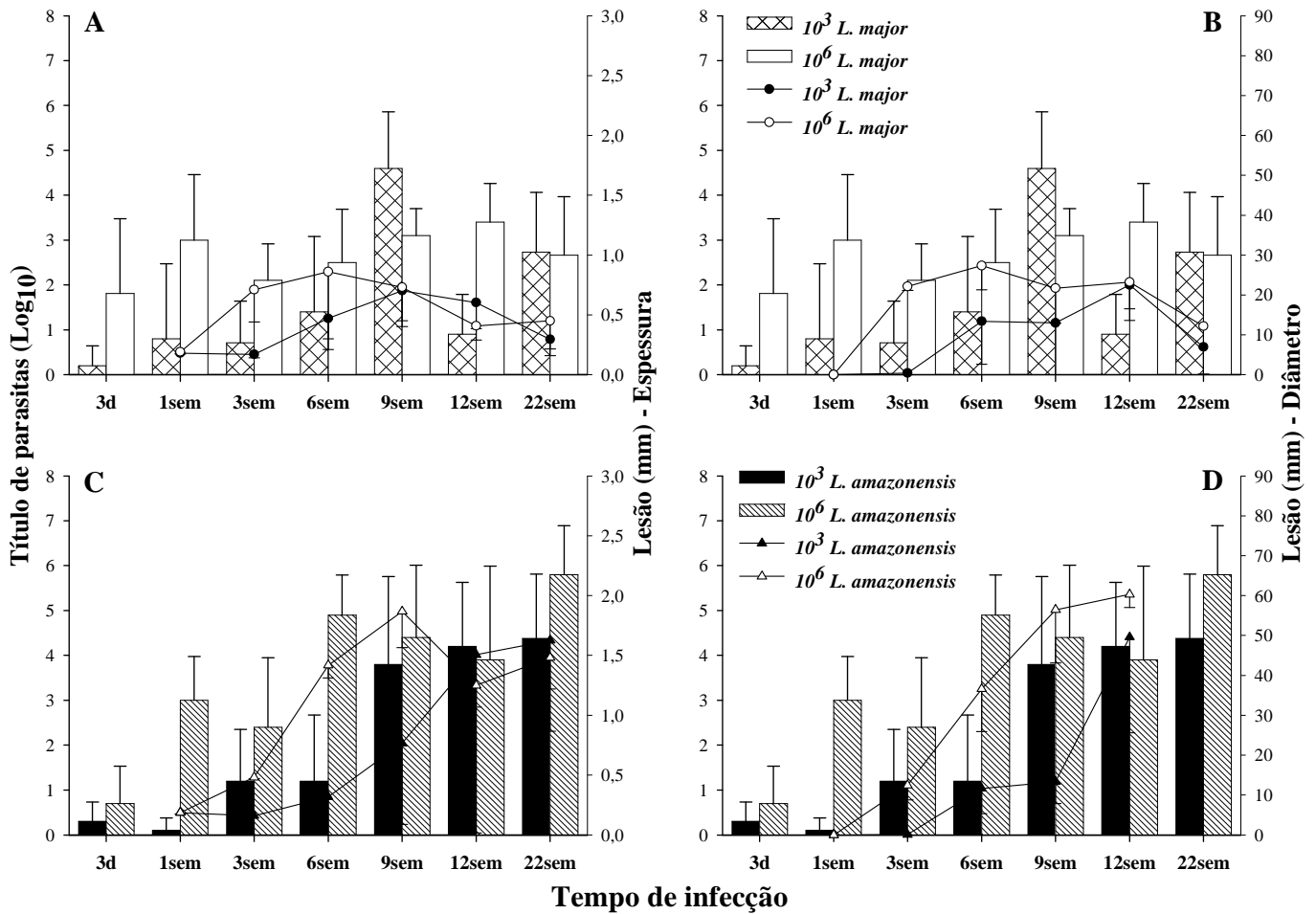


Figura 6: Comparação entre o desenvolvimento da lesão e o número de parasitos de uma mesma espécie de Leishmania e inóculos diferentes ao longo do tempo estudado. Eixos da esquerda: espessura da lesão (A e C) e diâmetro da lesão (B e D). Eixos da direita: número de parasitos na lesão. Barras e o desvio padrão representam a média do número de parasitos de três – cinco grupos (três animais por grupo) e as curvas representam o curso de infecção de um experimento representativo (4 - 5 experimentos com 3 camundongos cada).

4.3- Processo inflamatório

Diante do quadro apresentado, investigamos os tipos celulares presentes nas lesões. Analisando o terceiro dia de infecção com 10^6 *L. major* encontramos um edema e um infiltrado inflamatório discretos apesar de ainda não ter sido possível visualizar parasitos (Fig. 6A, Prancha 1G). Com uma semana, entretanto, já observamos um parasitismo discreto associado a um processo inflamatório ainda discreto (Prancha 1 H). A terceira semana de infecção foi o ponto máximo da inflamação e do parasitismo observados neste grupo de animais (Prancha 1 I). Neste momento a lesão apresentou uma carga parasitária moderada e um quadro inflamatório acentuado. No entanto, a partir da sexta semana e seguindo até 22 semanas de infecção o parasitismo se mostrou discreto e o processo inflamatório moderado (Prancha 1 J-L).

A cinética da resposta inflamatória e da carga parasitária para uma infecção com 10^3 *L. major*, entretanto, se mostrou diferente em alguns pontos em relação ao inóculo com a dose maior. Uma inflamação discreta foi encontrada na lesão apenas na primeira semana de infecção quando ainda não visualizamos parasitos (Fig. 6A, Prancha 1 A-B). Estes se apresentaram de forma discreta três semanas após inóculo associado a um processo inflamatório moderado (Prancha 1 C). Este perfil inflamatório não se alterou até a última semana (Prancha 1 D-F). O parasitismo, no entanto, se revelou moderado na sexta semana de infecção, representando seu pico, e uma carga parasitária discreta passou a predominar a partir da 12ª semana de infecção se estendendo até a 22ª semana .

Desta forma, observamos diferenças mais marcantes entre a menor e maior dose de inóculo no início da infecção onde encontramos para a infecção de 10^3 parasitos um atraso na visualização dos parasitos e no desenvolvimento do processo inflamatório e uma inflamação que não chegou a apresentar um perfil acentuado. Curiosamente, a infecção realizada com as duas doses de interesse mostra semelhança em boa parte do curso de infecção onde se estabeleceu um parasitismo discreto associado a um processo inflamatório também moderado.

Procurando conhecer se as diferentes doses de inóculo também acarretariam diferenças no perfil inflamatório de uma infecção por *L. amazonensis* analisamos a cinética celular destas duas condições. Nossos resultados mostraram que três dias após inóculo de 10^6 parasitos a lesão apresentava um edema discreto, raras células inflamatórias e ausência dos parasitos (Fig. 6B, Prancha 1 S). Já com uma semana de infecção a inflamação observada era discreta, assim como o parasitismo (Prancha 1 T). Na terceira semana apesar do quadro inflamatório se tornar moderado a carga parasitária

ainda se mantinha discreta (Prancha 1 U). Entretanto, na sexta semana o local da infecção mostrou um parasitismo acentuado enquanto a inflamação ainda se mantinha moderada (Prancha 1 V). A partir da 12^a semana parece existir uma estabilização da infecção (Prancha 1 X). Nesta semana a lesão apresentou um parasitismo moderado e um quadro inflamatório acentuado e este mesmo perfil foi observado com 22 semanas de infecção (Prancha 1 Z).

Na infecção com 10^3 *L. amazonensis* as orelhas mostraram um aspecto normal e ausência de parasitos três dias após inóculo (Fig. 6B, Prancha 1 M). Completada uma semana de infecção começamos a observar raras células inflamatórias e ainda ausência de parasitos (Prancha 1 N). Este quadro evoluiu para uma inflamação discreta na terceira semana e só agora visualizamos parasitos na lesão (Prancha 1 O). Após seis semanas de inóculo a lesão mostrou um infiltrado inflamatório e parasitismo moderados (Prancha 1 P). A partir daqui o parasitismo se manteve constante, mas o processo inflamatório ainda evoluiu se mostrando acentuado na 12^a semana e assim se estabelecendo até 22 semanas após infecção (Prancha 1 Q-R).

Então, com uma menor dose de parasitos observamos inicialmente uma demora maior no desenvolvimento e estabelecimento de um processo inflamatório e no aumento da carga parasitária. No entanto, nos tempos finais estudados tanto a carga parasitária quanto o perfil inflamatório se apresentaram semelhantes.

Relacionando o perfil inflamatório e a multiplicação dos parasitos das duas espécies de *Leishmania* estudadas, observamos algumas situações interessantes. Nos tempos iniciais, três dias, uma e três semanas de infecção, encontramos um desenvolvimento mais rápido do processo inflamatório nos animais infectados com 10^6 *L. major* do que no grupo infectado com a mesma dose de *L. amazonensis* (Fig. 6D, Prancha 1 G,H,I e S,T,U). Além disto, a multiplicação da *L. major* pareceu estar sendo seguida de perto por esta evolução do infiltrado inflamatório. Vimos o pico de parasitismo e da inflamação acontecendo no mesmo período seguido por queda no número destes parasitos e diminuição do quadro inflamatório (Prancha 1 G,H,I). Já na infecção por *L. amazonensis* a multiplicação do parasito se mostrou mais lenta, o parasitismo foi discreto até a terceira semana de infecção com pico na sexta semana, e o atraso no desenvolvimento do processo inflamatório parece estar dificultando o controle dos parasitos (Prancha 1 S,T,U). Apenas após a observação do parasito, com uma semana de infecção, um processo inflamatório discreto foi instalado, e o pico da carga parasitária aconteceu antes do pico do infiltrado inflamatório, seis e 12 semanas de infecção respectivamente. Assim, parece que o aumento da intensidade da inflamação

que aconteceu entre a sexta e 12^a semana não foi suficiente para controlar de forma eficiente o parasitismo. Um perfil inflamatório acentuado se estabeleceu junto com um parasitismo moderado (Prancha 1 V,X,Z).

Na baixa dose de inóculo nossos resultados mostraram também uma cinética diferente de multiplicação dos parasitos e desenvolvimento do infiltrado inflamatório entre as duas espécies de *Leishmania*. Na infecção por 10³ *L. major* observamos, com uma semana de infecção, um infiltrado inflamatório discreto antes mesmo da visualização dos parasitos na terceira semana e uma evolução para uma inflamação moderada na terceira semana antes do pico do parasitismo acontecer seis semanas após o inóculo (Fig. 6C, Prancha 1 A,B,C). Este processo inflamatório moderado instalado a partir da terceira semana de infecção parece ter sido suficiente para controlar a multiplicação dos parasitos e estabelecer um parasitismo discreto até a 22^a semana (Prancha 1 D,E,F). Já no inóculo de 10³ *L. amazonensis* a multiplicação dos parasitos acompanhou a cinética observada na infecção por mesma dose de *L. major*. Entretanto, o mesmo não ocorreu com o desenvolvimento do infiltrado inflamatório. A inflamação só se mostrou discreta três semanas após a infecção quando já conseguíamos observar parasitos na lesão e moderada na sexta semana junto ao pico do parasitismo (Prancha 1 M-R). Portanto, este atraso na instalação do processo inflamatório parece ter sido significativo, pois a carga parasitária se manteve moderada após a sexta semana de infecção não diminuindo mesmo quando associada a uma inflamação acentuada como observamos na 12^a e 22^a semana.

Diante das diferenças mostradas em nosso estudo na cinética da resposta inflamatória entre as duas espécies de *Leishmania*, resolvemos então avaliar a participação de alguns tipos celulares presentes na lesão por 22 semanas de infecção observando o perfil encontrado nos campos analisados.

No sítio de inóculo dos animais infectados com 10⁶ *L. major* encontramos um número maior de macrófagos que nos animais infectados com 10³ parasitos já com três dias de infecção (Fig. 7A, Prancha 2 G e A). Esta diferença foi mantida até a terceira semana (Prancha 2 H-I e B-C). Neste momento podemos observar o pico de macrófagos no grupo infectado com 10⁶ parasitos. A partir daqui o número de macrófagos presentes no infiltrado inflamatório destes animais diminuiu enquanto nas lesões dos animais infectados com 10³ *Leishmania* continuou aumentando e assim, na sexta semana, o número de macrófagos presentes nas lesões de ambos os grupos eram semelhantes (Prancha 2 J e D). Na 12^a e 22^a semanas de infecção os animais inoculados com maior quantidade de parasitos apresentaram um número de macrófagos no local de infecção

um pouco maior que a encontrada para 10^3 *L. major* (Prancha 2 K-L e E-F). Interessantemente, o pico de macrófagos vistos para o inóculo de 10^6 parasitos na terceira semana coincidiu com o pico de infiltrado inflamatório e parasitismo (Figs. 7A e 6A) e a queda observada na carga parasitária e um processo inflamatório menos intenso encontrado após a sexta semana foram acompanhados pela diminuição no número de macrófagos presentes na lesão. Situação muito semelhante foi vista para o inóculo de 10^3 *L. major* só que com um certo atraso. Logo, estes resultados sugerem que estes macrófagos podem estar envolvidos no controle do parasitismo e conseqüente controle da lesão.

Nos grupos infectados com *L. amazonensis* observamos que os animais inoculados com 10^6 parasitos apresentaram macrófagos no infiltrado inflamatório na primeira semana de infecção enquanto que com os animais inoculados com menor dose o mesmo só aconteceu três semanas após a infecção (Fig. 7B, Prancha 2 S-U e M-O). Mesmo com este atraso a cinética na migração dos macrófagos para o sítio de infecção foi bem semelhante para ambas as doses. O número de macrófagos aumentou gradualmente durante todo o tempo que acompanhamos o curso de infecção, porém com o inóculo de 10^3 *L. amazonensis* mostrando sempre um número um pouco menor destas células em relação à maior dose. Apesar deste aumento no número de macrófagos, o qual acompanhou a cinética do processo inflamatório visto na 12^a e 22^a semanas de infecção, não houve um controle eficiente do parasitismo (Figs 7B e 6B; Prancha 2 V-Z e P-R). Estes dados corroboram a deficiência na capacidade destas células eliminarem esta espécie de parasitos como já sugerido na literatura (QI *et al.*, 2004).

Comparando então a eficiência dos macrófagos na eliminação destas duas espécies de *Leishmania*, observamos que já no terceiro dia após a infecção os animais inoculados com 10^6 *L. major* apresentaram um número maior de macrófagos que o grupo infectado com mesma dose de *L. amazonensis* (Fig. 8B, Prancha 2 G e S). Uma semana após o inóculo, esta diferença deixou de existir e voltou a se apresentar na terceira semana de infecção (Prancha 2 H-I e T-U). A partir daqui, o número de macrófagos diminuiu na lesão dos animais infectados com *L. major*, mas continuou aumentando no grupo infectado com *L. amazonensis* (Prancha 2 J e V). O aumento rápido na quantidade de macrófagos que aconteceu até a sexta semana coincidiu com o aumento do parasitismo, mas não com o aumento da intensidade do processo inflamatório (Figs. 8B e 6). Na 12^a e 22^a semana após a infecção continuamos encontrando ainda um aumento no número de macrófagos associado a um infiltrado inflamatório acentuado e carga parasitária moderada nas lesões destes animais (Prancha

2 K-L e X-Z). Estes dados sugerem, então, uma relevância na resposta inicial dos macrófagos para o controle do parasitismo e do processo inflamatório e conseqüente cura da lesão.

Observando-se as infecções realizadas com menor dose, entretanto, vemos um número bem parecido de macrófagos nos grupos infectados com ambas as espécies de parasitos até a sexta semana de infecção (Fig. 8A, Prancha 2 A-D e M-P). A seguir, os animais infectados com *L. major* começaram a mostrar uma queda no número de macrófagos presentes na lesão enquanto que o grupo infectado com *L. amazonensis* continuou apresentando um aumento. Com 12 e 22 semanas de infecção observamos então uma menor presença destas células na lesão dos animais inoculados com *L. major*, porém um maior número no grupo inoculado com *L. amazonensis* (Prancha 2 E-F e Q-R).

Avaliamos também a presença das células T no infiltrado inflamatório, e suas subpopulações CD4 e CD8. As células T CD8⁺ estavam presentes nas lesões em número menor que as células T CD4⁺, mas com cinética de aparecimento semelhante (dados não mostrados). As células T CD4⁺ foram encontradas primeiro nos animais com maior inóculo, já no terceiro dia de infecção, e para menor dose só na primeira semana (Fig. 7C, Prancha 3 A e B; G e H). Outra diferença foi observada na 22^a semana de infecção onde os animais infectados com 10⁶ *L. major* mostram um número um pouco maior destas células em relação ao grupo infectado com 10³ parasitos (Prancha 3 F e L). Foram observadas também poucas diferenças na cinética de infecção por *L. amazonensis*. Vimos um mesmo atraso no surgimento destas células nos animais inoculados com 10³ parasitos em relação aos animais infectados com 10⁶ *L. amazonensis* (Fig. 7D). Estas células foram encontradas nas lesões dos animais inoculados com maior dose na primeira semana e no grupo com menor dose apenas na terceira semana de infecção. Nesta primeira e terceira semana de infecção o número de células T CD4⁺ foi maior na lesão dos animais infectados com 10⁶ parasitos (Prancha 3 M-O e S-U). Na sexta semana este perfil se inverte com o grupo de menor dose passando a apresentar um número um pouco maior. Nos tempos seguintes, já não observamos diferença no número das células T CD4⁺ entre estes grupos (Prancha 3 P-R e V-Z). O perfil de células T seguiu o observado para as células T CD4⁺.

Procurando entender os diferentes perfis de infecção causados pela *L. major* e *L. amazonensis*, comparamos também a cinética das células T entre ambas as espécies. Encontramos já no terceiro dia de infecção células T presentes na lesão dos animais infectados com 10⁶ *L. major* mas nos infectados com 10⁶ *L. amazonensis* apenas na

primeira semana (Fig. 8D). Curiosamente, o número de células T CD4⁺ presentes na lesão destes dois grupos foi semelhante na primeira e terceira semanas de infecção. Entretanto, com seis e 12 semanas o local da infecção apresentava mais células T CD4⁺ nos animais com infecção por *L. major*. Já na 22^a semana esta diferença existia, mas em menor proporção.

Nos camundongos inoculados com menor dose encontramos um perfil semelhante, porém com algum atraso (Fig. 8C). No terceiro dia não encontramos um infiltrado de células T CD4⁺ no local da infecção de nenhum dos dois grupos. Na primeira semana estas células começaram a ser encontradas nos animais inoculados com 10³ *L. major* mas ainda não nos animais com 10³ *L. amazonensis*. Nestes só observamos células T CD4⁺ na terceira semana e com um número bem menor que o visto nos animais inoculados com 10³ *L. major*. Com seis e 12 semanas o número de células T CD4⁺ permanecia menor nos animais infectados com *L. amazonensis*, entretanto, no último tempo observado esta diferença já não existia.

Interessava-nos também observar se as células B poderiam estar participando da resposta inflamatória. Este tipo de linfócito foi encontrado em números muito baixos nas lesões, e os resultados foram inconclusivos (dados não mostrados).

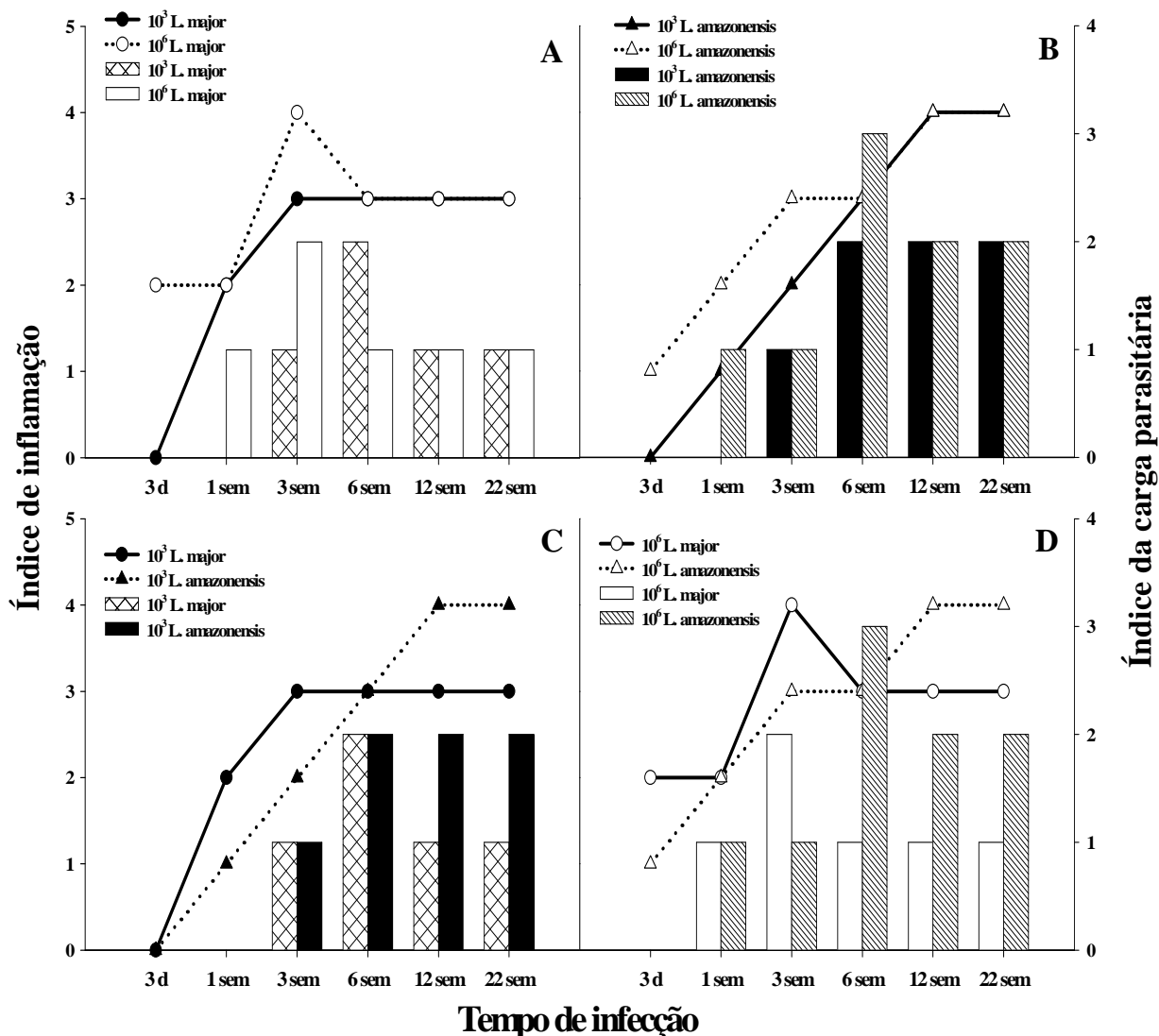


Figura 7: Parasitismo e processo inflamatório na orelha de camundongos C57BL/6 infectados com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis*. A relação entre o índice de inflamação (linhas) e o índice de carga parasitária (barras) em camundongos infectados com 10^3 ou 10^6 *L. major* ou *L. amazonensis* está representada. Os índices de carga parasitária se referem a 0: sem parasitos visíveis, 1: parasitismo discreto, 2: parasitismo moderado e 3: parasitismo acentuado. Para índice de inflamação estabelecemos 0: sem alterações, 1: raras células inflamatórias, 2: inflamação discreta, 3: inflamação moderada e 4: inflamação acentuada.

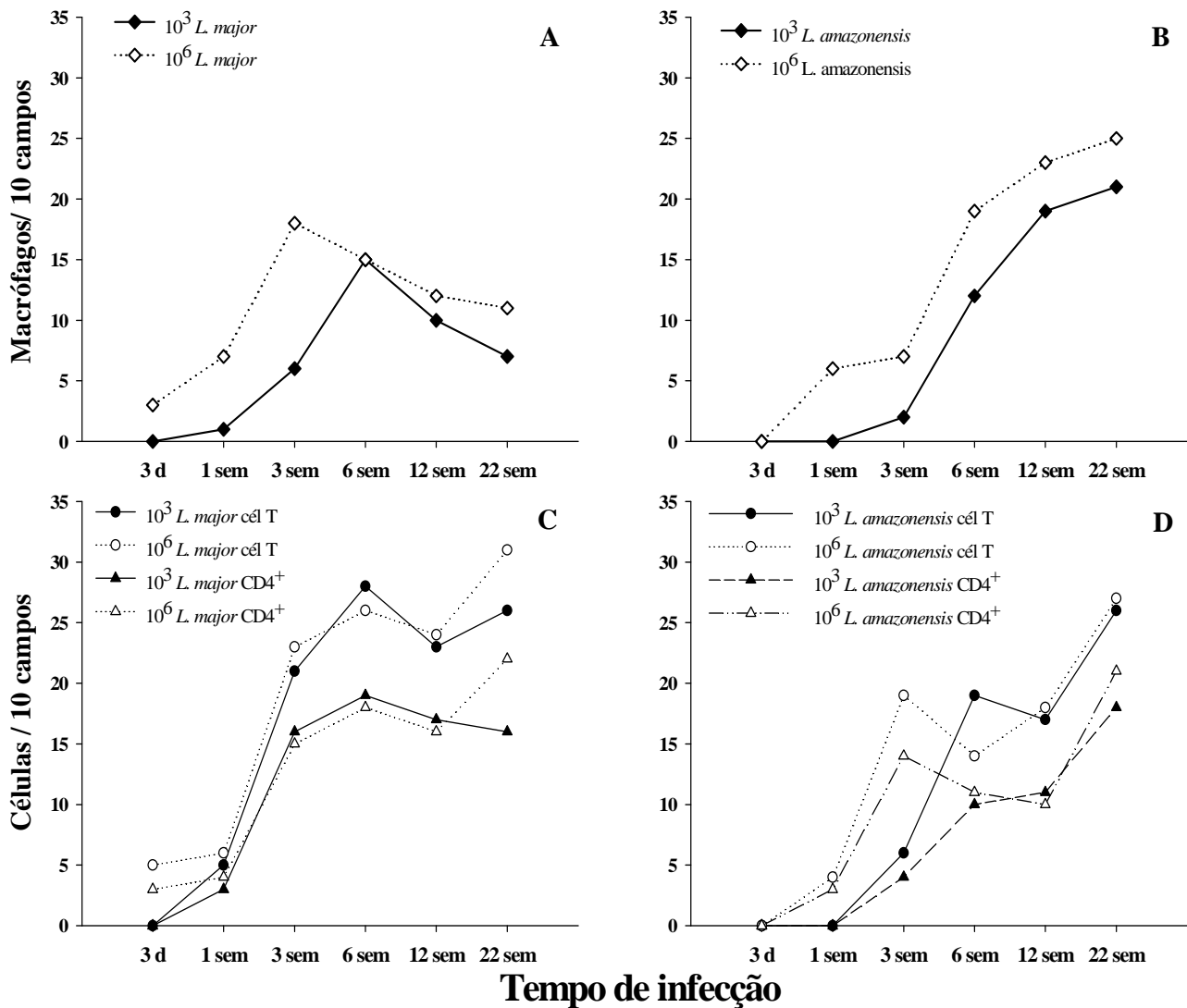


Figura 8: Cinética do aparecimento de células T (círculo), células T CD4⁺ (triângulo) e macrófagos (losango) em camundongos infectados com 10³ (linha) ou 10⁶ (linha pontilhada) *L. major* ou *L. amazonensis*. Os resultados foram representados pelo número de células/dez campos. * indica diferença entre *L. major* e *L. amazonensis* no mesmo tipo celular analisado (p<0,05). Para detalhes ver Materiais e Métodos.

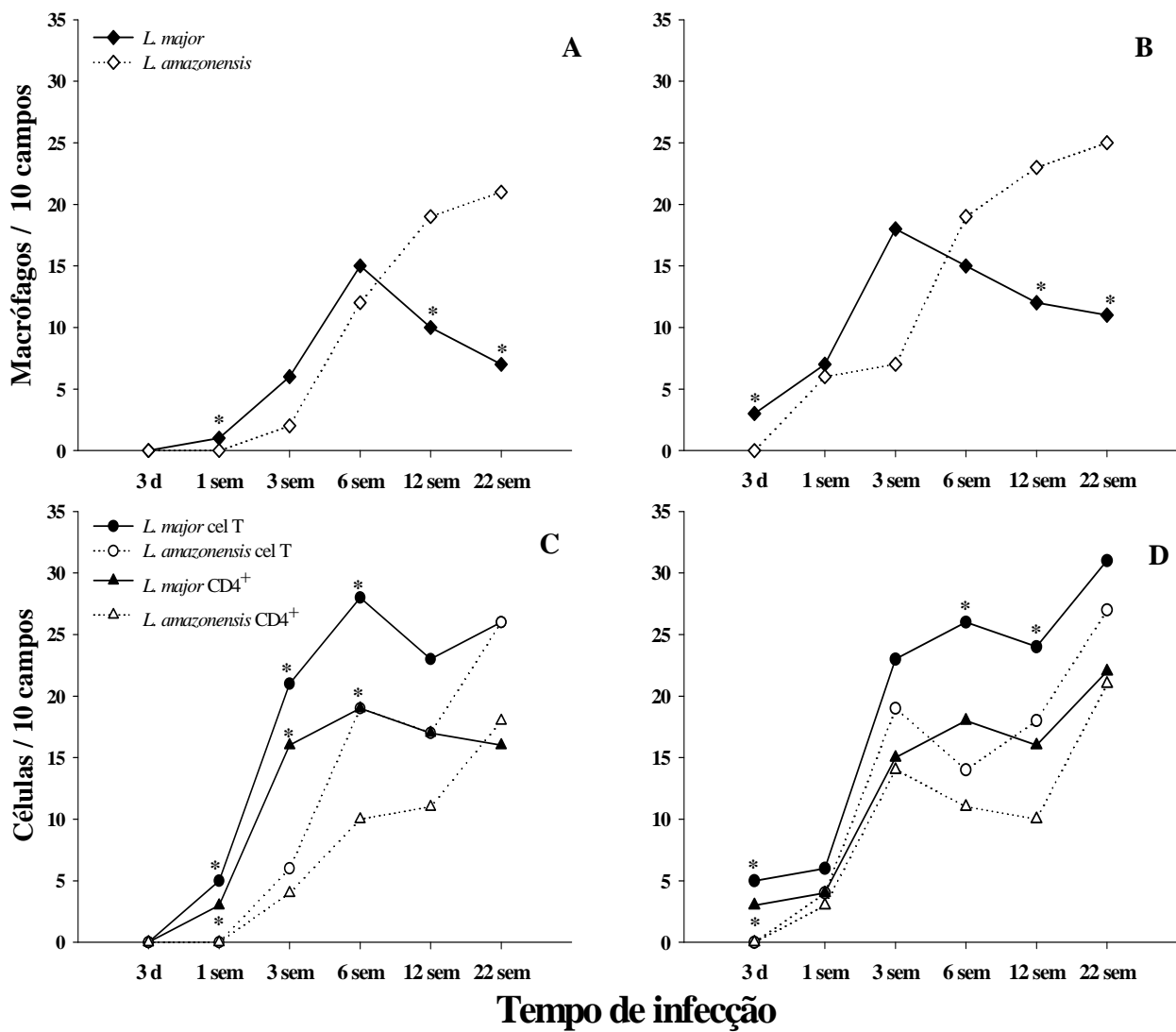
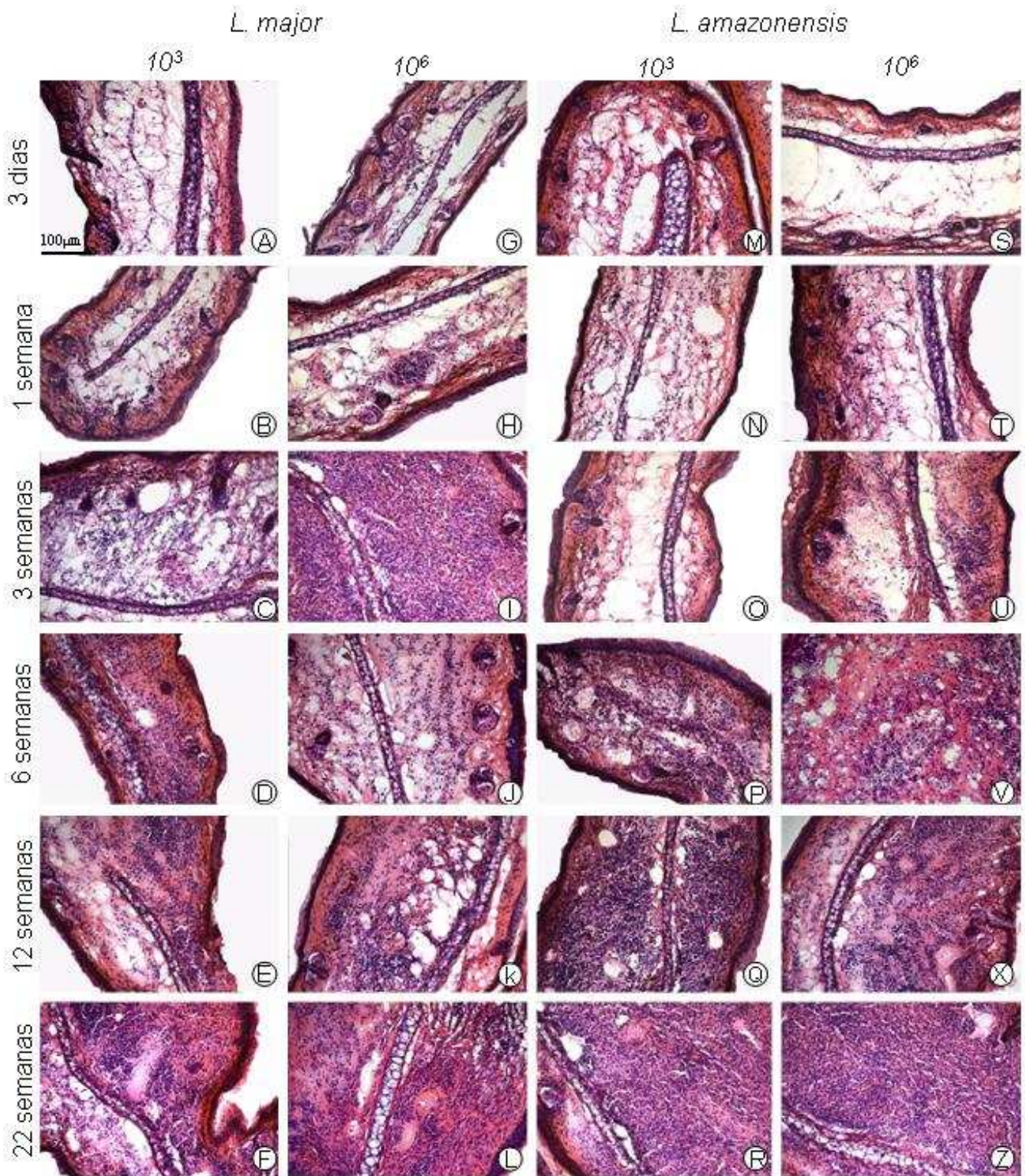
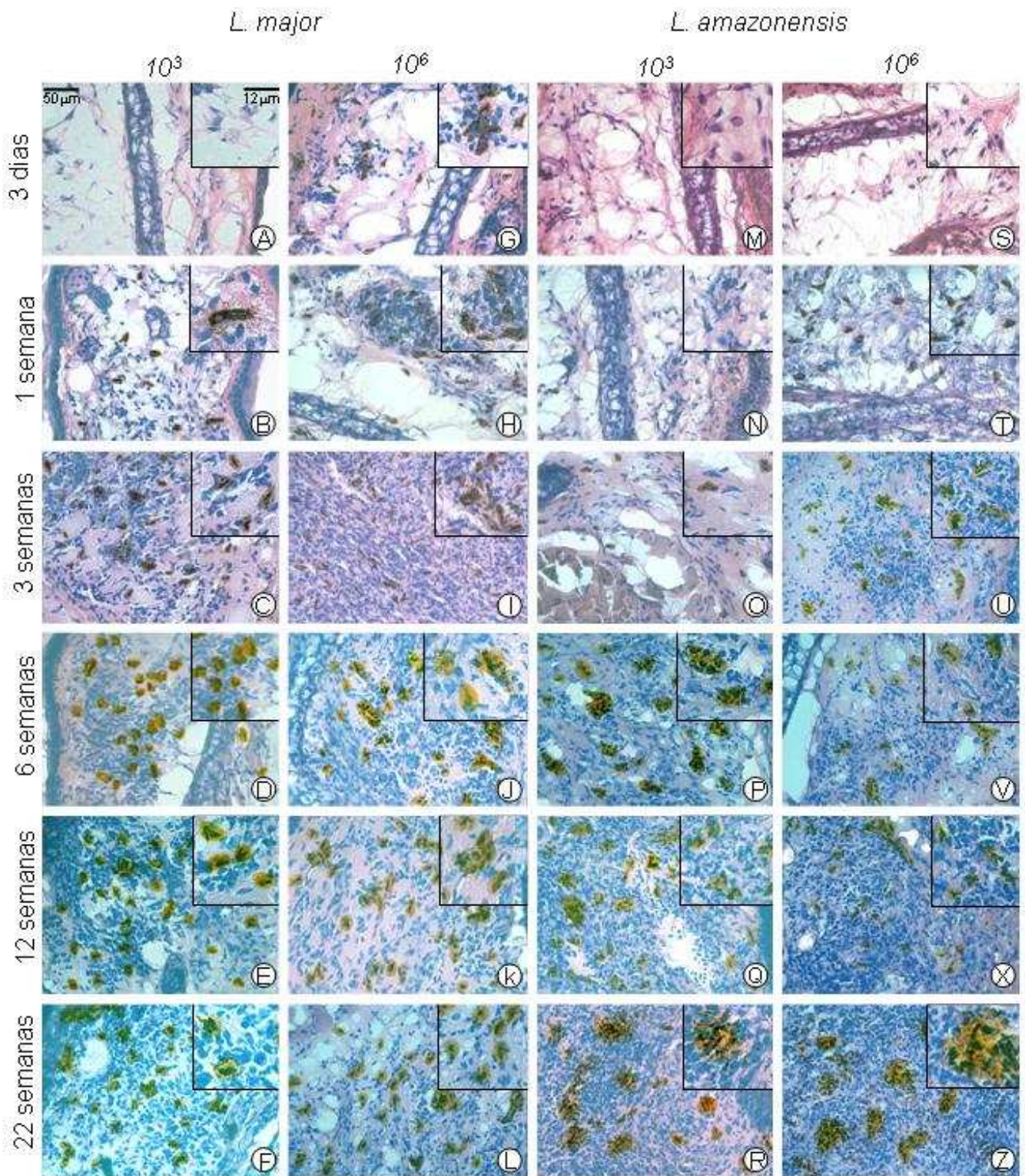


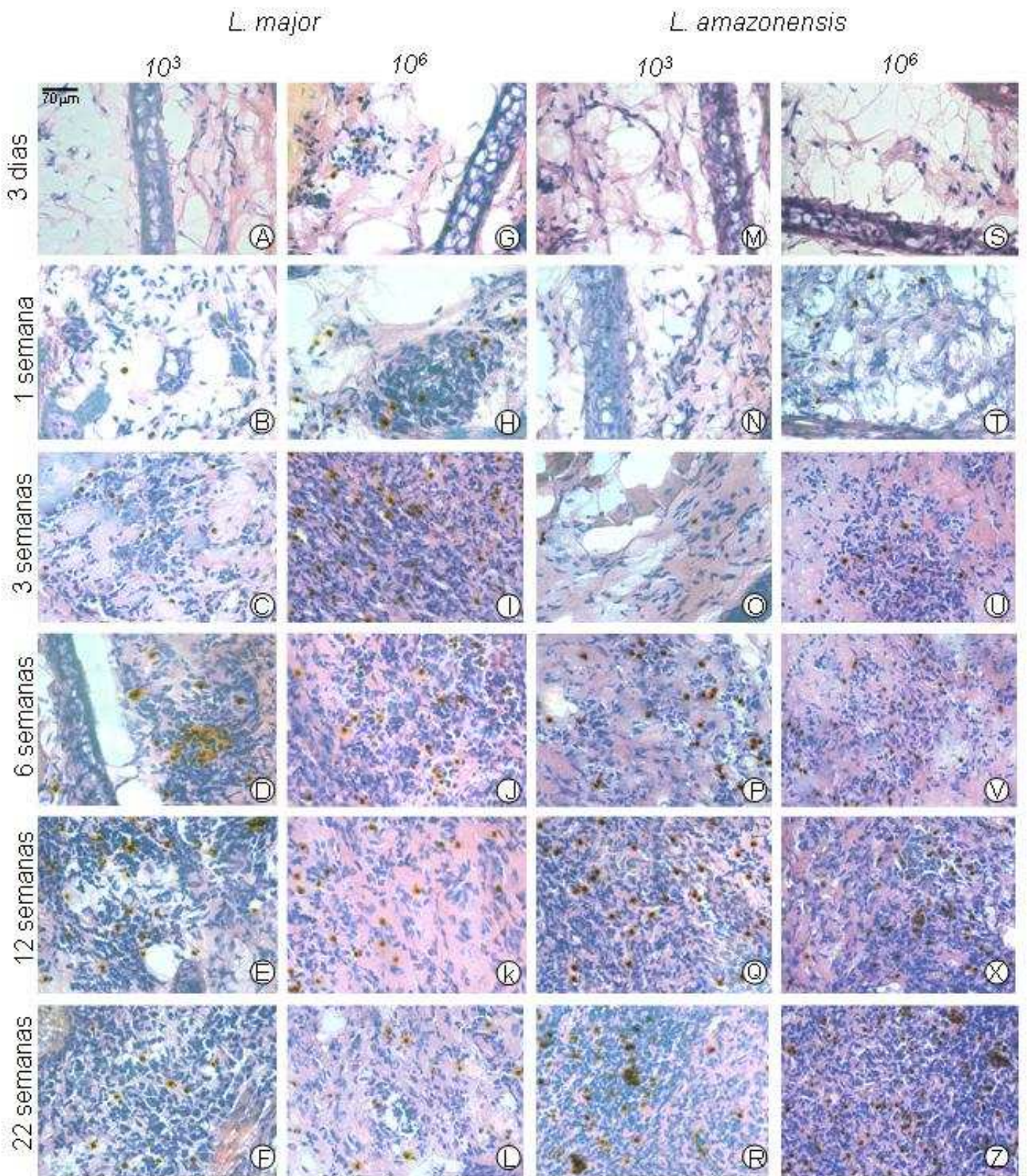
Figura 9: Comparação da cinética de células T (círculo), células T CD4⁺ (triângulo) e macrófagos (losango) em camundongos infectados com 10³ (A, C) ou 10⁶ (B, D) *L. major* (linha) ou *L. amazonensis* (linha pontilhada) durante o curso de infecção. Os resultados foram representados pelo número de células/ dez campos. * indica diferença entre *L. major* e *L. amazonensis* no mesmo tipo celular (p<0,05). Para detalhes ver Materiais e Métodos.



Prancha 1: Fotomicrografias do infiltrado inflamatório na orelha de camundongos C57BL/6 inoculados intradermicamente com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis*.



Prancha 2: Fotomicrografias da orelha de camundongos C57BL/6 inoculados intradermicamente com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis*. Distribuição de macrófagos.



Prancha 3: Fotomicrografias da orelha de camundongos C57BL/6 inoculados intradermicamente com 10^3 ou 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis*. Distribuição de linfócitos T CD4⁺.

4.4- Cinética de produção das citocinas TNF, IFN- γ e IL-10

Após análise dos tipos celulares presentes nas lesões nos tempos determinados ao longo do curso de infecção, verificamos como estaria a produção de citocinas nos linfonodos drenantes e no baço.

Uma das citocinas de nosso interesse foi o TNF, responsável por uma série de efeitos durante o curso de infecção, como por exemplo, início da resposta inflamatória, ativação de macrófagos e necrose tecidual. Nossos resultados mostraram uma cinética diferente na produção sistêmica de TNF nas doses de inóculo utilizadas. O grupo inoculado com 10^6 *L. major* apresentou um pico de produção desta citocina na terceira semana de infecção (Fig. 9A). Após este tempo observamos uma diminuição acentuada nos níveis de TNF produzidos pelas células do baço destes animais inoculados com alta dose de parasitos no período de seis a 22 semanas de infecção. Já o grupo inoculado com 10^3 *L. major* mostrou um aumento pequeno na produção sistêmica desta citocina entre a terceira e a sexta semana e uma queda na nona semana de infecção. Entretanto, doze semanas após a infecção esta produção de TNF voltou a aumentar. Este tempo representou o pico de produção desta citocina para esta dose de inóculo. Após 22 semanas de infecção a produção de TNF voltou a diminuir. Na terceira e nona semana de infecção, encontramos uma maior produção sistêmica de TNF pelos animais infectados por 10^6 *L. major* em relação ao grupo inoculado com menor dose. Interessantemente, os pontos onde encontramos uma maior produção de TNF correspondem a momentos importantes no controle do parasitismo e da lesão para ambas as doses estudadas (Figs.1A, 1C e 6A).

Avaliando nossos resultados para os animais infectados com *L. amazonensis*, encontramos uma maior produção de TNF pelas células do baço do grupo inoculado com 10^6 parasitos na terceira semana de infecção (Fig. 9A). Este momento representou o pico de produção desta citocina para os animais infectados com alta dose deste parasito. Nos tempos seguintes observamos para este grupo uma diminuição gradual na produção do TNF sistêmico. Já os animais inoculados com baixa dose mostraram um pequeno aumento na produção de TNF pelas células do baço na sexta e 12ª semana após a infecção. Durante o curso de infecção o grupo inoculado com alta dose de *L. amazonensis* apresentou uma diferença significativa na produção de TNF apenas na terceira semana em relação ao grupo com baixa dose de inóculo.

Quando comparamos a produção sistêmica de TNF entre animais infectados com 10^6 *L. major* ou *L. amazonensis* observamos um aumento na produção desta citocina em

torno da terceira semana de infecção para ambas as espécies do parasito porém a quantidade de TNF produzida pelas células do baço do grupo infectado com *L. amazonensis* foi menor (Fig. 9A). A partir deste tempo a produção diminuiu rapidamente para *L. major* e lentamente para *L. amazonensis* e se manteve baixa até a última semana estudada. Para o inóculo de 10^3 parasitos observamos uma produção maior de TNF na terceira e 12^a semana pelos animais infectados com *L. major*. Interessantemente, nos demais tempos analisados não foi encontrada diferença na produção desta citocina pelas células de baço dos camundongos inoculados com estas duas espécies.

Já o perfil de produção desta citocina pelos linfonodos que drenam o local de infecção apresentou algumas diferenças em relação à produção sistêmica. Observamos que os animais inoculados com 10^6 *L. major* apresentaram uma produção de TNF por células de linfonodo maior que o grupo inoculado com baixa dose durante o período de três dias a seis semanas de infecção (Fig. 9B). Após este período a produção do TNF diminuiu até a 12^a semana de infecção e apresentou um pequeno aumento na 22^a semana. Os animais com inóculo de 10^3 parasitos mostraram uma cinética de produção de TNF local parecida com os animais infectados com alta dose até a nona semana de infecção. Entretanto, a quantidade desta citocina produzida por esse grupo foi menor. Na 12^a e 22^a semana de infecção, entretanto, este perfil se inverteu com os animais inoculados com baixa dose dos parasitos passando a produzir maior quantidade de TNF pelas células do linfonodo.

Interessantemente nos grupos inoculados com *L. amazonensis* observamos uma maior produção de TNF pelas células dos linfonodos dos animais inoculados com alta dose no terceiro dia de infecção e uma produção semelhante no período de uma a nove semanas. Entretanto, na 12^a e 22^a semana este quadro se alterou e os animais inoculados com 10^3 parasitos passaram a apresentar uma maior produção de TNF que o grupo infectado com alta dose.

Relacionando as duas espécies de *Leishmania* na dose de 10^6 parasitos, observamos uma maior produção de TNF pelas células do linfonodo do grupo inoculado com *L. major* no período inicial do curso de infecção, entre uma e seis semanas. A partir desta semana esta produção diminuiu e após nove semanas de infecção já não existia diferença na quantidade de TNF local produzido. Curiosamente, também a produção de TNF por células do linfonodo dos grupos infectados com baixa dose de *L. major* ou *L. amazonensis* foram parecidas durante todo o curso de infecção. Apenas na 22^a semana vimos uma produção um pouco maior nos animais infectados por *L. amazonensis*.

Uma outra citocina de nosso interesse foi o IFN- γ devido à sua importante participação em uma resposta protetora. Durante a resposta sistêmica observamos uma cinética diferente de produção de IFN- γ pelos grupos infectados com *L. major*. Os animais inoculados com alta dose mostraram um aumento na produção desta citocina pelas células de baço na primeira semana em relação ao terceiro dia de infecção (Fig. 9C). Esta mesma produção foi observada após três semanas de infecção. Já na sexta semana, encontramos novo aumento na produção desta citocina e, a seguir, uma pequena diminuição na nona semana. Doze semanas após a infecção novo aumento foi observado e na 22^a semana encontramos uma diminuição acentuada na produção do IFN- γ . Já para o grupo inoculado com baixa dose deste parasito observamos um aumento lento e gradual na produção desta citocina até a nona semana de infecção. Curiosamente, na 12^a semana observamos um aumento acentuado na produção de IFN- γ e a seguir uma diminuição também acentuada na 22^a semana de infecção. Interessantemente, nossos resultados mostraram uma maior produção de IFN- γ pelos animais inoculados com 10⁶ *L. major* no período de uma a seis semanas de infecção e perfil oposto na 12^a semana, onde os animais inoculados com baixa dose apresentaram uma maior produção desta citocina que o grupo inoculado com alta dose. No último tempo analisado não encontramos diferença na produção de IFN- γ entre estes dois grupos.

Já em uma infecção por *L. amazonensis*, a produção de IFN- γ pelas células de baço foi baixa durante todo o curso de infecção. Observamos apenas uma diferença pequena entre as doses na terceira e sexta semana de infecção.

Nossos resultados mostraram também uma maior produção desta citocina nos animais inoculados com alta dose de *L. major* em relação àqueles inoculados com mesma dose de *L. amazonensis* entre a primeira e 12^a semana de infecção (Fig. 9C). Surpreendentemente, a produção de IFN- γ pelos animais inoculados com baixa dose de ambas as espécies do parasito foi semelhante até a nona semana de infecção. Interessantemente, na 12^a semana encontramos uma maior produção pelos animais infectados por *L. major* e na 22^a semana esta diferença deixou de existir.

A cinética de produção de IFN- γ pelas células do linfonodo próximo ao local da infecção se mostrou diferente da sistêmica. No grupo inoculado com 10⁶ *L. major* observamos uma queda acentuada na produção desta citocina entre o terceiro dia e a primeira semana de infecção. A seguir encontramos novo aumento na produção de IFN- γ na terceira semana. Esta produção se manteve na sexta semana e aumentou novamente

na nona semana de infecção. Na 12^a semana de infecção a produção de IFN- γ diminuiu acentuadamente e permaneceu a mesma na 22^a semana. Já os animais inoculados com baixa dose deste parasito mostraram um aumento lento e gradual na produção de IFN- γ até a sexta semana de infecção. Nove semanas após o inóculo observamos uma elevação na produção que voltou a cair na 12^a semana e se mostrou bem diminuída na 22^a semana de infecção. Interessantemente, os animais inoculados com 10⁶ *L. major* apresentaram maior produção desta citocina em relação ao grupo inoculado com 10³ parasitos no período de três dias a seis semanas de infecção. Na nona semana esta diferença não foi encontrada e 12 semanas após infecção os animais com baixa dose de infecção produziram mais IFN- γ que o grupo inoculado com alta dose. Na 22^a semana, entretanto, a produção desta citocina por ambos os grupos foram semelhantes.

A cinética de produção de IFN- γ pelo linfonodo local dos animais inoculados com alta dose de *L. amazonensis* diferiu do grupo infectado com baixa dose apenas no terceiro dia de infecção onde o grupo inoculado com 10⁶ parasitos apresentou uma maior produção desta citocina. Nos demais tempos não encontramos diferença na produção do IFN- γ . Em ambos os grupos observamos um aumento lento e gradual na produção desta citocina até a 12^a semana e uma diminuição na produção na 22^a semana de infecção.

A produção de IFN- γ entre ambas as espécies se mostrou diferente em alguns tempos durante o curso de infecção. No inóculo de 10⁶ parasitos observamos que os animais infectados por *L. major* produziram mais IFN- γ que os animais infectados por *L. amazonensis* no período de uma a nove semanas de infecção. Já o grupo inoculado com 10³ *L. major* apresentou maior produção desta citocina em relação aos animais infectados com mesma dose de *L. amazonensis* no período de nove a 22 semanas de infecção.

Interessamos-nos também por analisar a participação da IL-10 nas diferentes condições estudadas. Nossos resultados mostraram que a produção sistêmica desta citocina pelo grupo inoculado com 10⁶ *L. major* apresentou um pequeno aumento na terceira semana de infecção em relação à primeira semana (Fig. 10A). Já 12 semanas após a infecção observamos uma menor produção da IL-10 em relação à terceira semana e uma produção parecida na 22^a semana. Os animais inoculados com 10³ *L. major*, entretanto, apresentaram um aumento significativo na produção desta citocina da primeira para a terceira semana de infecção e um nível de produção parecido na 12^a semana. Na 22^a semana após a inóculo do parasito a produção desta citocina foi um pouco menor em relação à 12^a semana de infecção. Assim, nos tempos analisados

encontramos uma maior produção de IL-10 pelas células de baço dos animais inoculados com 10^6 *L. major* que pelas células do grupo inoculado com menor dose desta espécie de *Leishmania* na primeira semana de infecção e um perfil inverso na 12^a semana onde uma maior produção desta citocina ocorre no grupo inoculado com 10^3 parasitos. Nos demais tempos onde dosamos a IL-10 não foi encontrada diferença na sua produção.

Os animais inoculados com 10^6 *L. amazonensis* apresentaram um aumento significativo na produção sistêmica de IL-10 da primeira para a terceira semana de infecção e uma diminuição, também significativa, desta para a 12^a semana. Na 22^a semana de infecção a produção foi parecida com a encontrada 12 semanas após a infecção. Para o inóculo com 10^3 *L. amazonensis* observamos um aumento significativo da primeira para a terceira semana de infecção e na 12^a semana um aumento em relação à terceira semana. Já 22 semanas após o inóculo observamos uma diminuição acentuada na produção de IL-10 comparada à encontrada na 12^a semana. Comparando a cinética de produção desta citocina entre as doses de inóculo usadas não observamos diferença na produção desta citocina nos tempo iniciais analisados, mas encontramos uma maior produção pelo grupo inoculado com menor dose deste parasito em relação à maior dose na 12^a semana de infecção e um perfil oposto na 22^a semana.

Em relação às espécies, curiosamente, observamos uma cinética de produção parecida. Nos grupos inoculados com alta dose os animais infectados com *L. major* apresentaram uma maior produção desta citocina na primeira e 12^a semana de infecção em relação aos animais infectados com *L. amazonensis*. No restante dos tempos analisados não houve diferença. Já em relação aos grupos inoculados com baixa dose apenas na 22^a semana de infecção os animais infectados com *L. major* apresentaram uma maior produção de IL-10. Nos demais tempos não houve diferença.

A produção de IL-10 pelas células do linfonodo que drena o local da infecção também foi avaliada. Observamos uma maior produção desta citocina pelo grupo inoculado com alta dose de *L. major* na terceira e 22^a semana de infecção em relação à 12^a semana (Fig. 10B). Para os animais inoculados com menor dose deste parasito observamos também uma menor produção de IL-10 na 12^a semana em relação à terceira semana. Porém esta diminuição não foi tão acentuada quanto a observada no inóculo de 10^6 *Leishmania*. Já na 22^a semana de infecção os animais inoculados com 10^3 *L. major* apresentaram uma produção de IL-10 semelhante a encontrada na 12^a semana. Apenas na neste último tempo avaliado encontramos uma maior produção de IL-10 pelo grupo

inoculado com alta dose deste parasito em relação ao grupo com menor dose de infecção.

Curiosamente, a produção de IL-10 pelas células de linfonodo dos animais inoculados com alta dose de *L. amazonensis* foi semelhante nos pontos analisados. Os animais inoculados com baixa dose apresentaram uma cinética um pouco diferente. Na terceira semana de infecção a produção de IL-10 foi menor que a encontrada na 12^a semana e esta produção diminuiu na 22^a semana. Na infecção por esta *Leishmania* observamos uma maior produção desta citocina apenas na terceira semana de infecção. Nos outros tempos não encontramos diferença.

Interessantemente, quando comparamos a produção de IL-10 entre as espécies estudadas na dose de inóculo de 10⁶ parasitos observamos uma maior produção desta citocina pelo grupo infectado com *L. major* na terceira e na 22^a semana de infecção em relação ao grupo inoculado com *L. amazonensis*. Na 12^a semana encontramos um perfil inverso de produção. Os animais infectados com *L. major* apresentaram um nível de IL-10 um pouco menor que os animais inoculados com *L. amazonensis*. Também na menor dose de inóculo observamos uma maior produção desta citocina pelo grupo infectado com *L. major* na terceira e 22^a semana de infecção. Na 12^a semana não houve diferença.

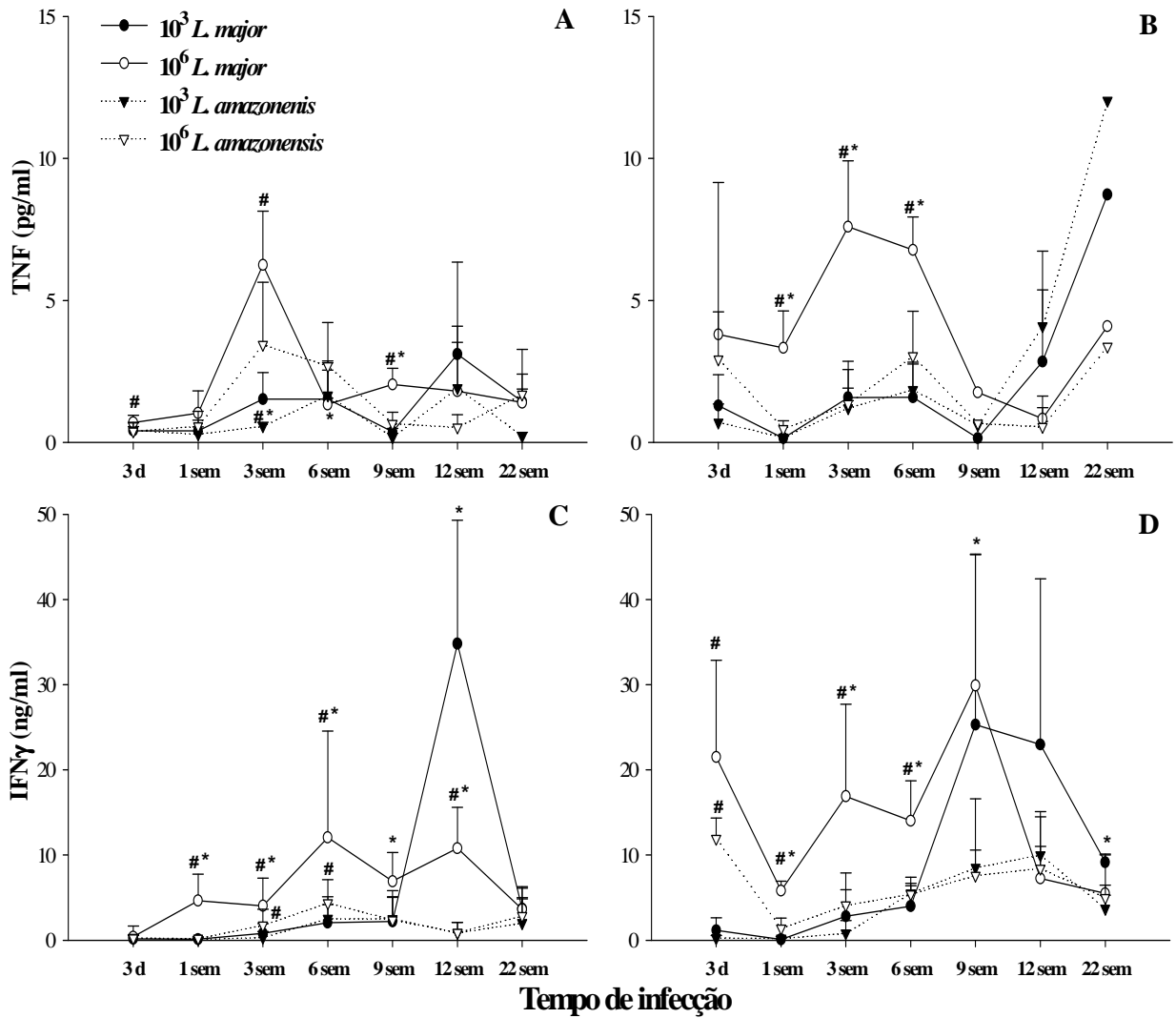


Figura 10: Produção das citocinas TNF e IFN- γ durante o curso de infecção de camundongos C57BL/6 infectados intradermicamente na orelha com 10^3 ou 10^6 parasitos das espécies *L. major* ou *L. amazonensis*. Produção de TNF (A, B) e IFN- γ (C, D) por células do baço (A,C) e linfonodo (B, D) 72h após estímulo com antígeno homólogo. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de três a cinco grupos (três camundongos por grupo). # indica diferença significativa para mesma espécie de *Leishmania* mas diferente inóculo e * indica mesmo inóculo mas diferente espécie de *Leishmania*. Foi realizado teste *t* de Student para os pontos com distribuição normal e Mann-Whitney para os pontos com distribuição não-normal. (* $p \leq 0,05$). Limite de detecção: IFN- γ 0,03 ng/ml e TNF 0,001 - 0,0001pg/ml.

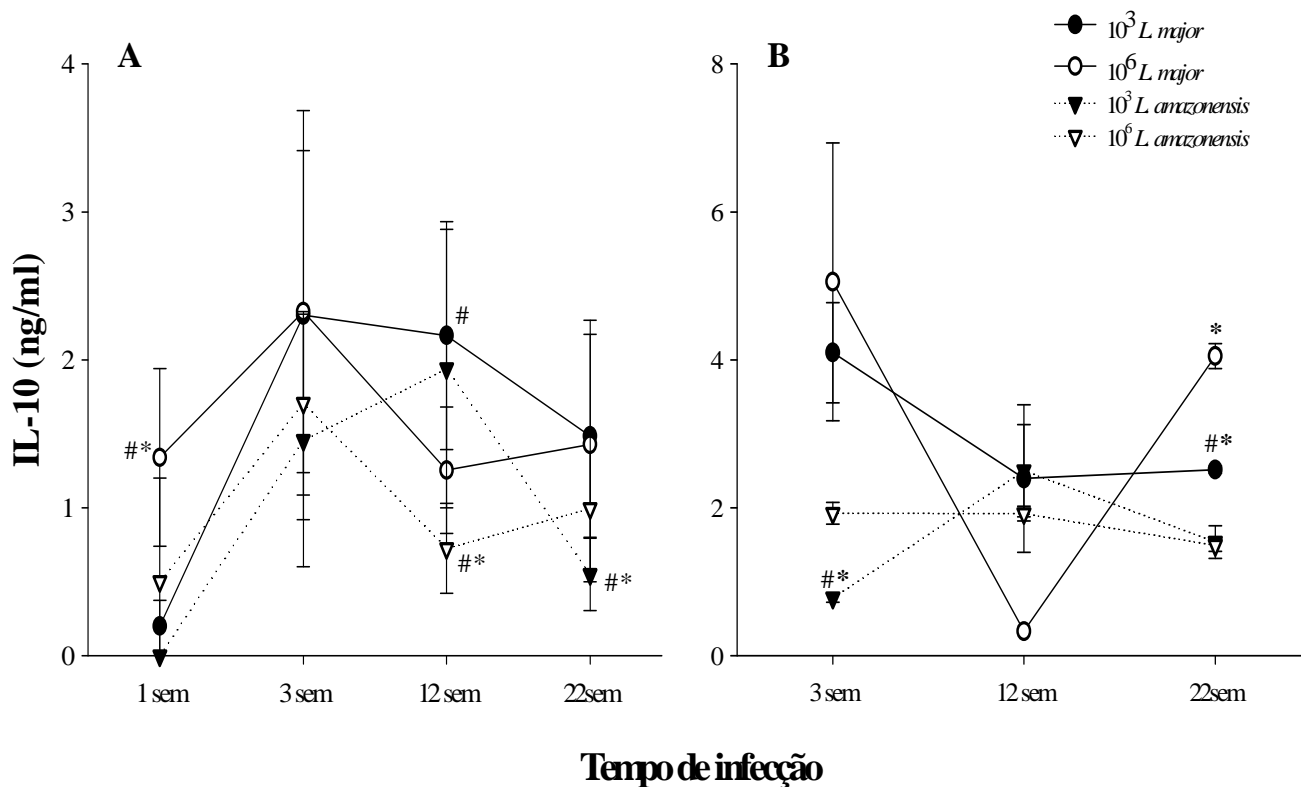


Figura 11: Produção de IL-10 por células de baço (A) e linfonodo (B) de camundongos C57BL/6 infectado com *L. major* ou *L. amazonensis* e inoculados com 10^3 ou 10^6 parasitos intradermicamente na orelha em pontos do curso de infecção. # indica diferença significativa para mesma espécie de *Leishmania* mas diferente inóculo e * indica mesmo inóculo mas diferente espécie de *Leishmania*. Foi realizado teste *t* de Student para os pontos com distribuição normal e Mann-Whitney para os pontos com distribuição não-normal. (* $p \leq 0,05$). Limite de detecção 0,03 ng/ml.

4.5- Produção de NO e arginase por macrófagos peritoneais coletados de animais infectados

A resposta do tipo Th1 induz a expressão de óxido nítrico sintase por macrófagos. Esta enzima produz óxido nítrico a partir de L- arginina. Por outro lado, a arginase também utiliza L- arginina como substrato, formando ornitina, que é precursora de aminas que favorecem o crescimento do parasito. Uma vez que detectamos produção diferente de citocinas quando camundongos C57BL/6 são infectados com *L. major* ou *L. amazonensis*, decidimos verificar a atividade destas enzimas nos nossos grupos experimentais. Para este estudo utilizamos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados e como controle macrófagos de animais não infectados.

Nossos resultados mostraram uma produção espontânea de NO pelos macrófagos de camundongos inoculados com 10^3 *L. major* e 10^6 *L. amazonensis* cultivados *in vitro* sem estímulo na 12^a semana (Fig. 11A). Nos demais tempos, a produção foi equivalente àquela de camundongos não infectados.

Na presença de antígeno homólogo, observamos que macrófagos de animais inoculados com alta dose de *L. major* produziram uma quantidade crescente de NO a partir do terceiro dia de infecção até a nona semana (Fig. 11B). Na 12^a semana esta produção de NO apresentou uma diminuição e se manteve até a 22^a semana de infecção. Já os macrófagos de animais inoculados com 10^3 parasitos mostraram um aumento na produção de NO na sexta semana, que não foi mantida, diminuindo na nona semana. Doze semanas após a infecção, entretanto, esta produção aumentou novamente, constituindo o pico de produção de NO por este grupo. No tempo de 22 semanas de infecção ocorreu nova diminuição nesta produção. Os macrófagos de animais inoculados com alta dose de *L. major* produziram mais NO que o grupo inoculado com baixa dose no período entre uma e nove semanas de infecção e perfil oposto foi encontrado na 12^a semana. Na 22^a semana após a infecção, entretanto, a quantidade de NO encontrada foi semelhante entre os grupos inoculados com as duas doses do parasito.

Na infecção por *L. amazonensis* observamos um aumento gradual na produção de NO pelos macrófagos de animais inoculados com 10^6 parasitos no período de três dias a três semanas de infecção (Fig. 11B). Na sexta semana esta produção diminuiu, voltando a aumentar na nona semana após a infecção. Este tempo representou o pico de produção de NO por macrófagos deste grupo. A seguir, na 12^a semana, esta produção voltou a diminuir sendo mantida na 22^a semana de infecção. Para o grupo inoculado

com 10^3 parasitos observamos uma pequena produção de NO na sexta semana e uma diminuição desta na nona semana. Na 12^a semana de infecção observamos um aumento acentuado da produção de NO que se estendeu até a 22^a semana. Entre as diferentes doses de inóculo utilizadas observamos uma maior produção de NO pelos animais inoculados com 10^6 parasitos em relação ao grupo inoculado com 10^3 na primeira, terceira e nona semana de infecção e perfil oposto na 22^a semana onde o grupo inoculado com baixa dose apresentou maior produção.

Os macrófagos de animais inoculados com 10^6 *L. major* ou *L. amazonensis* produziram quantidades parecidas de NO durante quase todo o curso de infecção. Apenas na sexta semana o grupo infectado com *L. major* apresentou uma maior produção de NO. Comparando estas duas espécies de *Leishmania* com inóculo de 10^3 parasitos observamos uma situação parecida. Nos tempos analisados entre três dias e 12 semanas de infecção a produção de NO foi semelhante. Apenas na 22^a semana de infecção os animais inoculados com *L. amazonensis* apresentaram maior produção de NO.

Devido ao importante papel do IFN- γ na indução da expressão da enzima iNOS foi também de nosso interesse analisar o efeito desta citocina na produção de NO por estes macrófagos peritoneais de animais infectados na ausência ou presença de estímulo *in vitro* com antígeno homólogo. Como os resultados foram semelhantes em ambas as condições, optamos por mostrar a produção ocorrida na presença de IFN- γ e antígeno homólogo.

Observamos que a adição de IFN- γ à cultura levou à produção semelhante de NO pelos macrófagos de camundongos inoculados com *L. major* nas doses estudadas no período de três dias a 12 semanas de infecção. Apenas na 22^a semana de infecção os macrófagos de camundongos infectados com baixa dose dos parasitos apresentaram uma maior produção de NO que o grupo inoculado com alta dose (Fig. 11C). Para os animais infectados por *L. amazonensis* um perfil parecido foi encontrado. A produção de NO não diferiu durante a maior parte do curso de infecção. Apenas na 12^a e 22^a semana de infecção o grupo inoculado com baixa dose do parasito apresentou uma maior produção de NO. Na presença de IFN- γ a produção de NO pelos macrófagos de camundongos infectados com alta dose de ambos os parasitos foi semelhante nos tempos analisados do curso de infecção (Fig. 11C). Já os macrófagos de camundongos infectados com baixa dose de *L. amazonensis* apresentaram uma maior produção de NO que os macrófagos de camundongos infectados com *L. major* 12 e 22 semanas após a infecção.

Verificamos, ainda, a atividade de arginase dos macrófagos peritoneais obtidos dos diversos grupos de camundongos. Nossos resultados mostraram que os macrófagos peritoneais dos animais inoculados com alta e baixa dose de *L. major* cultivados *in vitro* sem estímulo apresentaram uma atividade de arginase espontânea semelhante durante quase todo o curso da infecção (Fig. 11D). Apenas na nona semana de infecção observamos uma maior atividade desta enzima pelo grupo infectado com baixa dose deste parasito. Quanto aos animais infectados com *L. amazonensis* observamos que com uma e 22 semanas de infecção o grupo inoculado com baixa dose apresentou maior atividade de arginase em relação ao grupo infectado com alta dose. Quando comparamos as infecções por *L. major* ou *L. amazonensis* observamos que macrófagos de camundongos inoculados com 10^6 parasitos tiveram a atividade de arginase semelhante. Entretanto, com inóculo de 10^3 parasitos, macrófagos do grupo infectado com *L. amazonensis* apresentaram maior atividade desta enzima no terceiro dia, uma e 22 semanas de infecção.

Avaliando a atividade de arginase na presença de antígeno homólogo observamos que macrófagos obtidos de camundongos inoculados com 10^6 *L. major* apresentaram atividade de arginase maior que a de macrófagos de camundongos não infectados (Fig. 11E). Após uma semana, esta atividade apresentou acentuada diminuição. Esta menor atividade permaneceu entre a terceira e sexta semana de infecção. Já na nona semana a atividade da arginase voltou a aumentar porém, na 22^a semana, diminuiu novamente. Já os macrófagos dos camundongos inoculados com baixa dose apresentaram um aumento na atividade da arginase na primeira semana em relação ao terceiro dia de infecção e uma diminuição acentuada na terceira semana. Seis semanas após a infecção esta atividade voltou a aumentar apresentando a seguir uma diminuição gradual até a 22^a semana. Na cinética de atividade da arginase observada durante o curso de infecção por estes grupos inoculados com as diferentes doses encontramos uma maior atividade desta enzima pelos animais infectados com 10^6 *Leishmania* no terceiro dia e terceira semana em relação ao grupo inoculado com 10^3 parasitos. Perfil oposto, entretanto, foi encontrado nos tempos de uma e seis semanas. Nos tempos restantes não encontramos diferença na atividade de arginase entre estes grupos.

Ainda na presença de antígeno homólogo, macrófagos de camundongos inoculados com alta dose de *L. amazonensis* mantiveram uma mesma atividade de arginase no período de três dias e uma semana de infecção. Na terceira semana encontramos uma diminuição nesta atividade e novo aumento foi visto na nona semana

de infecção. Entretanto, a atividade da arginase se mostrou novamente diminuída na 22^a semana. Já o grupo inoculado com baixa dose apresentou uma diminuição acentuada da atividade na terceira semana em relação à primeira e um aumento na sexta semana de infecção. A partir deste ponto ocorreu uma diminuição gradativa desta atividade até o tempo de 22 semanas após a infecção. Encontramos diferença na atividade da arginase quando comparamos as doses apenas na sexta semana, onde macrófagos dos camundongos inoculados com alta dose apresentaram maior atividade que os infectados com baixa dose, e na 22^a semana onde perfil oposto foi encontrado.

Não houve diferença estatística na atividade de arginase de macrófagos de camundongos infectados com altas doses de parasitos estimulados com antígeno homólogo. Entretanto, macrófagos de camundongos infectados com baixa dose de *L. amazonensis* apresentaram uma maior atividade de arginase com três dias, três e 22 semanas de infecção em relação ao grupo infectado com baixa dose de *L. major*.

Devido a participação do IFN- γ na indução da via de ativação da iNOS e síntese de NO analisamos se sua presença interferiria na atividade da arginase. Interessantemente, não observamos grandes divergências do padrão obtido com estímulo homólogo (Fig. 11F).

Diante do importante papel da citocina IL-4 no direcionamento de uma resposta Th2 analisamos sua interferência na produção de NO e sua participação na atividade da arginase. Os resultados encontram-se na Figura 12. Os gráficos A e D da Figura 12 são os mesmos dados de macrófagos não estimulados *in vitro* apresentados na Figura 11. Quando os macrófagos de camundongos foram incubados apenas com IL-4 houve baixa produção de NO, e não houve diferença entre os diversos grupos (Fig. 12B). Entretanto, na presença de IL-4 e antígeno homólogo a cinética de produção de NO foi diferente. Interessantemente, observamos que macrófagos de camundongos infectados com alta ou baixa dose de *L. major* produziram NO. Os macrófagos do grupo infectado com 10^6 *L. major* apresentaram um acentuado aumento na produção de NO a partir da terceira semana, produção esta que se manteve na sexta e na nona semana de infecção. Já os macrófagos dos animais inoculados com 10^3 *L. major* mostraram um pequeno aumento na terceira semana e um aumento maior na sexta semana de infecção. Este mesmo nível de produção de NO foi mantido na nona semana de infecção. Os macrófagos de animais inoculados com alta dose de *L. major* apresentaram maior produção de NO que os inoculados com baixa dose no período de três a nove semanas de infecção.

Um perfil diferente foi observado para os macrófagos de camundongos infectados com *L. amazonensis* e estimulados *in vitro* com IL-4 e antígeno homólogo. O

grupo inoculado com 10^6 parasitos apresentou um aumento lento, mas gradual na produção de NO no período de três dias a três semanas de infecção. Na sexta semana houve uma diminuição nesta produção que voltou a aumentar de forma acentuada após nove semanas de infecção. Os animais inoculados com 10^3 parasitos também mostraram um aumento lento e gradual na síntese de NO só que entre a primeira e a sexta semana de infecção. Nove semanas após inóculo do parasito esta produção de NO se mostrou diminuída. Interessantemente, apenas na terceira semana de infecção encontramos uma maior produção de NO pelos macrófagos dos animais infectados com 10^6 parasitos em relação aos inoculados com 10^3 . Nos demais tempos não houve diferença significativa.

Quando comparamos a produção de NO por macrófagos de camundongos infectados com alta dose de *L. amazonensis* e *L. major* e estimulados *in vitro* com IL-4 e antígeno homólogo, observamos uma maior produção pelos animais infectados por *L. major* na terceira e sexta semanas de infecção. Nas outras semanas analisadas não houve diferença na produção de NO por estes dois grupos. Já entre os grupos infectados com baixa dose dos parasitos encontramos também uma maior produção pelos animais infectados com *L. major* só que no tempo de seis e nove semanas após a infecção.

Avaliando a interferência do IL-4 na atividade da arginase observamos que macrófagos do grupo infectado com 10^6 *L. major* não apresentaram muita variação na atividade durante o tempo de infecção analisado (Fig. 12E). Já o grupo inoculado com baixa dose deste parasito mostrou nos tempos avaliados atividade da arginase aumentada na primeira e sexta semana de infecção. A atividade nos macrófagos de camundongos infectados com baixa dose foi maior que a encontrada nos macrófagos infectados com alta dose de *L. major* no período entre uma e seis semanas de infecção.

Macrófagos de camundongos infectados com 10^6 *L. amazonensis* apresentaram atividade de arginase maior que macrófagos controles no terceiro dia e primeira semana de infecção. Na sexta semana observamos uma diminuição nesta atividade e nos demais tempos a atividade foi constante. Já os macrófagos de camundongos inoculados com 10^3 *Leishmania* mostraram na primeira semana uma maior atividade da arginase que a observada três dias após a infecção. Na terceira semana houve uma diminuição na atividade desta enzima e esta se manteve na sexta semana de infecção. Observamos novo aumento na atividade da arginase na nona semana e uma diminuição na 22^a semana de infecção. Comparando as doses, no inóculo com alta dose de parasitos encontramos uma maior atividade de arginase apenas no terceiro dia de infecção em relação aos macrófagos infectados com baixa dose. Este grupo, entretanto, apresentou uma maior atividade desta enzima uma e seis semanas após o inóculo.

Quando comparamos a atividade da arginase entre as diferentes espécies de *Leishmania* estudadas, observamos uma maior atividade da arginase pelos macrófagos obtidos de animais inoculados com alta dose de *L. amazonensis* nos tempos de três dias, três e nove semanas de infecção. Na sexta semana de infecção, os macrófagos do grupo infectado com *L. major* apresentaram uma atividade um pouco maior que a observada nos animais infectados com *L. amazonensis*. Curiosamente, nos grupos inoculados com baixa dose a atividade da arginase encontrada nos tempos estudados não foi diferente entre as espécies de *Leishmania*.

Analisando a participação da IL-4 na atividade da arginase agora na presença de antígeno homólogo encontramos situações interessantes. Os macrófagos de animais inoculados com 10^6 *L. major* apresentaram uma atividade crescente desta enzima no período de três dias a 3 semanas de infecção (Fig. 12F). Na sexta semana observamos uma queda nesta atividade e na nona, novo aumento da atividade. Os macrófagos do grupo inoculado com menor dose desta *Leishmania* apresentaram uma atividade de arginase semelhante à dos macrófagos do grupo inoculado com alta dose. Apenas na primeira semana de infecção a atividade nesse grupo foi maior que a dos animais infectados com alta dose.

Para os animais infectados com *L. amazonensis*, encontramos um aumento na atividade da arginase entre o terceiro dia e a primeira semana de infecção, uma queda acentuada nesta atividade observada a partir desta semana que se estendeu até a sexta semana e novo aumento na nona semana de infecção. Os animais infectados com 10^3 *L. amazonensis* também mostraram um aumento na atividade da arginase entre o terceiro dia e primeira semana de infecção e uma queda a partir de então até a terceira semana. No período de três a nove semanas após a infecção, entretanto, a atividade observada se manteve constante. Entre as doses de inóculo deste parasito observamos uma maior atividade da arginase pelo grupo infectado com alta dose no terceiro dia de infecção e perfil oposto na sexta semana. Nos demais tempos observados não encontramos diferença na atividade desta enzima.

Encontramos uma maior atividade de arginase por macrófagos do grupo inoculado com 10^6 *L. amazonensis* em relação aos macrófagos de camundongos infectados com mesma dose de *L. major* no terceiro dia e primeira semana de infecção, quando estes macrófagos foram estimulados com IL-4 e extrato do parasito homólogo. Nos outros tempos a atividade foi parecida. Já entre os grupos inoculados com baixa dose, a atividade da arginase foi diferente apenas na sexta semana de infecção onde ela se apresentou maior no grupo infectado por *L. amazonensis*.

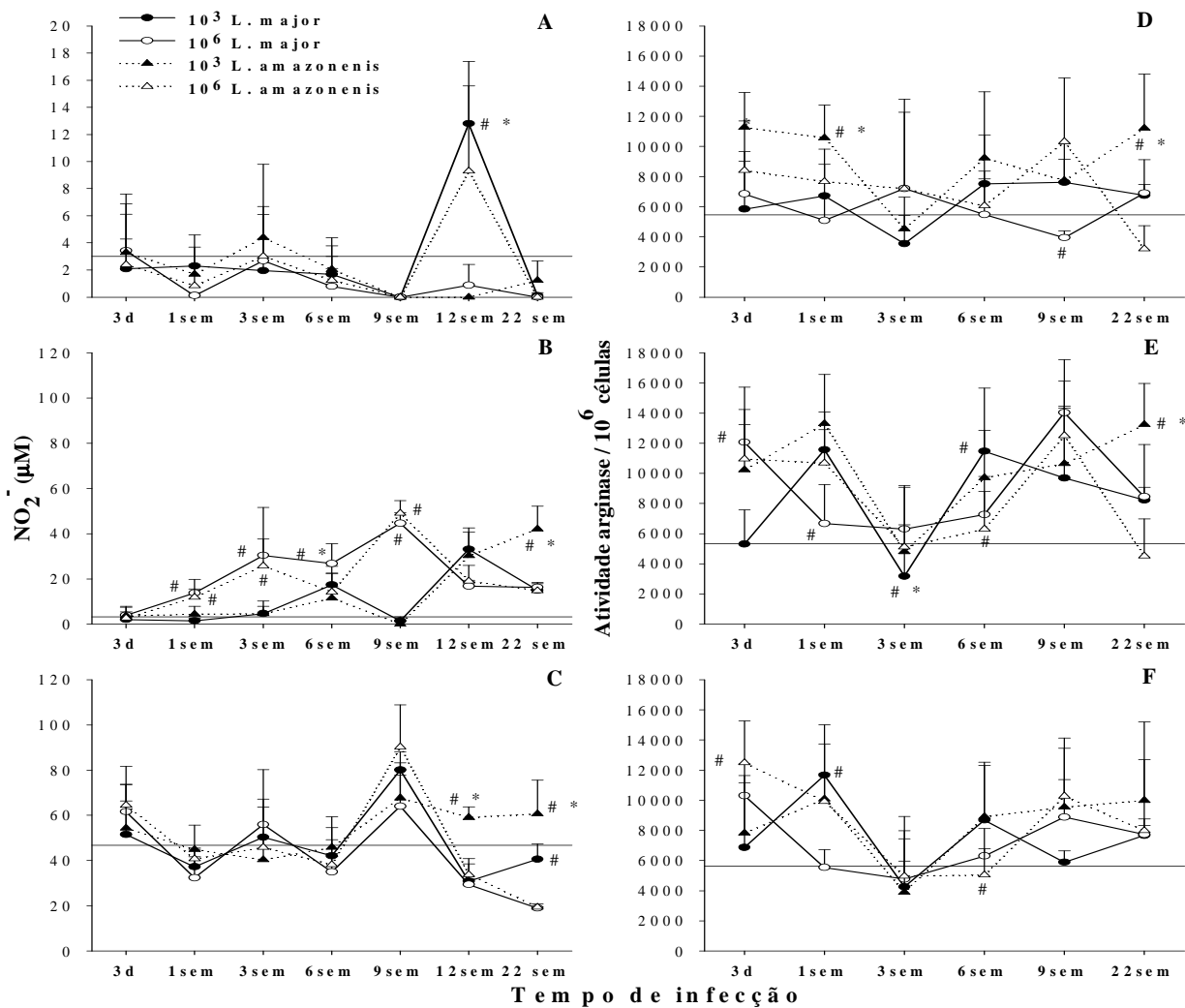


Figura 12: Produção de NO e atividade de arginase por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados intradermicamente na orelha com 10^3 ou 10^6 parasitos das espécies *L. major* ou *L. amazonensis* estimulados por IFN- γ . Os macrófagos peritoneais dos animais infectados foram coletados em diferentes tempos e cultivados em meio de cultura (A e D), estimulados com antígeno homólogo (B e E) ou com antígeno homólogo e IFN- γ (C e F) por 48h. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de três a cinco grupos (três camundongos por grupo). A linha horizontal representa o valor de NO₂⁻ ou atividade de arginase produzido por macrófagos de animais não infectados nas mesmas condições acima. # indica diferença significativa entre a mesma espécie de *Leishmania* mas diferente dose de inóculo e * indica diferença entre as espécies de *Leishmania* mas mesma dose de inóculo, pelo teste *t* de Student (* $p \leq 0,05$). Limite de detecção: NO₂⁻ 3,9 μ M e arginase 0,016 mg/ml.

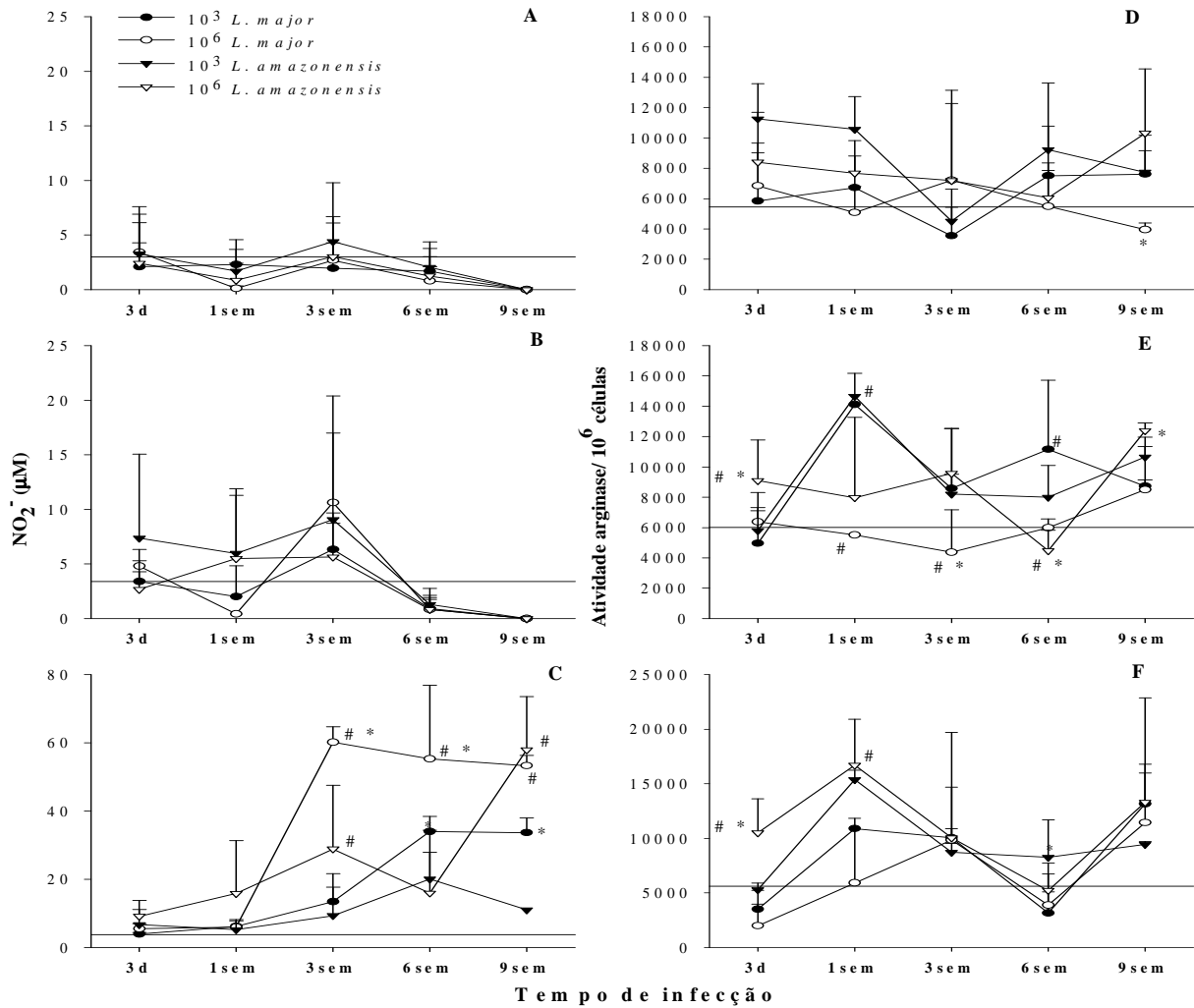


Figura 13: Produção de NO e atividade de arginase por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados intradermicamente na orelha com 10³ ou 10⁶ parasitos das espécies *L. major* ou *L. amazonensis* estimulados por IL-4. Os macrófagos peritoneais dos animais infectados foram coletados em diferentes tempos e cultivados em meio de cultura (A e D), estimulados com IL-4 (B e E) ou com antígeno homólogo e IL-4 (F e G). Cada ponto representa a média e o desvio padrão de três a cinco grupos (três camundongos por grupo). A linha horizontal representa o valor de NO₂⁻ ou atividade de arginase produzido por macrófagos de animais não infectados nas mesmas condições acima. # indica diferença significativa entre a mesma espécie de *Leishmania* mas diferente dose de inóculo e * indica diferença entre as espécies de *Leishmania* mas mesma dose de inóculo, pelo teste *t* de Student (* *p* ≤ 0,05). Limite de detecção: NO₂⁻ 3,9 μM e arginase 0,016 mg/ml.

5- DISCUSSÃO

Grande parte dos dados conhecidos hoje sobre a imunologia da Leishmaniose foram obtidos através de estudos com inóculos de alta dose de parasitos (10^5 - 10^7) em modelos experimentais (AFONSO; SCOTT, 1993; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SCOTT *et al.*, 1988) em contraste com número estimado inoculado pelo vetor (10 - 10^3) em uma infecção natural (BELKAID *et al.*, 1998; BELKAID *et al.*, 2000a; COURRET *et al.*, 2003; FELIZARDO *et al.*, 2007; LIRA *et al.*, 2000). Outro aspecto importante de se ressaltar é que durante a picada do flebótomo são inoculadas formas infectantes, promastigotas metacíclicas, entretanto em parte destes estudos foram usados parasitos de fase estacionária onde existem formas não-infectantes e infectantes. Além disso, quando se utilizam camundongos como modelo experimental, o inóculo na orelha reflete mais acuradamente as características locais da infecção pelo vetor que os sítios de infecção comumente usados, pata e base da cauda (MORTATTI; HENRIQUES, 1990) uma vez que a via de inóculo pelo vetor é intradérmica, como conseguimos fazer na orelha, e não sub-cutânea, como é o caso de inóculos feitos nos dois outros locais.

Diante das diferenças entre os modelos de infecção mais freqüentemente utilizados e o modelo de infecção natural, pesquisadores investigaram se estas características poderiam interferir na resposta imune mascarando, anulando ou exacerbando algum mecanismo crítico para o controle da infecção e desenvolvimento da imunidade (BELKAID *et al.*, 1998; BELKAID *et al.*, 2000a; BELKAID; BUTCHER; SACKS, 1998; LIRA *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos até o momento na infecção por *L. major* revelam diferenças interessantes entre os modelos de alta e baixa dose de infecção. Assim sendo, nosso objetivo foi avaliar o curso da infecção, multiplicação do parasito e resposta imune no modelo de infecção natural por *L. amazonensis* comparativamente à infecção por *L. major*. Como nosso interesse foi buscar diferenças entre o mecanismo de controle da infecção, com conseqüente desenvolvimento de resistência ou suscetibilidade, optamos por utilizar o camundongo C57BL/6 que reflete bem estes modelos quando infectados com *L. major* e *L. amazonensis*, respectivamente (AFONSO; SCOTT, 1993; SOONG *et al.*, 1997).

Nós verificamos que a infecção com baixa dose de *L. amazonensis* na orelha seguiu o padrão de infecção com alta dose na pata, mostrando lesões que persistiram por semanas, parasitos presentes em alto número nestas lesões e baixos níveis de IFN- γ e TNF produzidos em resposta a este parasito. Entretanto, em contraste aos camundongos inoculados com alta dose de *L. amazonensis*, o grupo inoculado com baixa dose deste

parasito apresentou lesão menos exacerbada com desenvolvimento mais lento e com pouca ou nenhuma necrose durante o período avaliado.

O curso de infecção para os camundongos inoculados intradermicamente na orelha com alta dose de promastigotas metacíclicas de *L. major* ou *L. amazonensis* repetiu os resultados previamente descritos na literatura para o inóculo subcutâneo na pata e base da cauda (AFONSO; SCOTT, 1993; JI; SUN; SOONG, 2003; SOONG *et al.*, 1996). A infecção por *L. major* levou ao desenvolvimento de uma lesão que foi controlada enquanto a infecção por *L. amazonensis* desencadeou a formação de uma lesão crônica com ulcerações e necrose altamente destrutivas (MORTATTI; HENRIQUES, 1990). No entanto, no modelo de baixa dose de infecção por *L. amazonensis* encontramos, similarmente ao observado para *L. major* (BELKAID *et al.*, 2000a), um atraso no desenvolvimento da lesão que fica evidente quando comparado ao modelo de alta dose. Enquanto o início de formação da lesão aconteceu na segunda semana de infecção com alta dose de ambos os parasitos, na infecção com baixa dose ocorreu apenas em torno da quarta semana. Entretanto, o fenótipo de resistência e suscetibilidade foi mantido.

No modelo de alta dose de infecção na orelha por *L. major* nossos resultados revelaram pouca variação na carga parasitária ao longo do curso de infecção. Entretanto, em camundongos BALB/c, infectados também na orelha, foi observado um grande aumento no número dos parasitos (10^4 no terceiro dia de infecção e 10^8 na terceira semana) correlacionado com o curso de infecção. Outro trabalho com infecção na pata de camundongos C57BL/6 revelou um grande número de parasitos no momento do pico da lesão e um pequeno número de parasitos persistindo no sítio de infecção após o controle da mesma (LIRA *et al.*, 2000). A diferença observada na multiplicação dos parasitos entre os modelos descritos pode ser devida às diferentes linhagens de camundongos ou ao sítio de inóculo utilizado. Para a *L. amazonensis*, entretanto, o aumento na carga parasitária foi paralelo ao desenvolvimento da lesão apresentando uma estabilização no período entre seis e 12 semanas de infecção e, surpreendentemente, um novo aumento no parasitismo na 22^a semana avaliada. Nossa surpresa foi devida ao fato de que havia muita necrose no tecido e, ainda assim, o parasito sobrevivia e em grandes números. A estabilização no tamanho da lesão na infecção por *L. amazonensis* já foi demonstrado em outros trabalhos (AFONSO; SCOTT, 1993; SANTIAGO *et al.*, 2006).

Uma multiplicação silenciosa do parasito no sítio de infecção, isto é, sem ocorrência de inflamação aguda, pode explicar, pelo menos parcialmente, o atraso na

progressão da lesão no modelo de baixa dose como inicialmente demonstrado na infecção por *L. major* (BELKAID *et al.*, 2000a; LIRA *et al.*, 2000) e encontrado por nós na infecção por *L. amazonensis*. Entretanto, enquanto nestes estudos a infecção por *L. major* levou à formação da lesão associada ao início de morte do parasito, nossos resultados na infecção com *L. amazonensis* ou *L. major* apresentaram um desenvolvimento de lesão associado à multiplicação do parasito. Em acordo com nossos dados, outro estudo observou que camundongos BALB/c infectados na orelha com baixa dose de *L. major* ou *L. amazonensis* apresentaram formação da lesão associada com a carga parasitária no local de infecção (COURRET *et al.*, 2003). Foi demonstrado também o aparecimento de lesões visíveis após um longo período de aumento da carga de *L. amazonensis* na pata tanto em C57BL/6 quanto em BALB/c. Em camundongos C57BL/6 mostraram que após a nona semana de infecção o tamanho da lesão se manteve até o último tempo estudado enquanto que o número de parasitas apresentado na 13ª semana de infecção (10^{14}) foi maior que o encontrado na 24ª semana de infecção (10^3). Desta forma, neste estudo não foi observada correlação entre multiplicação de parasitos e desenvolvimento de lesão. Entretanto, nossos resultados também mostraram uma estabilização no tamanho da lesão, porém, o número de parasitos não apresentou variação.

Buscando esclarecer as diferenças observadas entre o modelo de baixa e alta dose em relação ao curso de infecção e multiplicação dos parasitos, analisamos a cinética e o perfil celular do infiltrado inflamatório no sítio do inóculo durante o período avaliado. A qualidade do infiltrado celular foi similar entre os modelos de infecção. Entretanto, no grupo infectado com baixo número de parasitos houve um atraso no aparecimento de células T e macrófagos no local de infecção. Esta demora no início da migração destas células pode explicar o desenvolvimento mais lento da lesão neste modelo. Pesquisadores descreveram um atraso no desenvolvimento da lesão na pata de camundongos SCID infectados com baixa dose de *L. major*, associado à ausência de células T, necessárias para o recrutamento de macrófagos para o sítio do inóculo (GUY; BELOSEVIC, 1995). Outro estudo implica a participação das células T CD4⁺ no desenvolvimento da lesão na infecção com *L. amazonensis*. Camundongos nude, MHC II^{-/-} e RAG2^{-/-} infectados com este parasito apresentaram uma progressão da lesão muito lenta, refletindo a manutenção de condições associadas com a fase silenciosa inicial da infecção observadas no camundongo selvagem infectado com baixa dose de parasitos.

Observamos também que em infecções com baixa e alta dose de parasitos houve um atraso no surgimento do infiltrado celular em camundongos infectados com *L. amazonensis* quando comparados aos infectados com *L. major*. Em nossos resultados visualizamos primeiramente a presença de um infiltrado inflamatório no sítio de infecção dos camundongos infectados com *L. major*. De forma semelhante, dados da literatura mostraram uma redução da expressão e um atraso no surgimento das quimiocinas inflamatórias na infecção por *L. amazonensis* quando comparada a *L. major*. Este dado foi relacionado à baixa resposta das células T ao parasito e conseqüente prejuízo na migração celular no estágio inicial da infecção (JI; SUN; SOONG, 2003).

Os linfócitos persistiram na lesão até a 22^a semana de infecção em todos os grupos. Entretanto, o controle da infecção por *L. major* e o desenvolvimento de lesão crônica na infecção por *L. amazonensis* sugerem diferentes funções para estas células no sítio da infecção. Realmente, dados da literatura mostraram um papel importante das células T CD4⁺ no desenvolvimento (SOONG *et al.*, 1997) e ulceração das lesões (TERABE *et al.*, 1999; TERABE *et al.*, 2000) causadas por *L. amazonensis*. Recentemente foi demonstrado que um rápido acúmulo de células Treg no sítio da infecção entre a primeira e terceira semana de infecção suprimiu a atividade das células T CD4⁺ efectoras e restringiu o desenvolvimento da doença em camundongos infectados por *L. amazonensis*. Entretanto, este efeito foi transitório, sugerindo a importância de um fino balanço entre células Treg e células T efectoras na regulação à suscetibilidade a este parasito (JI *et al.*, 2005). Em contraste, na infecção com *L. major*, a presença de células T reguladoras no sítio de infecção associou-se com supressão de células T efectoras (BELKAID *et al.*, 2002a) e persistência do parasito no final da infecção, quando a lesão já havia sido controlada (BELKAID *et al.*, 2001).

Na leishmaniose, as células T CD8⁺ têm sido associadas com proteção e cura em humanos e camundongos. Nossos resultados mostraram a presença de células T CD8⁺ no sítio de infecção em menor quantidade que as células T CD4⁺, seguindo uma cinética similar, sem diferença significativa entre as doses ou espécies de *Leishmania* utilizadas. Entretanto, sua participação na resistência à reinfeção foi bem estabelecida no modelo de alta dose de infecção por *L. major* (MULLER *et al.*, 1994). A primeira evidência da participação de células T CD8⁺ na imunidade à infecção por *L. major* veio da observação que um maior número de células T CD8⁺ específicas contra o parasito foram ativadas em camundongos resistentes, comparados aos suscetíveis (MILON *et al.*, 1986). Por outro lado, alguns estudos demonstram que estas células têm pouca ou

nenhuma participação no controle primário da infecção no modelo de alta dose por *L. major*. A depleção das células T CD8⁺ em camundongos resistentes acentuou o desenvolvimento da lesão primária mesmo não modificando o fenótipo de cura (TITUS *et al.*, 1987) e camundongos deficientes em CD8 ou β2-microglobulina mantiveram sua capacidade de resolver infecções primárias com *Leishmania* (HUBER *et al.*, 1998) de forma semelhante ao observado no nosso trabalho.

Em contraste, a capacidade de proteção por este tipo celular em infecção por alta dose de *L. amazonensis* é controversa. Estudos demonstraram que camundongos deficientes em β2-microglobulina ou perforina imunizados não foram capazes de controlar a infecção com *L. amazonensis* (COLMENARES *et al.*, 2003). Em oposição a estes resultados e de acordo com nossos dados, recentemente foi demonstrado que as células T CD8⁺ não são necessárias na imunidade contra *L. amazonensis*. Camundongos deficientes na cadeia p40 da IL-12 e IL-23 (IL-12/23p40^{-/-}) depletados de células T CD8⁺ ou camundongos deficientes de β2-microglobulina imunizados apresentaram lesões e parasitismo menores que o grupo controle não imunizado após infecção com *L. amazonensis* (HERNANDEZ SANABRIA *et al.*, 2007).

O papel das células T CD8⁺ foi revisto no modelo de infecção intradérmica com baixa dose de *L. major*. Neste estudo, camundongos deficientes em células CD8⁺ ou cujas células foram removidas por tratamento com anticorpos, não controlaram o crescimento do parasito, a lesão foi menor e seu desenvolvimento foi atrasado. A reconstituição com células T CD8⁺ provenientes de camundongos C57BL/6 durante fase aguda de infecção foi capaz de transferir apenas resistência parcial. Outros resultados também reforçam a função das células T CD8⁺ no modelo de infecção com baixa dose de *L. major* (UZONNA; JOYCE; SCOTT, 2004). Seus resultados demonstraram que a baixa dose de parasitos promove a expansão de células Th2. Entretanto, a *L. major* induziria concomitantemente a produção de IFN-γ por células T CD8⁺, a qual promove uma troca de resposta Th2 para uma protetora Th1. Estes dados sugerem então que, em condições similares à infecção natural, as células T CD8⁺ participam do controle da lesão primária pela alteração do perfil de resposta inicialmente Th2 para Th1 (BELKAID *et al.*, 2002b; UZONNA; JOYCE; SCOTT, 2004). Estes resultados contrastam com os obtidos no modelo de infecção com alta dose de *L. major* (HUBER *et al.*, 1998; TITUS *et al.*, 1987; WANG *et al.*, 1993). Portanto, os dados referentes à participação das células T CD8⁺ são controversos no modelo de alta e baixa dose de inóculo, sendo necessária a realização de mais estudos.

A diminuição do número de macrófagos no sítio de infecção com *L. major* foi associada à diminuição no tamanho da lesão. Entretanto, alguns macrófagos ainda foram encontrados nos pontos finais de infecção. Vários estudos também mostraram a presença do parasito em lesões controladas em hospedeiros resistentes (AEBISCHER; MOODY; HANDMAN, 1993; FELIZARDO *et al.*, 2007) . Em contraste, macrófagos persistiram em alto número nas lesões de camundongos infectados com *L. amazonensis*. O maior número de macrófagos na lesão destes camundongos infectados com *L. amazonensis* pode justificar a persistência de maior número deste parasito, pois esta é sua célula hospedeira. Entretanto, nenhuma razão para esta permanência foi encontrada por nós ou é descrita na literatura. Estudos demonstraram a participação das quimiocinas na fase inicial da infecção por *L. amazonensis* e no controle da infecção por *L. major* (SANTIAGO *et al.*, 2004). Vários trabalhos mostraram a participação das quimiocinas no recrutamento celular ao longo do curso de infecção (LUSTER, 2002; MACKAY, 2001; MACKAY *et al.*, 1993; SALLUSTO *et al.*, 1998; SALLUSTO; LANZAVECCHIA; MACKAY, 1998). Entretanto, a expressão de quimiocinas não foi determinada quando os camundongos infectados com *L. amazonensis* ainda mostravam lesões e os infectados com *L. major* já haviam curado.

Avaliamos também o perfil de citocinas produzidas por células de baço e linfonodo próximo ao sítio de infecção e a produção de NO e arginase por macrófagos peritoneais. Inúmeros trabalhos demonstraram que o controle da infecção por *Leishmania* depende de uma ativação adequada dos macrófagos por IFN- γ e TNF e conseqüente produção de NO por estas células. Nosso estudo mostrou que a cinética de produção de IFN- γ e TNF no modelo de baixa e alta dose de infecção com *L. major* está correlacionada com a cinética de desenvolvimento e controle da lesão bem como com a diminuição do número de parasitos. A multiplicação do parasito no sítio de infecção na ausência de formação de lesão observada no modelo de baixa dose com *L. major* sugere alterações na ativação de mecanismos imunes do hospedeiro necessários para eliminar o parasito e controlar a infecção. Observamos um atraso na produção de IFN- γ correlacionado com um período de multiplicação lenta do parasito e atraso no desenvolvimento da lesão quando comparada à produção observada no grupo inoculado com alta dose de *L. major*. Nossos resultados estão em acordo com dados da literatura que demonstraram que no modelo de baixa dose de infecção a multiplicação do parasito, sem o desenvolvimento de lesão, está correlacionada com a ausência de produção de IL-12 e IFN- γ (BELKAID *et al.*, 2000a; BELKAID *et al.*, 2000b). Ainda, camundongos depletados de IL-12 e IFN- γ também apresentaram uma fase lenta de multiplicação de

L. major na ausência de lesão em relação ao grupo selvagem (LIRA *et al.*, 2000). Em contraste, no modelo de alta dose os efeitos do tratamento com anti-IL-12 e anti-IFN- γ em termos de desenvolvimento de lesão e número de parasitos tornou-se aparente após três semanas de infecção, consistente com resultados anteriores com este tratamento (HEINZEL *et al.*, 1995; LIRA *et al.*, 2000; SYPEK *et al.*, 1993) e com o início relativamente rápido de resposta de IL-12 e IFN- γ descrito para camundongos C57BL/6 após inóculo com alta dose (DOHERTY; COFFMAN, 1996; HEINZEL *et al.*, 1995; REINER *et al.*, 1994). Isto sugere que a habilidade do parasito estabelecer uma fase discreta e prolongada de crescimento intracelular provavelmente está relacionada ao baixo inóculo, conseqüentemente, baixa carga antigênica. Desta forma, os macrófagos processam e liberam antígenos lentamente dando início ao desenvolvimento de uma resposta imune mais tardia.

Foi demonstrado também um efeito do IFN- γ sobre o recrutamento de leucócitos através da indução da expressão de vários genes de quimiocinas (FARBER, 1997). Diferentes modelos de infecção confirmam a participação do IFN- γ na migração celular (ISSEKUTZ; STOLTZ; VAN DER, 1988; KULIDJIAN; ISSEKUTZ; ISSEKUTZ, 2002). Alguns pesquisadores demonstraram que baixas doses de IFN- γ diminuía a adesão e migração de células T mediada por integrinas, interferindo assim na migração de células T naïve para os linfonodos (FLAISHON *et al.*, 2002). Mostraram também um efeito anti-inflamatório de baixas concentrações desta citocina em modelo de asma *in vivo*. Assim como o IFN- γ , o TNF também participa da migração celular na fase inicial de infecção. Reforçando estes resultados, a literatura demonstra a participação do TNF na expressão de selectinas importantes para a migração dos leucócitos para o sítio de infecção (KULIDJIAN; ISSEKUTZ; ISSEKUTZ, 2002). Assim, o atraso observado na produção destas duas citocinas por células de baço e linfonodo no modelo de baixa dose, quando comparado ao de alta dose de infecção por *L. major*, está em acordo com o atraso no desenvolvimento da lesão.

O macrófago murino ativado por IFN- γ e TNF metaboliza a L-arginina pela enzima iNOS gerando como produto final o NO importante molécula efetora na eliminação do parasito (GREEN *et al.*, 1990c; GREEN *et al.*, 1990a; GREEN *et al.*, 1990b; LIEW *et al.*, 1990a; LIEW; LI; MILLOTT, 1990a; LIEW; LI; MILLOTT, 1990b). Além disto, parece que o parasito pode regular a expressão da iNOS, favorecendo assim sua sobrevivência (PROUDFOOT *et al.*, 1996). Assim, a menor produção de IFN- γ e TNF encontrada na fase inicial da infecção por baixa dose de *L. major* em relação aos camundongos infectados com alta dose parece estar interferindo

não só na migração do macrófago, mas também em sua ativação, pois, nesta fase da infecção observamos um atraso na migração de macrófagos para o sítio de infecção e uma menor produção de NO por macrófagos peritoneais, estimulados por antígeno homólogo, dos camundongos infectados. Em contraste, nossos resultados mostraram uma maior atividade de arginase por estes macrófagos peritoneais, ainda nesta fase da infecção. Estudos iniciais *in vitro* mostraram que o crescimento de *L. major* dentro dos macrófagos foi aumentado na presença da arginase (INIESTA *et al.*, 2002). Além disto, a inibição da arginase reduziu o número de parasitas e atrasou o desenvolvimento da doença no camundongo, enquanto o tratamento com L-ornitina aumentou a suscetibilidade no camundongo resistente (INIESTA *et al.*, 2005). Desta forma a menor produção de NO e maior atividade da arginase relacionada à presença de macrófago no sítio de infecção, célula onde o parasito se multiplica, mostram um ambiente favorável à multiplicação silenciosa do parasito encontrada no modelo de baixa dose de infecção por *L. major*.

No modelo de baixa dose de infecção por *L. amazonensis* também foi encontrado um atraso no desenvolvimento inicial da lesão. Como discutido acima, dados na literatura demonstraram um atraso e redução na expressão e produção de quimiocinas e citocinas por camundongos infectados por *L. amazonensis* quando comparado à infecção por *L. major*. Este resultado foi correlacionado a uma menor responsividade inicial das células T à *L. amazonensis*, pois a transferência de células Th1 específicas para este parasito no início da infecção levou ao controle da mesma (JI; SUN; SOONG, 2003). Nossos dados mostraram uma menor produção sistêmica de IFN- γ entre a terceira e sexta semana de infecção quando usamos o inóculo de baixa dose em comparação à alta dose de infecção por *L. amazonensis*. Mesmo perfil foi encontrado para a produção sistêmica de TNF na terceira semana de infecção. Estes resultados, associados ao atraso na migração das células T para o sítio de infecção dos camundongos infectados com baixa dose deste parasito, sugerem a participação das quimiocinas e citocinas no atraso do desenvolvimento da lesão.

No momento em que o curso de infecção por *L. major* ou *L. amazonensis* começa a divergir, observamos algumas diferenças no perfil do infiltrado inflamatório associadas à produção de citocinas, NO e arginase relacionados aos fenótipos de resistência e suscetibilidade, respectivamente. Durante a fase de controle da lesão e do número de parasitos na infecção com baixa e alta dose de *L. major* os altos níveis de produção de IFN- γ , TNF e NO observados foram correlacionados à presença de células T e a um pico de macrófagos, seguido de uma diminuição em seu número, no sítio de

infecção. Experimentos de infecção com este parasito utilizando camundongos resistentes tratados com anticorpos anti-IFN- γ (LAUNOIS *et al.*, 2002) e camundongos em fundo genético resistente, porém deficientes de IFN- γ ou receptor para IFN- γ , demonstraram que estes camundongos foram incapazes de controlar a infecção (WAKIL *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1994). Vários trabalhos demonstraram que esta citocina aumenta a síntese da iNOS, levando a produção de NO tóxico para o parasito (ASSREUY *et al.*, 1994; GREEN *et al.*, 1990a; LIEW; LI; MILLOTT, 1990b). A produção de IFN- γ e morte do parasito mediada por NO foram também confirmadas no modelo da baixa dose de infecção (BELKAID *et al.*, 2000a). O TNF também possui importante função na eliminação de parasitos (GREEN *et al.*, 1990a; LIEW *et al.*, 1990b; LIEW; LI; MILLOTT, 1990a; PFEFFER *et al.*, 1993) e na indução de apoptose (TARTAGLIA *et al.*, 1993; WONG; GOEDDEL, 1994). Estudos iniciais demonstraram que o TNF atua em sinergismo com o IFN- γ na ativação dos macrófagos (LIEW; LI; MILLOTT, 1990b). Trabalhos com camundongos deficientes no receptor p55 de TNF (TNFRp55^{-/-}) demonstraram que estes animais, quando infectados com alta dose de *L. major*, eram incapazes de controlar a lesão embora controlassem o parasitismo (VIEIRA *et al.*, 1996). Estes resultados sugerem que a sinalização através do receptor p55 de TNF é necessária para induzir apoptose de células T na lesão uma vez o parasita tendo sido eliminado, pois na sua ausência as lesões não regrediram (KANALY *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 1996). Foi demonstrado, entretanto, que esta citocina é essencial para o controle do parasito, pois camundongos resistentes deficientes na produção de TNF, B6.TNF^{-/-}, desenvolveram a forma visceral da leishmaniose que foi fatal para estes animais (WILHELM *et al.*, 2001). Assim, os resultados obtidos em nosso trabalho estão em acordo com a literatura.

Em contraste, para a infecção por *L. amazonensis* observamos, na fase inicial de divergência da lesão, em relação aos camundongos infectados por *L. major*, um infiltrado inflamatório mostrando um número parecido de macrófagos, mas um menor número de células T no sítio de infecção associado a baixos níveis de produção de IFN- γ , TNF e NO. No período de aumento da lesão este perfil celular modificou passando a apresentar um maior número de macrófagos e um número de células T semelhantes ao observado na infecção por *L. major*. Entretanto, os níveis de produção de IFN- γ e TNF se mantiveram baixos. As razões pelas quais os camundongos C57BL/6 são menos eficientes no controle da infecção por *L. amazonensis* em comparação com *L. major* ainda não são claras. Camundongos C57BL/10 são suscetíveis à *L. amazonensis* e tem uma resposta Th1 deficiente a esta espécie, apresentando produção baixa ou ausente de

IFN- γ , mas são resistentes à *L. major* (AFONSO; SCOTT, 1993). Nosso trabalho mostra uma menor produção desta citocina na infecção por *L. amazonensis* quando comparada à infecção por *L. major*, independentemente da dose de inóculo usada. Alguns estudos demonstraram que o IFN- γ possui um papel crítico na resolução tardia da lesão, pois, a partir da 10ª semana de infecção, as lesões dos camundongos GKO se tornaram significativamente maiores que as do grupo controle (COLMENARES *et al.*, 2003; PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007). Ainda, foi mostrado que o IFN- γ favorece o crescimento de amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos *in vitro* e *in vivo* (QI *et al.*, 2004). Embora o controle da replicação deste parasito pelo IFN- γ possa ocorrer, as concentrações necessárias são tão altas que superam as concentrações suficientes para o controle de *L. major* (STEINBRINK *et al.*, 2000; SUNDERKÖTTER *et al.*, 1993). Além do mais, quando a produção de IFN- γ é elevada pela vacinação, são observados uma pequena, porém significativa, diminuição dos níveis de parasitos e um controle da lesão (GONZÁLEZ-LOMBANA *et al.*, 2008; HERNANDEZ SANABRIA *et al.*, 2007; HERNANDEZ *et al.*, 2006; VANLOUBBEECK *et al.*, 2004). Além disto, foi demonstrado que a adição de TNF a macrófagos ativados por IFN- γ acentua a atividade leishmanicida destes macrófagos (GOMES *et al.*, 2003). Em experimentos *in vivo*, foi observado que o estabelecimento e disseminação da infecção por *L. amazonensis* não estavam relacionados a uma inabilidade do macrófago produzir NO, mas que, em comparação a *L. major*, *L. amazonensis* é mais resistente sendo morta por maiores níveis de NO ou outros mecanismos produzidos na fase inicial de infecção (LEMOS, V *et al.*, 2000). Realmente, nossos resultados mostram uma produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis* similar aos infectados com *L. major*, independentemente da dose de inóculo utilizada. Assim, a menor produção de IFN- γ associada à menor produção de TNF observadas no modelo de infecção com alta e baixa dose de *L. amazonensis* parecem insuficientes para estimular o macrófago a produzir NO suficiente para matar este parasito. Reforçando estes resultados, foi demonstrado que a resistência apresentada pela *L. amazonensis* à morte por NO pôde ser observada também nesta espécie de parasita isolado de pacientes. Os isolados apresentaram diferença na suscetibilidade à morte por NO *in vitro*. Parasitos provenientes de alguns isolados foram mortos por níveis mais baixos de NO comparados a parasitos provenientes de outros isolados (chamados isolados suscetíveis e resistentes, respectivamente). Esta divisão foi biologicamente relevante, pois, nos pacientes cujo isolado era resistente à morte por NO, as úlceras foram significativamente maiores que nos pacientes cujo isolado era suscetível ao NO

(GIUDICE *et al.*, 2007). Recentemente, dados da literatura demonstraram que o NO atua como um agente citostático contra *L. amazonensis*, e que a presença de NO e superóxido é necessária para morte eficiente de amastigotas e *L. amazonensis* dentro de macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ (MUKBEL *et al.*, 2007).

Assim, os dados apresentados até o momento estão correlacionados com o desfecho final das infecções encontrados na 22^a semana. Para a infecção com *L. major* observamos, após o controle da lesão e do parasitismo, menores níveis de produção de IFN- γ e TNF por células de baço e linfonodo e de NO por macrófagos peritoneais dos camundongos infectados. Esta baixa produção de citocinas e NO observada condiz como os poucos parasitos e macrófagos observados no sítio de infecção. Outro estudo realizado também demonstrou este efeito (VIEIRA *et al.*, 1996). Camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* apresentaram uma maior produção IFN- γ , TNF e NO no pico da lesão e após o controle da mesma os níveis destas citocinas e NO diminuíram. Entretanto, para a infecção com *L. amazonensis* os baixos níveis de IFN- γ e TNF foram associados a um número semelhante de células T e um número maior de macrófagos e parasitos quando comparados à infecção por *L. major*. Outro trabalho também descreveu um infiltrado inflamatório com maior número de macrófagos parasitados e produção de IFN- γ semelhante ao encontrado em nosso trabalho (LEMOS, V *et al.*, 2000). O recrutamento de monócitos e macrófagos é fundamental para a sobrevivência e persistência da *Leishmania* (SCOTT, 1985; SCOTT; SACKS; SHER, 1983). É possível, então, que o nível de resposta Th1 à infecção por *L. amazonensis* seja inadequado para a erradicação do parasito, mas permita o recrutamento de macrófagos por células T, favorecendo um meio adequado para a replicação do parasito.

Em resumo, quando comparamos baixa dose de inóculo de *L. major* e *L. amazonensis* observamos que apenas a produção de IFN- γ apresentou diferença entre estas espécies. Os níveis de TNF e NO não diferiram. Portanto, sugerimos que a inabilidade do camundongo matar os parasitos deve-se somente aos baixos níveis de produção de IFN- γ .

É interessante notar que a *L. amazonensis* falha em ativar uma resposta Th2 (AFONSO; SCOTT, 1993; HERNANDEZ *et al.*, 2006; JI *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2002), mesmo desenvolvendo lesões bastante severas e que levam a necrose e perda de tecido. Vários estudos demonstraram que a suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis* é independente de IL-4. A neutralização de IL-4 endógena não promoveu a resolução da lesão (AFONSO; SCOTT, 1993) e a deleção do gene para IL-4 também

não alterou o curso de infecção e carga parasitária na infecção por *L. amazonensis* (JONES *et al.*, 2002).

A IL-10 apresenta uma função imunomoduladora, limitando a produção de IFN- γ por células T via inibição da produção de IL-12 por macrófagos e DC e inibição de apresentação de antígeno (FIORENTINO *et al.*, 1991b; FIORENTINO *et al.*, 1991a; MACATONIA *et al.*, 1993). Entretanto, a IL-10 também não é responsável pela ausência de controle do parasitismo e resolução das lesões, pois não observamos aumento significativo na produção desta citocina quando lesões de camundongos infectados com *L. amazonensis* e *L. major* começam a divergir. Além do mais, nenhuma diferença significativa no curso de infecção de camundongos infectados com *L. amazonensis* foi encontrada entre camundongos selvagens e deficientes em IL-10 (GONZÁLEZ-LOMBANA *et al.*, 2008; JONES *et al.*, 2002).

Diferente do observado para a IL-4 e IL-10, o TGF- β tem uma função importante na diferenciação de células T na infecção por *L. amazonensis*. A administração desta citocina em camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* ou *L. brasiliensis* resultou em progressão da doença enquanto sua neutralização em camundongo BALB/c induziu resistência (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992). O controle da lesão nos camundongos BALB/c tratados foi associada a um aumento na produção de IFN- γ e redução na produção de IL-4.

Foi demonstrado também na infecção por *L. amazonensis* uma função da IL-13 na promoção da doença durante a infecção por esta espécie (ALEXANDER *et al.*, 2002).

A função da arginase na patologia e replicação do parasita ainda não está clara. Foi demonstrado que a arginase é induzida em camundongos suscetíveis e resistentes durante o desenvolvimento da doença. Na lesão dos camundongos suscetíveis, a indução desta enzima ocorreu paralela ao tempo de infecção, enquanto que nos camundongos resistentes a enzima apresentou aumento na atividade apenas durante período em que as lesões eram aparentes (INIESTA *et al.*, 2002). Entretanto, nossos resultados não mostraram diferenças significantes na atividade da arginase ao longo do curso de infecção.

No modelo de baixa dose de infecção por *L. amazonensis* utilizando a via intradérmica na orelha nós mostramos que, como observado para este mesmo modelo de infecção por *L. major*, houve um atraso no desenvolvimento da lesão associado a uma fase de crescimento silencioso dos parasitos e que, neste período, a produção de IFN- γ , TNF, IL-10, NO e arginase foram similares. Mostramos também que, no momento de

divergência do curso de infecção, os camundongos infectados com *L. amazonensis* mantiveram a baixa produção das citocinas dosadas e do NO em oposição aos altos níveis de produção observado nos camundongos infectados por *L. major*. O perfil celular do infiltrado inflamatório também diferiu entre as duas espécies de *Leishmania*. Macrófagos e células T persistiram no sítio de infecção de camundongos inoculados com *L. amazonensis*.

Quando comparamos baixa e alta dose de infecção por *L. amazonensis* encontramos que, como observado para infecção com alta dose deste parasito, as lesões não curam e os níveis de IFN- γ e TNF são menores que os níveis de produção por camundongos infectados por *L. major*. O número de parasitos no sítio de infecção e o perfil do infiltrado inflamatório foram similares entre as doses de infecção por *L. amazonensis*. Entretanto, as lesões desenvolvidas pelos camundongos inoculados com baixa dose de *L. amazonensis* são menos exacerbadas e apresentam pouca ou nenhuma necrose quando comparadas ao inóculo de alta dose. Acreditamos que este modelo, mais semelhante à infecção pelo vetor, será útil para esclarecer os motivos para não cura das lesões devido infecção por *L. amazonensis*.

6- CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o desenvolvimento mais lento da lesão no modelo de baixa dose de inóculo com *L. amazonensis*, quando comparado ao modelo de alta dose, está associado ao atraso no recrutamento celular para o sítio de infecção.

Nossos dados sugerem também que a produção de baixos níveis de IFN- γ , TNF e a presença de grande número de macrófagos e células T CD4⁺ no sítio de infecção no período final de infecção no modelo de infecção com baixa dose *L. amazonensis*, assim como no modelo de alta dose, favoreceram a multiplicação do parasito e o estabelecimento de lesão crônica semelhante entre os modelos. Entretanto, quando utilizamos a baixa dose de infecção observamos uma lesão menos exacerbada e com pouca necrose em relação ao grupo com alta dose de *L. amazonensis*.

Concluimos então que a infecção com baixa dose de *L. amazonensis* na derme alterou o curso de infecção, atrasando o surgimento da lesão, mas não alterou o fenótipo de suscetibilidade e produção de citocinas previamente descritos após infecção subcutânea com alto número de parasitos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIBLIOGRAFIA

AEBISCHER, T.; MOODY, S. F.; HANDMAN, E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infection and Immunity*, v. 61, n. 1, p. 220-226, 1993

AEBISCHER, T.; WOLFRAM, M.; PATZER, S. I.; ILG, T.; WIESE, M.; OVERATH, P. Subunit vaccination of mice against new world cutaneous leishmaniasis: comparison of three proteins expressed in amastigotes and six adjuvants. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 3, p. 1328-1336, 2000

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

ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F.; MCGACHY, H. A.; MCKENZIE, A. N.; WALKER, W.; CARTER, K. C. An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. *European Journal of Immunology*, v. 32, n. 10, p. 2923-2933, 2002

ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.*, v. 6, n. 10, p. 392-401, 1998

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

AZEREDO-COUTINHO, R. B.; CONCEICAO-SILVA, F.; SCHUBACH, A.; CUPOLILLO, E.; QUINTELLA, L. P.; MADEIRA, M. F.; PACHECO, R. S.; VALETE-ROSALINO, C. M.; MENDONCA, S. C. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, v. 101, n. 7, p. 735-737, 2007

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

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A.; ELLINGSWORTH, L. R.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth

factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*, v. 257, n. 5069, p. 545-548, 1992

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Rev.Bras.Epidemiol.*, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004

BEHIN, R.; MAUEL, J.; SORDAT, B. *Leishmania tropica*: pathogenicity and in vitro macrophage function in strains of inbred mice. *Experimental Parasitology*, v. 48, n. 1, p. 81-91, 1979

BELKAID, Y.; BUTCHER, B.; SACKS, D. L. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *European Journal of Immunology*, v. 28, n. 4, p. 1389-1400, 1998

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M. C.; WYNN, T. A.; SACKS, D. L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 194, n. 10, p. 1497-1506, 2001

BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN-TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D. L. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 188, n. 10, p. 1941-1953, 1998

BELKAID, Y.; MENDEZ, S.; LIRA, R.; KADAMBI, N.; MILON, G.; SACKS, D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 2, p. 969-977, 2000a

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

BELKAID, Y.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.; SACKS, D. L.; RIBEIRO, J. M. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 97, n. 12, p. 6704-6709, 2000b

BELKAID, Y.; VON STEBUT, E.; MENDEZ, S.; LIRA, R.; CALER, E.; BERTHOLET, S.; UDEY, M. C.; SACKS, D. CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, v. 168, n. 8, p. 3992-4000, 2002b

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

BELOSEVIC, M.; DAVIS, C. E.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. Lymphokine-induced macrophage resistance to infection with *Leishmania major*. *Adv.Exp.Med.Biol.*, v. 239, n. 239-244, 1988a

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

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin.Infect.Dis.*, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997

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

BIRD, J. J.; BROWN, D. R.; MULLEN, A. C.; MOSKOWITZ, N. H.; MAHOWALD, M. A.; SIDER, J. R.; GAJEWSKI, T. F.; WANG, C. R.; REINER, S. L. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity.*, v. 9, n. 2, p. 229-237, 1998

BOGDAN, C.; PAIK, J.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 32, p. 23301-23308, 1992

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do parasites survive inside macrophages? *Parasitology Today*, v. 15, n. 22-28, 1999

BOURGEOIS, C.; VEIGA-FERNANDES, H.; JORET, A. M.; ROCHA, B.; TANCHOT, C. CD8 lethargy in the absence of CD4 help. *European Journal of Immunology*, v. 32, n. 8, p. 2199-2207, 2002

BROWN, D. R.; REINER, S. L. Polarized helper-T-cell responses against *Leishmania major* in the absence of B cells. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 1, p. 266-270, 1999

CHATELAIN, R.; MAUZE, S.; COFFMAN, R. L. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. *Parasite Immunol.*, v. 21, n. 4, p. 211-218, 1999

- COLMENARES, M.; KIMA, P. E.; SAMOFF, E.; SOONG, L.; MCMAHON-PRATT, D. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 6, p. 3172-3182, 2003
- CONCEICAO-SILVA, F.; HAHNE, M.; SCHROTER, M.; LOUIS, J.; TSCHOPP, J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, v. 28, n. 1, p. 237-245, 1998
- CONSTANT, S. L.; BROGDON, J. L.; PIGGOTT, D. A.; HERRICK, C. A.; VISINTIN, I.; RUDDLE, N. H.; BOTTOMLY, K. Resident lung antigen-presenting cells have the capacity to promote Th2 T cell differentiation in situ. *J.Clin.Invest*, v. 110, n. 10, p. 1441-1448, 2002
- CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; RONDÓN, A. J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect in the host. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, n. 4, p. 603-610, 1972
- CORRALIZA, I. M.; SOLER, G.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 206, n. 2, p. 667-673, 1995
- COURRET, N.; FREHEL, C.; PRINA, E.; LANG, T.; ANTOINE, J. C. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. *Parasitology*, v. 122, n. Pt 3, p. 263-279, 2001
- COURRET, N.; LANG, T.; MILON, G.; ANTOINE, J. C. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int.J.Parasitol.*, v. 33, n. 12, p. 1373-1383, 2003
- DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and Immunity*, v. 55, n. 11, p. 2802-2806, 1987
- DESJEUX, P. Global control and *Leishmania* HIV co-infection. *Clin.Dermatol.*, v. 17, n. 3, p. 317-325, 1999
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. *Nat.Rev.Microbiol.*, v. 2, n. 9, p. 692-2004a
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.*, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004b

DOHERTY, T. M.; COFFMAN, R. L. Leishmania major: effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, v. 84, n. 2, p. 124-135, 1996

EBNER, S.; RATZINGER, G.; KROSBACHER, B.; SCHMUTH, M.; WEISS, A.; REIDER, D.; KROCZEK, R. A.; HEROLD, M.; HEUFLER, C.; FRITSCH, P.; ROMANI, N. Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. *The Journal of Immunology*, v. 166, n. 1, p. 633-641, 2001

EISERT, V.; MUNSTER, U.; SIMON, M. M.; MOLL, H. The course of Leishmania major infection in mice lacking granzyme-mediated mechanisms. *Immunobiology*, v. 205, n. 3, p. 314-320, 2002

ERB, K.; BLANK, C.; RITTER, U.; BLUETHMANN, H.; MOLL, H. Leishmania major infection in major histocompatibility complex class II-deficient mice: CD8+ T cells do not mediate a protective immune response. *Immunobiology*, v. 195, n. 2, p. 243-260, 1996

FARBER, J. M. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *The Journal of Leukocyte Biology*, v. 61, n. 3, p. 246-257, 1997

FARRELL, J. P.; MULLER, I.; LOUIS, J. A. A role for Lyt-2+ T cells in resistance to cutaneous leishmaniasis in immunized mice. *The Journal of Immunology*, v. 142, n. 2052-2056, 1989

FELIZARDO, T. C.; TOMA, L. S.; BORGES, N. B.; LIMA, G. M.; ABRAHAMSOHN, I. A. Leishmania (Leishmania) amazonensis infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. *Parasitology*, v. 134, n. Pt 12, p. 1699-1707, 2007

FENG, G. J.; GOODRIDGE, H. S.; HARNETT, M. M.; WEI, X. Q.; NIKOLAEV, A. V.; HIGSON, A. P.; LIEW, F. Y. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *The Journal of Immunology*, v. 163, n. 12, p. 6403-6412, 1999

FIorentino, D. F.; Slotnik, A.; Mosmann, T. R.; Howard, M.; O'Garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 147, n. 3815-3822, 1991a

FIorentino, D. F.; Zlotnik, A.; Vieira, P.; Mosmann, T. R.; Howard, M.; Moore, K. W.; O'Garra, A. IL-10 Acts on the Antigen-Presenting Cell to Inhibit Cytokine Production by Th1 Cells. *The Journal of Immunology*, v. 146, n. 3444-3451, 1991b

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

FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K. J.; PFEFFER, K.; LOWENSTEIN, C. J.; SCHREIBER, R.; MAK, T. W.; BLOOM, B. R. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*, v. 2, n. 6, p. 561-572, 1995

FONTENEAU, J. F.; KAVANAGH, D. G.; LIRVALL, M.; SANDERS, C.; COVER, T. L.; BHARDWAJ, N.; LARSSON, M. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood*, v. 102, n. 13, p. 4448-4455, 2003

FRISCHHOLZ, S.; ROLLINGHOFF, M.; MOLL, H. Cutaneous leishmaniasis: coordinate expression of granzyme A and lymphokines by CD4+ T cells from susceptible mice. *Immunology*, v. 82, n. 2, p. 255-260, 1994

GIL, L. H.; BASANO, S. A.; SOUZA, A. A.; SILVA, M. G.; BARATA, I.; ISHIKAWA, E. A.; CAMARGO, L. M.; SHAW, J. J. Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 6, p. 751-755, 2003

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P. T.; PEREIRA, J. M.; RILEY, L. W.; WILSON, M. E.; HO, J. L.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC.Infect.Dis.*, v. 7, n. 7-2007

GOMES, C. M.; GOTO, H.; CORBETT, C. E.; GIDLUND, M. Insulin-like growth factor-1 is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes. *Acta Tropica*, v. 64, n. 3-4, p. 225-228, 1997

GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F.; TAVARES, Rda S.; WIETZERBIN, J.; DE FREITAS, L. A.; VERAS, P. S. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes.Infect.*, v. 5, n. 4, p. 251-260, 2003

GONZÁLEZ-LOMBANA, C. Z.; SANTIAGO, H. C.; MACEDO, J. P.; SEIXAS, V. A. R.; RUSSO, R. C.; TAFURI, W. L.; AFONSO, L. C. C.; VIEIRA, L. Q. Early infection with *Leishmania major* restrain pathogenic response to *L. amazonensis* and parasite growth. *Acta Tropica*, v. in press, n. 2008

GORELİK, L.; CONSTANT, S.; FLAVELL, R. A. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 195, n. 11, p. 1499-1505, 2002

GOTO, H.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E.; MONTEIRO, H. P.; GIDLUND, M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 95, n. 22, p. 13211-13216, 1998

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 131-138, 1982

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

GREEN, S. J.; MELLOUK, S.; HOFFMAN, S. L.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunology Letters*, v. 25, n. 1-3, p. 15-19, 1990b

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

GREENBLATT, C. L.; HANDMAN, E.; MITCHELL, G. F.; BATTYE, F. L.; SCHNUR, L. F.; SNARY, D. Phenotypic diversity of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. *Z.Parasitenkd.*, v. 71, n. 2, p. 141-157, 1985

GROUX, H.; COTTREZ, F.; ROULEAU, M.; MAUZE, S.; ANTONENKO, S.; HURST, S.; MCNEIL, T.; BIGLER, M.; RONCAROLO, M. G.; COFFMAN, R. L. A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *The Journal of Immunology*, v. 162, n. 3, p. 1723-1729, 1999

GUERMONPREZ, P.; AMIGORENA, S. Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin.Immunopathol.*, v. 26, n. 3, p. 257-271, 2005

GUERY, J. C.; GALBIATI, F.; SMIROLDO, S.; ADORINI, L. Selective development of T helper (Th)2 cells induced by continuous administration of low dose soluble proteins to normal and beta(2)-microglobulin-deficient BALB/c mice. *J.Exp.Med.*, v. 183, n. 2, p. 485-497, 1996

GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Response of scid mice to establishment of *Leishmania major* infection. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 100, n. 3, p. 440-445, 1995

HEINZEL, F. P.; RERKO, R. M.; AHMED, F.; PEARLMAN, E. Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. *The Journal of Immunology*, v. 155, n. 2, p. 730-739, 1995

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or IL4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 169, n. 59-72, 1989

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; MUTHA, S. S.; LOCKSLEY, R. M. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 88, n. 16, p. 7011-7015, 1991

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

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. *Clin.Exp.Dermatol.*, v. 25, n. 5, p. 363-370, 2000

HERATH, S.; KROPF, P.; MULLER, I. Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. *Parasite Immunol.*, v. 25, n. 11-12, p. 559-567, 2003

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

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

HIMMELRICH, H.; PARRA-LOPEZ, C.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor β 2-chain expression on CD4⁺ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. *The Journal of Immunology*, v. 161, n. 11, p. 6156-6163, 1998

HOCHREIN, H.; O'KEEFFE, M.; LUFT, T.; VANDENABEELE, S.; GRUMONT, R. J.; MARASKOVSKY, E.; SHORTMAN, K. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 192, n. 6, p. 823-833, 2000

HOERAUF, A.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M.; GESSNER, A. Effect of IL-7 treatment on Leishmania major-infected BALB.Xid mice: enhanced lymphopoiesis with sustained lack of B1 cells and clinical aggravation of disease. *Int.Immunol.*, v. 7, n. 11, p. 1879-1884, 1995

HOLADAY, B. J.; POMPEU, M. M.; EVANS, T.; BRAGA, D. N.; TEXEIRA, M. J.; SOUSA, Ade Q.; SADICK, M. D.; VASCONCELOS, A. W.; ABRAMS, J. S.; PEARSON, R. D.; . Correlates of Leishmania-specific immunity in the clinical spectrum of infection with Leishmania chagasi. *Journal of Infectious Diseases*, v. 167, n. 2, p. 411-417, 1993

HOLADAY, B. J.; SADICK, M. D.; WANG, Z. E.; REINER, S. L.; HEINZEL, F. P.; PARSLOW, T. G.; LOCKSLEY, R. M. Reconstitution of Leishmania immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1- and Th2-like cell lines. *The Journal of Immunology*, v. 147, n. 5, p. 1653-1658, 1991

HOSKEN, N. A.; SHIBUYA, K.; HEATH, A. W.; MURPHY, K. M.; O'GARRA, A. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J.Exp.Med.*, v. 182, n. 5, p. 1579-1584, 1995

HOUDE, M.; BERTHOLET, S.; GAGNON, E.; BRUNET, S.; GOYETTE, G.; LAPLANTE, A.; PRINCIOTTA, M. F.; THIBAUT, P.; SACKS, D.; DESJARDINS, M. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, v. 425, n. 6956, p. 402-406, 2003

HUANG, F. P.; NIEBALA, W.; WEI, X. Q.; XU, D.; FENG, G. J.; ROBINSON, J. H.; LAM, C.; LIEW, F. Y. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *European Journal of Immunology*, v. 28, n. 12, p. 4062-4070, 1998a

HUANG, F. P.; XU, D.; ESFANDIARI, E. O.; SANDS, W.; WEI, X. Q.; LIEW, F. Y. Mice defective in Fas are highly susceptible to Leishmania major infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. *The Journal of Immunology*, v. 160, n. 9, p. 4143-4147, 1998b

HUBER, M.; TIMMS, E.; MAK, T. W.; LLINGHOFF, M.; LOHOFF, M. Effective and Long-Lasting Immunity against the Parasite *Leishmania major* in CD8-Deficient Mice. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 3968-3970, 1998

INIESTA, V.; CARCELEN, J.; MOLANO, I.; PEIXOTO, P. M.; REDONDO, E.; PARRA, P.; MANGAS, M.; MONROY, I.; CAMPO, M. L.; NIETO, C. G.;

CORRALIZA, I. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 9, p. 6085-6090, 2005

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

ISSEKUTZ, T. B.; STOLTZ, J. M.; VAN DER, Meide P. The recruitment of lymphocytes into the skin by T cell lymphokines: the role of gamma-interferon. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 73, n. 1, p. 70-75, 1988

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

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

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

JONES, D. E.; ACKERMANN, M. R.; WILLE, U.; HUNTER, C. A.; SCOTT, P. Early Enhanced Th1 Response after *Leishmania amazonensis* Infection of C57BL/6 Interleukin-10-Deficient Mice Does Not Lead to Resolution of Infection. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 4, p. 2151-2158, 2002

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

KALINSKI, P.; SMITS, H. H.; SCHUITEMAKER, J. H.; VIEIRA, P. L.; VAN EIJK, M.; DE JONG, E. C.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG, M. L. IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 4, p. 1877-1881, 2000

KANALY, S. T.; NASHLEANAS, M.; HONDOWICZ, B.; SCOTT, P. TNF receptor p55 is required for elimination of inflammatory cells following control of intracellular pathogens. *The Journal of Immunology*, v. 163, n. 7, p. 3883-3889, 1999

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

- KAPLAN, G.; MATHUR, N. K.; JOB, C. K.; NATH, I.; COHN, Z. A. Effect of multiple interferon gamma injections on the disposal of *Mycobacterium leprae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 86, n. 20, p. 8073-8077, 1989
- KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology*, v. 133 Suppl, n. S87-112, 2006
- KHAMESIPOUR, A.; DOWLATI, Y.; ASILIAN, A.; HASHEMI-FESHARKI, R.; JAVADI, A.; NOAZIN, S.; MODABBER, F. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine*, v. 23, n. 28, p. 3642-3648, 2005
- KIMA, P. E.; CONSTANT, S. L.; HANNUM, L.; COLMENARES, M.; LEE, K. S.; HABERMAN, A. M.; SHLOMCHIK, M. J.; MCMAHON-PRATT, D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 191, n. 6, p. 1063-1068, 2000
- KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M.; ROCK, K. L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science*, v. 267, n. 5195, p. 243-246, 1995
- KUCHROO, V. K.; DAS, M. P.; BROWN, J. A.; RANGER, A. M.; ZAMVIL, S. S.; SOBEL, R. A.; WEINER, H. L.; NABAVI, N.; GLIMCHER, L. H. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*, v. 80, n. 5, p. 707-718, 1995
- KULIDJIAN, A. A.; ISSEKUTZ, A. C.; ISSEKUTZ, T. B. Differential role of E-selectin and P-selectin in T lymphocyte migration to cutaneous inflammatory reactions induced by cytokines. *Int.Immunol.*, v. 14, n. 7, p. 751-760, 2002
- LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983
- LANG, T.; COURRET, N.; COLLE, J. H.; MILON, G.; ANTOINE, J. C. The levels and patterns of cytokines produced by CD4 T lymphocytes of BALB/c mice infected with *Leishmania major* by inoculation into the ear dermis depend on the infectiousness and size of the inoculum. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 5, p. 2674-2683, 2003
- LATTIME, S. C.; STOPACCIARO, A.; STUTMAN, O. Limiting dilution analysis of TNF producing cells in C3H/HeJ mice. *The Journal of Immunology*, v. 141, n. 3422-3428, 1988
- LAUNOIS, P.; GUMY, A.; HIMMELRICH, H.; LOCKSLEY, R. M.; ROCKEN, M.; LOUIS, J. A. Rapid IL-4 production by *Leishmania* homolog of mammalian RACK1-

reactive CD4(+) T cells in resistant mice treated once with anti-IL-12 or -IFN-gamma antibodies at the onset of infection with *Leishmania major* instructs Th2 cell development, resulting in nonhealing lesions. *The Journal of Immunology*, v. 168, n. 9, p. 4628-4635, 2002

LAUNOIS, P.; MAILLARD, I.; PINGEL, S.; SWIHART, K. G.; XÉNARIOS, I.; ACHA-ORBEA, H.; DIGGELMAN, H.; LOCKSLEY, R. M.; MACDONALD, H. R.; LOUIS, J. A. IL-4 rapidly produced by V β 4 V α 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity*, v. 6, n. 541-549, 1997

LAUNOIS, P.; OHTEKI, T.; SWIHART, K.; MACDONALD, H. R.; LOUIS, J. A. In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1.1-. *European Journal of Immunology*, v. 25, n. 12, p. 3298-3307, 1995

LEIST, M.; GANTNER, F.; BOHLINGER, I.; TIEGS, G.; GERMANN, P. G.; WENDEL, A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am.J.Pathol.*, v. 146, n. 5, p. 1220-1234, 1995

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

LEON, L. L.; MACHADO, G. M.; PAES, L. E.; GRIMALDI, Junior G. Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 84, n. 5, p. 678-680, 1990

LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology*, v. 16, n. 137-161, 1998

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

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*, v. 71, n. 556-559, 1990a

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *The Journal of Immunology*, v. 145, n. 4306-4310, 1990b

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; LI, Y.; LELCHUK, R.; CHAN, W. L.; ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)3 and IL4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, v. 19, n. 7, p. 1227-1232, 1989

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *The Journal of Immunology*, v. 144, n. 12, p. 4794-4797, 1990a

LIEW, F. Y.; PARKINSON, C.; MILLOTT, S.; SEVERN, A.; CARRIER, M. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology*, v. 69, n. 4, p. 570-573, 1990b

LINARES, E.; AUGUSTO, O.; BARAO, S. C.; GIORGIO, S. Leishmania amazonensis infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide in vivo. *J.Parasitol.*, v. 86, n. 1, p. 78-82, 2000

LIRA, R.; DOHERTY, M.; MODI, G.; SACKS, D. Evolution of lesion formation, parasitic load, immune response, and reservoir potential in C57BL/6 mice following. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 9, p. 5176-5182, 2000

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 265-275, 1951

LUSTER, A. D. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr.Opin.Immunol.*, v. 14, n. 1, p. 129-135, 2002

MA, X.; CHOW, J. M.; GRI, G.; CARRA, G.; GEROSA, F.; WOLF, S. F.; DZIALO, R.; TRINCHIERI, G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon- γ in monocytic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 183, n. 147-157, 1996

MACATONIA, S. E.; DOHERTY, T. M.; KNIGHT, S. C.; O'GARRA, A. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *The Journal of Immunology*, v. 150, n. 9, p. 3755-3765, 1993

MACKAY, C. R. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat.Immunol.*, v. 2, n. 2, p. 95-101, 2001

MACKAY, F.; LOETSCHER, H.; STUEBER, D.; GEHR, G.; LESSLAUER, W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 177, n. 5, p. 1277-1286, 1993

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

MATTNER, F.; MAGRAM, J.; FERRANTE, J.; LAUNOIS, P.; DI, Padova K.; BEHIN, R.; GATELY, M. K.; LOUIS, J. A.; ALBER, G. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with Leishmania major and mount a polarized Th2 cell response. *European Journal of Immunology*, v. 26, n. 7, p. 1553-1559, 1996

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol.Rev.*, v. 201, n. 206-224, 2004

MELIEF, C. J. Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *European Journal of Immunology*, v. 33, n. 10, p. 2645-2654, 2003

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

MILON, G.; TITUS, R. G.; CEROTTINI, J. C.; MARCHAL, G.; LOUIS, J. A. Higher frequency of Leishmania major-specific L3T4+ T cells in susceptible BALB/c as compared with resistant CBA mice. *The Journal of Immunology*, v. 136, n. 4, p. 1467-1471, 1986

MITCHELL, G. F. Murine cutaneous leishmaniasis: resistance in reconstituted nude mice and several F1 hybrids infected with Leishmania tropica major. *J.Immunogenet.*, v. 10, n. 5, p. 395-412, 1983

MITCHELL, G. F.; CURTIS, J. M.; SCOLLAY, R. G.; HANDMAN, E. Resistance and abrogation of resistance to cutaneous leishmaniasis in reconstituted BALB/c nude mice. *Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci.*, v. 59, n. Pt 5, p. 539-554, 1981

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

MOLL, H.; MULLER, C.; GILLITZER, R.; FUCHS, H.; ROLLINGHOFF, M.; SIMON, M. M.; KRAMER, M. D. Expression of T-cell-associated serine proteinase 1 during murine Leishmania major infection correlates with susceptibility to disease. *Infect.Immun.*, v. 59, n. 12, p. 4701-4705, 1991

MOORE, K. W.; O'GARRA, A.; DE WAAL, Malefyt R.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R. Interleukin-10. *Annual Review of Immunology*, v. 11, n. 165-190, 1993

MORTATTI, R. C.; HENRIQUES, A. Experimental cutaneous leishmaniasis by *Leishmania amazonensis*: course of fast-growth infection in the mouse ear. *Parasitology Research*, v. 76, n. 8, p. 729-730, 1990

MOSMANN, T. R. Properties and functions of interleukin-10. *Adv.Immunol.*, v. 56, n. 1-26, 1994

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, v. 7, n. 145-173, 1989

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

MULLER, I.; KROPF, P.; LOUIS, J. A.; MILON, G. Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 6, p. 2575-2581, 1994

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

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

NADIM, A; JAVADIAN, E. Leishmanization in the Islamic Republic of Iran. *Research on control strategies for leishmaniasis*, v. 336-339, 1988

NASHLEANAS, M.; SCOTT, P. Activated T cells induce macrophages to produce NO and control *Leishmania major* in the absence of tumor necrosis factor receptor p55. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 3, p. 1428-1434, 2000

NISHIKOMORI, R.; GURUNATHAN, S.; NISHIKOMORI, K.; STROBER, W. BALB/c mice bearing a transgenic IL-12 receptor beta 2 gene exhibit a nonhealing phenotype to *Leishmania major* infection despite intact IL-12 signaling. *The Journal of Immunology*, v. 166, n. 11, p. 6776-6783, 2001

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

NOBEN-TRAUTH, N.; PAUL, W. E.; SACKS, D. L. IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. *The Journal of Immunology*, v. 162, n. 10, p. 6132-6140, 1999

OVERATH, P.; HARBECKE, D. Course of *Leishmania* infection in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Immunology Letters*, v. 37, n. 1, p. 13-17, 1993

PADIGEL, U. M.; FARRELL, J. P. Control of infection with *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice lacking the common gamma-chain for FcR is associated with reduced production of IL-10 and TGF-beta by parasitized cells. *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 10, p. 6340-6345, 2005

PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B. D.; SCOTT, P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology*, v. 168, n. 6, p. 896-2000

PFEFFER, K.; MATSUYAMA, T.; KUNDIG, T. M.; WAKEHAM, A.; KISHIHARA, K.; SHAHINIAN, A.; WIEGMANN, K.; OHASHI, P. S.; KRONKE, M.; MAK, T. W. Mice deficient for the 55 kD tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*, v. 73, n. 3, p. 457-467, 1993

PINGEL, S.; LAUNOIS, P.; FOWELL, D. J.; TURCK, C. W.; SOUTHWOOD, S.; SETTE, A.; GLAICHENHAUS, N.; LOUIS, J. A.; LOCKSLEY, R. M. Altered ligands reveal limited plasticity in the T cell response to a pathogenic epitope. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 189, n. 7, p. 1111-1120, 1999

PINHEIRO, C. M.; MARTINS-DUARTE, E. S.; FERRARO, R. B.; FONSECA DE SOUZA, A. L.; GOMES, M. T.; LOPES, A. H.; VANNIER-SANTOS, M. A.; SANTOS, A. L.; MEYER-FERNANDES, J. R. *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Experimental Parasitology*, v. 114, n. 1, p. 16-25, 2006

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

PINTO, E. F.; PINHEIRO, R. O.; RAYOL, A.; LARRAGA, V.; ROSSI-BERGMANN, B. Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 8, p. 4521-4527, 2004

PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEICAO-SILVA, F.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J.Clin.Invest*, v. 91, n. 4, p. 1390-1395, 1993

PRINA, E.; JOUANNE, C.; DE SOUZA, Lao S.; SZABO, A.; GUILLET, J. G.; ANTOINE, J. C. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. *The Journal of Immunology*, v. 151, n. 4, p. 2050-2061, 1993

PROUDFOOT, L.; NIKOLAEV, A. V.; FENG, G. J.; WEI, W. Q.; FERGUSON, M. A.; BRIMACOMBE, J. S.; LIEW, F. Y. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 93, n. 20, p. 10984-10989, 1996

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

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

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

REINER, S. L.; ZHENG, S.; WANG, Z. E.; STOWRING, L.; LOCKSLEY, R. M. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 179, n. 2, p. 447-456, 1994

REY, A.; QUARTULLI, F.; ESCOUBET, L.; SOZZANI, P.; CAPUT, D.; FERRARA, P.; PIPY, B. IL-13 induces serine phosphorylation of cPLA2 in mouse peritoneal macrophages leading to arachidonic acid and PGE2 production and blocks the zymosan-induced serine phosphorylation of cPLA2 and eicosanoid production. *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1440, n. 2-3, p. 183-193, 1999

ROGERS, M. E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A. V.; FERGUSON, M. A.; BATES, P. A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, v. 430, n. 6998, p. 463-467, 2004

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002

- SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology*, v. 69, n. 100-103, 1989
- SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, v. 223, n. 4643, p. 1417-1419, 1984
- SADICK, M. D.; HEINZEL, F. P.; HOLADAY, B. J.; PU, R. T.; DAWKINS, R. S.; LOCKSLEY, R. M. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 171, n. 115-127, 1990
- SALGAME, P.; ABRAMS, J. S.; CLAYBERGER, C.; GOLDSTEIN, H.; CONVIT, J.; MODLIN, R. L.; BLOOM, B. R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*, v. 254, n. 5029, p. 279-282, 1991
- SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; MACKAY, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology Today*, v. 19, n. 12, p. 568-574, 1998
- SALLUSTO, F.; SCHAERLI, P.; LOETSCHER, P.; SCHANIEL, C.; LENIG, D.; MACKAY, C. R.; QIN, S.; LANZAVECCHIA, A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology*, v. 28, n. 9, p. 2760-2769, 1998
- SANTIAGO, H. C.; BRAGA PIRES, M. F.; SOUZA, D. G.; ROFFE, E.; CORTES, D. F.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; VIEIRA, L. Q. Platelet activating factor receptor-deficient mice present delayed interferon-gamma upregulation and high susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Microbes.Infect.*, v. 8, n. 11, p. 2569-2577, 2006
- SANTIAGO, Hda C.; OLIVEIRA, C. F.; SANTIAGO, L.; FERRAZ, F. O.; DE SOUZA, Dda G.; DE FREITAS, L. A.; AFONSO, L. C.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q. Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 8, p. 4918-4923, 2004
- SARAVIA, N. G.; VALDERRAMA, L.; LABRADA, M.; HOLGUÍN, A. F.; NAVAS, C.; PALMA, G.; WEIGLE, K. A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 159, n. 4, p. 725-735, 1989
- SCHOENBERGER, S. P.; TOES, R. E.; VAN, der, V; OFFRINGA, R.; MELIEF, C. J. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, v. 393, n. 6684, p. 480-483, 1998

- SCOTT, P. Impaired macrophage leishmanicidal activity at cutaneous temperature. *Parasite Immunol.*, v. 7, n. 3, p. 277-288, 1985
- SCOTT, P. IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 147, n. 3149-3155, 1991
- SCOTT, P.; CASPAR, P.; SHER, A. Protection against *Leishmania major* in BALB/c mice by adoptive transfer of a T cell clone recognizing a low molecular weight antigen released by promastigotes. *The Journal of Immunology*, v. 144, n. 3, p. 1075-1079, 1990
- SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of the cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 168, n. 1675-1684, 1988
- SCOTT, P.; SACKS, D.; SHER, A. Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 131, n. 2, p. 966-971, 1983
- SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 89, n. 3, p. 471-478, 1994
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. v. 2005
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; DE SOUZA, A. A.; ISHIKAWA, E. A.; BRAGA, R. R. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 6, p. 735-738, 1991
- SKEEN, M. J.; MILLER, M. A.; SHINNICK, T. M.; ZIEGLER, H. K. Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines. *The Journal of Immunology*, v. 156, n. 3, p. 1196-1206, 1996
- SOONG, L.; CHANG, C. H.; SUN, J.; LONGLEY, B. J., Jr.; RUDDLE, N. H.; FLAVELL, R. A.; MCMAHON-PRATT, D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis

associated with *Leishmania amazonensis* infection. *The Journal of Immunology*, v. 158, n. 11, p. 5374-5383, 1997

SOONG, L.; XU, J.-C.; GREWAL, I. S.; KIMA, P. E.; SUN, J.; MCMAHON-PRATT, D.; FLAVELL, R. A. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity*, v. 4, n. 263-273, 1996

SPATH, G. F.; EPSTEIN, L.; LEADER, B.; SINGER, S. M.; AVILA, H. A.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 97, n. 16, p. 9258-9263, 2000

STEINBRINK, K.; SCHONLAU, F.; RESCHER, U.; HENSELEIT, U.; VOGEL, T.; SORG, C.; SUNDERKOTTER, C. Ineffective elimination of *Leishmania major* by inflammatory (MRP14-positive) subtype of monocytic cells. *Immunobiology*, v. 202, n. 5, p. 442-459, 2000

STENGER, S.; DONHAUSER, N.; THÜRING, H.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 183, n. 1501-1514, 1996

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

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; MANNING, P.; BOGDAN, C. L-N⁶-(1-iminoethyl)-lysine potently inhibits inducible nitric oxide synthase and is superior to NG-monomethyl-arginine in vitro and in vivo. *Eur.J.Pharmacol.*, v. 294, n. 2-3, p. 703-712, 1995

STEVENS, B. R.; KAKUDA, D. K.; YU, K.; WATERS, M.; VO, C. B.; RAIZADA, M. K. Induced nitric oxide synthesis is dependent on induced alternatively spliced CAT-2 encoding L-arginine transport in brain astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 39, p. 24017-24022, 1996

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

SUNDERKÖTTER, C.; KUNZ, M.; STEINBRINK, K.; MEINARDUS-HAGER, G.; GOEBELER, M.; BILDAU, H.; SORG, C. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in fitro and in vivo. *Journal of Immunology*, v. 151, n. 4891-4901, 1993

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

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

SZABO, S. J.; DIGHE, A. S.; GUBLER, U.; MURPHY, K. M. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 185, n. 5, p. 817-824, 1997

TAKEUCHI, M.; ALARD, P.; STREILEIN, J. W. TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *The Journal of Immunology*, v. 160, n. 4, p. 1589-1597, 1998

TARTAGLIA, L. A.; AYRES, T. M.; WONG, G. H.; GOEDDEL, D. V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, v. 74, n. 5, p. 845-853, 1993

TERABE, M.; KURAMOCHI, T.; HATABU, T.; ITO, M.; UEYAMA, Y.; KATAKURA, K.; KAWAZU, S.; ONODERA, T.; MATSUMOTO, Y. Non-ulcerative cutaneous lesion in immunodeficient mice with *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitol.Int.*, v. 48, n. 1, p. 47-53, 1999

TERABE, M.; KURAMOCHI, T.; ITO, M.; HATABU, T.; SANJOBA, C.; CHANG, K. P.; ONODERA, T.; MATSUMOTO, Y. CD4⁺ cells are indispensable for ulcer development in murine cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 8, p. 4574-4577, 2000

TITUS, R. G.; MILON, G.; MARCHAL, G.; VASSALLI, P.; CEROTTINI, J. C.; LOUIS, J. A. Involvement of specific Lyt-2⁺ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, v. 17, n. 10, p. 1429-1433, 1987

TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 2, n. 10, p. 735-747, 2002

UZONNA, J. E.; JOYCE, K. L.; SCOTT, P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8⁺ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 199, n. 11, p. 1559-1566, 2004

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

VARKILA, K.; CHATELAIN, R.; LEAL, L. M.; COFFMAN, R. L. Reconstitution of C.B-17 scid mice with BALB/c T cells initiates a T helper type-1 response and renders them capable of healing *Leishmania major* infection. *European Journal of Immunology*, v. 23, n. 1, p. 262-268, 1993

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu.Rev.Immunol.*, v. 10, n. 411-452, 1992

VENDRAME, C. M.; CARVALHO, M. D.; RIOS, F. J.; MANULI, E. R.; PETITTO-ASSIS, F.; GOTO, H. Effect of insulin-like growth factor-I on *Leishmania amazonensis* promastigote arginase activation and reciprocal inhibition of NOS2 pathway in macrophage in vitro. *Scand.J.Immunol.*, v. 66, n. 2-3, p. 287-296, 2007

VIEIRA, L. Q.; GOLDSCHMIDT, M.; NASHLEANAS, M.; PFEFFER, K.; T., Mak.; SCOTT, P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *The Journal of Immunology*, v. 157, n. 827-835, 1996

VIETH, M.; WILL, A.; SCHROPPEL, K.; ROLLINGHOFF, M.; GESSNER, A. Interleukin-10 inhibits antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. *Scand.J.Immunol.*, v. 40, n. 4, p. 403-409, 1994

VODOVOTZ, Y.; BOGDAN, C.; PAIK, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 178, n. 2, p. 605-613, 1993

WAKIL, A. E.; WANG, Z. E.; RYAN, J. C.; FOWELL, D. J.; LOCKSLEY, R. M. Interferon γ derived from CD4⁺ T cells is sufficient to mediate T helper cell type 1 development. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 188, n. 9, p. 1651-1656, 1998

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

WANASEN, N.; XIN, L.; SOONG, L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int.J.Parasitol.*, v. 2007

WANDERLEY, J. L.; MOREIRA, M. E.; BENJAMIN, A.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine

participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *The Journal of Immunology*, v. 176, n. 3, p. 1834-1839, 2006

WANG, Z.-E.; REINER, S. L.; HATAM, F.; HEINZEL, F. P.; BOUVIER, J.; TURCK, C. W.; LOCKSLEY, R. M. Targeted activation of CD8 cells and infection of β_2 -microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 151, n. 2077-2086, 1993

WANG, Z.-E.; REINER, S. L.; ZHENG, S.; DALTON, D. K.; LOCKSLEY, R. M. CD4⁺ Effector cells default to the Th2 pathway in Interferon γ -deficient mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 179, n. 1367-1371, 1994

WARBURG, A.; SCHLEIN, Y. The effect of post-blood-meal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 35, n. 926-930, 1986

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

WILHELM, P.; RITTER, U.; LABBOW, S.; DONHAUSER, N.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C.; KORNER, H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *The Journal of Immunology*, v. 166, n. 6, p. 4012-4019, 2001

WONG, G. H.; GOEDDEL, D. V. Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways. *The Journal of Immunology*, v. 152, n. 4, p. 1751-1755, 1994

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organization Technical Report Series*, v. 793, n. 1-158, 1990

WU, C. Y.; WANG, K.; MCDYER, J. F.; SEDER, R. A. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *The Journal of Immunology*, v. 161, n. 6, p. 2723-2730, 1998

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

YERAMIAN, A.; MARTIN, L.; ARPA, L.; BERTRAN, J.; SOLER, C.; MCLEOD, C.; MODOLELL, M.; PALACIN, M.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. *European Journal of Immunology*, v. 36, n. 6, p. 1516-1526, 2006

ZAPH, C.; SCOTT, P. Interleukin-12 regulates chemokine gene expression during the early immune response to *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 3, p. 1587-1589, 2003