



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**  
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**Dissertação de Mestrado**

**Desenvolvimento de um modelo experimental para  
Leishmaniose Tegumentar Americana utilizando *Leishmania  
braziliensis*.**

**Tatiana Rodrigues de Moura**

Salvador – Bahia - Brasil

2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**Desenvolvimento de um modelo experimental para  
Leishmaniose Tegumentar Americana utilizando *Leishmania  
braziliensis*.**

**Tatiana Rodrigues de Moura**

**Orientadora: Camila Indiani de Oliveira**

Dissertação apresentada  
para a obtenção do grau de  
Mestre em Patologia  
Experimental

Salvador – Bahia - Brasil

2004

**Desenvolvimento de um modelo experimental para  
Leishmaniose Tegumentar Americana utilizando *Leishmania  
braziliensis*.**

**Tatiana Rodrigues de Moura**

FOLHA DE APROVAÇÃO  
COMISSÃO EXAMINADORA

---

Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu  
Professora Adjunta da UFCE

---

Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras  
Pesquisadora Adjunta do  
CPqGM-FIOCRUZ

---

Dra. Camila Indiani de Oliveira  
Orientadora  
Pesquisadora Visitante do CNPq

# DEDICATÓRIA

---

A Deus, que dá ao homem conhecimento e ensina o mortal a compreensão, por ser o meu caminho, a minha verdade e a minha vida.

Aos meus amados pais, Luiz e Maria, e aos meus queridos irmãos, Luiza e Sérgio, por me cercarem de amor, confiança e paz.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Camila Indiani de Oliveira pela orientação e convivência enriquecedora.

Aldina Barral e Manoel Barral-Netto pela acolhida e pela contribuição intelectual de valor inestimável.

Cláudia Brodskyn pelas sugestões e comentários durante o desenvolvimento desta dissertação.

Fernanda Novais, Maria Jania Teixeira, Jorge Clarêncio e Almério Noronha pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos Amigos do laboratório pela convivência agradável e estimulante.

Aos alunos da pós-graduação em especial a minha amiga Cynara pelo imenso apoio e preciosa amizade.

Aos professores do curso de pós-graduação pelo empenho nas suas atividades de ensino.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, pela disponibilidade no atendimento das solicitações, em especial a Rosália Meires, Iumara Evangelista e Roberta Lopes.

À equipe do biotério pela colaboração com o fornecimento dos animais.  
A FAPESB, CNPq e PAPES/FIOCRUZ.

# SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	<b>14</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>15</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 LEISHMANIOSE .....	17
1.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA) .....	20
1.3 FORMAS CLÍNICAS DA LTA .....	20
<i>Leishmaniose cutânea localizada (LCL)</i> .....	20
<i>Leishmaniose cutânea mucosa (LCM)</i> .....	21
<i>Leishmaniose cutânea difusa (LCD)</i> .....	22
1.4 MODELOS EXPERIMENTAIS NA LEISHMANIOSE .....	23
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>30</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>30</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>4 DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>31</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
5.1 ANIMAIS .....	32
5.2 PARASITAS .....	32
5.3 INFECÇÃO INTRADÉRMICA.....	32
5.3.1 MENSURAÇÃO DA LESÃO .....	33
5.4 HISTOPATOLOGIA.....	33
5.5 CARGA PARASITÁRIA.....	33
5.6 DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA LEISHMANIA BRAZILIENSIS .....	34
5.7 RE-ESTIMULAÇÃO IN VITRO .....	35
5.8 DETECÇÃO DE CITOCINAS PELO MÉTODO DE ELISA .....	35
5.9 DETECÇÃO DE CITOCINAS INTRACELULARES PELO MÉTODO DE CITOMETRIA DE FLUXO .....	36
5.10 DETECÇÃO DE QUIMIOCINAS PELO MÉTODO DE RT-PCR .....	37
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
6.1 CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM L. BRAZILIENSIS NA DERME DE ORELHA DESENVOLVEM LESÕES QUE MIMETIZAM A LTA HUMANA. ....	40
6.3 O INFILTRADO INFLAMATÓRIO FOI CONSTITUÍDO POR CÉLULAS MONONUCLEARES E POLIMORFONUCLEARES. ....	44
6.4 OS ANTICORPOS ANTI-LEISHMANIA FORAM DETECTADOS A PARTIR DA QUARTA SEMANA APÓS A INFECÇÃO. ....	50
6.5 QUIMIOCINAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA IMUNE TH1 FORAM SIGNIFICATIVAMENTE PRODUZIDAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA LESÃO. ....	51
6.6 IFN- $\gamma$ FOI CONSTANTEMENTE PRODUZIDO NO SOBRENADANTES DE CULTURA DE CÉLULAS RE-ESTIMULADAS IN VITRO. ....	53
6.7. IFN- $\gamma$ FOI CONSTANTEMENTE PRODUZIDO POR CÉLULAS CD4 <sup>+</sup> ENQUANTO QUE A EXPRESSÃO DE IL-4 E IL-10 ACOMPANHARAM O CURSO DA LESÃO. ....	55
6.8. A POPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD8 <sup>+</sup> EXPRESSA IFN- $\gamma$ EM NÍVEIS ELEVADOS. ....	57
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>9 CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>70</b>

<b>ANEXO 1-TABELA COM TAMANHO DA LESÃO DE CADA ANIMAL APÓS A INOCULAÇÃO COM 10<sup>5</sup> <i>L. BRAZILIENSIS</i> NA DERME DA ORELHA. -----</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO 2-TABELA DA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA LESÃO DE ANIMAIS INFECTADOS COM 10<sup>5</sup> <i>L. BRAZILIENSIS</i> NA DERME DA ORELHA. -----</b>	<b>89</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

APC -Célula apresentadora de antígenos

DTH - Hipersensibilidade Tipo Tardia

CCL - C-C quimiocina ligante

CXCL - CXC quimiocina ligante

ELISA - Ensaio Imunoenzimático

Cy - "CyChrome"

FACS – "Fluorescence Activated Cell Sorting"

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

H&E- Hematoxilina e eosina

IFN- $\gamma$  - Interferon gama

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-8 - Interleucina 8

KC - "Keratinocyte-derived chemokine"

LPS - Lipopolissacarídeo

MCP-1 – "Monocyte chemoattractant protein 1"

MIP-1 $\alpha$  – "Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ "

MIP-1 $\beta$  – "Macrophage inflammatory protein 1 $\beta$ "

RANTES - "Regulated on activation, normal T cell expressed"

IP10 - "Gamma interferon-inducible protein 10"

NK - "Natural Killer"

NO - Óxido nítrico

PBS - Tampão-fosfato salina (fosfato de sódio 40%/ fosfato de potássio 10%/ cloreto de sódio 45%)

PCR - Reação de Polimerase em Cadeia

PE - Ficoeritrina

PMN - Polimorfonucleares

RT-PCR – "Reverse Transcriptase" PCR

SGS - Sonicado de Glândula Salivar

TBE - Tris Borato EDTA

TGF- $\beta$  - Fator Transformador do Crescimento beta

Th1 – "T helper 1"

Th2 – "T helper 2"

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa

## LISTA DE FIGURAS

---

**Figura 1.** Ciclo biológico da *Leishmania* sp. p 18

**Figura 2.** Curso do desenvolvimento da lesão de camundongos BALB/C (grupo de 14 animais) infectados com  $10^5$  promastigotas de *L. braziliensis* na derme da orelha. (A) Lesão única ulcerada, bem delimitada, com bordas elevadas e fundo necrótico observada na quinta semana após a infecção, (B) A orelha de 14 animais foram mensuradas semanalmente. Média do tamanho da lesão em mm  $\pm$  desvio padrão da média. p 41

**Figura 3.** Carga parasitária de camundongos BALB/c infectados na orelha com  $10^5$  *L. braziliensis*. A carga parasitária da orelha (barras vazias) e do linfonodo regional (barras cheias) de 3 camundongos foi determinada por diluição limitante. Os dados apresentados (média  $\pm$  o desvio padrão da média) são referentes de um experimento representativo de três experimentos independentes. p 41

**Figura 4.** Corte histológico da orelha de camundongos BALB/c infectados com  $10^5$  *L. braziliensis*. A. Duas semanas pós-infecção observa-se infiltrado inflamatório moderado composto por polimorfonucleares e mononucleares (objetiva 10x); B. Maior objetiva (objetiva 100x), do corte A evidenciando célula intensamente parasitada (seta); C. Quatro semanas após infecção observa-se infiltrado nodular e denso (objetiva 10x); D. Maior aumento do corte C (objetiva 100x) demonstrando a presença de células parasitadas (seta). p 43

**Figura 5.** Corte histológico da orelha de camundongos BALB/c infectados com  $10^5$  *L. braziliensis*. A. Sete semanas pós-infecção observa-se infiltrado nodular denso (objetiva 10X); B. Maior aumento de A. (objetiva 100X) evidenciando um infiltrado com células parasitadas (seta), polimorfonucleares (seta), mononucleares e fibroblastos (seta), além da deposição de matriz (seta) (objetiva 10X); C. Na nona semana após-infecção observa-se o reparo tecidual com a deposição da matriz; D. Maior aumento de C (objetiva 100X) demonstrando um infiltrado inflamatório com mononucleares (seta), polimorfonucleares (seta) e fibroblastos (seta), a matriz conjuntiva está organizada (seta) e não foi observado a presença de células parasitadas. p 45

**Figura 6.** Análise morfométrica do infiltrado inflamatório da lesão de camundongos BALB/c infectados com  $10^5$  *L. braziliensis* após duas, quatro e nove semanas de infecção. Com duas semanas de infecção 54% da área do corte foi avaliada, na quinta semana 22,4% da área do corte foi avaliada e na nona semana a área avaliada do corte foi de 24,2%. p.47

**Figura 7** Anticorpos IgG anti- *Leishmania* detectados por ELISA utilizando-se soros de camundongos BALB/c infectados na orelha com  $10^5$  *L. braziliensis* (3 camundongos por grupo). Os dados apresentados (média  $\pm$  o desvio padrão da média) são referentes a um experimento representativo de três experimentos independentes. OD em 405 nm. p. 48.

**Figura 8.** Expressão de quimiocinas no linfonodo de camundongos BALB/c infectados na orelha com  $10^5$  *L. braziliensis* (3 camundongos por grupo). O RNA total

dos linfonodos foi extraído e submetido a RT-PCR para amplificação de CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL4/MIP-1 $\beta$ . Os dados apresentados são de um experimento representativo de dois experimentos independentes.. p. 50

**Figura 9.** Produção de IL-4 (A), IL-10 (B) e IFN- $\gamma$  (C) por células mononucleares de camundongos BALB/c infectados na orelha com  $10^5$  *L. braziliensis* (3 camundongos por grupo). As células do linfonodo regional foram re-estimuladas na presença de promastigotas de *L. braziliensis* e as citocinas presentes nos sobrenadantes foram dosadas por ELISA. Os dados apresentados representam os valores obtidos após a re-estimulação com parasita subtraídos dos valores obtidos com meio apenas. p.52

**Figura 10.** . Freqüência de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-4 e IL-10 em camundongos BALB/c infectados na orelha com  $10^5$  *L. braziliensis* (3 camundongos por grupo). As células foram incubadas com Brefeldina A antes da marcação. Os números representam a porcentagem de células com sinal específico para cada citocina em relação ao sinal das células incubadas com o isotipo controle. Os dados apresentados são de um experimento representativo de dois experimentos separados. p. 54

**Figura 11.** Freqüência de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-4 e IL-10 em camundongos BALB/c infectados na orelha com  $10^5$  *L. braziliensis* (3 camundongos por grupo). As células foram incubadas com Brefeldina A antes da marcação. Os números representam a porcentagem de células com sinal específico para cada citocina em relação ao sinal das células incubadas com o isotipo controle. Os dados

apresentados são de um experimento representativo de dois experimentos separados p. 56

## LISTA DE ANEXOS

---

Anexo 1 - Tabela com tamanho da lesão de cada animal após inoculação com  $10^5$  *L. braziliensis* na derme da orelha.

Anexo 2 – Tabela da avaliação histopatológica da lesão de animais infectados com  $10^5$  *L. braziliensis* na derme da orelha.

## RESUMO

---

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA UTILIZANDO *Leishmania braziliensis*. **TATIANA RODRIGUES DE MOURA.** [INTRODUÇÃO] A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença endêmica no Brasil. No entanto, não existe um bom modelo experimental para o estudo da doença. Nosso objetivo foi desenvolver um modelo de infecção com *L. braziliensis*, o principal agente etiológico da LTA em nosso país, levando em consideração o inoculo de parasitas e o sítio de infecção. [MATERIAL E MÉTODOS] Camundongos BALB/c foram infectados com  $10^5$  *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788), na derme da orelha. Os animais foram acompanhados durante 10 semanas para a avaliação do desenvolvimento da lesão e para a avaliação da resposta imune. [RESULTADOS] Observamos que a expansão parasitária foi acompanhada pelo desenvolvimento de uma lesão na derme da orelha, similar à observada em pacientes com LTA (lesão nodular e ulcerada no centro), a qual regrediu espontaneamente, como evidenciado pela presença de uma cicatriz. A análise histopatológica da orelha infectada mostrou a presença de, inicialmente, um infiltrado focal constituído por células mononucleares (linfócitos e monócitos), neutrófilos e poucos parasitas. No auge do desenvolvimento da lesão, havia predominância de macrófagos infectados os quais foram, em seguida, substituídos por um infiltrado inflamatório constituído por histiócitos, plasmócitos, neutrófilos e fibroblastos e pela ausência de parasitas. Os parasitas podem ser detectados no linfonodo regional, durante toda a infecção. A análise da expressão de quimiocinas no linfonodo regional mostra um aumento na expressão de quimiocinas recrutadoras de monócitos/macrófagos e neutrófilos. Observamos também um aumento na expressão de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-10, tanto por células T CD4<sup>+</sup> quanto por células T CD8<sup>+</sup>. Com a regressão da lesão, a expressão destas citocinas diminuiu. [CONCLUSÃO] A inoculação de *L. braziliensis* na derme da orelha de camundongos constitui um modelo de resistência devido ao desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1. Contudo, nesse modelo, os parasitas são capazes de sobreviver no linfonodo regional de camundongos infectados apesar do desenvolvimento de uma resposta imune capaz de curar a lesão.

[PALAVRAS CHAVE] *Leishmania braziliensis*, BALB/c, Leishmaniose Tegumentar Americana, IFN- $\gamma$ .

## ABSTRACT

---

DEVELOPMENT OF A EXPERIMENTAL MODEL OF INFECTION USING *Leishmania braziliensis*. **TATIANA RODRIGUES DE MOURA TATIANA RODRIGUES DE MOURA.** [INTRODUCTION] American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an endemic disease in Brazil. However, we still lack a reliable experimental model to study this disease. Our objective was to develop an infection model using *L. braziliensis*, the main etiological agent of ATL in our country, taking into account the parasite inoculum and route of infection. [MATERIALS AND METHODS] BALB/c mice were infected with  $10^5$  *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) into the ear dermis. The infection was followed for 10 weeks for the evaluation of lesion development and for evaluation of the immune response. [RESULTS] We observed that parasite expansion was accompanied by lesion development at the ear dermis. Lesions were similar to those observed in ATL patients (ie. nodular and ulcerated in the center). Lesions cured spontaneously and as seen by the presence of a scar. Histopathological analysis of infected ears showed the presence of, initially, a focal infiltrate consisting of mononuclear cells (lymphocytes and monocytes), neutrophils and few parasites. At the peak of lesion development, infected macrophages predominated. Thereafter, a weak infiltrate consisting of histiocytes, plasma cells, neutrophils and dermal fibrosis was observed with the absence of parasites. Regarding the draining lymph nodes, parasites could be detected throughout the infection period at a constant level. Results also show the up regulation in both monocyte/macrophage and granulocyte-recruiting chemokines. Measurement of intra cellular cytokine response by draining lymph nodes cells showed the up regulation of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 and IL-10 by both CD4+ and CD8+ T cells. Later, cytokine expression decreased paralleled by lesion regression. [CONCLUSION] *L. braziliensis* inoculation in the ear dermis of mice results in a model of resistance to infection due to the development of a predominant Th1-type immune response. However, in this model, parasites are able to persist within draining lymph nodes of infected mice regardless of the development of a protective immune response. [KEY WORDS] *Leishmania braziliensis*, BALB/c, American Tegumentary Leishmaniasis, IFN- $\gamma$ .

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é causada por espécies de protozoários unicelulares pertencentes ao gênero *Leishmania* (Família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida). Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios, digenéticos (heteroxenos), encontrados na forma flagelada promastigota, no interior do trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, e na forma amastigota, sem flagelo livre, no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (SACKS & KAMHAWI, 2001).

A transmissão da leishmania ocorre quando formas promastigotas metacíclicas (infectantes) são inoculadas no hospedeiro vertebrado, pelas fêmeas dos insetos vetores (flebotomíneos), durante o repasto sangüíneo (Fig. 1). Após inoculação na derme as promastigotas metacíclicas infectam mácrófagos e/ou células dendríticas ou da pele, onde se transformam em amastigotas (MOLL, 1996). Múltiplos receptores da célula do hospedeiro (receptor do complemento tipo 1 e tipo 3 (CR1 e CR3), receptor para fibronectina, receptor de mácrófagos para produtos glicosilados e diversas moléculas de superfície do parasito (Lipofosfoglicano (LPG), gp63) parecem ser responsáveis pela fixação e entrada do promastigota no mácrófago (ALEXANDER & RUSSELL, 1992). A leishmania evita a ativação do complexo de ataque a membrana (C5b-C9), além de utilizar o C3 para uma invasão “silenciosa” no mácrófago do hospedeiro (BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1997). Uma vez no interior do mácrófago, a principal célula que alberga este parasito no hospedeiro mamífero, o parasita reside dentro do vacúolo parasitóforo. Neste

vacúolo, o promastigota diferencia-se em amastigota, o qual multiplica-se por divisão binária e, após sucessivas divisões, o macrófago se rompe e os amastigotas liberados serão fagocitados por novas células hospedeiras, propagando a infecção no hospedeiro vertebrado (SACKS & KAMHAWI, 2001).

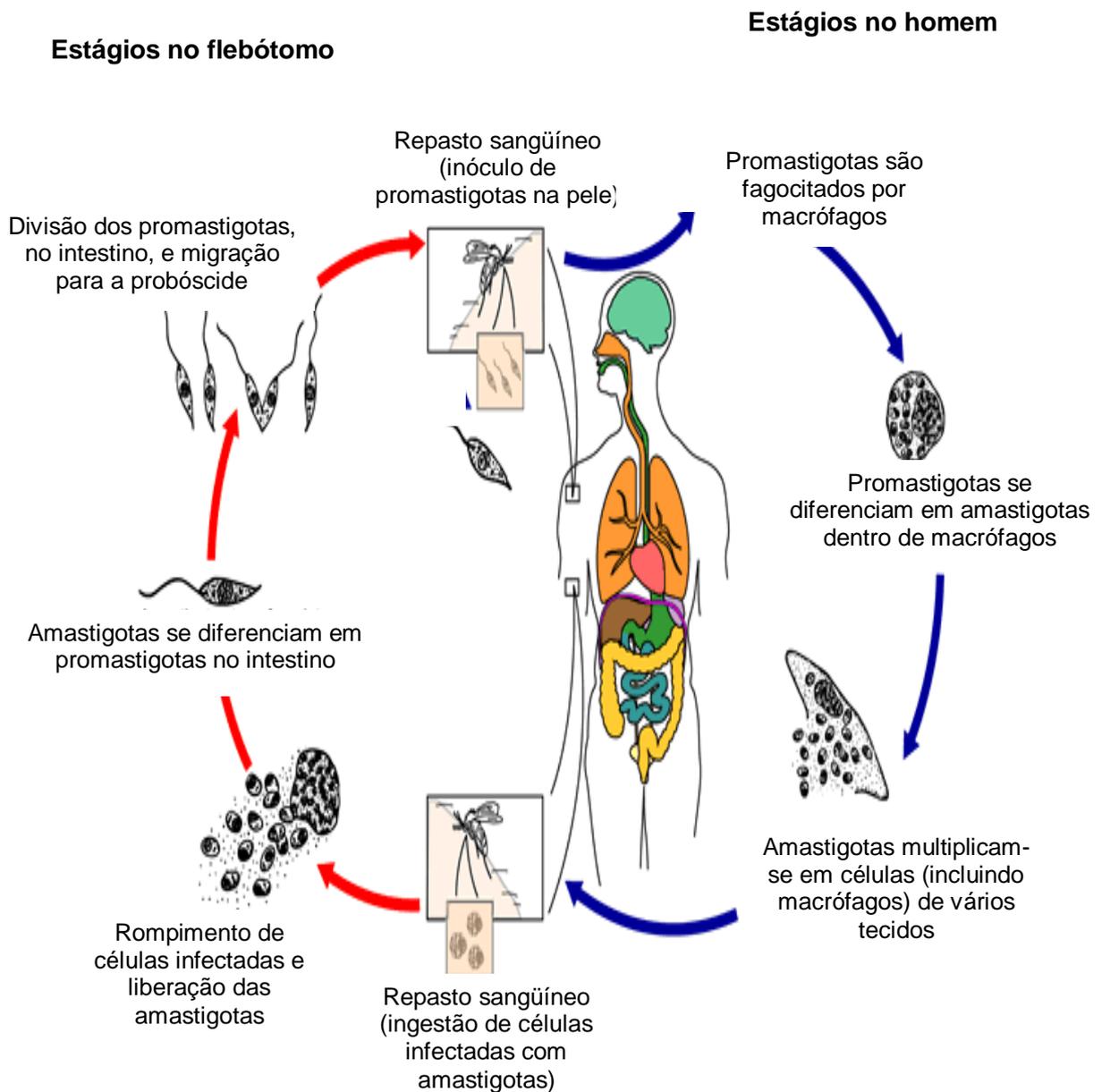


Figura 1 Ciclo biológico da *Leishmania* sp. (modificado de [www.med.sc.edu:85/parasitology/blood-proto/htm](http://www.med.sc.edu:85/parasitology/blood-proto/htm)).

A transmissão para o hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do flebótomo se alimenta em um hospedeiro infectado e ingere as formas amastigotas que acompanham o sangue. As células infectadas se rompem e liberam as amastigotas que se diferenciam, no interior do intestino do flebótomo, em promastigotas. As promastigotas se multiplicam por divisão binária e migram para o aparelho bucal do vetor onde se acumulam até que o flebótomo faça um novo repasto sangüíneo (SACKS & KAMHAWI, 2001).

As leishmanioses apresentam duas formas clínicas principais: a leishmaniose visceral (LV) e a Leishmaniose tegumentar (LT). A LV é uma forma grave e pode ser fatal se não tratada, consiste em uma infecção generalizada que acomete o sistema reticuloendotelial envolvendo baço, fígado, medula óssea e linfonodo (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO., 1995). A LT apresenta um espectro de manifestações clínicas sendo as principais a leishmaniose cutâneo-localizada (LCL), a leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) e a leishmaniose cutâneo-difusa (LCD). No Novo Mundo, a LT é causada por uma variedade de espécies sendo seus principais agentes etiológicos a *Leishmania braziliensis*, a *Leishmania amazonensis* e a *Leishmania guyanensis*, enquanto que, no Velho Mundo, as espécies responsáveis por esta manifestação da doença são, entre outras, a *Leishmania tropica*, a *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica* (LAINSON et al., 1987).

As manifestações clínicas da leishmaniose dependem de complexas interações que abrangem, desde a característica infectiva da espécie de *Leishmania* sp. até o estado imunológico do hospedeiro humano (PEARSON et al., 1996).

As espécies de *Leishmania* sp. que infectam o homem têm ampla distribuição mundial: cerca de 350 milhões de pessoas no mundo residem em área de risco com uma prevalência de 15 milhões de casos. Estima-se que um terço da população

mundial esteja sob o risco de infecção por parasitas do gênero *Leishmania* sp. (World Health Organization, Leishmaniasis Control) Disponível em: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/>. Acesso em 10/10/2004.

## **1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)**

A LTA é uma doença endêmica no mundo e no Brasil, sendo problema de saúde pública, é uma das seis doenças infecto-parasitárias endêmicas selecionadas pela OMS para o desenvolvimento de medidas eficazes de controle. Nos últimos 15 anos observa-se que o coeficiente de detecção de LTA no Brasil aumentou de 10,45/100.000 hab. para 18,63/100.000 habitantes. No ano de 1994, houve registro de casos autóctones em 1.861 municípios, o que representava 36,9% dos municípios do país; em 2001 houve uma expansão da doença para 2.268 municípios (40,8%). A região Norte, em 2001, apresentou os coeficientes de detecção mais elevados (93,84 por 100.000 habitantes), seguida da região Centro-Oeste (42,70 por 100.000 habitantes. A região Nordeste vem contribuindo com o maior número de casos, cerca de 36,8% do total de casos registrados no período e o coeficiente de detecção foi de 26,50 por 100.000 habitantes)(BRASIL, 2001) Disponível em <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/pdfs/guiavigepivol II.pdf> Acesso em 20/10/2004.

## **1.3 Formas clínicas da LTA**

### **Leishmaniose cutânea localizada (LCL)**

No Brasil, a LCL é ocasionada, principalmente, pelas espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. A forma cutânea localizada tem como principal característica uma

lesão ulcerada que se desenvolve, geralmente, nos membros inferiores, no local de inoculação do parasito pelo inseto vetor. Podem ocorrer lesões cutâneas únicas ou múltiplas, geralmente localizadas e ulceradas, sendo que a forma mais freqüente é uma úlcera indolor, de borda elevada e fundo plano que pode curar espontaneamente. Ocasionalmente, lesões verrugosas são observadas (revisado em MARSDEN, 1986). Nos pacientes com LCL, o teste cutâneo ao antígeno de *Leishmania* sp. (Teste de Montenegro) é positivo, indicando que há desenvolvimento de uma resposta imune celular contra o parasita, a qual persiste após a cura da lesão (CASTES et al., 1983; SARAVIA et al., 1989). Observa-se também o desenvolvimento de uma resposta imune humoral, a qual não está associada com proteção. A resposta humoral compreende uma produção inicial de IgM, seguida pela produção de IgG1, IgG2 e IgG3 e algumas vezes IgA e IgE (RODRIGUEZ et al., 1996). A linfadenopatia regional é um achado comum e por vezes precede o aparecimento de lesões cutâneas (BARRAL et al., 1992; BARRAL et al., 1995).

### **Leishmaniose cutânea mucosa (LCM)**

A LCM ocorre em 1 a 10% dos pacientes infectados por *L. braziliensis* estando a *L. amazonensis* raramente associada a esta manifestação (BARRAL et al., 1991). Em geral, o comprometimento das mucosas aparece anos após a lesão primária, mas existem casos onde a concorrência é concomitante (PESSOA & BARRETO, 1941). A lesão mucosa surge por provável disseminação hematogênica, a partir do foco primário. Nesta forma de doença, a principal característica é o comprometimento da mucosa nasal que pode se estender por todo o trato respiratório superior (revisado em MARSDEN, 1986). Os pacientes com LCM também apresentam resposta positiva ao teste de Montenegro. CARVALHO e

colaboradores (1985) sugerem que a natureza crônica e destrutiva da LCM pode ser conseqüente de uma resposta hiperreativa devido à intensa resposta imune mediada por células aos antígenos de leishmania.

### **Leishmaniose cutânea difusa (LCD)**

A LCD é uma manifestação rara da LT que ocorre no Brasil (CARVALHO et al., 1994) e é decorrente da infecção por *L. amazonensis* (COSTA et al., 1992). Na LCD a progressão crônica da doença é decorrente do crescimento incontrolável do parasita. As lesões evoluem formando pápulas, nódulos ou infiltrações difusas, de distribuição simétrica na face, no tronco e nos membros, podendo disseminar-se para todo o corpo. A disseminação é por via linfática (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995; MAUEL & BEHIN, 1981). O teste de Montenegro, nesses pacientes, é negativo, o que caracteriza ausência de resposta imune celular contra o parasito. No entanto, ocorre o desenvolvimento de uma intensa resposta imune humoral (CASTES et al., 1983). Os pacientes não curam da doença com o tratamento, tendo alternância de melhoras e agravamento do quadro.

Como descrito acima, a infecção por esse parasita pode se manifestar de diferentes maneiras no hospedeiro vertebrado, sendo que toda infecção decorre da inoculação do parasita na derme do hospedeiro por meio da picada do flebotomíneo. A interação parasita-hospedeiro irá direcionar a progressão da doença, seja para cura espontânea, seja para progressão crônica com necessidade de tratamento. A cura ou progressão da doença é atribuída a predominância de uma resposta do tipo Th1, caracterizada pela presença de IFN- $\gamma$  ou a predominância de uma resposta do tipo Th2, com importante produção de IL-10, respectivamente (BARRAL-NETTO et

al., 1998). A utilização de modelos experimentais constitui uma ferramenta importante para estudar esta interação.

#### **1.4 Modelos experimentais na leishmaniose**

O desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da leishmaniose tem contribuído para o melhor entendimento da patogênese desta doença. Nos últimos anos, vários estudos vêm explorando padrões de resistência e susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos infectados com diferentes espécies de *Leishmania* sp. (BOGDAN et al., 1996).

O modelo para LT mais bem estudado é o de infecção de camundongos com *L. major*. Esse modelo emprega grande quantidade de parasitas ( $10^4$ - $10^7$ ), os quais são inoculados por via subcutânea, na pata dos animais. Utilizando esse modelo criou-se o paradigma de susceptibilidade e resistência à leishmaniose: camundongos C57BL/6 são resistentes à infecção com *L. major* porque desenvolvem uma resposta imune celular do tipo Th1 na qual os linfócitos produzem altos níveis de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de IL-4, há o desenvolvimento de uma pequena lesão, no local do inoculo, não ulcerada que cura espontaneamente. Em contraste, camundongos BALB/c são susceptíveis à infecção por *L. major* porque desenvolvem uma resposta do tipo Th2, na qual os linfócitos produzem baixos níveis de IFN- $\gamma$  e altos níveis de IL-4, nesses animais a lesão não cura e é ulcerada e necrótica .

A imunidade protetora depende da indução de linfócitos T produtores de citocinas Th1, as quais ativam os mecanismos microbicidas de macrófagos, mediados, principalmente, por óxido nítrico (NO). Um fator importante no

estabelecimento de uma resposta Th1 ou Th2 são as citocinas locais, presentes nas primeiras horas da infecção (revisado em SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

O TNF- $\alpha$  é uma das citocinas envolvidas na resposta imune contra leishmania e exerce um importante papel no controle da infecção. Sabe-se que em camundongos C3H, resistentes à infecção por *L. major*, as células do linfonodo produzem TNF- $\alpha$  em resposta ao parasita *in vitro* e o bloqueio *in vivo* de TNF- $\alpha$ , por anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , exacerba o curso da infecção por *L. major*, resultando em um aumento no tamanho das lesões cutâneas e no número de parasitas. A administração de TNF- $\alpha$  humano recombinante protege os camundongos C3H, diminuindo o tamanho das lesões e o número de parasitas nos locais de inoculação (TITUS et al., 1989; THEODOS et al., 1991).

Uma sinergia entre IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foi observada na atividade microbicida de macrófagos murinos. A adição de somente TNF- $\alpha$  foi incapaz de alterar a atividade microbicida de macrófagos enquanto que esta atividade foi alterada quando as duas citocinas são administradas conjuntamente (SOLBACH et al., 1991; STENGER et al., 1991).

Outra citocina importante envolvida na resposta Th1 é a IL-12. Como o TNF- $\alpha$ , a IL-12 é necessária para manter uma população de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ . BELKAID e colaboradores (2000) observaram o importante papel da IL-12 no modelo experimental de *L. major*. Camundongos IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> ou IL-12<sup>-/-</sup> apresentam um maior número de parasitos no local da inoculação e um maior diâmetro da lesão quando comparados ao animais controle.

A progressão da LT está associada à sobrevivência do parasito e à desativação o macrófago. A IL-10, segundo FIORENTINO e colaboradores (1991), é capaz de diminuir a apresentação de antígenos por macrófagos e é capaz de inibir a

produção de citocinas do tipo Th1. BELKAID e colaboradores (2001) observaram uma redução no número de parasitas, no início da infecção, na derme das orelhas e nos linfonodos de camundongos C57BL/6 e C57BL/10 nocautes para IL-10 e IL-10/IL-4 inoculados com *L.major*, já na fase crônica os parasitas não foram detectados no sítio de infecção e no linfonodo regional.

O TGF- $\beta$  possui um importante papel na leishmaniose humana e murina. O tratamento de camundongos com TGF- $\beta$  tornou cepas avirulentas de *L. braziliensis* em cepas virulentas promovendo uma infecção letal. Essa citocina induziu a síntese de mRNA para IL-10 e diminuiu a de mRNA de IFN- $\gamma$  em linfonodos de camundongos infectados com *L. braziliensis* (BARRAL et al., 1993). Além disso, o TGF- $\beta$  também estaria envolvido na desativação de macrófagos murinos por inibição da produção de IFN- $\gamma$  e pela diminuição das respostas oxidativas mediadas por IFN- $\gamma$  (TSUNAWAKI et al., 1989).

As quimiocinas possuem uma potente ação ativadora e quimiotática para subpopulações de leucócitos e algumas células não hematopoiéticas (revisado por MURDOCH & FINN, 2000). Estudos enfatizam o papel de quimiocinas em respostas inflamatórias contra inúmeros agentes infecciosos, entre eles a leishmania (CHENSUE, 2001). Após a infecção com *L. major*, as quimiocinas MIP-2 e KC (homólogo de IL-8 em murinos) são rapidamente produzidas na pele (MULLER et al., 2001). Já foi demonstrado que a co-incubação de *L. Major*, *L. donovani* ou *L. aethiopica* com células polimorfonucleares (PMNs) inibe a produção de CXCL10/IP-10, sugerindo que a essas espécies inibem a atividade de células Th1 ou de células NK (VAN ZANDBERGEN et al., 2002). Por outro lado, PMNs estimulados com LPS ou TNF- $\alpha$  produzem CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL4/MIP-1 $\beta$ , quimiocinas envolvidas no recrutamento de monócito, macrófagos, NK e células dendríticas imaturas, essas

quimiocinas, também, recrutam apenas células Th1 (revisado por SCAPINI et al., 2000).

Infecções experimentais em camundongos com várias espécies de *Leishmania* sp. podem mimetizar diversas formas de leishmaniose cutânea humana. Dependendo da espécie de parasita e linhagem de camundongo, um considerável espectro de doença pode ser produzido. Algumas linhagens de camundongos como BALB/c, são altamente susceptíveis a infecção por *L. major* e falham no desenvolvimento de uma resposta Th1 contra o parasita, em contraste, outras linhagens de camundongos como C3H e C57BL/6, infectadas com *L. major*, desenvolvem lesões que curam espontaneamente associadas a uma forte imunidade celular (REINER & LOCKSLEY., 1995; SCOTT & FARREL., 1998). Infecções em murinos com outras espécies de *Leishmania* sp. podem levar a diferentes modelos de resistência e susceptibilidade. Por exemplo, linhagens de camundongos resistentes à infecção por *L. major* (como CBA, C3H ou C57BL/6) são susceptíveis a infecção com *L. amazonensis* ou a *L. mexicana*, sugerindo que fatores específicos do parasita possuem um importante papel no curso da doença (BARRAL et al., 1983; AFONSO & SCOTT, 1993; LEMOS DE SOUZA et al., 2000).

Em geral, em animais resistentes a *Leishmania* sp., estudos histopatológicos mostram que, inicialmente, existe uma variedade de células inflamatórias, macrófagos parasitados e poucos linfócitos. À medida que a lesão evolui há um aumento do número de linfócitos e uma diminuição no número de macrófagos parasitados. Observam-se também macrófagos epitelióides e necrose fibrinóide focal. Com a resolução da lesão, o infiltrado inflamatório é escasso e a presença de fibroblastos e a deposição de colágeno indicam a regeneração tecidual. No entanto, em animais susceptíveis a *Leishmania* sp., a lesão apresenta diversos macrófagos

parasitados, com aspecto íntegro, que aumentam em número, progressivamente, com a evolução da lesão. Poucos linfócitos são observados na periferia da lesão, com extensa área de necrose coagulativa e escassa deposição de colágeno (ANDRADE et al., 1984; BARRAL-NETTO et al., 1987; LEMOS DE SOUZA et al., 2000).

Embora a *L. braziliensis* induza uma doença que é um sério problema de saúde pública na América do Sul, existem poucos trabalhos experimentais que caracterizam a resposta imune a este parasita, provavelmente porque camundongos são pouco susceptíveis. NEAL & HALE (1983) compararam a infectividade de diferentes cepas de *L. braziliensis* em camundongos CBA, CD1 e BALB/c e observaram que mesmo com alto inóculo ( $2 \times 10^7$  promastigotas), na cauda ou no nariz, não houve desenvolvimento de lesão. Apenas um transitório edema foi observado nos camundongos CBA e BALB/c. No entanto, as cepas de *L. braziliensis* apresentaram infectividade em hamsters. Mais tarde, CHILDS e colaboradores (1984) testaram a susceptibilidade de doze linhagens de camundongos (A/J, A/He, BALB/c, C3H/He, C57BL/6, C57L, CBA, CBA/Ca, DBA/1, DBA/2, e SWR/J) à infecção com *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. aethiopica*, os animais foram inoculados com  $5 \times 10^6$  parasitas na região dorsal do nariz. A linhagem BALB/c foi a mais susceptível a infecção por *L. braziliensis*, esses animais apresentaram lesões, as quais curaram até 60 dias após a infecção.

DEKREY e colaboradores (1998) caracterizaram a resposta imune de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. O estudo mostrou que a produção de IFN- $\gamma$  é similar na infecção de BALB/c com *L. major* ou *L. braziliensis*, no entanto, a produção de IL-4 é menor em animais infectados com *L. braziliensis*. Além disso, camundongos infectados por *L. braziliensis*, quando tratados com anti-

IFN- $\gamma$ , não são capazes de controlar a infecção. Portanto a constante produção de IFN- $\gamma$  deve estar associada à cura da lesão, e a menor expressão de IL-4, nos animais infectados com *L. braziliensis*, não é capaz de bloquear a capacidade do IFN- $\gamma$  de ativar macrófagos infectados para matar o parasita.

DE OLIVEIRA et al., 2004, infectaram camundongos BALB/c com dois isolados de *L. braziliensis*, de diferentes regiões do Brasil, o isolado H3227 (proveniente do Ceará) e o isolado BA788 (proveniente da Bahia), e demonstraram diferenças no perfil genômico e em características clínicas e parâmetros imunológicos. Essas diferenças nas características clínicas são relacionadas a propriedades intrínsecas dos isolados como indução de uma lesão transitória e recrutamento de diferentes populações de leucócitos para o sítio parasitado.

Recentemente, TEVA et al., 2003, infectaram macaco rhesus (*Macaca mulatta*) com diferentes cepas de *L. braziliensis* utilizando  $10^7$  parasitas intrademicamente, e observaram, em alguns animais, o desenvolvimento de uma resposta inflamatória granulomatosa semelhante à de pacientes com LT. Sugerindo que o modelo utilizando primata pode ser útil para o estudo da patofisiologia e eventos imunorregulatórios associados com a evolução da doença, além do estudo de novas drogas e o desenvolvimento de vacinas.

LIMA e colaboradores (1999), demonstraram uma proteção cruzada entre *L. braziliensis* e *L. major*. BALB/c infectados com *L. braziliensis* e, posteriormente curados, foram desafiados com *L. major*. Os animais desafiados apresentaram resistência à nova infecção, pois nesses animais, foram observados uma produção elevada de IFN- $\gamma$  com baixos níveis de IL-4 e ausência de lesão.

Já foi demonstrada a importância de componentes da saliva de flebótomos na exacerbação da infecção por *Leishmania* sp. em modelos murinos de LTA. Além da

atividade hemostática e vasodilatadora, a saliva também aumentava a infectividade por *Leishmania* sp. (TITUS & RIBEIRO, 1988).

A saliva de *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi* aumentam consideravelmente a infectividade de *L. major* e camundongos C57BL/6, resistentes à infecção por *Leishmania*, se tornam susceptíveis quando co-inoculados com parasita e saliva, mesmo na presença de uma pequena quantidade de parasita (THEODOS et al., 1991; BELKAID et al., 1998). A co-inoculação de *L. braziliensis* e saliva em camundongos BALB/c causou uma lesão progressivamente maior quando comparado à inoculação de *L. braziliensis* somente (SAMUELSON et al., 1991; LIMA & TITUS, 1996; BEZERRA & TEIXEIRA, 2001)

BELKAID e colaboradores (1998), desenvolveram um modelo de infecção com *L. major* utilizando um baixo inóculo (1000 promastigotas metacíclicas) de parasita (associado ou não à presença da saliva) e a via de infecção intradérmica, o que melhor mimetiza as condições da infecção natural na LT. Utilizando-se este modelo, observou-se que o fenótipo de susceptibilidade e resistência de camundongos BALB/c ou C57BL/6, respectivamente estabelecido usando um grande número de parasitas inoculados em um sítio subcutâneo, foi mantido na derme usando 1000 promastigotas metacíclicas.

A partir dos achados descritos acima, desenvolvemos um modelo experimental de LT causada por *L. braziliensis*, levando em consideração a importância do sítio de inoculação para o desenvolvimento da infecção e a importância do baixo inóculo de parasitas.

## **2 JUSTIFICATIVA**

---

A LTA tem como principal agente etiológico a *L. braziliensis*, responsável tanto pela LCL e quanto pela LCM, uma das formas mais graves da LTA. Embora a LTA seja uma das seis doenças infecto-parasitárias endêmicas selecionadas pela OMS para o desenvolvimento de medidas eficazes de controle, ainda não existe um bom modelo experimental para o estudo dos mecanismos de imunidade a *L. braziliensis*.

## **3 OBJETIVO GERAL**

---

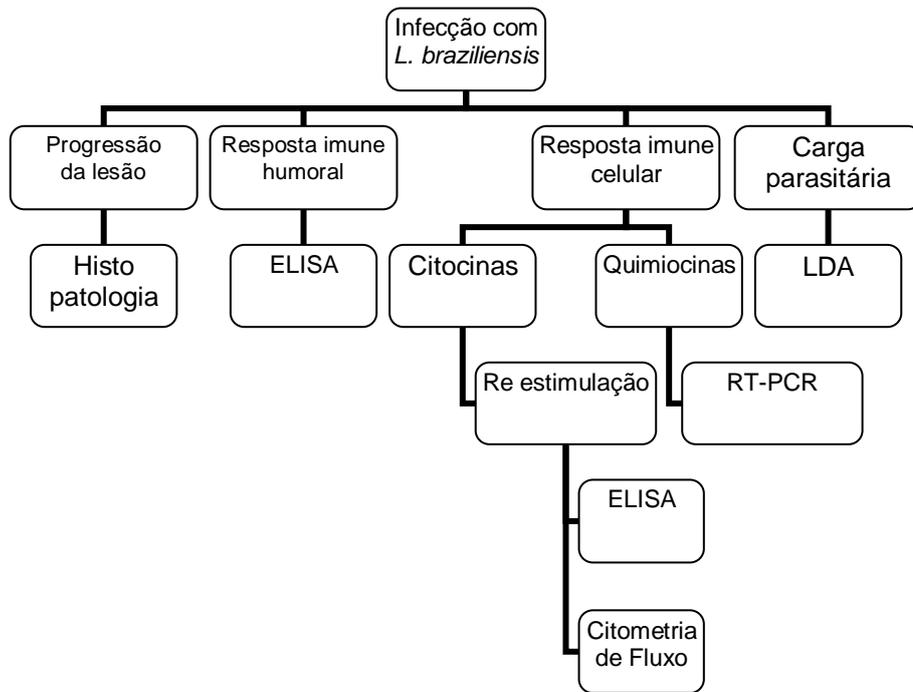
Desenvolver um modelo experimental de LTA, causada por *L. braziliensis*, em camundongos BALB/c, que melhor mimetizae a infecção natural pela *Leishmania braziliensis*.

### **3.1 Objetivos específicos**

- Caracterizar o desenvolvimento da lesão e a resposta inflamatória no sítio da lesão.
- Caracterizar a resposta imune de animais infectados quanto as citocinas e quimiocinas produzidas e quanto à presença de anticorpos.

## 4 DESENHO EXPERIMENTAL

---



## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **5.1 Animais**

Camundongos BALB/c, fêmeas, entre 6 e 8 semanas de vida, foram obtidos do Biotério do CPqGM/FIOCRUZ e mantidos em condições livres de patógenos. Todos os protocolos de experimentação foram aprovados pelo Comitê de Ética do CPqGM (Protocolo Número 005).

### **5.2 Parasitas**

A cepa MHOM/BR/01/BA788 foi isolada da úlcera de um paciente com leishmaniose cutânea localizada e caracterizada como sendo *L. braziliensis* por PCR (CASTILHO et al., 2003) e anticorpos monoclonais (MCMAHON-PRATT et al., 1982). Os promastigotas foram mantidos em meio de cultura Schneider (Sigma) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 20 mM HEPES (todos da Gibco), este meio denominamos Schneider completo.

### **5.3 Infecção intradérmica**

Grupos de camundongos 40 animais foram anestesiados e inoculados com promastigotas ( $10^5$  em 10 µl de solução salina estéril) em fase estacionária na derme da orelha esquerda, utilizando-se uma seringa para insulina de 0,3 ml (BD) e agulha

de calibre 29G. Essa quantidade de parasitas utilizada foi determinada após a realização de um experimento utilizando diferentes concentrações de parasitas, estabelecendo uma curva de infecção, observou-se o desenvolvimento de lesão a partir da infecção com  $10^5$  parasitas.

### **5.3.1 Mensuração da lesão**

A espessura da orelha infectada foi monitorada semanalmente por meio de um paquímetro digital (Thomas Scientific).

## **5.4 Histopatologia**

Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram sacrificados e as orelhas infectadas removidas e fixadas em formol a 10% e, posteriormente, emblocadas em parafina. Secções de 5  $\mu\text{m}$  de espessura foram colocadas em lâminas de vidro e coradas pela hematoxilina-eosina (H&E) para posterior avaliação em microscópio óptico. Para a avaliação morfométrica as lâminas foram avaliadas com identificação desconhecida no sistema de morfometria Axio Vision 3.1 da Zeiss, utilizando objetiva de 40 X, a fim de determinar o número de células em cinco campos, o que representa aproximadamente 1  $\mu\text{m}^2$ .

## **5.5 Carga parasitária**

A carga parasitária foi estimada por meio do teste quantitativo de diluição limitante (TITUS et al., 1985) e analisada pelo programa ELIDA® (TASWELL, 1984).

Brevemente, os animais foram sacrificados e a orelha infectada e o linfonodo regional foram retirados e homogeneizados em 1ml de meio Schneider completo. A partir deste homogenizado inicial foram realizadas 8 diluições seriadas, as quais foram aplicadas em placas de 96 poços contendo meio ágar sangue. O número de parasitas viáveis foi determinado pela máxima diluição na qual foram encontrados, após uma semana de incubação a 26°C.

## **5.6 Detecção de anticorpos contra *Leishmania braziliensis***

Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a obtenção do soro. A presença de anticorpos anti-leishmania foi analisada por ELISA. Brevemente, uma placa de 96 poços foi sensibilizada com promastigotas de *L. braziliensis* ( $5 \times 10^7$  / poço) em tampão carbonato-bicarbonato e foi incubada por 12 horas a 4°C. A placa foi lavada com PBS (tampão fosfato-salino)/ Tween a 0,05% e o soro dos animais infectados, diluído 1:50, foi incubado por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente e o segundo anticorpo, anti-IgG murino (Sigma), diluído 1:1000, foi adicionado. Após nova incubação, a placa foi lavada e a reação foi revelada pela adição de fosfatase alcalina diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M com cloreto de magnésio (20mg/ml). A reação foi interrompida com a adição de NaOH 3N e a leitura do resultado foi feita em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 405 nm. O ponto de corte ( $OD \geq 0,3$ ) foi estabelecido a partir da média da OD mais dois desvios padrões obtida com soros de animais controle, não infectados.

## 5.7 Re-estimulação *in vitro*

Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram sacrificados para a obtenção dos linfonodos que drenam a lesão. Os linfonodos foram macerados em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal Hy-Cone (Logan, Utah, EUA), HEPES (10µl/ml), L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (10mg/mL), todos da Gibco, este meio denominamos RPMI completo.

As células obtidas por ajustadas para a concentração de  $5 \times 10^6$  células/ml e foram plaqueadas em placas de 96 poços (Corning) com *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788), em uma taxa de 5 parasitas por célula, ou sem parasitas, em RPMI completo, a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes de cultura foram coletados 24 horas (para detecção de TNF-α), 48 horas (para detecção de IL-4 e IL-10) e 72 horas (para detecção de IFN-γ) após o início da cultura e conservados a -20°C até o momento do uso. Como controle positivo, as células foram re-estimuladas com Concanavalina A (5µg/mL) (Amersham Biotec).

## 5.8 Detecção de citocinas pelo método de ELISA

As concentrações das citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura foram determinadas pelo método imunoenzimático (ELISA) usando kits comerciais (BD PharMingen), de acordo com as recomendações do fabricante. TNF-α, IL-4, IL-10 e IFN-γ murino recombinantes (PharMingen) foram usados para gerar as curvas-

padrão. Os limites de detecção para esses testes são de 800 pg/ml para TNF- $\alpha$ , 15 pg/ml para IL-4 e IL-10 e 30 pg/ml para IFN- $\gamma$ .

## **5.9 Detecção de citocinas intracelulares pelo método de Citometria de Fluxo**

A expressão de citocinas por células T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> foi avaliada por citometria utilizando-se o kit Cytotfix/Cytosperm Plus (BD PharMingen), seguindo-se as instruções dos fornecedores. Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram sacrificados para a obtenção dos linfonodos que drenam a lesão. Os linfonodos foram macerados em meio RPMI completo e as células obtidas foram ajustadas para a concentração de 10<sup>6</sup>/ml e foram distribuídas em placas de 96 poços (Corning). As células foram ativadas na presença de anti-CD28 (10 $\mu$ g/ml) e anti-CD3 (10 $\mu$ g/ml), por 12 horas, a 37° em 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, a secreção das citocinas foi bloqueada pela adição de Brefeldin A (Sigma Co.) (10 $\mu$ g/ml). Após quatro horas, as células foram coletadas e foram bloqueadas com anti-Fc $\gamma$ III/II (BD PharMingen). Posteriormente, as células foram marcadas simultaneamente com anticorpos específicos anti-CD4 conjugado a FITC e anti-CD8 conjugado a CyChrome. Após a fixação e permeabilização com Cytotfix/Cytosperm as células foram incubadas com anticorpos anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL4, anti-IL-5 e anti-IL-10, todos conjugados a PE (todos da PharMingen). Como controle negativo, foram empregados os respectivos isotipos controle (BD PharMingen). As amostras foram adquiridas utilizando o aparelho FACSsort (Becton-Dickinson) e foram analisadas utilizando-se o programa Cell Quest (Becton-Dickinson).

## 5.10 Detecção de quimiocinas pelo método de RT-PCR

Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram sacrificados para a obtenção das orelhas infectadas e dos linfonodos regionais. Os tecidos obtidos foram macerados em Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen) e a extração de RNA foi feita de acordo com as instruções do fabricante. Após a precipitação com isopropanol, o RNA foi ressuspenso em água-DEPC e foi quantificado com espectrofotômetro a 260 nm. Um µg de RNA foi submetido ao tratamento com DNase I (Invitrogen) para garantir a eliminação de DNA genômico. Em seguida, o RNA tratado foi utilizado na síntese de cDNA utilizando a SuperScript III (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. O cDNA resultante foi estocado a -20°C até a amplificação por PCR. As amplificações do cDNA de orelha e linfonodo foram feitas em reações de 20 µl contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,5, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,8 µM de dNTP, 1 U *Taq* DNA polimerase, 7,5 µl de cDNA e 0,2 µM de cada um dos pares de oligonucleotídeos (Tabela 1). O seguinte programa foi utilizado para todas as amplificações de citocinas (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL2/MCP-1 e CCL5/RANTES): 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, T°C (Tabela 1) 45 segundos para citocinas e 1 minuto para quimiocinas e 72°C por 1 minuto, com uma amplificação final de 72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% (citocinas) e em gel de poliacrilamida 6% TBE (quimiocinas)(Invitrogen) corados com brometo de etídio. A intensidade das bandas de amplificação obtidas foi normalizada com a intensidade de amplificação da banda referente a um gene constitutivo ( $\beta$ -actina)

utilizando o programa EagleSight (Stratagene) e subtraídas das intensidades das bandas de animais normais, não infectados.

Tabela 1: Seqüência dos oligonucleotídeos, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos produzidos.

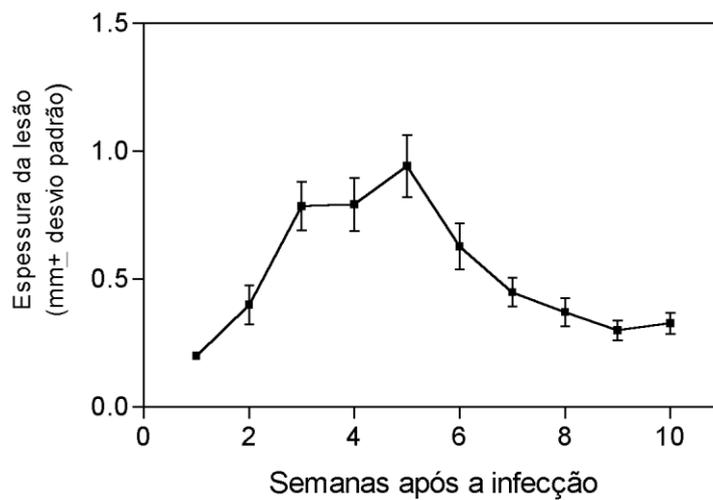
Alvo de amplificação	Seqüência	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
β-actina	5' tgg aat cct gtg gca tcc atg aaa 3'	57.2	349
	3' taa aaa gca gct cag taa cag tcc g 5'		
CCL2/MCP-1	5' cta agg acc act tgc cat gga 3'	55	445
	3' ctg gta gct ctc tgc cct gtt t 5'		
CCL5/RANTES	5' ctg gtt tct tgg gtt tgc tgt g 3'	54	310
	3' c cca cgt caa gca gta ttt c 5'		
CCL3/MIP1-α	5' t gag gaa cgt gtc ctg aag 3'	54	427
	3' c cgg aag att cca cgc caa ttc 5'		
CCL4/MIP1-β	5' ccc act tcc tgc tgt ttc tct tac 3'	55.6	427
	3' agc aga gaa aca gca atg gtg g 5'		

## 6. RESULTADOS

---

### 6.1 Camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* na derme de orelha desenvolvem lesões que mimetizam a LTA humana.

Com o objetivo de desenvolver um modelo experimental de LTA que melhor mimetize a infecção natural pela *L. braziliensis*, camundongos BALB/c foram inoculados na derme da orelha com  $10^5$  parasitas. O desenvolvimento da lesão foi observado semanalmente e, como mostrado na Fig 2A, os animais infectados desenvolveram uma lesão semelhante àquela encontrada em pacientes de área endêmica, caracterizada pela presença de uma lesão única ulcerada, bem delimitada, com bordas elevadas e fundo necrótico. Como mostrado na figura 2B, a lesão apareceu na terceira semana após a infecção, em média com 0,8 mm de espessura. Na quinta semana após a infecção, seu desenvolvimento chegou ao máximo e sua espessura atingiu um milímetro, em média. Cerca de 90% dos animais desenvolveram ulceração. Em seguida, a lesão regrediu gradualmente e curou espontaneamente de forma que, na sétima semana após a infecção, não foi possível observar a presença da lesão e a orelha do animal infectado apresentou novamente a espessura de uma orelha não infectada, com 0,3 mm, em média. Na nona semana após a infecção, observou-se total cicatrização da derme, indicando a cura clínica.

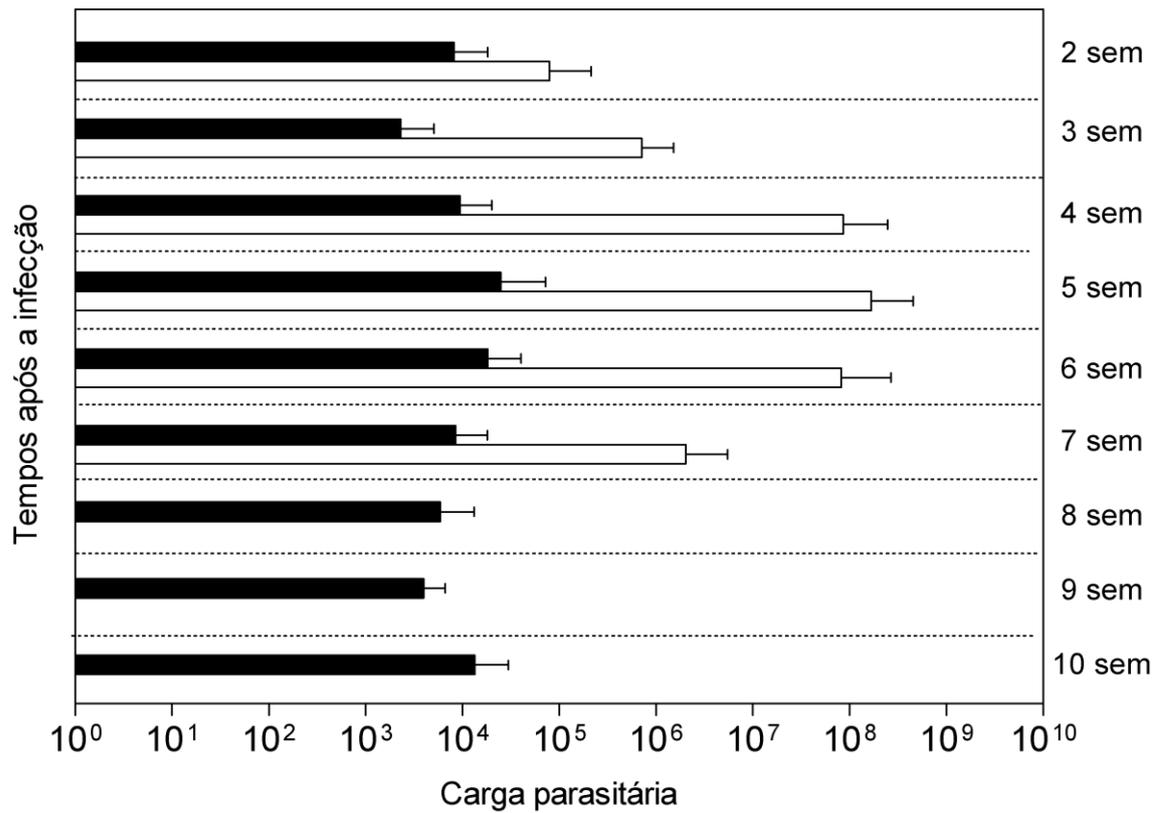


**Figura 2.** Curso do desenvolvimento da lesão de camundongos BALB/C (grupo de 14 animais) infectados com  $10^5$  promastigotas de *L. braziliensis* na derme da orelha. (A) Lesão única ulcerada, bem delimitada, com bordas elevadas e fundo necrótico observada na quinta semana após a infecção, (B) A orelha de 14 animais foram mensuradas semanalmente. Média da espessura da lesão em mm  $\pm$  desvio padrão da média.

## **6.2 A Carga Parasitária na orelha difere da carga parasitária no linfonodo regional.**

Determinamos a carga parasitária nas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 semanas após a infecção, tanto na orelha infectada quanto no linfonodo regional, pelo ensaio de diluição limitante. Na orelha, observamos uma rápida expansão dos parasitas, logo após a segunda semana de infecção (Fig. 3). Na quarta semana após a infecção, a carga parasitária alcançou seu máximo, chegando a  $10^8$  parasitas por orelha. O número de parasitas permaneceu inalterado até a sexta semana após a infecção e, em seguida, decresceu rapidamente. Na oitava semana após infecção, os parasitas não podiam ser mais detectados na orelha o que pode ser correlacionado com a observação da cicatrização da lesão, na orelha infectada, como mencionado anteriormente.

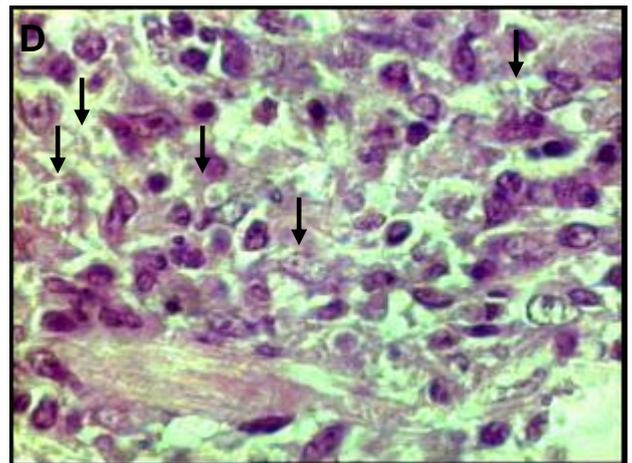
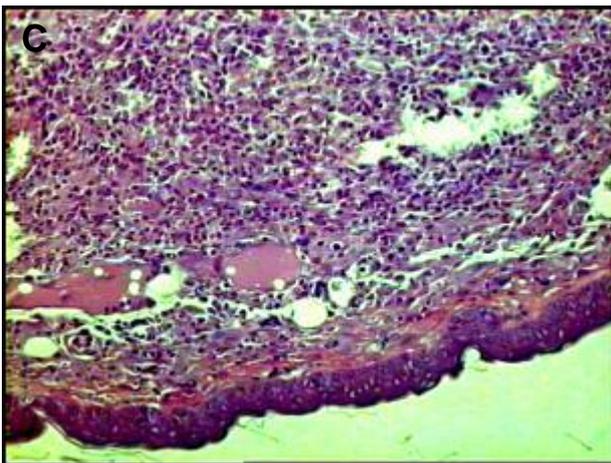
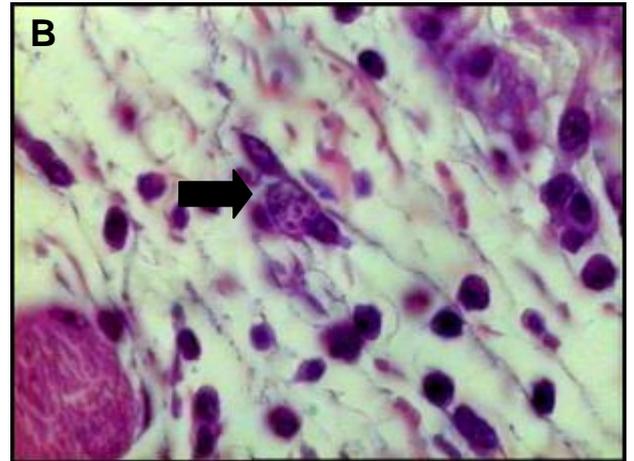
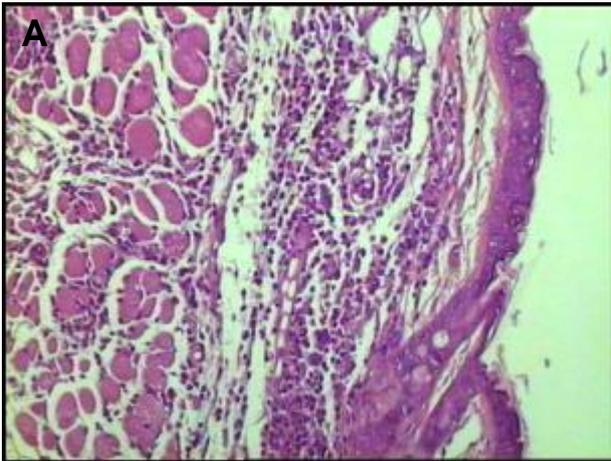
No linfonodo regional observamos que, na segunda semana após infecção,  $10^4$  parasitas foram detectados, em média (Fig. 3). A partir deste ponto, a carga parasitária variou, em média, entre  $10^4$  e  $10^5$  parasitas e não podia ser correlacionada com a presença da úlcera, observada na quinta semana após a infecção, ou mesmo com sua cicatrização, observada na nona semana após a infecção. Estes resultados indicaram que os parasitas persistem no linfonodo regional mesmo após a cura clínica do camundongo.



**Figura 3.** Carga parasitária de camundongos BALB/c infectados na orelha com  $10^5$  *L. braziliensis*. A carga parasitária da orelha (barras vazias) e do linfonodo regional (barras cheias) de 3 camundongos foi determinada por diluição limitante. Os dados apresentados (média  $\pm$  o desvio padrão da média) são referentes de um experimento representativo de três experimentos independentes.

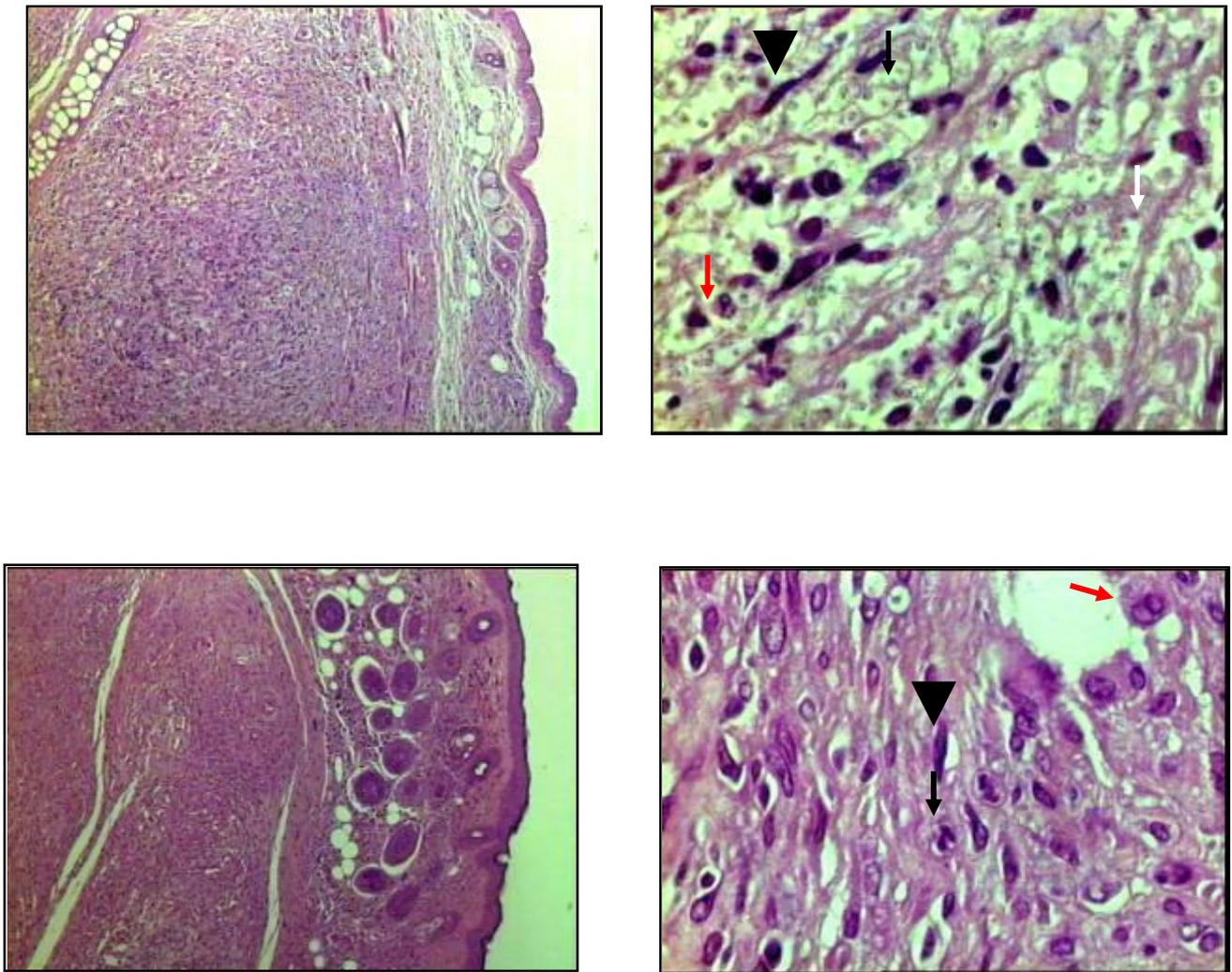
### **6.3 O infiltrado inflamatório foi constituído por células mononucleares e polimorfonucleares.**

Foram avaliadas as lesões na segunda, quarta, sétima e nona semana após infecção, pois são representativos do início (segunda semana), pico do desenvolvimento (quarta semana) e resolução da lesão (sétima e nona semana). Em geral, observamos que, durante o curso da lesão, o infiltrado inflamatório foi constituído por células mononucleares e polimorfonucleares (eosinófilos e neutrófilos) com predominância das células mononucleares. Observou-se na segunda semana após a infecção a presença de um infiltrado focal com poucas células, predominando células mononucleares, além da presença de células polimorfonucleares e de macrófagos parasitados (Fig. 4A e 4B), enquanto que, na epiderme, observou-se à formação da úlcera. Na quarta semana após a infecção, o infiltrado inflamatório foi nodular e denso, constituído de linfócitos, monócitos e neutrófilos, observou-se um grande número de células densamente parasitadas (Fig. 4C e 4D), a destruição de miócitos e a vasculite foi observada.



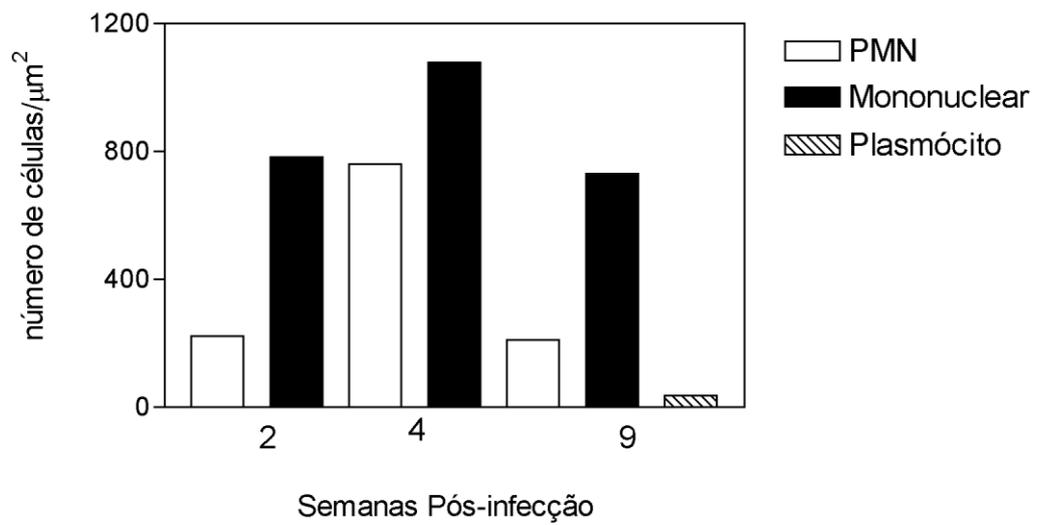
**Figura 4.** Corte histológico da orelha de camundongos BALB/c infectados com  $10^5$  *L. braziliensis*. A. Duas semanas pós-infecção observa-se infiltrado inflamatório moderado composto por polimorfonucleares e mononucleares (objetiva 10x); B. Maior objetiva (objetiva 100x), do corte A evidenciando célula intensamente parasitada (seta larga); C. Quatro semanas após infecção observa-se infiltrado nodular e denso (objetiva 10x); D. Maior aumento do corte C (objetiva 100x) demonstrando a presença de células parasitadas (seta).

Na sétima semana após a infecção, observou-se o início do processo de reparação do tecido e observou-se modificação dos tipos de células presentes no infiltrado: embora ainda se observasse a presença de células mononucleares, polimorfonucleares e plasmócitos os fibroblastos foram observados no local da lesão. Houve deposição de matriz conjuntiva e uma diminuição do parasitismo (Fig. 5A e 5B). Observamos necrose do tipo fibrinóide. O fechamento da lesão foi claramente observado na nona semana após a infecção, com uma matriz conjuntiva densa e organizada (Fig. 5C e 5D). Neste momento, o infiltrado inflamatório apresentou as mesmas características da sétima semana após a infecção, ou seja, presença de plasmócitos, fibroblastos, polimorfonucleares e mononucleares. Além disso, não foi possível detectar a presença de parasitas neste período, o que está diretamente correlacionado com a carga parasitária negativa (Fig. 3). Foi realizada imunohistoquímica anti-leishmania na nona semana após a infecção que foi negativa.



**Figura 5.** Corte histológico da orelha de camundongos BALB/c infectados com  $10^5$  *L. braziliensis*. A. Sete semanas pós-infecção observa-se infiltrado nodular denso (objetiva 10X); B. Maior aumento de A. (objetiva 100X) evidenciando um infiltrado com células parasitadas (seta), polimorfonucleares (seta vermelha) e fibroblastos (cabeça de seta), além da deposição de matriz (seta branca) (objetiva 10X); C. Na nona semana após-infecção observa-se o reparo tecidual com a deposição da matriz; D. Maior aumento de C (objetiva 100X) demonstrando um infiltrado inflamatório com mononucleares (seta vermelha), polimorfonucleares (seta) e fibroblastos (cabeça de seta), a matriz conjuntiva está organizada e não foi observado a presença de células parasitadas.

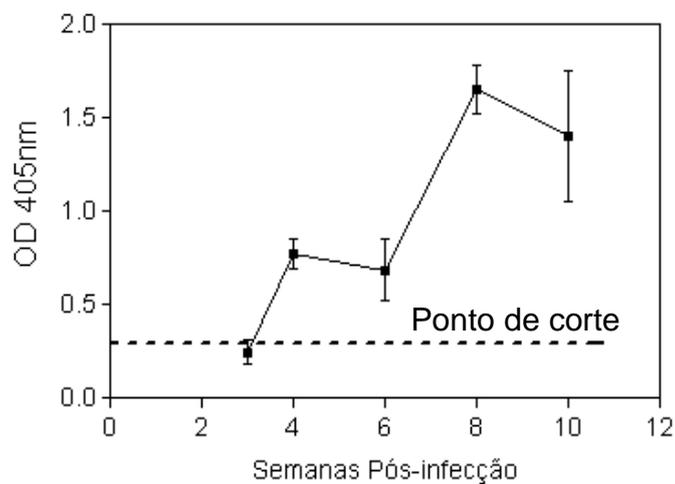
Para esta avaliação morfológica avaliação escolhemos lâminas obtidas na segunda, na quarta e na nona semana após a infecção por representarem, respectivamente, o início, o pico do desenvolvimento e o fechamento da lesão. Pelo programa de morfometria utilizado não foi possível diferenciar a morfologia das células mononucleares, especialmente linfócitos e monócitos, no modelo aqui apresentado diferenciamos células mononucleares (linfócitos e monócitos) de polimorfonucleares e de plasmócitos. Observamos que as células mononucleares predominaram durante todo o curso da infecção (Fig. 6), sendo elas mais abundantes na quarta semana após a infecção, momento no qual a lesão apresentou o pico do desenvolvimento. O número absoluto de células polimorfonucleares progrediu de maneira semelhante ao observado para as células mononucleares (Fig. 6), e, também na quarta semana após a infecção, observamos a maior presença destas células. Embora na nona semana após a infecção houvesse fechamento da lesão e ausência de parasitismo ainda permaneceu elevado o número de células mononucleares e polimorfonucleares, e ainda nessa semana foi detectada presença de plasmócito, constituindo cerca de 5% das células mononucleares.



**Figura 6.** Análise morfométrica do infiltrado inflamatório da lesão de um camundongo BALB/c infectado com  $10^5$  *L. braziliensis* após duas, quatro e nove semanas de infecção. Com duas semanas de infecção 54% da área do corte foi avaliada, na quinta semana 22,4% da área do corte foi avaliada e na nona semana a área avaliada do corte foi de 24,2%.

#### 6.4 Os anticorpos anti-*Leishmania* foram detectados a partir da quarta semana após a infecção.

Anticorpos anti-*Leishmania* foram detectáveis, a partir da quarta semana após a infecção (Fig. 7). A partir da sexta semana os níveis de anticorpos aumentaram e na oitava semana após a infecção observamos a OD máxima. Esses níveis se correlacionaram com a presença de plasmócitos no sítio da infecção, uma vez que a partir da sétima semana de infecção essas células compõem o infiltrado inflamatório (Fig.5).



**Figura 7.** Anticorpos IgG anti- *Leishmania* detectados por ELISA utilizando-se soros de camundongos BALB/c infectados na orelha com  $10^5$  *L. braziliensis* (3 camundongos por grupo). Os dados apresentados (média  $\pm$  o desvio padrão da média) são referentes a um experimento representativo de três experimentos independentes. OD em 405 nm.

## **6.5 Quimiocinas envolvidas na resposta imune Th1 foram significativamente produzidas durante o desenvolvimento da lesão.**

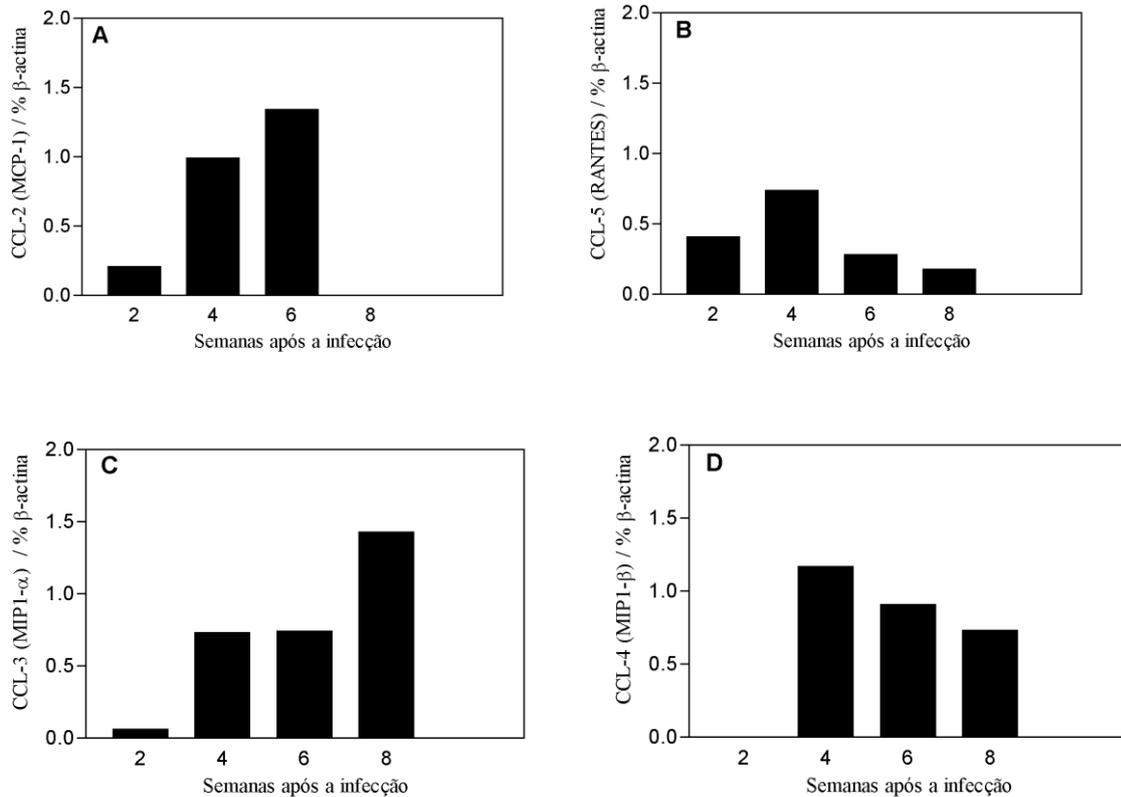
Para avaliar as quimiocinas envolvidas na diferenciação de células T e na ativação da atividade leishmanicida de macrófagos, o RNA total foi obtido do linfonodo regional e submetido a RT-PCR. Como mostrado na Fig. 8A, a produção de CCL5/RANTES, envolvida na migração de diversas células do sistema imune como linfócitos, eosinófilos, células NK e células dendríticas, acompanhou o curso da infecção, ou seja, sua expressão aumentou conforme a lesão se desenvolveu, atingindo a expressão máxima na quarta semana após a infecção, e diminuindo com a cicatrização.

CCL2/MCP-1, por sua vez, possui um importante papel na migração de monócitos e macrófagos e, como mostrado na Fig. 8B, sua produção aumentou gradativamente a partir da segunda semana após a infecção e a máxima expressão foi detectada na sexta semana após a infecção.

CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL4/MIP-1 $\beta$ , quimiocinas envolvidas no recrutamento tanto de monócitos quanto de neutrófilos, foram produzidas a partir da quarta semana após a infecção. A expressão de CCL3/MIP-1 $\alpha$  aumentou da segunda para oitava semana de infecção (Fig. 8C). Por outro lado, a expressão de CCL4/MIP-1 $\beta$  foi mais elevada na quarta semana após a infecção e esta expressão diminuiu com a cura da lesão (Fig. 8D).

Possivelmente, a maior expressão de quimiocinas recrutadoras de monócitos e macrófagos poderia ser correlacionada com a elevada carga parasitária observada no linfonodo regional, durante a quarta e sexta semana após a infecção (Fig. 6B).

Sendo assim, o recrutamento de células hospedeiras (macrófagos) para o linfonodo poderia justificar a manutenção da carga parasitária.

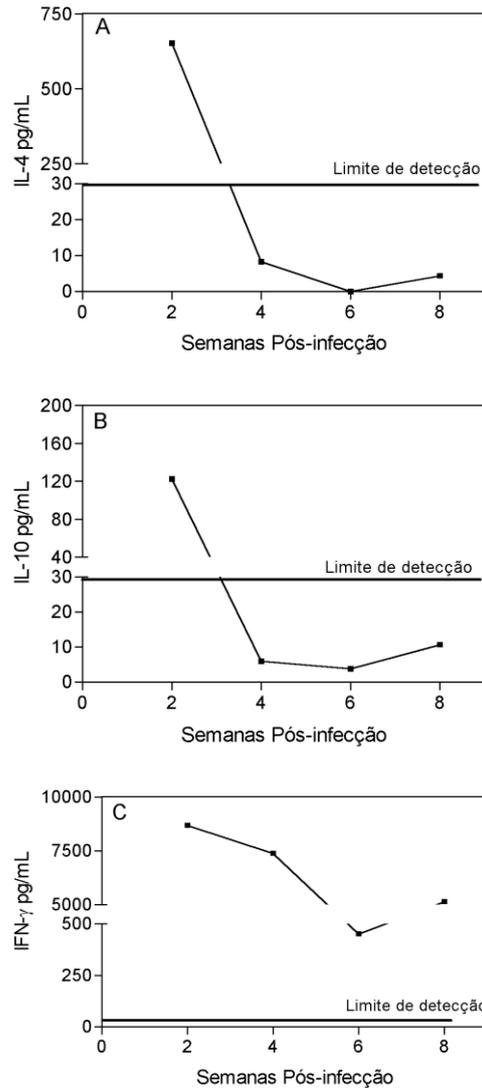


**Figura 8.** Expressão de quimiocinas no linfonodo de camundongos BALB/c infectados na orelha com  $10^5$  *L. braziliensis* (3 camundongos por grupo). O RNA total dos linfonodos foi extraído e submetido a RT-PCR para amplificação de CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL4/MIP-1 $\beta$ . Os dados apresentados são de um experimento representativo de dois experimentos independentes.

## **6.6 IFN- $\gamma$ foi constantemente produzido no sobrenadantes de cultura de células re-estimuladas *in vitro*.**

A cura da LT é dependente do desenvolvimento de uma resposta Th1, a falha no desenvolvimento de uma resposta Th1 anti-leishmania resulta na progressão da doença. Para avaliarmos a produção de citocinas, envolvidas no desenvolvimento de um padrão Th1 ou Th2, por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, as células do linfonodo regional foram coletadas em diferentes pontos após a infecção e foram re-estimulados *in vitro* com *L. braziliensis*. A presença de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes de cultura foi analisada por ELISA. Como controle, células de animais não infectados foram estimuladas *in vitro* com *L. braziliensis* e não apresentaram níveis detectáveis de citocinas pelo método utilizado. Observou-se produção de IL-4 (Fig. 9A) e IL-10 (Fig. 9B), após a re-estimulação *in vitro*, na segunda semana após a infecção, momento que antecedeu a ulceração da lesão. Em seguida, os níveis de IL-4 e de IL-10 estavam abaixo do limite de detecção. Não foi detectada a presença de TNF- $\alpha$  em culturas re-estimuladas com *L. braziliensis*.

De fato, observamos que a produção de IFN- $\gamma$  é elevada durante todo o período da infecção (Fig. 9C). A presença de uma forte resposta Th1, caracterizada pela presença de IFN- $\gamma$  já foi correlacionada com a resistência do hospedeiro à infecção, similar ao que observamos neste estudo.



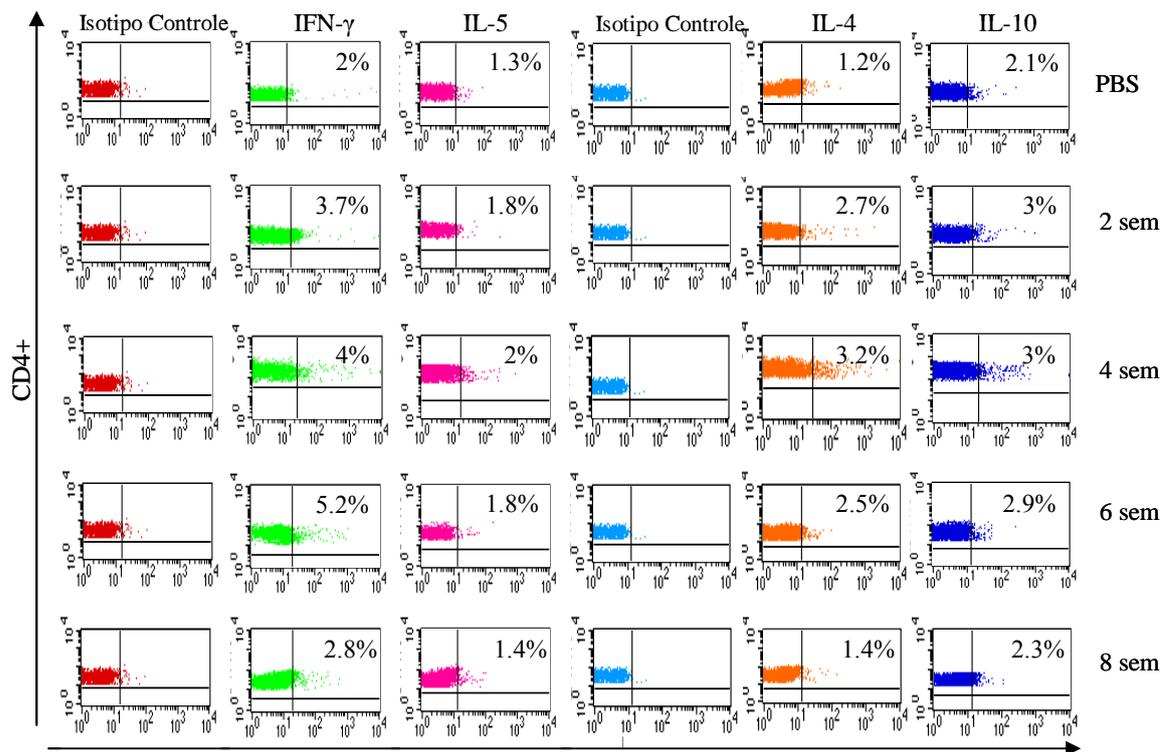
**Figura 9.** Produção de IL-4(A), IL-10(B) e IFN- $\gamma$ (C) por células mononucleares de camundongos BALB/c infectados na orelha com  $10^5$  *L. braziliensis* (3 camundongos por grupo). As células do linfonodo regional foram re-estimuladas na presença de promastigotas de *L. braziliensis* e as citocinas presentes nos sobrenadantes foram dosadas por ELISA. Os dados apresentados representam os valores obtidos após a re-estimulação com parasita, subtraídos dos valores obtidos com meio apenas.

## **6.7. IFN- $\gamma$ foi constantemente produzido por células CD4<sup>+</sup> enquanto que a expressão de IL-4 e IL-10 acompanharam o curso da lesão.**

O curso da infecção com *Leishmania* é dependente do desenvolvimento de células CD4 Th1 ou Th2 após a infecção, a produção de IFN- $\gamma$  por células Th1 leva ao controle parasitário enquanto a resposta Th2 está associada à progressão da doença (revisado por SACKS & NOBEN-TRANATH, 2002).

No presente estudo, a expressão de IFN- $\gamma$  pelas células CD4<sup>+</sup> foi crescente durante a infecção e acompanhou o desenvolvimento e a posterior cura da lesão. Como mostrado na Fig. 10, na segunda semana após a infecção, a frequência de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  foi de 3,7% e na sexta semanas após a infecção, esta frequência aumentou para 5,2%. Na oitava semana após a infecção, apenas 2,77% das células expressaram essa citocina, ainda assim, esta frequência era superior à observada no grupo controle (2,1%).

Em relação às citocinas do tipo Th2, a frequência de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-4, IL-5 e IL-10 foi inferior à frequência de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  (Fig. 10), no entanto, a frequência de células T CD4<sup>+</sup> produtoras dessas citocinas foi maior na quarta semana após a infecção, o período no qual observamos a ulceração da lesão. Em média, 1,6% das células T CD4<sup>+</sup> expressaram IL-5, 2,5% expressaram IL-4 e 2,8% expressaram IL-10. Sendo assim, a produção de citocinas do tipo Th2, por células CD4<sup>+</sup>, poderia ser correlacionada com a ulceração da lesão e a cicatrização da mesma estaria correlacionada com a expressão aumentada de IFN- $\gamma$  por esta mesma população celular.



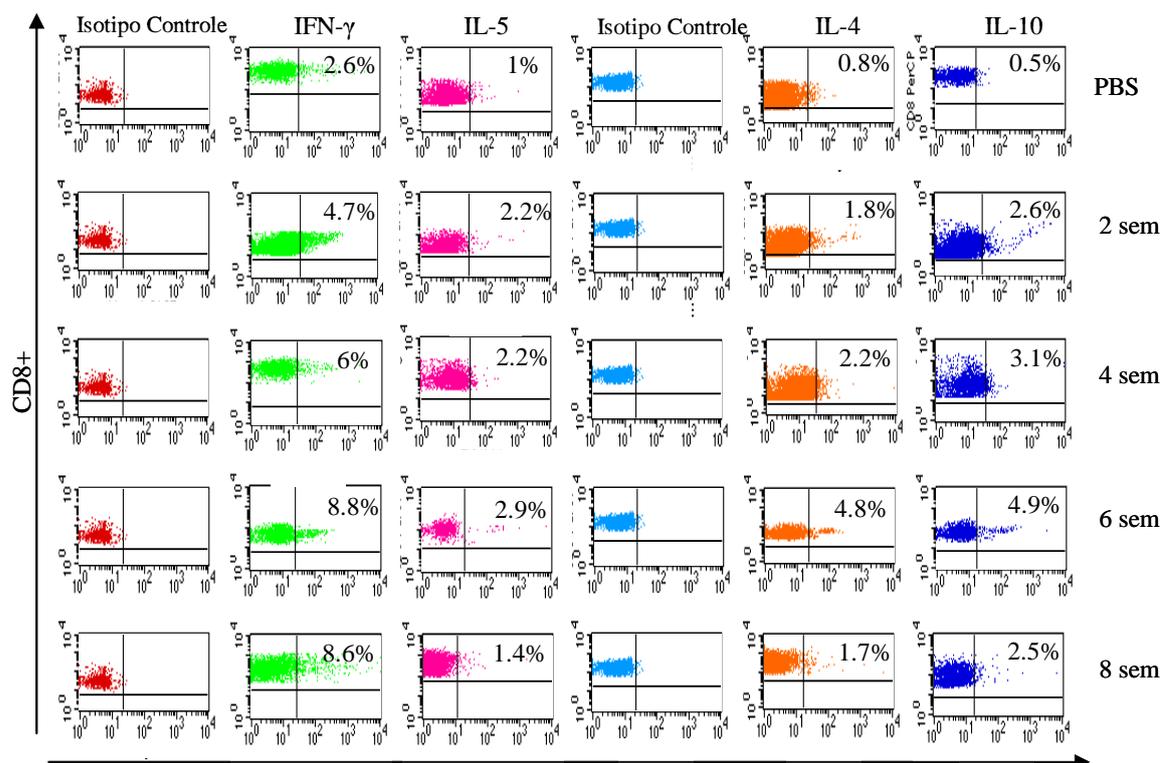
**Figura 10.** Frequência de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-4 e IL-10 em camundongos BALB/c infectados na orelha com  $10^5$  *L. braziliensis* (3 camundongos por grupo). As células foram incubadas com Brefeldina A antes da marcação. Os números representam a porcentagem de células com sinal específico para cada citocina em relação ao sinal das células incubadas com o isotipo controle. Os dados apresentados são de um experimento representativo de dois experimentos separados.

## **6.8. A população de células T CD8<sup>+</sup> expressa IFN- $\gamma$ em níveis elevados.**

As células T CD8<sup>+</sup> possuem um papel na resistência à leishmaniose por mecanismos de citotoxicidade direta a macrófagos infectados (MULLER et al., 1991) ou pela produção de IFN- $\gamma$  que pode influenciar o desenvolvimento de uma resposta Th1 (THOMAS et al., 2002).

Assim como observado na população de células T CD4<sup>+</sup>, o IFN- $\gamma$  também foi a citocina produzida em maior intensidade pelas células T CD8<sup>+</sup>, durante o curso da infecção, quando comparado com as citocinas do tipo Th2 (Fig. 11). No entanto, a expressão média de IFN- $\gamma$  por células T CD8<sup>+</sup> foi maior (7,1% x 4,2% em células T CD4<sup>+</sup>) e, além disso, esta expressão foi crescente durante o curso da infecção. Novamente, a frequência máxima de células produtoras de IFN- $\gamma$  foi observada, na sexta semana após a infecção, e esta frequência permaneceu bastante elevada mesmo após a cicatrização da lesão. Estes resultados indicaram que, apesar da cura clínica, uma população de células T CD8<sup>+</sup> altamente produtoras de IFN- $\gamma$  permaneceu no linfonodo o que poderia estar correlacionado com a persistência dos parasitas neste local.

A frequência de células produtoras de citocinas do tipo Th2, por sua vez, acompanhou a frequência observada para as células produtoras de IFN- $\gamma$  e, diferentemente, do observado para as células T CD4<sup>+</sup>, a maior expressão de IL5, IL-4 e IL-10 aconteceu na sexta semana após a infecção (Fig. 11). Na oitava semana após a infecção, quando observamos a cicatrização da lesão (Fig.2A), a frequência de células produtoras de IL5, IL-4 e IL-10 diminuiu.



**Figura 11.** Frequência de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-4 e IL-10 em camundongos BALB/c infectados na orelha com  $10^5$  *L. braziliensis* (3 camundongos por grupo). As células foram incubadas com Brefeldina A antes da marcação. Os números representam a porcentagem de células com sinal específico para cada citocina em relação ao sinal das células incubadas com o isotipo controle. Os dados apresentados são de um experimento representativo de dois experimentos separados.

## 7 DISCUSSÃO

---

Neste trabalho desenvolvemos um modelo murino de infecção com *L. braziliensis* após a inoculação de  $10^5$  promastigotas na derme da orelha de camundongos BALB/c. A partir deste tipo de infecção, utilizando a via intradérmica de infecção e um inóculo menor de parasitas em relação aos modelos anteriores utilizando *L. braziliensis*, observamos que esta linhagem de camundongos é resistente à infecção. Como demonstrado anteriormente (NEAL et al., 1983; CHILDS et al., 1984), diversas linhagens de camundongos são naturalmente resistentes à infecção com *L. braziliensis*, mesmo quando infectadas com altos inóculos ( $10^7$  promastigotas) e por sítios diferentes de infecção (pata, cauda, ou nariz). Em todos os casos, o parasito promove o desenvolvimento de uma pequena lesão que regride espontaneamente.

A manifestação clínica típica da LTA é uma lesão única com ulceração, bem delimitada, com bordas elevadas e fundo necrótico (LLANOS-CUENTAS et al., 1984; JONES et al., 1987). A lesão pode curar espontaneamente e o tratamento com antimonial acelera o processo de cura (MARSDEN et al., 1984). Nas lesões curadas observa-se a completa re-epitelização do tecido com presença de fibrose e redução do infiltrado inflamatório (BLIDDLESTONE et al., 1994). No modelo aqui descrito, observamos no sítio do inóculo, o gradual aparecimento de uma lesão, semelhante à descrita em humanos, a qual ulcerou e, em seguida, apresentou cura espontânea. Este é o primeiro modelo experimental murino capaz de reproduzir as características clínicas naturais da LTA (formação de úlcera e cura espontânea) após a infecção com *L. braziliensis*.

Ao avaliarmos a carga parasitária na orelha, observamos que o surgimento da lesão e sua cicatrização estão diretamente relacionados com o aumento e com a posterior diminuição no número de parasitas na orelha. Esses dados estão de acordo com trabalho de TITUS e colaboradores (1985) que demonstraram que a carga parasitária no sítio de infecção relaciona-se com a susceptibilidade do animal. A análise histopatológica, das lesões de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, mostrou que a progressão da lesão é acompanhada por um aumento de células parasitadas, as quais desaparecem durante o processo de cicatrização da lesão. RIDLEY & RIDLEY (1983) demonstraram a presença de um infiltrado rico em macrófagos durante a infecção por diferentes espécies de *Leishmania* sp. e a presença de um infiltrado inflamatório pronunciado foi proporcional à carga parasitária. A LCL apresenta uma lesão granulomatosa, formada por um infiltrado linfocitário e um número variável de células epitelióides. Este granuloma se estrutura a medida que a lesão perdura. MAGALHÃES e colaboradores (1986) propuseram uma classificação morfológica para a LT: entre os quatro padrões propostos, o de melhor prognóstico foi observado quando a lesão pertencia ao padrão de “Reação Exsudativa e Granulomatosa”. Neste trabalho, nós observamos a cura da lesão mesmo sem a formação de um granuloma, porém observamos a presença de um infiltrado rico em linfócitos e macrófagos, ou seja, as células capazes de controlar a infecção estão presentes, mas não se encontram organizadas de uma forma padrão. De fato, o controle da infecção mesmo sem a formação de granuloma foi observado em outros modelos experimentais para LT utilizando *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* (ANDRADE et al., 1984; LEMOS DE SOUZA et al., 2000; TEIXEIRA et al., in press).

O infiltrado inflamatório apresentou, durante a infecção, células polimorfonucleares, as quais poderiam ser recrutadas pela presença de CXCL1/KC, uma quimiocina recrutadora de neutrófilos, detectada na orelha infectada durante a evolução da infecção (dados não mostrados). Dentre os polimorfonucleares, os neutrófilos são as células que primeiro migram para o sítio de infecção e funcionam como células efetoras primárias capazes de fagocitar a leishmania (PEARSON & STEIGBIGEL, 1981; CHANG et al., 1981). A presença de neutrófilos foi descrita principalmente em lesões agudas, mas também é observada em lesões crônicas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar (ANDRADE et al., 1984; GRIMALDI et al., 1984). LIMA e colaboradores (1998) relataram a importante participação dos neutrófilos no controle inicial da carga parasitária e na disseminação dos parasitas na LT causada por *L. major*, tanto em camundongos susceptíveis (BALB/c) quanto em camundongos resistentes (C57BL/6). A participação dos neutrófilos foi particularmente mais significativa nos camundongos resistentes. Da mesma maneira, neutrófilos ativados por CD28 inibem o crescimento de *L. major* em macrófagos infectados por uma via dependente de IFN- $\gamma$  e secretam quimiocinas recrutadoras de células T CD4<sup>+</sup>, ou seja, os neutrófilos têm uma participação na resposta imune anti-*Leishmania*, precedendo o desenvolvimento da resposta de células T específicas (VENUPRASAD et al., 2003). Por outro lado, os neutrófilos infectados por *L. major* podem ser fagocitados por macrófagos e, conseqüentemente, silenciar a resposta imune adaptativa (LASKAY et al., 2003). A infecção de neutrófilos pela *L. major* desencadeia o mecanismo de apoptose do neutrófilo que, em seguida, é reconhecido e fagocitado por macrófagos. A fagocitose de PMNs apoptóticos não ativa os mecanismos microbicidas de macrófagos favorecendo a sobrevivência e a multiplicação do parasita (LASKAY et al., 2003).

Por meio da análise morfométrica observamos que o número de PMNs acompanhou o número das células mononucleares durante o curso da lesão e é possível supor que as células PMNs contribuem para a resolução da lesão, sem a formação do granuloma.

A coordenação de uma resposta imune eficiente necessita do reconhecimento de patógenos e da subsequente ativação de células da resposta imune com a liberação de mediadores solúveis da imunidade. A imunidade inata é capaz de rapidamente limitar a disseminação de patógenos e de preparar o sistema imune adaptativo para a eficiente eliminação do patógeno, sendo crucial durante a primeira fase de resposta (COOPER et al., 2004).

Na segunda e terceira semana após a infecção observou-se, no sítio da infecção, a presença de células com fenótipo NK1.1 o qual corresponde às células NK (dados não mostrados). As células NK, por produzirem IFN- $\gamma$ , apresentam um importante papel na diferenciação da resposta imune para o tipo Th1 na leishmaniose e, conseqüentemente, no desenvolvimento de uma imunidade protetora contra *L. major* (SCHARTON & SCOTT, 1993). A presença de células NK no sítio da lesão, no início da infecção, fortalece que o modelo proposto é de resistência à infecção por *L. braziliensis*.

A interação resposta imune inata e resposta imune adaptativa ocorre no linfonodo. No linfonodo regional observamos a expressão de CCL5/RANTES durante todo o curso da infecção enquanto que a expressão de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL4/MIP1- $\beta$  foi marcante a partir da quarta semana após a infecção. Muitos estudos enfatizam o papel de quimiocinas em respostas inflamatórias contra inúmeros agentes infecciosos, entre eles a *Leishmania* sp. (CHENSUE, 2001). Ensaio de quimiotaxia *in vitro* mostram que quimiocinas da subfamília C-C (como

CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP1- $\beta$  e CCL5/RANTES) atraem preferencialmente monócitos e macrófagos (FURIE & RANDOLPH, 1995). Tanto CCL2/MCP-1 quanto CCL5/RANTES são envolvidas no recrutamento de macrófagos e células dendríticas (SCAPINI et al., 2000). Estas quimiocinas, portanto, podem recrutar células que, por sua vez, podem contribuir para a fagocitose do parasita e a sua destruição ou facilitar sua permanência no linfonodo, pois as mesmas células capazes de destruir o parasita, podem ser responsáveis por albergá-los.

As quimiocinas CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL4/MIP1- $\beta$  são produzidas por macrófagos e neutrófilos (KASAMA et al., 1993; KASAMA et al., 1994) e têm efeito autócrino, aumentando o recrutamento destes tipos celulares (APPELBERG, 1992). Por outro lado, foi observado que a infecção por protozoários pode induzir a produção de ambas as quimiocinas resultando no recrutamento de células do tipo Th1 (SCAPINI et al, 2000). Outros trabalhos também correlacionam a presença de CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL4/MIP1- $\beta$ , além de CCL5/RANTES, com a resposta celular do tipo Th1 (SCHRUM et al., 1996), em uma ação conjunta com IFN- $\gamma$  (DORNER et al., 2002).

Neste trabalho, detectamos a presença de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL4/MIP1- $\beta$ , no linfonodo regional, a partir da quarta semana de infecção. É possível supor que estas quimiocinas participam no desenvolvimento de uma resposta efetora contra o parasita a partir do recrutamento de macrófagos, fortalecendo a resposta Th1 contra leishmania, que é predominante nesse modelo.

Ao avaliarmos o perfil de citocinas produzidas no linfonodo regional observamos uma constante produção de IFN- $\gamma$ . Esta produção foi acompanhada pela presença de elevados níveis de IL-4 e IL-10 durante as primeiras semanas de infecção, os quais diminuiram com a cicatrização da lesão. Quando o fenótipo

dessas células foi avaliado, observamos que, tanto células T CD4<sup>+</sup> quanto células T CD8<sup>+</sup> produzem IFN- $\gamma$  durante a infecção sendo que a frequência de células T CD8<sup>+</sup> é maior do que a frequência de células T CD4<sup>+</sup>. Como observado na re-estimulação in vitro, a produção de IL-4 e IL-10 é maior durante as primeiras semanas após a infecção.

A resposta imune associada com a cura da LTA, em modelos murinos, envolve a produção de IFN- $\gamma$ , o qual leva à ativação de macrófagos, à produção de óxido nítrico e à destruição dos parasitas intracelulares (REINER & LOCKSLEY, 1995; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; SCOTT & FARRELL, 1998). Células T CD4<sup>+</sup> que produzem IFN- $\gamma$  são absolutamente necessárias para a resistência à infecção pela *Leishmania* e células T CD8<sup>+</sup> possuem um importante papel no desenvolvimento e manutenção da resistência (MULLER et al., 1993). O IFN- $\gamma$  derivado de células T CD8<sup>+</sup> pode influenciar o desenvolvimento de células Th1 via o aumento de produção de IL-12 por células dendríticas (THOMAS et al., 2002) ou pela produção de quimiocinas pró-inflamatórias (KIM et al., 1998; COOK et al., 1999). Células T CD8<sup>+</sup> de camundongos infectados com *L. infantum* produzem CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL5/RANTES, quimiocinas envolvidas na resistência do hospedeiro. A cura da leishmaniose, segundo DA-CRUZ e colaboradores (1994) e AMARAL e colaboradores (2000) foi associada ao aumento da percentagem de células T CD8<sup>+</sup> e, por conseguinte, à diminuição na relação CD4/CD8. A susceptibilidade de camundongos BALB/c, segundo HILL e colaboradores (1989), é devida à geração de células T CD4<sup>+</sup> que suprimem a geração ou expressão da imunidade anti-leishmania mediada por células T CD8<sup>+</sup>.

Os camundongos C3H e C57BL/6, resistentes à infecção por *L. major* apresentam diferentes perfis de resposta imune inicial: em camundongos C3H, a *L.*

*major* induz uma rápida resposta imune associada a uma elevada produção de IFN- $\gamma$  e ausência de IL-4. Após 3 dias de infecção, uma significativa resposta de células NK pode ser detectada no linfonodo regional e essas células são as primeiras a produzir IFN- $\gamma$  (SCHARTON & SCOTT, 1993). Em contraste, camundongos C57BL/6 apresentam uma resposta inicial caracterizada pela presença de IL-4 que é substituída pela produção constante de IFN- $\gamma$  (SHANKAR et al., 1996).

Neste trabalho, a ulceração pode estar associada a lesões vasculares. O TNF- $\alpha$  é uma citocina reconhecida por promover alterações vasculares e foi detectada por RT-PCR no sítio da infecção (dados não mostrados). A vasculite foi observada por histopatologia na quarta semana de infecção e foi observada concomitante com a produção mais acentuada de IL-4 e IL-10. Por outro lado, a constante produção de IFN- $\gamma$  é capaz de controlar o crescimento do parasita, levando à cicatrização e cura clínica. Sendo assim, é possível supor que a participação de células NK no início da infecção contribui para o desenvolvimento de uma resposta Th1. Em seguida, a presença de células T CD8<sup>+</sup> e de quimiocinas recrutadoras de monócitos e envolvidas na diferenciação de células T e na potenciação da atividade leishmanicida de macrófagos auxiliam no fortalecimento da resposta Th1, assim como a participação dos neutrófilos no local na lesão, favorecendo a eliminação do parasita. No entanto, a eliminação do parasita só ocorre no sítio da infecção, enquanto que, no linfonodo regional, estes são capazes de persistir durante todo o curso da infecção. O equilíbrio entre parasita e hospedeiro é benéfico para o hospedeiro, pois a persistência do parasita está associada ao desenvolvimento de memória imunológica. Porém a reativação da doença é possível se o equilíbrio parasita-hospedeiro for quebrado. Uma das características da infecção por *L. braziliensis* é a capacidade do parasita de

disseminar para diferentes partes do corpo, em particular a mucosa nasofaríngea, que ocorre anos após a cura clínica da LTA; a capacidade para metástase e a persistência do parasita estão intimamente ligados (RAMIREZ & GUEVARA, 1997). A reativação da LTA ocorre em indivíduos imunocompetentes e pode ser precedida por um evento de imunossupressão como a administração de drogas ou a infecção por HIV. Na LTA, a presença do parasita, após o tratamento e cura clínica, já foi observada tanto pela detecção do DNA do parasita em sangue periférico como pela sua detecção na cicatriz da lesão e no tecido linfóide (DELGADO et al., 1996; RAMIREZ & GUEVARA, 1997; SCHUBACH et al., 1998; MENDONÇA et al., 2004).

Os mecanismos envolvidos na persistência do parasita, ou seja, na falha do hospedeiro em eliminar completamente o parasita, estão mais bem estudados no modelo experimental de infecção com *L. major*. Neste caso, o parasita persiste no linfonodo após a cura clínica seja ela espontânea ou após o tratamento quimioterápico (AEBISCHER et al., 1993). Trinta a quarenta por cento das células que albergam a *Leishmania* são macrófagos ou células dendríticas e 70-60% destas células são negativas para produção de óxido nítrico sintase e para a presença de marcadores de macrófagos, granulócitos, células endoteliais e células dendríticas (STENGER et al., 1996). BOGDAN e colaboradores (2000) demonstraram, em camundongos resistente à *L. major*, a co-localização dos parasitas em fibroblastos, sugerindo um mecanismo de escape do parasita na fase latente da doença. Neste caso, os parasitas persistem, mas sua multiplicação é controlada por macrófagos vizinhos que são efetivos na destruição de *Leishmania* residente em fibroblastos, estabelecendo assim um balanço entre parasita e hospedeiro na fase crônica.

Por outro lado, as células T regulatórias têm sido descritas como uma população de células T CD4<sup>+</sup> capaz de controlar uma resposta imune excessiva

contra patógenos ou auto-antígenos (THOMPSON & POWRIE, 2004). Existem evidências em infecções clínicas e experimentais, incluindo *Pneumocystis carinii* (HORI & DEMENGEOT, 2002), *Candida albicans* (MONTAGNOLI et al., 2002), e *L. major* (BELKAID et al., 2002) em murinos e *Helicobacter pylori* (LUNDGREN et al., 2003) em humanos, que as células T regulatórias suprimem funções efetoras e contribuem, parcialmente, para a persistência do parasita. Tanto em camundongos quanto em humanos, células T regulatórias CD25<sup>+</sup> secretam altos níveis de IL-10 e TGF-β. A participação de células T regulatórias na persistência da *L. major* em camundongos resistentes já foi descrita por BELKAID e colaboradores (2002) e MENDEZ e colaboradores (2004). Estes estudos sugerem que a célula T regulatória, durante a infecção, promove um benefício ao hospedeiro não somente por controlar a severidade da inflamação, mas também pela manutenção de uma infecção persistente. Essas células T regulatórias, provavelmente, mantiveram a recirculação de células T de memória, o que conferiu uma imunidade contra a re-infecção.

Neste modelo de infecção com *L. braziliensis*, a participação de células T regulatórias bem como a presença do parasita em fibroblastos nos linfonodos regionais poderiam estar diretamente relacionada com a persistência do parasita e resistência a re-infecção. Neste sentido, dados preliminares mostram que animais curados da infecção por *L. braziliensis* são resistentes contra o desafio com parasitas na orelha contra-lateral (dados não mostrados).

O modelo experimental de LTA aqui descrito se assemelha aos outros modelos de resistência já estudados, como os de infecção de camundongos C57BL/6 com *L. major* e camundongos A/J com *L. amazonensis*, já que nestes animais há, respectivamente, cura espontânea e persistência do parasita. Porém, nosso modelo difere dos outros modelos de LTA utilizando *L. braziliensis* tanto no

método de infecção empregado quanto na própria manifestação clínica da doença. O fato de a inoculação intradérmica levar à formação de uma lesão ulcerada, semelhante à infecção natural, torna este um bom modelo para o estudo de outros aspectos da LTA como, por exemplo, a leishmaniose muco-cutânea. Além disso, o fato dos parasitas persistirem no linfonodo regional também abre a perspectiva de utilizarmos este modelo para o estudo de imunidade e reativação da doença, como observado em casos de trauma ou imunossupressão.

## 9 CONCLUSÃO

---

A inoculação de *L. braziliensis* na derme da orelha de camundongos BALB/c leva ao:

- ✓ desenvolvimento de uma lesão ulcerada, com bordas elevadas e fundo necrótico que cura espontaneamente.
- ✓ linfadenopatia regional e persistência do parasita em tecidos linfóides.
- ✓ desenvolvimento de uma resposta Th1

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AEBISCHER, T.;MOODY, S. F. ;HANDMAN, E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. **Infect Immun.**61: 220-6,1993.

AFONSO, L. & SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun.**61: 2952-59,1993.

ALEXANDER, J. & RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Adv Parasitol**, **31**: 175-254, 1992.

AMARAL, V.;PIRMEZ, C.;GONCALVES, A.;FERREIRA, V. ; GRIMALDI, G., JR. Cell populations in lesions of cutaneous leishmaniasis of *Leishmania (L.) amazonensis*-infected rhesus macaques, *Macaca mulatta*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**95: 209-16,2000.

ANDRADE, Z. A.;REED, S. G.;ROTTERS, S. B.; SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am J Pathol.**114: 137-48,1984.

APPELBERG, R. Macrophage inflammatory proteins MIP-1 and MIP-2 are involved in T cell-mediated neutrophil recruitment. **J Leukoc Biol.**52: 303-6,1992.

BARRAL, A.; PETERSEN, E.A; SACKS, D.L; NEVA, F.A. Late metastatic Leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. . **Am J Trop Med Hyg.**32: 277-285,1983.

BARRAL, A.;BARRAL-NETTO, M.;ALMEIDA, R.;DE JESUS, A. R.;GRIMALDI JUNIOR, G.;NETTO, E. M.;SANTOS, I.;BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. **Am J Trop Med Hyg.**47: 587-92,1992.

BARRAL, A.;PEDRAL-SAMPAIO, D.;GRIMALDI JUNIOR, G.;MOMEN, H.;MCMAHON-PRATT, D.;RIBEIRO DE JESUS, A.;ALMEIDA, R.;BADARO, R.;BARRAL-NETTO, M. ; CARVALHO, E. M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg.**44: 536-46,1991.

BARRAL, A.;BARRAL-NETTO, M.;YONG, E. C.;BROWNELL, C. E.;TWARDZIK, D. R. ; REED, S. G. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**90: 3442-6,1993.

BARRAL, A.;GUERREIRO, J.;BOMFIM, G.;CORREIA, D.;BARRAL-NETTO, M. ; CARVALHO, E. M. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am J Trop Med Hyg.**53: 256-9,1995.

BARRAL-NETTO, M.;BRODSKYN, C.;CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.

Human\_leishmaniasis/cytokines.bahia.br. **Braz J Med Biol Res**.31: 149-55,1998.

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. **J Exp Med**.194: 1497-506,2001.

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. **J Exp Med**.188: 1941-53,1998.

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. **J Immunol**.165: 969-77,2000.

BELKAID, Y.;PICCIRILLO, C. A.;MENDEZ, S.;SHEVACH, E. M. ; SACKS, D. L.

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**.420: 502-7,2002.

BEZERRA, H. S. ; TEIXEIRA, M. J. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**.96: 349-51,2001.

BIDDLESTONE, L. R.;HEPBURN, N. C. ; MCLAREN, K. M. A clinico-pathological study of cutaneous Leishmaniasis in British troops from Belize. **Trans R Soc Trop Med Hyg**.88: 672-6,1994.

BITTENCOURT, A.L & BARRAL-NETTO, M. **Leishmaniasis in Tropical Pathology**, Eds. Doerr, W. , Seifert, G., Springer Verlag Berlim, Vol.8, 2<sup>a</sup> Edição, p 597-650,1995.

BOGDAN, C.;DONHAUSER, N.;DORING, R.;ROLLINGHOFF, M.;DIEFENBACH, A. ; RITTIG, M. G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **J Exp Med**.191: 2121-30,2000.

BOGDAN, C.;GESSNER, A.;SOLBACH, W. ; ROLLINGHOFF, M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Curr Opin Immunol**.8: 517-25,1996.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M . The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Int J Parasitol**, **28**(1): 121-34. 1998.

CARVALHO, E. M.;BARRAL, A.;COSTA, J. M.;BITTENCOURT, A. ; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop**.56: 315-25,1994.

CARVALHO, E. M.;JOHNSON, W. D.;BARRETO, E.;MARSDEN, P. D.;COSTA, J. L.;REED, S. ; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J Immunol**.135: 4144-8,1985.

CASTES, M.;AGNELLI, A.;VERDE, O. ; RONDON, A. J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin Immunol Immunopathol**.27: 176-86,1983.

CASTILHO, T. M. ; SHAW, J. J. ; FLOETER-WINTER, L. M . New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **J Clin Microbiol** 41(2): 540-6, 2003.

CHANG, K. P.;BRAY, R. S. ; LEANEY, A. J. Infection of mouse macrophages in vitro by sandfly-derived promastigotes of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**.75: 475-6,1981.

CHENSUE, S. W. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. **Clin Microbiol Rev**.14: 821-35, table of contents,2001.

CHILDS, G. E.;LIGHTNER, L. K.;MCKINNEY, L.;GROVES, M. G.;PRICE, E. E. ; HENDRICKS, L. D. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Ann Trop Med Parasitol**.78: 25-34,1984.

COOK, D. N.;SMITHIES, O.;STRIETER, R. M.;FRELINGER, J. A. ; SERODY, J. S.  
CD8+ T cells are a biologically relevant source of macrophage inflammatory protein-1  
alpha in vivo. **J Immunol.**162: 5423-8,1999.

COOPER, M. A.;FEHNIGER, T. A.;FUCHS, A.;COLONNA, M. ; CALIGIURI, M. A.  
NK cell and DC interactions. **Trends Immunol.**25: 47-52,2004.

COSTA, J. M.;SALDANHA, A. C.;DE MELO E SILVA, A. C.;SERRA NETO,  
A.;GALVAO, C. E.;PEDROSO E SILVA CDE, M. ; DA SILVA, A. R. [The current  
status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhao. II. The  
epidemiological and clinico-evolutionary aspects]. **Rev Soc Bras Med Trop.**25: 115-  
23,1992.

DA-CRUZ, A. M.;CONCEICAO-SILVA, F.;BERTHO, A. L. ; COUTINHO, S. G.  
*Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human  
cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun.**62: 2614-8,1994.

DE MAGALHAES, A. V.;MORAES, M. A.;RAICK, A. N.;LLANOS-CUENTAS,  
A.;COSTA, J. M.;CUBA, C. C. ; MARSDEN, P. D. [Histopathology of cutaneous  
leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 4. Histopathological  
classification]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.**28: 421-30,1986.

DE MAGALHAES, A. V.;MORAES, M. A.;RAICK, A. N.;LLANOS-CUENTAS,  
A.;COSTA, J. M.;CUBA, C. C. ; MARSDEN, P. D. [Histopathology of tegumentary

leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 2. Tissue humoral response]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**.28: 293-9,1986.

DEKREY, G. K.;LIMA, H. C. ; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect Immun**.66: 827-9,1998.

DELGADO, O.;GUEVARA, P.;SILVA, S.;BELFORT, E. ; RAMIREZ, J. L. Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**.55: 267-72,1996.

DORNER, B. G.;SCHEFFOLD, A.;ROLPH, M. S.;HUSER, M. B.;KAUFMANN, S. H.;RADBRUCH, A.;FLESCH, I. E. ; KROCZEK, R. A. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. **Proc Natl Acad Sci U S A**.99: 6181-6,2002.

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. **J Immunol**.146: 3444-51,1991.

FURIE, M. B. & RANDOLPH, G. J. Chemokines and tissue injury. **Am J Pathol**.146: 1287-301,1995.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar. In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 8.ed.São Paulo: Atheneu, 1991. cap.7, p. 34-52.

GRIMALDI, G., JR.;SOARES, M. J. MORIEARTY, P. L. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**6: 397-408,1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica Volume II. Disponível em [http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/pdfs/guia\\_vig\\_epi\\_vol\\_II.pdf](http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/pdfs/guia_vig_epi_vol_II.pdf). Acesso em 20/10/2004.

HILL, J. O.;AWWAD, M. ; NORTH, R. J. Elimination of CD4+ suppressor T cells from susceptible BALB/c mice releases CD8+ T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*. **J Exp Med.**169: 1819-27,1989.

HORI, S.;CARVALHO, T. L. ; DEMENGEOT, J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. **Eur J Immunol.**32: 1282-91,2002.

KASAMA, T.;STRIETER, R. M.;LUKACS, N. W.;BURDICK, M. D. ; KUNKEL, S. L. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. **J Immunol.**152: 3559-69,1994.

KASAMA, T.;STRIETER, R. M.;STANDIFORD, T. J.;BURDICK, M. D. ; KUNKEL, S. L. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. **J Exp Med.**178: 63-72,1993.

KIM, J. J.;NOTTINGHAM, L. K.;SIN, J. I.; TSAI, A.;MORRISON, L.;OH, J.;DANG, K.;HU, Y.;KAZAHAYA, K.;BENNETT, M.;DENTCHEV, T.;WILSON, D. M.;CHALIAN, A. A.;BOYER, J. D.;AGADJANYAN, M. G. ; WEINER, D. B. CD8 positive T cells influence antigen-specific immune responses through the expression of chemokines. **J Clin Invest.**102: 1112-24,1998.

LAINSON, R.;RYAN, L. ; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**82: 421-4,1987.

LASKAY, T.;VAN ZANDBERGEN, G. ; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends Microbiol.**11: 210-4,2003.

LEMOS DE SOUZA, V.;ASCENCAO SOUZA, J.;CORREIA SILVA, T. M.;SAMPAIO TAVARES VERAS, P. ; RODRIGUES DE-FREITAS, L. A. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes Infect.**2: 1807-15,2000.

LIMA, G. M.;VALLOCHI, A. L.;SILVA, U. R.;BEVILACQUA, E. M.;KIFFER, M. M. ; ABRAHAMSOHN, I. A. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. **Immunol Lett.**64: 145-51,1998.

LIMA, H. C.;DEKREY, G. K. ; TITUS, R. G. Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**.94: 71-6,1999.

LIMA, H. C. ; TITUS, R. G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infect Immun**.64: 5442-5,1996.

LLANOS CUENTAS, E. A.;CUBA, C. C.;BARRETO, A. C. ; MARSDEN, P. D. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. **Trans R Soc Trop Med Hyg**.78: 845-6,1984.

LUNDGREN, A.;SURI-PAYER, E.;ENARSSON, K.;SVENNERHOLM, A. M. ; LUNDIN, B. S. *Helicobacter pylori*-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. **Infect Immun**.71: 1755-62,2003.

MARSDEN, P. D. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XIV. Leishmaniasis. **Rev Infect Dis**.6: 736-44,1984.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). **Trans R Soc Trop Med Hyg**.80: 859-76,1986.

MAUEL, J.;BEHIN, R. ; LOUIS, J. *Leishmania enriettii*: immune induction of macrophage activation in an experimental model of immunoprophylaxis in the mouse. **Exp Parasitol**.52: 331-45,1981.

MCMAHON-PRATT D.; BENNETT E.; DAVID JR. Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*.

**J Immunol**. 129(3):926-7. 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. **J Exp Med**.200: 201-10,2004.

MENDONCA, M. G.;DE BRITO, M. E.;RODRIGUES, E. H.;BANDEIRA, V.;JARDIM, M. L. ; ABATH, F. G. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous Leishmaniasis: is there a sterile cure? **J Infect Dis**.189: 1018-23,2004.

MOLL, H; RITTER, U.; FLOHE, S.; ERB, K.; BAUER, C. ; BLANK, C. Cutaneous leishmaniasis: a model for analysis of the immunoregulation by accessory cells. **Med Microbiol Immunol (Berl)**. 184(4):163-8,1996.

MONTAGNOLI, C.;BACCI, A.;BOZZA, S.;GAZIANO, R.;MOSCI, P.;SHARPE, A. H. ; ROMANI, L. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. **J Immunol**.169: 6298-308,2002.

MULLER, I. Role of T cell subsets during the recall of immunologic memory to *Leishmania major*. **Eur J Immunol**.22: 3063-9,1992.

MULLER, I.;PEDRAZZINI, T.;KROPF, P.;LOUIS, J. ; MILON, G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells. **Int Immunol**.3: 587-97,1991.

MULLER, K.;VAN ZANDBERGEN, G.;HANSEN, B.;LAUFS, H.;JAHNKE, N.;SOLBACH, W. ; LASKAY, T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Med Microbiol Immunol (Berl)**.190: 73-6,2001.

MURDOCH, C. & FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**.95: 3032-43,2000.

NEAL, R. A. ; HALE, C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniases. **Parasitology**.87 (Pt 1): 7-13,1983.

NOBEN-TRAUTH, N.;KROPF, P. ; MULLER, I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. **Science**.271: 987-90,1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WHO). Disponível em:

<http://www.who.int/ctd/html/leis.html>

PEARSON, R. D. & SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin Infect Dis.**22: 1-13,1996.

PEARSON, R. D. ; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **J Immunol.**127: 1438-43,1981.

PESSOA, S. & BARRETO, M. Profilaxia da leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo. *Folha Med.*, 22: 157-161,1941.

RAMIREZ, J. L. & GUEVARA, P. Persistent infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**92: 333-8,1997.

REINER, S. L. & LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annu Rev Immunol.**13: 151-77,1995.

RIDLEY, D. S. & RIDLEY, M. J. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. **J Pathol.**141: 83-96,1983.

RODRIGUEZ, V.;CENTENO, M. ; ULRICH, M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. **Parasite Immunol.**18: 341-5,1996.

ROSSI, D. & ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev Immunol.**18: 217-42,2000.

SACKS, D. & NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol.**2: 845-58,2002.

SAMUELSON, J.;LERNER, E.;TESH, R. ; TITUS, R. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **J Exp Med.**173: 49-54,1991.

SACKS, D & KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol.** 55: 453-83, 2001.

SARAVIA, N. G.;VALDERRAMA, L.;LABRADA, M.;HOLGUIN, 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. **J Infect Dis.**159: 725-35,1989.

SCAPINI, P.;LAPINET-VERA, J. A.;GASPERINI, S.;CALZETTI, F.;BAZZONI, F. ; CASSATELLA, M. A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol Rev.**177: 195-203,2000.

SCHARTON, T. M. & SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J Exp Med.**178: 567-77,1993.

SCHRUM, S.;PROBST, P.;FLEISCHER, B. ; ZIPFEL, P. F. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. **J Immunol**.157: 3598-604,1996.

SCHUBACH, A.;HADDAD, F.;OLIVEIRA-NETO, M. P.;DEGRAVE, W.;PIRMEZ, C.;GRIMALDI, G., JR. ; FERNANDES, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **J Infect Dis**.178: 911-4,1998.

SCOTT, P. & FARRELL, J. P. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. **Chem Immunol**.70: 60-80,1998.

SHANKAR, A. H.;MORIN, P. ; TITUS, R. G. *Leishmania major*: differential resistance to infection in C57BL/6 (high interferon-alpha/beta) and congenic B6.C-H-28c (low interferon-alpha/beta) mice. **Exp Parasitol**.84: 136-43,1996.

SOLBACH, W.;ROLLINGHOFF, M.;STENGER, S. ; BOGDAN, C. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. **Behring Inst Mitt**.230-8,1991.

STENGER, S.;DONHAUSER, N.;THURING, H.;ROLLINGHOFF, M. ; BOGDAN, C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **J Exp Med**.183: 1501-14,1996.

STENGER, S.;SOLBACH, W.;ROLLINGHOFF, M. ; BOGDAN, C. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. II. Endogenous tumor necrosis factor-alpha production by macrophages is induced by the synergistic action of interferon (IFN)-gamma and interleukin (IL) 4 and accounts for the antiparasitic effect mediated by IFN-gamma and IL 4. **Eur J Immunol**.21: 1669-75,1991.

TASWELL, C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. III. Validity tests for the single-hit Poisson model. **J Immunol Methods**. 72(1):29-40, 1984.

TEIXEIRA, M J; FERNANDES, J D; TEIXEIRA, C R; ANDRADE, B B; POMPEU, M M L; SILVA, J S; BRODSKYN, C I; BARRAL NETTO, M; BARRAL, A. - Distinct courses of cutaneous leishmaniasis are dependent on early chemokine expression patterns. **Infection and Immunity**, v.(.): p., in press, 2005.

THEODOS, C. M.;POVINELLI, L.;MOLINA, R.;SHERRY, B. ; TITUS, R. G. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. **Infect Immun**.59: 2839-42,1991.

THEODOS, C. M.;RIBEIRO, J. M. ; TITUS, R. G. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. **Infect Immun**.59: 1592-8,1991.

THOMAS, M. J.;NOBLE, A.;SAWICKA, E.;ASKENASE, P. W. ; KEMENY, D. M. CD8 T cells inhibit IgE via dendritic cell IL-12 induction that promotes Th1 T cell counter-regulation. **J Immunol**.168: 216-23,2002.

THOMPSON, C. & POWRIE, F. Regulatory T cells. **Curr Opin Pharmacol**.4: 408-14,2004.

TITUS, R. G.;MARCHAND, M.;BOON, T. ; LOUIS, J. A. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol**.7: 545-55,1985.

TITUS, R. G. ; RIBEIRO, J. M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**.239: 1306-8,1988.

TITUS, R. G.;SHERRY, B. ; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med**.170: 2097-104,1989.

TSUNAWAKI, S.;SPORN, M. ; NATHAN, C. Comparison of transforming growth factor-beta and a macrophage- deactivating polypeptide from tumor cells. Differences in antigenicity and mechanism of action. **J Immunol**.142: 3462-8,1989.

VAN ZANDBERGEN, G.;HERMANN, N.;LAUFS, H.;SOLBACH, W. ; LASKAY, T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infect Immun**.70: 4177-84,2002.

VENUPRASAD, K.;CHATTOPADHYAY, S. ; SAHA, B. CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response. **Hum Immunol**.64: 38-43,2003.

**ANEXO 1-Tabela com espessura da lesão de cada animal após a inoculação com  $10^5$  *L. braziliensis* na derme da orelha.**

	Semanas após a infecção									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Animal 1	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2	0,3
Animal 2	0,2	1,1	1,1	1,1	1,3	1,2	0,8	0,7	0,3	0,2
Animal 3	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,2	0,3
Animal 4	0,2	0,6	0,6	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4
Animal 5	0,2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,4	0,4	0,2	0,5	0,7
Animal 6	0,2	0,9	0,9	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3
Animal 7	0,1	0,4	0,8	0,4	1,3	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2
Animal 8	0,2	0,8	1,2	0,8	1,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2
Animal 9	0,2	1,4	1,3	1,4	1,2	0,9	0,5	0,2	0,3	0,4
Animal 10	0,3	0,6	0,8	0,6	0,8	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3
Animal 11	0,3	1,6	1,1	1,6	1,6	1,4	1,0	0,8	0,7	0,6
Animal 12	0,2	1,1	1,0	1,1	0,5	0,9	0,4	0,7	0,4	0,3
Animal 13	0,2	0,6	0,3	0,6	1,3	0,5	0,3	0,4	0,2	0,2
Animal 14	0,2	0,8	0,9	0,8	1,4	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2

## Anexo 2-Tabela da avaliação histopatológica da lesão de animais infectados com $10^5$ *L. braziliensis* na derme da orelha.

<b>Dia de Infecção</b>	<b>Úlcera</b>	<b>Amastigotas</b>	<b>Ninhos de amastigotas</b>	<b>Tipo de inflamação</b>	<b>Macrófagos</b>
<b>7 dias</b>	Ausente	?	Ausente	Focal	Poucos
<b>14 dias</b>	Ausente	?	Ausente	Focal	Moderado
<b>21 dias</b>	Presente	4+	Frequentes	Difusa. Denso	Frequentes
<b>28 dias</b>	Ausente	2 a 3+	Raros - ocasionais	Nodular	Frequentes
<b>35 dias</b>	Presente	4+	Frequentes	Nodular, Denso	Frequentes
<b>42 dias</b>	Ausente	3+	Raros	Nodular, Denso	Frequentes
<b>49 dias</b>	Ausente	4+	Frequentes	Nodular	Frequentes
<b>63 dias</b>	Ausente	?	Ausente	Nodular	Frequentes

<b>Dia de Infecção</b>	<b>Linfócitos</b>	<b>Monócitos</b>	<b>Neutrófilos</b>	<b>Plasmócitos</b>	<b>Matriz conjuntiva</b>	<b>Degeneração de miócitos</b>	<b>Vasculite</b>
<b>7 dias</b>	Raros	Raros	Raros	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>14 dias</b>	Raros	Raros	Raros	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<b>21 dias</b>	Presentes	presentes	Muitos	Ausentes	Ausente	Presente	Ausente
<b>28 dias</b>	Presentes	presentes	Muitos	Ausentes	Ausente	Presente	Presente
<b>35 dias</b>	Presente	Presente	Ocasionais	Ausentes	Ausente	Presente	Ausente
<b>42 dias</b>	Presentes	presentes	Muitos	Ausentes	Ausente	Presente	Presente
<b>49 dias</b>	Ausentes	Presentes	Presentes	Presentes	Presente	Ausente	Ausente
<b>63 dias</b>	Ausentes	Presentes	Presente	Presentes	Presente	Ausente	Ausente