



UFBA

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



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**APOPTOSE NA LEISHMANIOSE  
EXPERIMENTAL MURINA NO  
MODELO DO CAMUNDONGO CBA**

**CLÁUDIO PEREIRA FIGUEIRA**

Salvador - Bahia - Brasil

2002

123.4



001746

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

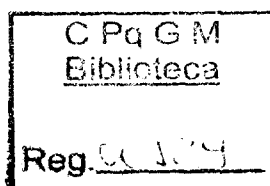
**APOPTOSE NA LEISHMANIOSE  
EXPERIMENTAL MURINA NO  
MODELO DO CAMUNDONGO CBA**

**CLÁUDIO PEREIRA FIGUEIRA**

Professor-Orientador: Luiz Antônio Rodrigues de Freitas

Dissertação apresentada para obtenção  
do grau de mestre em Patologia, área de  
concentração Patologia Experimental.

Salvador – Bahia  
2002



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Salvador - Bahia

F475a Figueira, Cláudio Pereira  
Apoptose na Leishmaniose experimental murina no modelo  
do camundongo CBA / Cláudio Pereira Figueira. \_ Salvador:  
Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia /  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo  
Cruz, 2002.  
98f. : il. tab.

Mestrado (Dissertação em Patologia Experimental)-  
Universidade Federal da Bahia, 2002.

1. Leishmaniose. 2. Camundongos isogênico. 3. Apoptose.  
*Leishmania amazonensis*. 4. *Leishmania major*. I. Título.

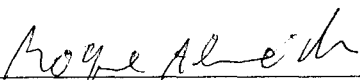
CDU 616.993:599.323.4

APOPTOSE NA LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL MURINA: O MODELO DO  
CAMUNDONGO CBA

**CLÁUDIO PEREIRA FIGUEIRA**

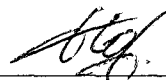
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



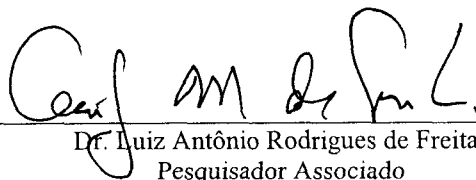
---

Dr. Roque Pacheco de Almeida  
Professor Adjunto  
FAMED - UFBA



---

Dr. Johan Van Weyenbergh  
Pesquisador Visitante  
CPqGM - FIOCRUZ



---

Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas  
Pesquisador Associado  
CPqGM - FIOCRUZ

Apoio Financeiro:

CPqGM- FIOCRUZ

CAPES

Aos meus pais Oscar (*in memoriam*) e Dilma

À minha querida Ilza

Aos meus irmãos Marli e Oscar

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

Obrigado:

Dr. Luiz A. R. de Freitas pela orientação.

Dra. Patrícia Veras pelo incentivo e contribuição em algumas atividades deste estudo.

Dr. Johan Van Weyenbergh pela contribuição com alguns reagentes e sugestões.

Valderez Lemos de Souza por todo o suporte no laboratório, incentivo e amizade.

Dra. Tânia Correa pelo incentivo.

Dra. Juana Wietzerbin (INSERM – U365) pela colaboração e na obtenção de alguns reagentes fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao colega Jorge Clarêncio e ao estudante Omar pela contribuição no citômetro de fluxo.

Sandra e Tatiana pela contribuição nos cortes histológicos.

Dra. Marilda Gonçalves pelo incentivo.

Marcus Weiby por alguns esclarecimentos técnicos e pela amizade.

Ao estudante Lucas Andrade pela contribuição em algumas atividades deste estudo.

Dra. Theolis Barbosa pelos ensinamentos em citometria de fluxo.

Aos colegas do LPBC Tânia Silva, Ivana Gomes, Marco Silvany, Taís, Gabriela, Aknar, Cleusa, Juliana Freitas, Juliana Perrone, Fábio, Guilherme, Caciús e Alice pela amizade.

Dra. Maria Lúcia pelos ensinamentos em Microscopia Eletrônica.

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

Sra. Rosália Meireles e Mara Evangelista pelo suporte nas questões administrativas do curso.

À equipe da biblioteca em especial a bibliotecária Ana Maria Fiscina Sampaio pela contribuição na normatização das referências bibliográficas.

À equipe do biotério em especial ao colega Antônio Carlos Muniz pela colaboração e amizade.

Aos colegas de turma do mestrado pelo agradável convívio e amizade.

Ao Curso de Pós-graduação em Patologia- FIOCRUZ/UFBA.

À direção do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela oportunidade e incentivo.



# SUMÁRIO

## LISTA DE ABREVIATURAS

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## RESUMO

## ABSTRACT

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>13</b> |
| 1.1      | ASPECTOS GERAIS .....   | 13        |
| 1.2      | O PARASITO .....  | 14        |
| 1.3      | CICLO DE VIDA.....  | 15        |
| 1.4      | INTERAÇÃO HOSPEDEIRO – LEISHMANIA.....  | 16        |
| 1.5      | LEISHMANIOSE .....  | 19        |
| 1.6      | O MODELO MURINO .....   | 22        |
| 1.7      | O MODELO DO CAMUNDONGO CBA .....  | 24        |
| 1.8      | APOPTOSE .....  | 25        |
| 1.8.1    | Breve Histórico.....  | 25        |
| 1.8.2    | Apoptose x Necrose.....   | 26        |
| 1.8.3    | Mecanismo da Apoptose.....  | 27        |
| 1.8.4    | Apoptose no Sistema Imune.....  | 30        |
| 1.8.1    | Apoptose em Doenças Infecciosas.....  | 31        |
| 1.8.2    | Apoptose na Leishmaniose Murina.....  | 33        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>  | <b>36</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL .....  | 36        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 36        |
| <b>3</b> | <b>JUSTIFICATIVAS .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>4</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>   | <b>39</b> |
| 4.1      | ANIMAIS .....   | 39        |
| 4.2      | PARASITOS.....  | 39        |
| 4.3      | INFECÇÃO.....   | 40        |
| 4.4      | MONITORAMENTO DO TAMANHO DAS LESÕES .....   | 40        |
| 4.5      | ASPECTOS HISTOLÓGICOS .....   | 41        |
| 4.5.1    | Microscopia Óptica .....  | 41        |
| 4.5.2    | Microscopia Eletrônica.....   | 41        |
| 4.6      | IMUNOHISTOQUÍMICA ANTI- <i>Leishmania</i> .....                                   | 42        |
| 4.7      | DETECÇÃO DE CÉLULAS EM APOPTOSE IN SITU ATRAVÉS DA<br>TÉCNICA DE TUNEL.....       | 44        |
| 4.8      | CONTAGEM DE CÉLULAS TOTAIS E DE CÉLULAS MORTAS .....                              | 46        |
| 4.9      | ANÁLISE DE CÉLULAS EM APOPTOSE POR CITOMETRIA DE<br>FLUXO EX-VIVO E IN VITRO..... | 46        |
| 4.9.1    | Análise ex-vivo.....  | 46        |
| 4.9.2    | Análise in vitro.....   | 48        |
| 4.9.3    | Aquisição dos Dados no Citômetro.....   | 49        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.10     | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 51        |
| 4.11     | CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....   | 51        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>52</b> |
| 5.1      | MONITORAMENTO DO TAMANHO DAS LESÕES DE PATA DE CAMUNDONGOS CBA INFECTADOS COM <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> ..... | 52        |
| 5.2      | FREQÜÊNCIA EX-VIVO DE CÉLULAS VIÁVEIS E NÃO-VIÁVEIS DO LINFONODO.....   | 54        |
| 5.3      | FREQÜÊNCIA EX-VIVO DE CÉLULAS ANEXINA-V POSITIVAS POR CITOMETRIA DE FLUXO .....   | 57        |
| 5.3.1    | Células Totais do Linfonodo.....  | 57        |
| 5.3.2    | Células CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do Linfonodo.....   | 59        |
| 5.4      | FREQÜÊNCIA DE CÉLULAS CD4 <sup>+</sup> E CÉLULAS CD8 <sup>+</sup> NO LINFONODO DE DRENAGEM .....                            | 61        |
| 5.5      | AVALIAÇÃO DA FREQÜÊNCIA DE CÉLULAS CD4 <sup>+</sup> E CÉLULAS CD8 ANEXINA POSITIVA APÓS REESTÍMULO IN VITRO .....           | 63        |
| 5.6      | AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS LINFONODOS DE DRENAGEM .....  | 66        |
| 5.6.1    | Descrição dos Linfonodos Popliteos .....  | 66        |
| 5.6.2    | Avaliação Ultra-Estrutural dos Linfonodos – Caracterização de Células Apoptóticas .....                                     | 71        |
| 5.7      | AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA FREQÜÊNCIA DE CÉLULAS EM APOPTOSE EM LINFONODOS DE DRENAGEM ATRAVÉS DA TÉCNICA DE TUNEL.....      | 74        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>   | <b>77</b> |
| <b>7</b> | <b>RESUMO DOS RESULTADOS.....</b>   | <b>87</b> |
| <b>8</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>  | <b>88</b> |
| <b>9</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>89</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |   |
|---------|---|
| APC-    | “Antigen-Presenting Cell” (célula apresentadora de antígeno)          |
| DMEM-   | “Dulbecco’s Modified Eagle’s Médium” (meio de cultivo de células)     |
| DTH-    | “Delayed Type Hypersensitivity” (reação de hipersensibilidade tardia) |
| H-E –   | Hematoxilina-Eosina   |
| HEPES – | N-2hidroxitilpiperazina-N’-2-etano ácido sulfônico                    |
| IFN –   | Interferon  |
| IL-     | “Interleukin” (Interleucina)  |
| LCD –   | Leishmaniose Cutânea Difusa   |
| LCL –   | Leishmaniose Cutânea Localizada                                       |
| LCM –   | Leishmaniose Cutânea-Mucosa   |
| LT –    | Leishmaniose Tegumentar   |
| LV –    | Leishmaniose Visceral   |
| LIT –   | “Liver Infusion Trytose”  |
| LPG –   | Lipofosfoligano   |
| NO –    | “Nitric Oxide” (óxido nítrico)  |
| PG –    | Fosfoligancos   |
| PPG –   | Proteofosfoligano   |
| sAP –   | Fosfatase Ácida Secretada   |
| TNF -   | Fator de Necrose Tumoral  |

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1-</b> Aquisição e análise no citômetro de fluxo.....  | 50 |
| <b>Figura 2-</b> Curso da infecção de camundongos CBA infectados com <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> . .....   | 53 |
| <b>Figura 3-</b> Contagem de células do linfonodo de camundongos CBA infectados com <i>L. amazonensis</i> (LA), <i>L. major</i> (LM) e inoculados com salina.....  | 56 |
| <b>Figura 4-</b> Frequência de células positivas exclusivamente para anexina-v do linfonodo de drenagem de camundongos CBA infectados com <i>L. amazonensis</i> (LA), <i>L. major</i> (LM) e inoculados com salina. ....                                     | 58 |
| <b>Figura 5-</b> Frequência de células CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> positivas para anexina-V do linfonodo de drenagem de camundongos CBA infectados com <i>L. amazonensis</i> (LA), <i>L. major</i> (LM) e inoculados com salina. ....                | 60 |
| <b>Figura 6-</b> Frequência de células CD4 <sup>+</sup> do linfonodo de drenagem de camundongos CBA infectados com <i>L. amazonensis</i> (LA), <i>L. major</i> (LM) e inoculados com salina. ....  | 62 |
| <b>Figura 7-</b> Frequência de apoptose de células CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do linfonodo de drenagem de camundongos CBA infectados com <i>L. amazonensis</i> (La), <i>L. major</i> (Lm) e inoculados com salina, após 72h de reestímulo in vitro. | 65 |
| <b>Figura 8-</b> Corte histológico de linfonodo popliteo de camundongo CBA infectado com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> – 6, 23 e 42 dias .....  | 70 |
| <b>Figura 9A-</b> L.a 21d – Células em diferentes estágios do processo de apoptose. Cromatina condensada disposta na periferia em meia-lua (seta). Célula em estágio mais tardio de apoptose (cabeça de seta). ....  | 72 |
| <b>Figura 9B-</b> Lm/ 23 dias – Macrófago com corpos apoptóticos de diferentes dimensões no citoplasma. ....   | 72 |
| <b>Figura 9C-</b> La/ 42dias – Macrófago com vacúolo parasitífero contendo duas formas amastigotas (seta), próximo de corpos apoptóticos internalizados (destaque). ....   | 73 |
| <b>Figura 10-</b> Secções de linfonodos submetidos à marcação de TUNEL.....  | 75 |
| <b>Figura 11-</b> Frequência in situ de células TUNEL positivas de linfonodos de drenagem de camundongos CBA infectados com <i>L. amazonensis</i> , <i>L. major</i> e inoculados com PBS.....  | 76 |

## RESUMO

**APOPTOSE NA LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL MURINA: O MODELO DO CAMUNDONGO CBA. CLÁUDIO PEREIRA FIGUEIRA.** Apoptose é um tipo de morte celular geneticamente regulada, com características morfológicas e bioquímicas específicas, essencial na organogênese e na manutenção da homeostase do organismo. Este evento celular também está envolvido na patogênese de diferentes doenças. Nas doenças parasitárias, como na doença de Chagas, tem sido demonstrada a importância deste evento para o estabelecimento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Na leishmaniose, poucos trabalhos tem investigado a participação da apoptose nos mecanismos de resistência e susceptibilidade desta doença. Nós avaliamos a ocorrência deste evento no modelo de leishmaniose murino, utilizando camundongos isogênicos CBA infectados com *L. amazonensis*, para as quais são susceptíveis, ou *L. major*, para as quais são resistentes. Diferente de outros modelos que utilizam camundongos com background genético distintos, este modelo permite apontar para fatores relacionados ao parasito que possam estar determinando o padrão de resposta. Foram utilizadas diferentes técnicas para a detecção da apoptose em diferentes fases deste processo. Células do linfonodo de drenagem foram avaliadas no intervalo de 7 a 42 dias de infecção. Nós observamos através da contagem com a coloração de azul de tripan, que houve um aumento no número de células mortas nos linfonodos dos animais infectados com *L. amazonensis*, porém em relação ao número de células totais, o percentual de células mortas foi semelhante entre os dois grupos. Através da análise na citometria de fluxo com marcação com anexina-V, verificou-se baixa frequência de células apoptóticas, tanto em células totais como em linfócitos T CD4+ e TCD8+. Porém, verificou-se uma diminuição na frequência de células CD4+ nos animais infectados. Na análise in situ através da marcação com a técnica de TUNEL, observou-se com sete dias um maior número de células apoptóticas nos animais infectados com *L. major* e com 21 dias um maior número de células em apoptose nos animais infectados com *L. amazonensis*, no 42º dia não houve diferenças entre os grupos. Na microscopia eletrônica foram evidenciados os aspectos típicos de apoptose nos dois grupos, sendo que foram observados com maior frequência macrófagos com corpos apoptóticos nos linfonodos dos animais infectados com *L. amazonensis* no 42º dia. A análise histopatológica mostra aumento no número de macrófagos com 42º dia nos animais infectados com *L. amazonensis*. Os dados apresentados mostram diferenças na cinética e na frequência da ocorrência de apoptose na resposta de resistência e de susceptibilidade.

Palavras Chaves: Leishmaniose. Camundongo isogênico. Apoptose. *Leishmania amazonensis*. *Leishmania major*.

## ABSTRACT

**APOPTOSIS IN MURINE EXPERIMENTAL LEISHMANIASIS: THE CBA MOUSE MODEL. CLÁUDIO PEREIRA FIGUEIRA** Apoptosis is a type of genetically regulated cell death, with specific morphological and biochemical characteristics, and it is essential in organogenesis and maintenance of homeostasis of the organism. This cellular event is also involved in the pathogenesis of different diseases. In parasite-caused diseases, such as Chagas' disease, the importance of this event for the establishment of infection by *Trypanosoma cruzi* has been demonstrated. In leishmaniasis, few studies have investigated the participation of apoptosis in the mechanism of resistance and susceptibility in this disease. We evaluated the occurrence of this event in the murine leishmaniasis model, using isogenic CBA mice infected with *L. amazonensis*, to which they are susceptible, or *L. major*, to which they are resistant. Different from the other models that use mice with distinct genetic background, this model allows the identification of factors related to the parasite which could be determining the response pattern. Different techniques were used for the detection of apoptosis in different phases of this process. Cells from the draining lymph node were evaluated in intervals of 7 to 42 days of infection. We observed, through counting with tripan blue coloring, that there was an increase in the number of killed cells in the lymph nodes of the animals infected with *L. amazonensis*, however, in relation to the total number of cells, the percentage of killed cells was similar between both groups. Through the analysis of flow cytometric staining with annexin-V, a low frequency of apoptotic cells, both in total cells and in T CD4+ and CD8+ lymphocytes was detected. However, a decrease in the frequency of CD4+ cells in the infected animals was detected. The in situ analysis through staining with TUNEL technique displayed a higher number of apoptotic cells in the infected animals with *L. major* for 7 days, and at 21 days a higher number of cells in apoptosis in the animals infected with *L. amazonensis*, on the 42<sup>nd</sup> day there was no difference between the groups. In electronic microscopy the typical aspects of apoptosis were evidenced in both groups, but macrophages with apoptotic bodies in the lymph nodes were observed with more frequency in the animals infected with *L. amazonensis* on the 42<sup>nd</sup> day. The histopathologic analysis showed an increase in the number of macrophages on the 42<sup>nd</sup> day in the animals infected with *L. amazonensis*. The data presented show differences in kinetics and frequency of occurrence of apoptosis in resistance, as well as susceptibility.

**Key Words:** Leishmaniasis. Isogenic Mice. Apoptosis. *Leishmania amazonensis*. *Leishmania major*.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS

As leishmanioses estão distribuídas em várias áreas do mundo, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais de todos continentes, exceto a Austrália. Segundo a OMS existem 12 milhões de casos de leishmaniose no mundo, distribuídos em 88 países. A incidência é de 2 milhões de casos anuais de leishmaniose cutânea. No continente americano, ela se distribui amplamente, sendo que no Brasil apresenta um dos maiores números de casos e está em franco crescimento, tanto em magnitude, como em expansão geográfica (LEISHMANIASIS..., 2002).

Esta zoonose é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, tendo como reservatório o cão, roedores e outros mamíferos. A transmissão ocorre através da picada do inseto vetor infectado, o flebótomo. A leishmaniose que inicialmente só afetava o homem por acidente, quando ele invadia os ecótopos naturais dos reservatórios silvestres durante as derrubadas das matas, passou a sofrer um processo de endemização em áreas de colonização antiga, como resultado da adaptação do parasito ao ambiente domiciliar, principalmente devido á presença dos animais domésticos (BRASIL, 1999).

A doença é causada por diferentes espécies de *Leishmania* que são capazes de produzir variadas manifestações clínicas, sendo o resultado da infecção dependente tanto da resposta imune do hospedeiro como da espécie infectante (GRIMALDI & TESH, 1993).

A busca pela compreensão dos mecanismos imuno-patogênicos desta doença através de diferentes abordagens, inclusive através de modelos experimentais, tem sido um caminho para a construção de estratégias para a interrupção da transmissão e na melhoria do tratamento.

## 1.2 O PARASITO

*Leishmania* são protozoários do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Ela apresenta duas formas evolutivas no seu ciclo de vida, que alterna entre o vetor invertebrado (Flebotomíneo – Diptera: Psychodidae) e o hospedeiro mamífero, incluindo o homem. A forma promastigota possui um flagelo, formato alongado e sobrevive no meio extracelular, colonizando o sistema digestório do flebotomíneo, enquanto a forma amastigota possui um resquício do flagelo, formato arredondado e sobrevive no fagolisossomo de macrófagos do hospedeiro mamífero (BITTENCOURT & BARRAL-NETO, 1995).

Durante o desenvolvimento no flebotomíneo podem ser observadas pelo menos cinco formas diferentes de promastigotas, a procíclica, a nectomonade, haptomonade, paramastigota e a metacíclica (BATES, 1994). Estas formas estão presentes em diferentes regiões do sistema digestório do flebótomo e somente a forma metacíclica é capaz de infectar o hospedeiro mamífero.

Existe uma grande diversidade no gênero *Leishmania*, porém morfológicamente as diferentes espécies são semelhantes. A classificação é baseada de acordo com o desenvolvimento das espécies de *Leishmania* no



aparelho digestório do flebótomo. O gênero é subdividido em dois subgêneros, o subgênero *Leishmania* e o *Viannia* (LAINSON & SHAW, 1987). As espécies do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se nos insetos vetores na região suprapilária. Fazem parte deste subgênero os complexos *Leishmania donovani* e *Leishmania mexicana*. Já as espécies do subgênero *Viannia* desenvolvem-se na região peripilária dos insetos vetores. O complexo *Leishmania braziliensis* faz parte deste subgênero.

### 1.3 CICLO DE VIDA

O ciclo de vida da *Leishmania* é heteroxênico. O flebótomo fêmea, ao picar o hospedeiro mamífero infectado, ingere células contendo *Leishmania* na forma amastigota. Uma membrana peritrófica é formada no estômago do flebótomo, envolvendo o sangue ingerido. As células infectadas se rompem e liberam as amastigotas que se diferenciam em promastigotas procíclicas. Dentro da membrana peritrófica as promastigotas se multiplicam por divisão binária e após aproximadamente três dias da ingestão elas escapam da membrana e migram para o aparelho bucal do vetor. Neste local, após cinco dias, observam-se as formas promastigota metacíclica, posicionadas numa região que facilita sua transmissão no momento do repasto sanguíneo do flebótomo fêmea (BATES, 1994).

Ao picar o hospedeiro mamífero para se alimentar, o flebótomo transmite a *Leishmania*. O vetor provoca um hematoma no local da picada, originado da laceração de vênulas superficiais na derme do mamífero, onde são lançadas as

formas infectantes da *Leishmania* juntamente com a saliva do flebótomo (RIBEIRO, 1995). Após a inoculação, as promastigotas metacíclicas interagem e resistem aos fatores séricos opsonizantes e ao complemento (BRITTINGHAM et al., 1995) o que favorece a sua fagocitose por macrófagos, principal célula que alberga este parasito no hospedeiro mamífero. No vacúolo parasitóforo a *Leishmania* promastigota diferencia-se na forma amastigota, sobrevive e multiplica-se por divisão binária até a morte do macrófago, quando são liberadas para o meio extracelular, sendo fagocitadas por outros macrófagos, mantendo assim a infecção.

#### 1.4 INTERAÇÃO HOSPEDEIRO – LEISHMANIA

A capacidade de a *Leishmania* evitar sua destruição em diferentes ambientes hostis no decorrer do ciclo de vida permite o estabelecimento da infecção nos hospedeiros. A participação de moléculas de superfície e secretadas da *Leishmania* representam um papel importante nesta fase. Moléculas como o lipofosfoglicano (LPG) e a metaloproteinase GP63, ambas presentes na superfície do parasito, bem como fosfoglicanos (PGs), proteofosfoglicanos (PPG) e fosfatase ácida secretada (sAP), que são moléculas exportadas, têm papéis importantes na manutenção da infecção tanto no flebotomíneo quanto no mamífero.

O LPG foi identificado em promastigotas de todas as espécies de *Leishmania* já estudada como o principal glicoconjugado de superfície destas células (TURCO,1992). No entanto, na forma amastigota esta molécula é expressa em um menor número de cópias, sendo que na *L. mexicana* e na

*Leishmania donovani* o LPG não é expresso, e na *Leishmania major* a capacidade de expressão é preservada (BAHR et al., 1993). O LPG é constituído por três segmentos. Uma âncora lipídica de glicofosfatidilinositol (GPI), que é ligada a membrana plasmática do parasito, um núcleo intermediário de hexasacarídeo e um segmento mais externo constituído de dissacarídeos fosforilados. Esta molécula apresenta estrutura única nas *Leishmanias*. Está presente em toda superfície do parasito inclusive no flagelo. O último segmento varia entre espécies (ILG et al., 1992), e é responsável pela atividade biológica do LPG, como a ligação ao epitélio da mucosa do sistema digestivo do flebotomíneo durante a metaciclogênese (VIEIRA et al., 1996).

Muitas atividades relacionadas à virulência têm sido atribuídas ao LPG, tanto no hospedeiro vertebrado como no invertebrado, a exemplo de: inibição de proteases do sistema digestivo do flebotomíneo (SCHLEIN et al., 1990), ligação de promastigotas a parede do estômago do vetor (PIMENTA et al., 1992), resistência à lise mediada por complemento no sangue (PUENTES et al., 1988), ligação e entrada no macrófago hospedeiro (HANDMAN & GODING, 1985) e inibição de vias de transdução de sinais em macrófagos (DESCOTEAUX et al., 1992). Sacks et al. (2000), utilizando leishmânias transgênicas que não expressavam enzimas chaves na biossíntese do LPG e do PPG, confirmaram a importância do LPG para a ligação de promastigotas à mucosa do sistema digestório do flebotomo, no entanto, foi verificada apenas na molécula de PPG a atividade inibitória das enzimas digestivas do inseto vetor.

Os proteofosfoglicanos são glicoconjugados que apresentam unidades de fosfoglicanos (PG), semelhante ao LPG, acopladas a uma molécula de proteína. A

leishmania sintetiza e secreta diferentes glicoconjugados em diferentes fases do seu ciclo de vida (ILG et al., 2000).

O PPG filamentar (fPPG) é secretado pela *Leishmania* na forma promastigota através da bolsa flagelar e tende a se agregar e formar uma malha destas moléculas filamentosas. Na *L. major*, na qual esta molécula está bem caracterizada, o fPPG é constituído predominantemente de fosfoglicanos (~ 96% p/p) e pequena quantidade de aminoácidos (~4% p/p). O fPPG apresenta um papel essencial no sucesso da colonização do flebótomo e possui ação sobre macrófagos do hospedeiro mamífero, suprimindo a produção de TNF- $\alpha$ , um efeito potencialmente benéfico para a invasão de promastigotas. Por outro lado, o fPPG tem ação sinérgica com IFN- $\gamma$  na produção de óxido nítrico, que possui ação leishmanicida (PIANI et al., 1999).

Amastigotas de *L. mexicana* não sintetizam LPG, mas secretam PPG denominado amastigota PPG (aPPG), dentro do vacúolo parasitóforo do macrófago hospedeiro. Esta molécula está presente em altas concentrações nas lesões teciduais de camundongos infectados com *L. mexicana* e acumula-se no vacúolo parasitóforo do macrófago parasitado, contribuindo para a sua enorme expansão, aspecto típico de macrófagos infectados com *L. mexicana* ou por *L. amazonensis* (PETERS et al., 1997). O aPPG, embora presente em abundância, não induz uma resposta humoral ou celular em animais infectados. Esta propriedade pode ser atribuída a dificuldade do seu processamento por APC em função da sua complexa glicosilação, levando a inibição da sua apresentação ao sistema imune (AEBISCHER et al., 1999). Uma propriedade importante do aPPG

é ativação do complemento através da via da “mannose-binding lectin” (PETERS et al., 1997). Devido a sua grande capacidade de ativar esta via do complemento, a liberação desta molécula no meio extracelular através da ruptura da célula parasitada ou através da sua exportação por tráfico vesicular, pode exaurir localmente C3 e ajudar o parasito a evitar a lise por complemento. A ativação contínua desta via na lesão também pode levar ao acúmulo de C3a, C4a e possivelmente C5a, os quais são potentes agentes quimiotáticos para monócitos, e pode contribuir para o recrutamento de novas células hospedeiras para o sítio da infecção (PETERS et al., 1997).

## 1.5 LEISHMANIOSE

Baseadas na forma clínica as leishmanioses podem ser divididas em dois grupos: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV). A forma tegumentar apresenta diferentes manifestações clínico-imuno-patológicas (BRYCESON, 1969) com grau de gravidade que alterna entre pequenas lesões autocicatrizantes a lesões deformantes. Com base nos aspectos clínicos, a leishmaniose tegumentar pode ser subdividida nas formas cutânea localizada (LCL), cutânea-mucosa (LCM), cutânea-difusa (LCD) e cutânea disseminada.

Diferentes espécies de *Leishmania* podem provocar formas diversas da doença. Parasitos do complexo *L. donovani* estão relacionadas, tanto no Novo quanto no Velho Mundo, com a forma visceral caracterizada pela infecção de células do sistema fagocítico mononuclear de órgãos internos como fígado, baço, e medula óssea. No Novo Mundo, a infecção pela *L. chagasi* é a principal causa

da leishmaniose visceral e a *L. donovani* no Velho Mundo (BITTENCOURT & BARRAL-NETO, 1995).

Os parasitos que causam a forma tegumentar no Novo Mundo estão agrupados nos complexos *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana*. Parasitos do complexo *L. braziliensis* causam LCL e MCL enquanto que parasitos do complexo *L. mexicana* não envolvem geralmente a mucosa, causando lesões limitadas e autocicatrizantes. A *L. braziliensis* é responsável pelas formas mais graves da leishmaniose cutânea. A *L. amazonensis* causa lesão única ou um número limitado de lesões, porém está associada menos frequentemente as forma LCM, LCD e LV. A infecção por *L. mexicana* apresenta entre 40% a 93% dos casos com lesão única autocicatrizante, mas causa também LCD. No Velho Mundo, as três principais espécies causadoras desta doença são a *L. tropica*, a *L. aethiopica* e a *L. major*. A *L. aethiopica* está associada a LCD e a LCM. A *L. major* induz doença menos grave e autolimitada quando comparada com os agentes do Novo Mundo e confere proteção contra reinfecções (BITTENCOURT & BARRAL-NETO, 1995).

Na LCL, as lesões surgem no local da picada do flebótomo como uma pequena pápula que desenvolve em um nódulo ulcerado no centro. Podem ocorrer lesões cutâneas únicas ou múltiplas, geralmente localizadas e ulceradas, sendo que a forma mais freqüente é uma úlcera de borda elevada e fundo plano, que cicatriza espontaneamente ou tem curso indolente. Menos freqüentemente, as lesões podem aumentar de tamanho, tornarem-se nodulares ou verrucosas. Estas formas podem sofrer ulcerações ou não (GRIMALDI, 1982).

Nos pacientes com LCM, a lesão mucosa pode aparecer algumas semanas ou anos após o desaparecimento da lesão inicial, devido a um provável quadro de disseminação hematogênica do parasito, para sítios da mucosa nasal, palato, úvula, faringe e lábio superior, causando destruição desses sítios e podendo ocorrer perfuração do septo nasal. Alguns autores, frente à natureza crônica e destrutiva da LCM, têm considerado essa forma clínica como o pólo hiperérgico da doença devido à intensa resposta imune mediada por células aos antígenos de *Leishmania* (CARVALHO et al., 1985).

Os pacientes com as formas LCL e LCM desenvolvem resposta de hipersensibilidade tardia a antígenos do parasito, apresentando reação de Montenegro positiva e produção reduzida de anticorpos específicos. As lesões apresentam pouco ou nenhum parasito, freqüentes granulomas, necrose, vasculite e hiperplasia da epiderme. Os pacientes em geral respondem ao tratamento (CASTES et al., 1983).

Na LCD as lesões evoluem formando pápulas, nódulos ou infiltrações difusas, de distribuição simétrica na face, tronco e membros, podendo disseminar-se para todo o corpo, sendo que o comprometimento da mucosa é ausente ou superficial. Nestes casos verifica-se disseminação do parasito de um sítio para outro através do sistema linfático, sem ocorrer visceralização (BITTENCOURT & BARRAL-NETO, 1995; MAUEL & BEHIN, 1981). Os pacientes com esta forma da doença não desenvolvem resposta de hipersensibilidade tardia a antígenos do parasito, apresentando reação de Montenegro negativa, caracterizando assim ausência de resposta imune celular contra o parasito, no entanto eles desenvolvem altos níveis de anticorpos, demonstrando resposta humoral intensa

(CASTES et al., 1983). As lesões destes pacientes apresentam acúmulo de macrófagos vacuolados repletos de parasitos, ausência de granulomas e epiderme geralmente atrófica. Os pacientes não curam da doença com o tratamento, tendo alternância de melhoras e agravamento do quadro.

## 1.6 O MODELO MURINO

O desenvolvimento de modelos experimentais em camundongos isogênicos para o estudo da leishmaniose tem contribuído para o melhor entendimento da patogênese desta doença. Nos últimos anos, vários estudos têm se acumulado, explorando os modelos de resistência e susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos infectados com diferentes espécies de *Leishmania* (BOGDAN et al., 1996). O uso de camundongos “knockout”, depletados de genes específicos, também tem sido utilizado como mais uma ferramenta na compreensão de certos aspectos imunológicos da leishmaniose experimental murina.

Algumas características das manifestações clínicas na doença humana são reproduzidas em várias linhagens de camundongos. As linhagens de camundongos considerados resistentes desenvolvem um padrão que se assemelha à LC localizada. No curso da infecção, desenvolvem lesões pequenas locais, são capazes de destruir os parasitos e de montar uma resposta imune protetora evoluindo para a cura espontânea da infecção. Os estudos histológicos mostram a presença de reação granulomatosa na lesão, associada a um número pequeno de parasitos. Já as linhagens consideradas como modelos de susceptibilidade desenvolvem lesões progressivas, ulceradas, podendo evoluir



com visceralização e morte. Há intenso parasitismo no local de inoculação e necrose lítica. Algumas linhagens de camundongos desenvolvem resposta intermediária, as lesões pequenas persistentes, apresentam parasitismo relativamente grande, mas a infecção não é fatal (ANDRADE et al., 1984; BRADLEY & KIRKLEY, 1977; PEREZ et al., 1978).

Estudos caracterizando a resposta imune das linhagens resistentes e susceptíveis verificaram o desenvolvimento de uma resposta polarizada para um dos tipos de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, Th1 ou Th2. A subdivisão em linfócitos Th1 e Th2 é baseada no padrão de citocinas que eles produzem. Linfócitos Th1 produzem interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-2 (IL-2), enquanto linfócitos Th2 produzem IL-4 e IL-5. A imunidade protetora depende da indução de linfócitos T produzirem citocinas Th1 que ativam macrófagos a matar organismos intracelulares, principalmente através do mecanismo mediado 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. A IL-12 é uma das citocinas que contribui significativamente para uma montagem de uma resposta Th1 (HEINZEL et al., 1995; HANDMAN, 2001).

Alguns trabalhos apontam para um papel importante das células T CD8<sup>+</sup> no controle da infecção no modelo murino da leishmaniose. Estas células são produtoras de IFN- $\gamma$ , contribuindo para a definição de uma resposta Th1 e para ativação de macrófagos parasitados, além da sua atividade citotóxica, através da via Fas-FasL ou da liberação de grânulos de perforina. A depleção das células T CD8<sup>+</sup> com anticorpos monoclonais, exacerba as lesões de camundongos

resistentes e susceptíveis, por outro lado foi também demonstrado que camundongos desprovidos de linfócitos T CD8<sup>+</sup> conseguem controlar infecção por *L. major* e montar resposta Th1 (TITUS et al., 1987; BELKAID et al., 2002; HUBER et al., 1998).

## 1.7 O MODELO DO CAMUNDONGO CBA

Camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazonensis* apresentam perfis de resposta imune e tecidual distintos. O perfil de resistência desses camundongos na infecção por *L. major* correlaciona-se com fenótipo Th1, com produção aumentada de IFN- $\gamma$ , enquanto o perfil de susceptibilidade observado na infecção por *L. amazonensis* está relacionado com o fenótipo Th2, com produção aumentada de IL-4 (LEMOS DE SOUZA et al., 2000).

Os aspectos histopatológicos mostram padrões de resposta teciduais no sítio de infecção e no linfonodo de drenagem que se correlacionam com resistência e susceptibilidade semelhantes aos descritos em outros modelos (ANDRADE et al., 1984; BARRAL-NETTO et al., 1987). Os camundongos infectados com *L. amazonensis* apresentam um infiltrado inflamatório macrofágico difuso, monomórfico, com intenso parasitismo, áreas de necrose lítica, microabscessos e úlceras. Nos animais infectados com *L. major* observa-se um infiltrado mononuclear misto, com aumento progressivo do número de linfócitos na lesão, fibrose, necrose fibrinóide e formação de granulomas, que culmina na cura espontânea das lesões compostas principalmente de macrófagos.

Os linfonodos de drenagem também apresentam diferenças importantes, a depender da espécie de *Leishmania* infectante. Observa-se nos camundongos infectados com *L. amazonensis* acúmulo de células macrofágicas na zona cortical, sendo várias delas parasitadas ou carreando antígeno no seu citoplasma. O número destas células aumenta progressivamente, modificando a arquitetura do linfonodo. Muitos plasmócitos são também observados. Os camundongos infectados com *L. major* apresentam macrófagos com aparência epitelióide formando granulomas que ficam espalhados no parênquima do linfonodo.

## 1.8 APOPTOSE

### 1.8.1 Breve Histórico

A morte celular tem sido alvo de estudos há vários anos. Desde o final do século XIX existem trabalhos investigando as características deste evento celular. Um tipo de morte celular distinto, caracterizado por núcleo com condensação de cromatina, formando “meia-lua” em células epiteliais de folículos ovarianos, foi observado em trabalho de Fleming em 1885, que propôs o nome de cromatólise. Gräper em (1914), analisando este mesmo fenômeno, propôs a existência de um mecanismo contrário à mitose e que a cromatólise poderia ser à forma de eliminar as células fisiologicamente. Em 1965, Kerr induzindo atrofia em fígado de rato, observou e caracterizou morfologicamente um tipo de morte celular no qual as células sofriam encolhimento do citoplasma e núcleo, condensação de cromatina e liberação de corpos apoptóticos (GRANVILLE et al., 1998 apud KERR, 1965). Anos mais tarde, um trabalho publicado por Kerr, Wyllie e Currie, propôs o termo

apoptose para o tipo de morte celular descrito por Kerr. Este termo de origem grega que significa “folhas caindo” faz alusão a liberação de fragmentos celulares das células apoptóticas (GRANVILLE et al., 1998 apud KERR et al., 1972).

Wyllie (1980), mostrou que células apoptóticas são clivadas em sítios internucleossomais por uma nuclease endógena e associou o padrão eletroforético do DNA em escada com a célula em apoptose, surgindo assim um marcador bioquímico para apoptose (*apud* CUMMINGS et al., 1997; GRANVILLE et al., 1998). Horvitz, utilizando o modelo do *C. elegans*, evidenciou a presença de genes específicos envolvidos na apoptose (HORVITZ et al., 1994; YAUN et al., 1993). Vários trabalhos foram publicados na década 90 de forma exponencial, abordando os mecanismos da apoptose tendo em vista o seu envolvimento em neoplasias e doenças neurodegenerativas, tendo aplicações potenciais na terapia e diagnósticos destas doenças (MAJNO & JORIS, 1995).

### 1.8.2 Apoptose x Necrose

A apoptose, portanto, com a evolução desses estudos, é definida como um tipo de morte celular que é geneticamente regulada, com características morfológicas e bioquímicas específicas e é essencial na organogênese e na manutenção da homeostase do organismo. Este evento celular pode ser desencadeado ou inibido por uma variedade de estímulos que podem ser extrínsecos ou intrínsecos. Dentre os fatores inibitórios estão os fatores de crescimento, matriz extracelular, infecção por alguns vírus como o Epstein-Barr e alguns agentes farmacológicos. Já entre os fatores indutores estão citocinas como o TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , o ligante de Fas, glicocorticóides, infecção viral, toxinas

bacterianas, célula T citotóxica, drogas quimioterápicas, radiação gama e UV, dentre outros (THOMPSON, 1995). Um dos eventos bioquímicos iniciais da célula em apoptose é a inversão da fosfatidilserina para porção externa da membrana plasmática. O reconhecimento deste fosfolípido por fagócitos permite a rápida retirada das células apoptóticas, evitando o extravasamento do conteúdo celular para o meio externo, fazendo que a eliminação destas células ocorra sem resposta inflamatória (FADOK et al., 1992).

Por outro lado, a morte celular accidental ou por necrose resulta de uma lesão aguda na célula, provocando perda da integridade da membrana celular, que pode ser desencadeada por exemplo, por hipóxia ou stress oxidativo. A célula em necrose sofre aumento de volume e lise, com liberação do conteúdo citoplasmático induzindo assim resposta inflamatória. No tecido, as células em necrose estão presentes em grupos enquanto que as células em apoptose estão presentes de forma pontual ou isolada (MAJNO & JORIS, 1995).

### 1.8.3 Mecanismo da Apoptose

As alterações morfológicas observadas nas células apoptóticas são resultantes principalmente da ação de um grupo de proteases denominadas de caspases. Estas enzimas fazem parte de uma família de proteases conservadas evolutivamente encontradas do *Caenorhabditis elegans* ao homem. Elas se caracterizam por apresentarem um resíduo de cisteína no seu sítio ativo que cliva especificamente ligações peptídicas entre o ácido aspártico e outro aminoácido na proteína. Sintetizadas como precursores latentes ou procaspases, as caspases são convertidas para a forma ativa durante a apoptose por um processo

proteolítico regulado intrinsecamente (EARNSHAW et al., 1999; CHANG & YANG, 2000).

As caspases são classificadas em duas subfamílias baseada na similaridade entre as seqüências dos domínios das proteases. A subfamília da caspase 1, composta de caspase 1, 4, 5 e 13, parece estar envolvida predominantemente no controle da inflamação. A subfamília da caspase 3, composta da caspase 3, 6, 7, 8, 9 e 10, é especializada primariamente na apoptose (EARNSHAW et al., 1999).

A ativação das caspases requer processamento proteolítico por outras proteases, freqüentemente outras caspases, ou por clivagem autocatalítica para produzir sua forma ativa. As caspases funcionam em cascata, tendo caspases iniciadoras, como a caspase-8, caspase-2 e caspase-9, que são ativadas pela sua interação com adaptadores de caspases. Uma vez ativadas, as caspases iniciadoras processam e ativam uma ou mais caspases efetoras, como a caspase-3. As caspases efetoras então clivam várias proteínas celulares, levando a célula à apoptose (GRANVILLE et al., 1998; EARNSHAW et al., 1999; CHANG & YANG, 2000; REED, 2000).

A caspase-3 funciona como uma caspase efetora comum para diferentes cascatas de ativação de caspases. Esta caspase ativada cliva e inativa o inibidor da deoxiribonuclease ativada por caspase (CAD), levando a CAD a entrar no núcleo e degradar o DNA cromossomal. Além disto, diversas proteínas celulares são clivadas pela caspase-3, incapacitando assim importantes estruturas celulares (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997).

As proteínas que controlam diretamente as vias de ativação das caspases apresentam-se em famílias que podem ser reconhecidas pela similaridade da seqüência de aminoácidos e/ou sua similaridade estrutural. Interações entre estas proteínas são comumente mediadas por domínios que estão intimamente associadas com a regulação da apoptose, como o domínio de recrutamento associado a caspase (CARDs), domínios da morte (DDs), domínios efetores da morte (DEDs), domínio das proteínas da família Bcl-2 e domínios das proteínas da família IAP (proteínas inibitórias da apoptose) (REED, 2000).

Muitas proteínas pro-apoptóticas estão presentes na mitocôndria, tornando esta organela não só importante para a viabilidade celular através da síntese de ATP, mas também pelo processo de morte celular (HENGARTNER, 2000). O comprometimento da permeabilidade da membrana mitocondrial representa um dos mecanismos comuns da morte celular tanto por apoptose como por necrose (KROEMER & REED, 2000). No processo apoptótico as proteínas da família Bcl-2 atuam no controle da permeabilidade da membrana mitocondrial. Uma das funções chaves destas moléculas é regular a liberação de fatores pró-apoptóticos, em particular o citocromo c, do compartimento intermembranar da mitocôndria para o citosol. O citocromo c juntamente com Apaf-1, formam um complexo com a caspase -9, o apoptossômo, que por sua vez ativa a caspase-3 (HENGARTNER, 2000).

A família de proteínas Bcl-2 é composta de 12 proteínas, sendo que a expressão de algumas proteínas desta família inibe a apoptose, como a Bcl-2 e a Bcl-x<sub>L</sub>, e outras a promovem, como a Bax. O mecanismo de ação destas proteínas

no controle da permeabilidade da mitocôndria envolve a formação de canais na membrana mitocondrial (HENGARTNER, 2000).

#### 1.8.4 Apoptose no Sistema Imune

A apoptose possui um papel importante na manutenção da homeostase do sistema imune. Nos órgãos linfóides primários, como medula óssea, fígado e timo, a eliminação de precursores celulares que não sofreram rearranjo ou com rearranjos aberrantes ou ainda com receptores não funcionais ocorre através da apoptose. Além disto, apoptose é essencial para eliminação de células T auto-reativas no timo, sendo, portanto, um mecanismo para garantir a auto-tolerância central. Nos órgãos linfóides periféricos, tais como linfonodo e baço, a eliminação de células T e B por apoptose é outro mecanismo que garante a auto-tolerância e regula negativamente o excesso da resposta imune (KRAMMER et al., 1994).

Muitos receptores envolvidos no desencadeamento da apoptose tem sido descritos. Os receptores TNF-R1(p55), DR3 (APO-3/TRAMP/Ws1-1/LARD), DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) e Fas (APO-1/CD95) compõem uma subfamília de receptores da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), denominados de receptores da morte (SCAFFIDI et al., 1998). Membros desta família contém domínio extra-celular rico em cisteína, e um domínio da morte (DD) na porção intra-celular (VAN PARIJS et al., 1996).

Dentre os receptores da morte o Fas possui um papel importante no sistema imune, sendo descrita a sua participação no mecanismo de apoptose em diferentes etapas do desenvolvimento e durante o curso da resposta imune. Fas é um receptor transmembrana tipo I, porém a forma solúvel pode ser gerada por



“splicing” alternativo, função da qual ainda não é completamente esclarecida (KRAMMER et al., 1994) . Fas é expresso em muitos tipos celulares, mas não em todos, incluindo células linfóides e não linfóides (KRAMMER, 2000). A apoptose mediada por Fas é ativada pelo seu ligante natural, FasL, o qual é uma molécula transmembranar relacionada com receptor tipo II do TNF e expresso de forma mais restrita do que seu receptor.

### 1.8.1 Apoptose em Doenças Infecciosas

O processo da apoptose é fundamental em processo vitais do organismo, bem como está envolvido na patogênese de diferentes doenças. A compreensão das vias regulatórias da apoptose na etiologia de doenças e em processo vitais cria perspectivas da utilização destes conhecimentos na criação de novas abordagens terapêuticas de tratamento, evitando a progressão natural destas doenças (THOMPSON, 1995).

Na AIDS, a apoptose ocorre em linfócitos através do mecanismo de hiperativação, contribuindo na depleção destas células no indivíduo infectado (REED, 2000). Em outras doenças virais ocorre inibição da apoptose, levando também um desequilíbrio em populações celulares. Por ser um processo vital, a interferência no mecanismo da apoptose por microorganismos, modulando a sua ocorrência, parece ser mais um mecanismo utilizado para o estabelecimento de infecção.

A participação da apoptose em doenças parasitárias tem sido investigada, avaliando não só este processo induzido por parasitas em células do sistema

imune do hospedeiro, como também a apoptose dos parasitas (BARCINSKI & DOSREIS, 1999).

A morte celular por apoptose tem sido descrita em alguns parasitas triposomatídeos como a *L. amazonensis*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*. Especula-se que este evento celular tem uma importante participação no controle de populações clonais para estes microorganismos. No caso do *T. brucei*, observou-se no inseto vetor infectado a manutenção de uma população constante do parasito no seu intestino, bem como a presença de parasitos em apoptose, sugerindo a participação deste tipo de morte celular para o equilíbrio populacional, contribuindo desta forma para a sobrevivência do inseto e perpetuação do parasito (WELBURN et al., 1999). Trabalhos investigando o mecanismo de ação de drogas leishmanicidas, verificaram que um possível mecanismo está relacionado com a capacidade de induzirem apoptose em *Leishmania* (SERENO et al., 2001).

Outros trabalhos mostraram a interferência de parasitos na regulação da apoptose nas células do hospedeiro. Estudos no modelo murino da doença de Chagas, mostraram que linfócitos T CD4<sup>+</sup> morrem por apoptose durante a fase aguda da infecção por um processo de hiperativação (LOPES et al., 1995). Este evento está associado ao aumento da replicação parasitária, favorecendo a manutenção da infecção (NUNES et al., 1998). A interação de linfócitos T apoptóticos com macrófagos possui um importante papel para este efeito. Foi demonstrado que a fagocitose de linfócitos apoptóticos, mas não de células necróticas, por macrófagos infectados com *T. cruzi* promove aumento da replicação parasitária. Este efeito é dependente da produção de TGF- $\beta$ , prostaglandinas e biossíntese de poliaminas, mostrando que a fagocitose de

linfócitos apoptóticos leva a uma resposta anti-inflamatória, favorecendo a replicação do parasito. Além disso, observou-se que o receptor de vitronectina é fundamental para cito-aderência de células apoptóticas e para a biossíntese dos mediadores anti-inflamatórios (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000).

Outro protozoário intracelular, o *Toxoplasma gondi*, também apresenta capacidade de induzir apoptose em linfócitos T CD4<sup>+</sup> na fase aguda da doença, levando a diminuição da resposta imune e perpetuação do parasito no hospedeiro infectado (KHAN et al., 1996).

### 1.8.2 Apoptose na Leishmaniose Murina

Poucos estudos têm investigado a participação deste evento celular na patogênese da leishmaniose. Recentemente, foi observado que espécies de *Leishmania spp*, mimetizam a apoptose, através da exposição de fosfatidilserina. A fagocitose das formas amastigotas através do reconhecimento deste fosfolípido na sua superfície, inibe a atividade microbicida do macrófago, diminuindo a produção de NO, induzindo a secreção de TGF- $\beta$  e síntese de IL-10, propiciando o crescimento intracelular da *leishmania* (DE FREITAS BALANÇO et al., 2001).

Trabalhos utilizando camundongos desprovidos da via Fas-FasL, demonstraram a importância desta via de indução de apoptose no controle da infecção por *Leishmania*. Camundongos C57BL-6 são capazes de cicatrizar espontaneamente lesões cutâneas induzidas por *L. major*. Associa-se sua resistência ao desenvolvimento de uma resposta Th1. No entanto, estes camundongos desprovidos da via funcional Fas, falham em cicatrizar suas lesões.

Esta sua incapacidade porém não é atribuída nem a falha de montar resposta Th1, nem a incapacidade dos seus macrófagos em responder aos sinais de ativação por IFN- $\gamma$ . A restituição desta via *in vivo* e *in vitro* restabelece a capacidade de controlar a infecção, demonstrando a importância desta via (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 1998).

Estas observações foram confirmadas no trabalho de HUANG et al. (1998), que utilizando camundongos MRL/MP-lpr/lpr, que não expressam Fas, observaram que, diferente dos camundongos selvagens, estes animais não controlam o desenvolvimento da lesão induzida por *L. major*, mesmo desenvolvendo uma forte resposta Th1 e tendo seus macrófagos maior capacidade de produzir NO e IL-12 .

Estes dois trabalhos demonstraram a importância da via Fas-FasL no controle da replicação parasitária e na resolução da lesão. Um trabalho investigando o papel do receptor do TNF p55, envolvido na apoptose induzida por TNF, demonstrou que camundongos deficientes do receptor p55 quando infectados com *L. major* , conseguem eliminar parasitos da lesão, sugerindo que a sinalização do TNF-TNFRp55 não é necessário para o controle da replicação parasitária. No entanto, estes camundongos, diferente dos camundongos controles, falham em cicatrizar a lesão, mesmo eliminando os parasitas. As lesões não cicatrizadas apresentam acúmulo de um grande número de linfócitos, sugerindo que o defeito na apoptose de linfócitos pode ser responsável para manutenção da lesão (KANALY et al., 1999).

Baseado nos resultados que sinalizam a importância da apoptose no controle da infecção por *Leishmania*, DESBARATS et al. (2000) avaliaram em camundongos CBA e Balb/c, infectados com *L. major*, a frequência de morte celular, a contagem de células do linfonodo e a expressão da molécula Fas. Observaram-se que nos camundongos resistentes havia uma frequência maior de morte celular em fases iniciais da infecção, associado a uma maior expressão de Fas e uma diminuição da celularidade do linfonodo de drenagem. Nos camundongos susceptíveis, por outro lado, observaram-se aumento tardio da frequência de morte celular e da expressão de Fas, bem como aumento progressivo do número de células (DESBARATS et al., 2000).

A investigação da participação da apoptose na infecção de camundongos CBA por *L. amazonensis* e *L. major* poderá contribuir para o entendimento da participação da morte celular por apoptose na leishmaniose murina. Este modelo tem como peculiaridade a observação de dois perfis de resposta distintos em um camundongo com o mesmo *background* genético, contornando questões relacionadas com diferenças genéticas do hospedeiro na resistência ou susceptibilidade e, por outro lado, permitindo explorar fatores relacionados ao parasito na polarização da resposta. Desta forma, caso se observem diferenças em relação à ocorrência de apoptose poder-se-á relacioná-la a resistência ou susceptibilidade, e futuramente explorar fatores dos parasitas relacionados com este fenômeno.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar comparativamente a ocorrência de apoptose em linfonodos de drenagem de camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazensis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar células do linfonodo poplíteo.
- Avaliar a frequência de células *ex vivo*, *in situ* e após re-estímulo *in vitro*.
- Analisar a morfologia dos linfonodos através da microscopia de campo claro e microscopia eletrônica de transmissão.

### 3 JUSTIFICATIVAS

A utilização do modelo murino para o estudo das leishmanioses tem contribuído bastante na compreensão dos mecanismos patológicos desta doença. O padrão na resposta de resistência e susceptibilidade descrito neste modelo vem apresentando correlações com a doença humana. A determinação de fatores que atuem na definição do desenvolvimento da imunidade contra o parasito é fundamental para o estabelecimento de novos tratamentos e desenvolvimento de vacinas.

Na última década e atualmente vários trabalhos vem sendo publicados, abordando os mecanismos da apoptose e da sua participação na patogênese de diferentes doenças inclusive as doenças parasitárias. Os estudos têm mostrado que este evento celular é um processo conservado e comum entre parasito e hospedeiro e seu controle pode ser um fator determinante na resposta do hospedeiro.

Alguns trabalhos demonstraram que a via Fas-FasL, relacionada com a indução de apoptose, é importante no controle da infecção murina por *L. major*. Porém, apenas um trabalho, até o momento, investigou a ocorrência de morte celular em camundongos resistente e susceptível a *L. major*, mostrando correlações com este evento celular.

O presente trabalho utiliza o modelo de infecção do camundongo CBA descrito por SOUZA e col para avaliar a frequência de células apoptóticas em padrões de resposta de resistência ou susceptibilidade. A utilização de camundongos isogênicos CBA, que são resistentes à *L. major* e susceptíveis à *L. amazonensis*, oferece a vantagem de eliminar a possível influência do “background” genético do hospedeiro na determinação do tipo de resposta, ao mesmo tempo em que permite considerar o papel do parasito na definição do perfil de resposta.

Será avaliado também se há diferenças na frequência de apoptose entre os tipos de linfócitos T, haja vista a importância destas células na definição da resposta imune protetora ou não na leishmaniose. O desequilíbrio deste evento nesta população celular pode sugerir a participação da morte celular por apoptose em linfócitos T na patogênese da leishmaniose murina.

Hipótese:

- Há diferenças na frequência de apoptose em células do linfonodo de camundongo CBA infectado com *L. amazonensis* ou *L. major*, que estão relacionadas com os perfis de resistência e susceptibilidade.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos isogênicos machos de 6-8 semanas da linhagem CBA, provenientes do Biotério do CPqGM/FIOCRUZ/BA. Os animais foram mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade e alimentados com ração comercial balanceada e água acidificada.

### 4.2 PARASITOS

Duas espécies de *Leishmania* foram utilizadas para a realização da infecção experimental, a *L. major* (cepa MHOM/IR/-173) e *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR88/BA-125), provenientes do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES/UFBA/SSA) que foram doadas ao laboratório pela Dra. Aldina Barral.

Para manter a infectividade e a virulência dos parasitos era realizado passagens sucessivas em camundongos. Para a utilização das referidas cepas nos experimentos, os parasitos eram isolados do linfonodo de drenagem dos camundongos e mantidos em cultura axênica em meio LIT total, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Hyclone) e gentamicina (SIGMA) numa concentração de 50µg/mL.

### 4.3 INFECÇÃO

As culturas de ambas as espécies de *Leishmania*, entre a 3ª e 4ª passagens, foram monitoradas diariamente, através de contagens do número de parasitos em câmara de Neubauer, até fase estacionária. Para o preparo do inóculo era realizada inicialmente uma centrifugação (500rpm por 5 min a 4°C) para sedimentar o refugo da cultura. Após esta etapa era iniciada a lavagem das formas promastigotas, utilizando solução fisiológica de cloreto de sódio 0,1% estéril, por três vezes (3.000 rpm por 10 minutos), para que o meio de cultivo fosse removido e os inóculos ajustados de modo a conter  $5 \times 10^6$  parasitos em 25µL de salina estéril.

Em cada experimento realizado, três grupos de animais foram inoculados por via subcutânea na pata direita traseira, como descrito abaixo:

- Grupo Controle: 25 µL de salina estéril;
- Grupo *La*:  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis*/25 µL de salina estéril;
- Grupo *Lm*:  $5 \times 10^6$  *L. major*/25 µL de salina estéril.

### 4.4 MONITORAMENTO DO TAMANHO DAS LESÕES

A infecção dos grupos experimentais foi monitorada durante 42 dias através da medição semanal da pata infectada e da pata não infectada utilizando-se um paquímetro (MITUTOYO, Brasil). O tamanho da lesão, expresso em milímetros (mm), foi determinado pela diferença entre a espessura da pata infectada (direita) e a não infectada (esquerda).

## 4.5 ASPECTOS HISTOLÓGICOS

### 4.5.1 Microscopia Óptica

Os animais foram sacrificados na 1<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana após a infecção. O sacrifício dos camundongos foi realizado por deslocamento cervical e logo em seguida eram retirados o linfonodo de drenagem e a pata infectada, levando estes a um recipiente com formalina 10% tamponado, que permaneciam num intervalo de cerca de 24h. Após este intervalo de fixação, o coxim plantar da pata infectada era retirado e processado juntamente com o linfonodo para inclusão em parafina. Os fragmentos após a inclusão em parafina eram seccionados em 3-5 $\mu$ m de espessura e colocados em lâminas de vidro. As seções foram coradas pela hematoxilina-eosina (H-E) para verificar o padrão do infiltrado inflamatório nos fragmentos da pata e as alterações nos linfonodos popliteo.

### 4.5.2 Microscopia Eletrônica

Para a caracterização de células em apoptose no linfonodo de drenagem, foi realizada análise por microscopia eletrônica. Grupos de três camundongos foram sacrificados no 7<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 42<sup>o</sup> após a infecção. Com brevidade, o linfonodo era retirado, seccionado em fragmentos e fixados em solução de glutaraldeído (Polyscience - EM Grade) a 2% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, conservando em banho de gelo. Após três horas foi desprezada a solução fixadora e realizado três banhos consecutivos com tampão cacodilato de sódio 0,2M, por 10 min a 4<sup>o</sup> C. Em seguida foi realizada a pós-fixação com solução de tetróxido de

ósmio 1% em cacodilado de sódio 0,15 M por 1h a 4° C. Depois desta etapa foi realizada a desidratação através de banhos sucessivos de 10 min com solução de acetona em concentrações crescentes. A etapa de substituição com resina epóxi (PolyBed – Polyscience) foi realizada com um banho de uma hora com a mistura 1:2 de resina e acetona seguida de um banho por 12 horas de resina pura em vácuo. Os fragmentos foram colocados em moldes com resina e deixados por 72h em uma estufa a 60° C para a polimerização da resina.

Os blocos foram então trimados e realizado cortes semi-finos dos fragmentos com navalha de vidro em espessura de 1µm. As secções foram coradas com azul de metileno-azur II e avaliadas com o microscópio de campo claro. Foram selecionados alguns blocos, dos quais as secções apresentavam áreas foliculares e paracortical do linfonodo. Cortes ultra-finos foram realizados dos blocos selecionados, utilizando navalha de diamante (Diatome). Os cortes eram postos em grades de cobre de 200 Mesh e contrastados com soluções de acetato de uranila e citrato de chumbo (**Reymnolds E. S.; J. Biophys Biochem. Cytol.; 17:208,1963**). As grades foram observadas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão marca Zeiss, modelo EM 109.

#### 4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-*Leishmania*

Para a demonstração dos parasitos no sítio da infecção e no linfonodo de drenagem foi realizada a técnica de imunohistoquímica, em 2 animais de cada grupo no 7º, 21º e 42º dia de infecção. As secções das patas e dos linfonodos em

lâminas de vidro foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol por 10 minutos e hidratados gradativamente em banhos de álcool por 5 minutos, água destilada e PBS pH 7,4 para iniciar o processo de imunomarcção que foi baseado na técnica de imunoperoxidase indireta com o sistema de avidina – exteptavidina.

Inicialmente, fez-se o bloqueio das ligações inespecíficas, colocando sobre os cortes leite desnatado diluído a 10% em PBS por 30 min. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário anti-*Leishmania* policlonal isolado de coelhos desafiados com *Leishmania*, diluído 1:1500 em PBS contendo 10% de soro normal de camundongo. Para todas as seções era realizado um controle negativo da reação, utilizando imunoglobulina de coelho não imune, diluído 1:2000. O tempo de incubação do anticorpo primário foi de 12-18h a 4°C. Após lavagem com PBS, foi adicionado o anticorpo secundário constituído de uma  $\alpha$ -IgG de coelho produzido em cabra conjugado a biotina (Pharmigen), diluído 1:200 em PBS contendo 10% de soro normal de camundongo, e incubou-se por 45 min a 37° C. As seções foram lavadas com PBS e logo a seguir foi realizado o bloqueio da atividade peroxidase endógena com metanol contendo 0,1% de azida sódica e 3% de peróxido de hidrogênio, durante 30 min. Após lavagem com água destilada e banhos com PBS, as seções foram incubadas por 30 min a 37° com exteptavidina peroxidase (Pierce) 1:2000 diluído em PBS. A reação foi revelada utilizando o substrato da peroxidase - o peróxido de hidrogênio - e o cromógeno – DAB (3- diaminobenzidina) diluídos em PBS. O tempo de revelação foi ajustado observando o surgimento da cor castanha nas seções do controle positivo através do microscópio de campo claro. A revelação foi interrompida mergulhando as

lâminas em água destilada. As seções foram contra-coradas com Hematoxilina de Gill e montadas as lâminas com lamínula e bálsamo do Canadá.

#### 4.7 DETECÇÃO DE CÉLULAS EM APOPTOSE IN SITU ATRAVÉS DA TÉCNICA DE TUNEL

Para a detecção de células em apoptose in situ foi utilizado o kit apoTACS – Basic da R&D Systems. As secções em lâminas de vidro dos linfonodos do 7º, 21º e 42º dias dos três grupos de experimentação, foram submetidas à marcação seguindo o protocolo do fabricante. Esta técnica baseia-se na inserção de nucleotídeos marcados (BrdU), através da enzima desoxinucleotidil transferase (TdT), no DNA da célula apoptótica, que é tipicamente clivado de forma regular em fragmentos de cerca de 200pb. Para a demonstração da inserção do nucleotídeo marcado, utiliza-se um anticorpo monoclonal anti-BrdU biotilado, juntamente com streptavidina peroxidase. A revelação é feita com o substrato, o peróxido de hidrogênio, e o cromógeno (diaminobenzidina-DAB), o qual torna-se insolúvel quando oxidado e forma um precipitado castanho claro localizado no local da reação.

Inicialmente as seções foram desparafinizadas e hidratadas seguindo procedimento semelhante ao descrito anteriormente para imunohistoquímica anti-leishmânia, tendo o cuidado de utilizar reagentes novos para evitar contaminação com DNAases, as quais podem interferir na marcação.

Após dois banhos com PBS pH 7,4, foi feita a digestão dos cortes com proteinase K na concentração de 1:50 por 20 min a temperatura ambiente. Ao

completar o tempo de incubação, foram realizados dois banhos com água destilada por 2 min cada. Em seguida foi feito o bloqueio da peroxidase endógena através de um banho com uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% diluída em metanol PA, por exatamente 5 minutos à temperatura ambiente, imediatamente após as lâminas eram lavadas com água destilada.

Após esta etapa foram realizados dois banhos com PBS pH 7,4 e imergido as lâminas em um tampão de marcação TdT 1x por 5min a temperatura ambiente, as lâminas em seguida foram colocadas em uma câmara úmida, previamente aquecida a 37°C, e gotejado sobre os cortes a mistura de marcação composta de: enzima desoxinucleotidil transferase (TdT), nucleotídeos marcados e tampão, sendo que o corte utilizado como controle negativo foi gotejado PBS. As lâminas foram então incubadas por 1h em estufa a 37°C. Após este período as lâminas foram imersas em tampão de parada 1X por 5min a temperatura ambiente e depois lavadas duas vezes com PBS por 5 min cada banho.

Na câmara úmida foi gotejada sobre os cortes a mistura de detecção composta de: anticorpo biotilado anti-nucleotídeo marcado, streptavidina peroxidase e diluente. Em seguida foi incubado por 1h em estufa a 37° C. Após esta etapa as lâminas foram lavadas com PBS, seguida a etapa de revelação que foi realizada conforme o mesmo procedimento da reação de imunohistoquímica anti-leishmania. Sendo que a contra-coloração foi realizada com verde de metila a 2% por 20 min.

A análise dos cortes foi realizada com a identificação das lâminas desconhecida. Foi medida a área do linfonodo, utilizando o sistema de

morfometria, a partir daí era contado as células marcadas em cerca de 70% da área medida.

## 4.8 CONTAGEM DE CÉLULAS TOTAIS E DE CÉLULAS MORTAS

Os camundongos na 1<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas pós-infecção foram sacrificados por deslocamento cervical. Imediatamente o linfonodo de drenagem era retirado e levado para uma placa de petri contendo 1mL de meio de cultura DEMEM, condicionada em gelo. Foram utilizados três camundongos por ponto de cada grupo.

Os linfonodos eram cuidadosamente rompidos com auxílio de duas agulhas, em uma nova placa de petri contendo 1mL de meio DEMEM, para a liberação das células. Uma alíquota da suspensão de cada linfonodo era retirada para contagem em câmara de Neubauer, sendo estas coradas com azul de Tripán previamente. Eram contabilizadas separadamente as células não coradas, que correspondia às células viáveis, e as células coradas, que correspondia às células mortas.

## 4.9 ANÁLISE DE CÉLULAS EM APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO EX-VIVO E IN VITRO

### 4.9.1 Análise ex-vivo

Para detecção de células em apoptose para análise por citometria de fluxo, foi utilizado como marcador a anexina-V conjugada a fluoresceína (FITC) juntamente com iodeto de propídio. A marcação de linfócitos T CD4+ e T CD8+ foi



realizada com anticorpo monoclonal anti-CD4<sup>+</sup> e anti-CD8<sup>+</sup> conjugados com phycoeritrin (PE). Um dos eventos iniciais da célula apoptótica é a perda da assimetria do fosfolípido de membrana, levando a exposição da fosfatidilserina na porção externa da membrana plasmática. A anexina-V é uma proteína que na presença de cálcio possui alta afinidade a fosfatidilserina, sendo utilizada amplamente como marcador de apoptose. O iodeto de propídio é utilizado simultaneamente com a anexina-V para permitir a diferenciação entre células apoptóticas e células necróticas ou em apoptose tardia. Células marcadas exclusivamente com anexina-V são consideradas apoptóticas, enquanto que células marcadas simultaneamente com anexina-V e iodeto de propídio são consideradas necróticas ou em apoptose tardia.

Foi realizada suspensão das células como descrito anteriormente. As células em suspensão eram transferidas para um tubo falcon de 15 mL, realizando um pool de células de três linfonodos por grupo. Em seguida era adicionado 10mL de meio DEMEM e centrifugado por 10 min a 1200 rpm a 4° C. O sobrenadante era desprezado e as células eram resuspendidas em 1mL de meio. Uma alíquota da suspensão de célula de cada tubo era retirada para contagem em câmara de Neubauer, sendo estas diluídas e coradas com azul de tripan previamente.

Em seguida era retirado um volume contendo entre  $5 \times 10^5$  a  $10^6$  células de cada tubo e transferido para um tubo eppendorf estéril. As células eram então centrifugadas a 500g por 5min. O sobrenadante era desprezado e as células eram resuspendidas em tampão de  $Ca^{++}$ . Outra centrifugação era realizada nas mesmas condições anteriores e em seguida era desprezado o sobrenadante.

Para realização da marcação, as células foram resuspendidas em 50 $\mu$ L de tampão de Ca<sup>++</sup> e 25 $\mu$ L desta suspensão foram transferidos para dois tubos específicos para leitura em FACS. Em um dos tubos eram adicionados 25 $\mu$ L da mistura marcadora contendo anexina-V-FITC, iodeto de propídio e anti-CD4-PE e no outro a mistura marcadora contendo anexina-V-FITC, iodeto de propídio e anti-CD8-PE. Era realizada incubação por 30min a 4<sup>o</sup> C com as amostras protegidas de luz, antes das amostras serem adquiridas no FACS.

#### 4.9.2 Análise in vitro

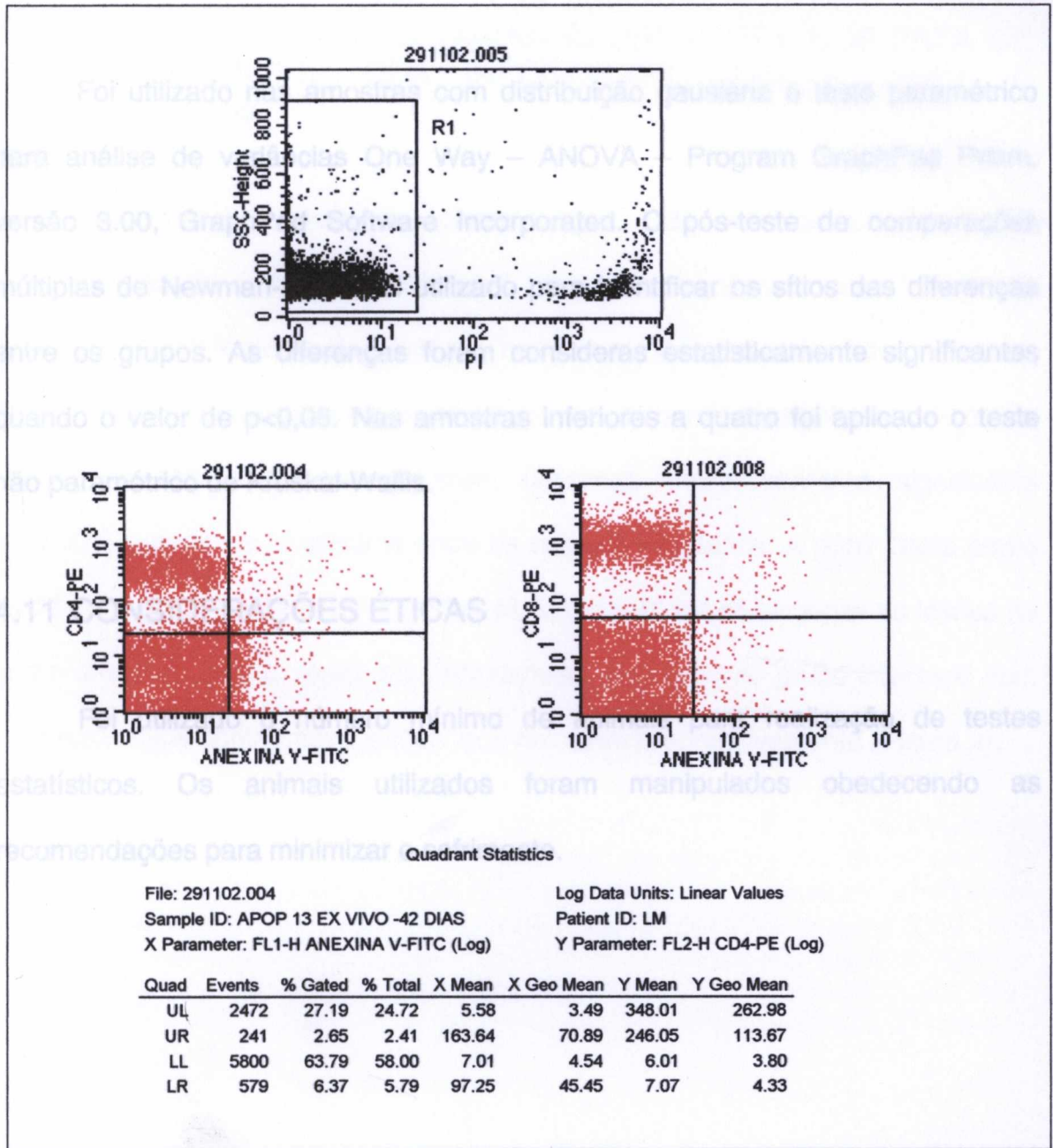
As células obtidas para contagem das células totais e mortas foram utilizadas para realizar este ensaio. Após lavagem, as células eram contadas e em seguida era feito o ajuste para a obtenção de 5x10<sup>6</sup> células/mL para a realização do plaqueamento. Para cada grupo, eram reservados três poços sem estímulo e três poços com estímulo, nos quais eram adicionados 5x10<sup>5</sup> *Leishmanias* promastigotas em fase estacionária, devidamente lavadas, da espécie que o animal foi infectado. No grupo salina um poço era estimulado com anti-CD3 de camundongo para servir como controle positivo. As células foram incubadas por 72h em estufa de CO<sub>2</sub> por 72h.

Após o período de incubação as células eram lavadas e marcadas conforme o procedimento anterior descrito para análise ex-vivo.

### 4.9.3 Aquisição dos Dados no Citômetro

As amostras após o processamento para marcação foram analisadas no citômetro de fluxo (FACS – Becton & Dickinson). O equipamento foi ajustado para aquisição de 10.000 eventos por amostra. Foram selecionados os parâmetros de SSC x PI (Iodeto de propídio) nos canais de aquisição. Na região negativa para iodeto de propídio era delimitada uma janela para análise (“gate”), correspondendo as células viáveis (Fig.1). Desta janela foram construídos dois gráficos com seguintes painéis: Anexina-V – FITC x CD4-PE e Anexina-V – FITC x CD8-PE (Fig. 1). A partir destes gráficos era calculado o valor percentual dos quadrantes. O percentual de células totais anexina-V positiva foi resultante da soma dos quadrantes superior e inferior direito. O percentual de células CD4+ ou CD8+ anexina-V positivas foram definidos apenas no quadrante superior direito. O percentual de células CD4+ ou CD8+ totais foi resultante da soma dos quadrantes superior direito e esquerdo.

## 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA



**Figura 1-**Aquisição e análise no citômetro de fluxo

O gráfico superior mostra as células adquiridas nos parâmetros de SSC(granulosidade)xPI. O retângulo delimita a região negativa para PI. Os eventos desta região são avaliados nos gráficos inferiores que relacionam CD4-PE ou CD8-PE x Anexina-V-FITC. A tabela abaixo mostra as percentagens de eventos em cada quadrante calculadas pelo softwear.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado nas amostras com distribuição gaussiana o teste paramétrico para análise de variâncias One Way – ANOVA – Program GraphPad Prism, versão 3.00, GraphPad Software Incorporated. O pós-teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, foi utilizado para identificar os sítios das diferenças entre os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de  $p < 0,05$ . Nas amostras inferiores a quatro foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

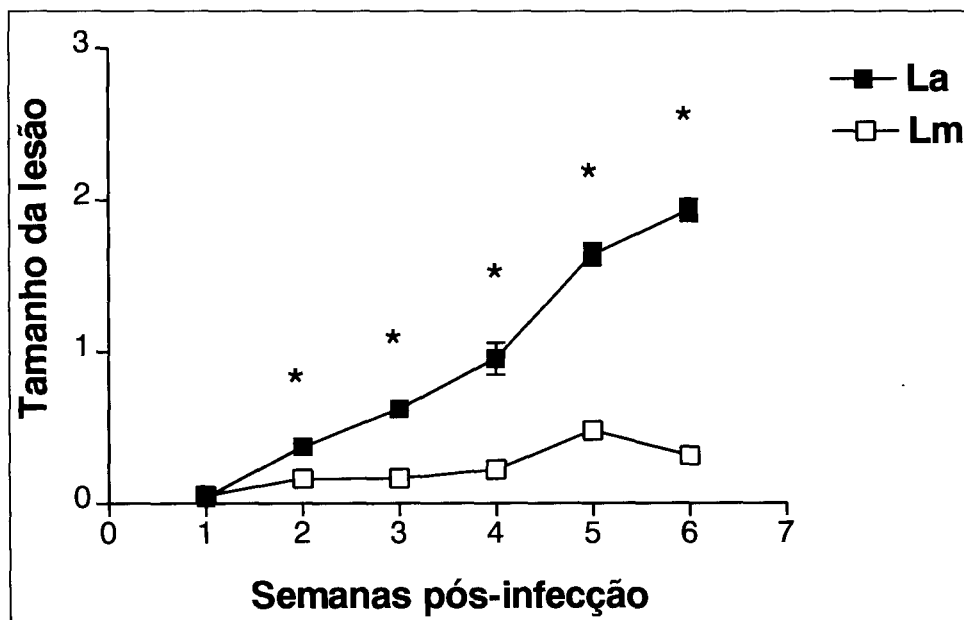
#### 4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Foi utilizado o número mínimo de animais para realização de testes estatísticos. Os animais utilizados foram manipulados obedecendo as recomendações para minimizar o sofrimento.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MONITORAMENTO DO TAMANHO DAS LESÕES DE PATA DE CAMUNDONGOS CBA INFECTADOS COM *L. major*, *L. amazonensis*.

O tamanho da lesão de camundongos CBA infectados com  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major* foi monitorado entre a 1ª e 6ª semanas pós-infecção. As lesões nos camundongos infectados com *L. amazonensis* foram maiores que as lesões em camundongos infectados com *L. major*. Os resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) a partir da 2ª semana entre os animais infectados. A partir deste ponto as diferenças tornaram-se mais evidentes. Entre a 4ª e a 6ª semanas as lesões no grupo infectado com *L. major* estabilizaram-se, enquanto no grupo infectado com *L. amazonensis* apresentava lesões que cresciam progressivamente (Figura 2).



**Figura 2**-Curso da infecção de camundongos CBA infectados com *L. major*, *L. amazonensis*.

Grupos de 06 animais foram infectados com  $5 \times 10^6$  *Leishmanias* de *L. major* ou *L. amazonensis*. Cada ponto representa a média da diferença da lesão e as barras os valores médios do erro padrão. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada através do teste de análise de variâncias One Way – ANOVA e pós-teste de múltipla comparação de Newman-Keuls. Na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas foram encontradas diferenças significativas entre os grupos infectados (\*  $p < 0,01$ ).

## 5.2 FREQUÊNCIA EX-VIVO DE CÉLULAS VIÁVEIS E NÃO- VIÁVEIS DO LINFONODO

Para avaliar a viabilidade de células do linfonodo dos camundongos, foi realizada a contagem de células viáveis e não viáveis, diferenciadas através da coloração com o corante azul de Tripán, em câmara de Neubauer. Este acompanhamento foi realizado nos camundongos inoculados com salina e nos infectados com *L. amazonensis* e *L. major*, com 10, 21 e 42 dias após a infecção.

No 10º dia, o número total de células nos linfonodos não foi significativamente diferente nos três grupos, apesar de haver mais células nos linfonodos dos animais infectados. Aos 21º dia, observou-se um aumento significativo na celularidade dos grupos infectados com *L. amazonensis* e *L. major*. No 42º dia observou-se um grande aumento na celularidade dos linfonodos de animais infectados com *L. amazonensis*. O número de células nos linfonodos de camundongos infectados com *L. amazonensis* aumentou mais de duas vezes, enquanto que no grupo infectado com *L. major* se manteve constante. As diferenças foram estatisticamente significantes (Figura 3-A).

Com 21 dias pós-infecção, o número de células mortas, coradas com azul de Tripán, aumentou nos grupos infectados, sendo que nos animais infectados com *L. amazonensis* o aumento foi significativamente maior que nos animais infectados com *L. major*. Esta diferença foi ainda maior aos 42º dias pós-infecção. Aos 21 dias, o número de células mortas nos animais infectados com *L. amazonensis* aumentou 1,95 vezes e com 42 dias aumentou 3,94 vezes, enquanto que no grupo resistente o número se manteve semelhante nestes dois pontos (Figura 3-B).



Ao comparar a percentagem de células mortas entre os animais infectados, não foi verificada diferenças significativas nos diferentes pontos de observação. Apesar de se observar nos animais infectados com *L. amazonensis* um percentual maior de células mortas no 21º e 42º dia de infecção (Figura 3-C).

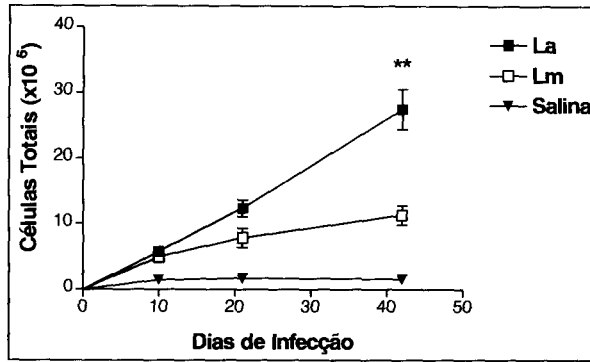


Figura 3 – A

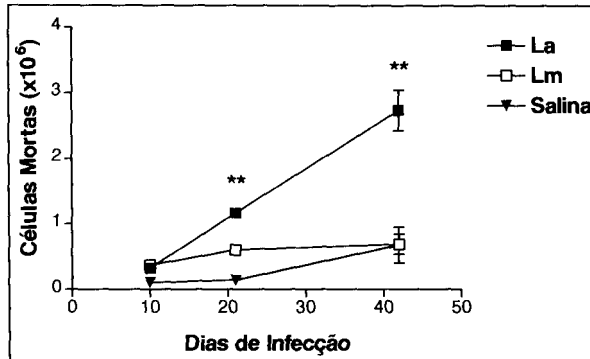


Figura 3 – B

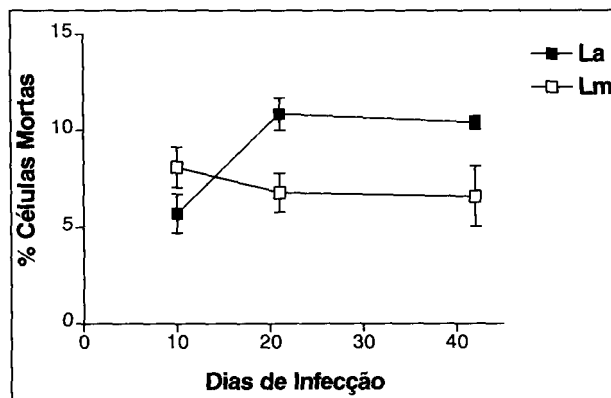


Figura 3 – C

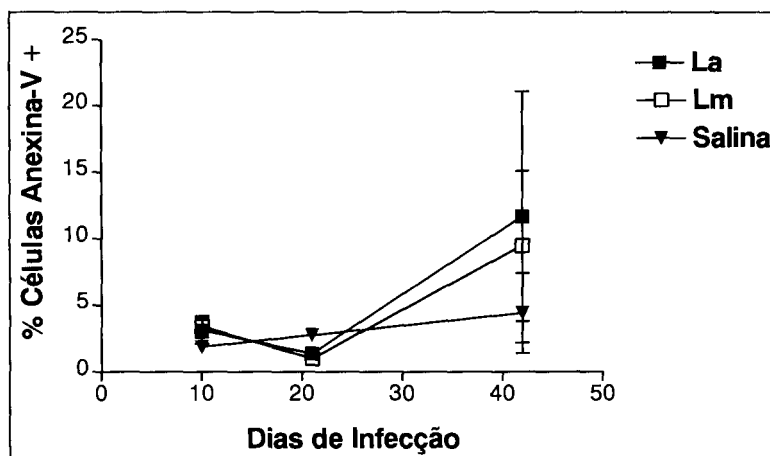
**Figura 3-**Contagem de células do linfonodo de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* (LA), *L. major* (LM) e inoculados com salina.

**A)** Contagem de células totais dos linfonodos. **B)** Contagem de células mortas **C)** Percentagem de células mortas em relação às células totais. Cada ponto representa a média da contagem de seis linfonodos de cada grupo de dois experimentos. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada através do teste de análise de variâncias One Way – ANOVA pós-teste Newman-Keuls. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos infectados e em relação ao grupo controle (\*\* $p < 0,001$ ).

### 5.3 FREQUÊNCIA EX-VIVO DE CÉLULAS ANEXINA-V POSITIVAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

#### 5.3.1 Células Totais do Linfonodo

Foi avaliada a frequência de células marcadas exclusivamente com anexina-V em linfonodos de drenagem por citometria de fluxo, a qual indica morte celular por apoptose. Dois experimentos foram feitos avaliando-se no 10<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 42<sup>o</sup> dias após a infecção. A frequência de células marcadas com anexina-V nos grupos infectados foi semelhante nos dois primeiros pontos em relação ao controle. No 10<sup>o</sup> dia, a média de células anexina positiva no grupo infectado com *L. amazonensis* foi de 3,1%, enquanto no grupo infectado com *L. major* foi de 3,4% e no controle foi de 1,9%. No 21<sup>o</sup> dia, a média de apoptose foi de 1,4%, 1,0% e 2,8%, respectivamente. No último ponto, ocorreu um aumento na frequência de células anexina positiva nos três grupos, sendo este acréscimo mais acentuado nos grupos dos animais infectados. No grupo infectado com *L. amazonensis* a frequência de células anexina positiva foi de 11,7%, no de *L. major* foi de 9,5% e no controle foi de 4,4% (Figura 4). Este aumento, no entanto, foi observado apenas em um dos experimentos.



**Figura 4-**Freqüência de células positivas exclusivamente para anexina-v do linfonodo de drenagem de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* (LA), *L. major* (LM) e inoculados com salina. O gráfico representa a média de dois experimentos. Foi analisado um pool de três linfonodos de cada grupo por ponto em cada experimento. Células marcadas com anexina-V, analisadas no citômetro de fluxo, foram consideradas em apoptose.

### 5.3.2 Células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do Linfonodo

Observaram-se freqüências semelhantes de células CD4<sup>+</sup> anexina positiva nos três grupos, nos pontos descritos anteriormente. Com 10 dias, a freqüência de células CD4<sup>+</sup> anexina positiva no grupo infectado com *L. amazonensis* foi 2,4%, no de *L. major* foi 2,4% e no controle foi 2,5%. No 21<sup>o</sup> dia, a freqüência de células CD4<sup>+</sup> anexina positiva foi 0,9%, 1,1% e 2,2%, respectivamente. No último ponto, a freqüência foi 0,7%, 1,0% e 0,9%, respectivamente (Figura 5-A).

A freqüência de células CD8<sup>+</sup> anexina positiva também foi semelhante nos três grupos nos pontos descritos. No 10<sup>o</sup> dia, a freqüência de células CD8<sup>+</sup> no grupo infectado com *L. amazonensis* foi de 0,7%, no de *L. major* foi 0,5% e no controle foi 0,5%. No 21<sup>o</sup> dia, a freqüência de apoptose foi 0,6%, 0,3% e 0,8%, respectivamente. No último ponto, a freqüência foi 0,9%, 1,0% e 1,1%, respectivamente (Figura 5-B).

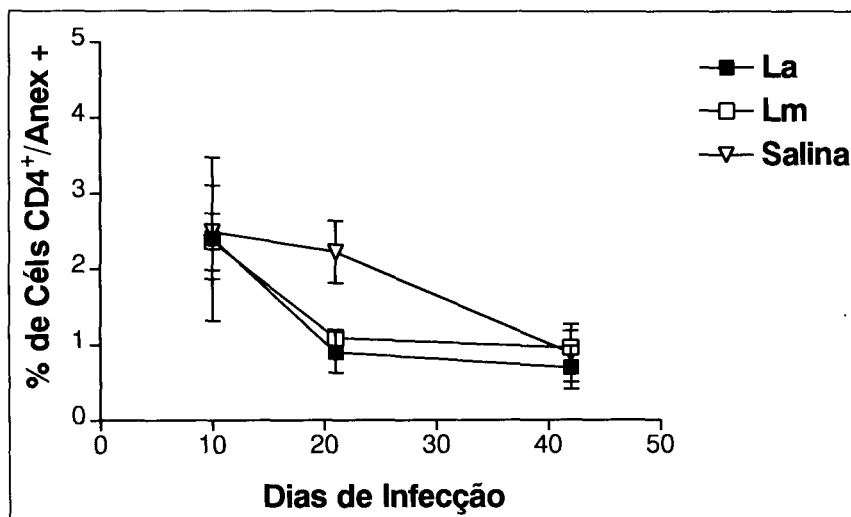


Figura 5 - A

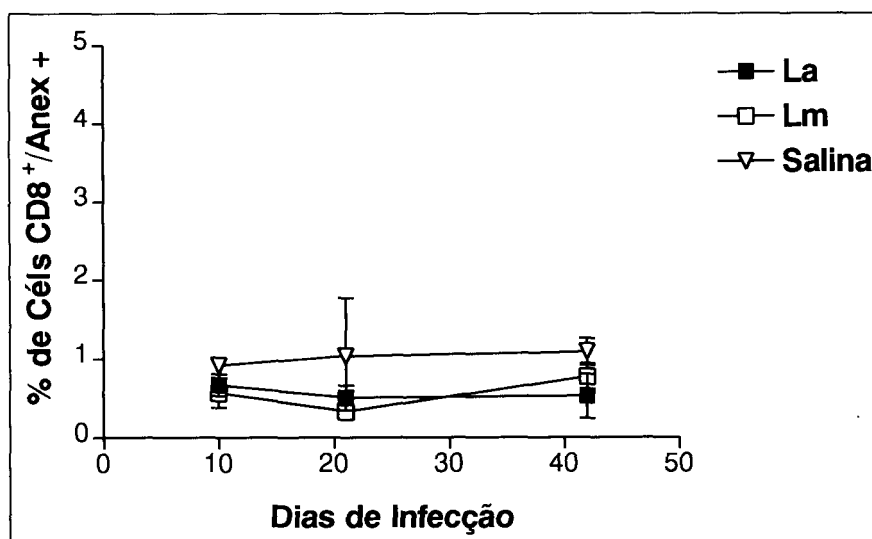


Figura 5 - B

**Figura 5-** Frequência de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> positivas para anexina-V do linfonodo de drenagem de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* (La), *L. major* (LM) e inoculados com salina. Cada ponto no gráfico representa a média de dois experimentos. Foi analisado um pool de três linfonodos de cada grupo por ponto em cada experimento. **A)** Foram computadas células marcadas simultaneamente com anexina-V-FITC e anti-CD4<sup>+</sup>-PE, analisadas no citômetro de fluxo. **B)** Foram computadas células marcadas simultaneamente com anexina-V-FITC e anti-CD8<sup>+</sup>-PE, analisadas no citômetro de fluxo.

#### 5.4 FREQUÊNCIA DE CÉLULAS CD4<sup>+</sup> E CÉLULAS CD8<sup>+</sup> NO LINFONODO DE DRENAGEM

No grupo salina, as células CD4<sup>+</sup> apresentaram uma frequência média de 51,1% nos três pontos analisados. Nos animais infectados com *L. amazonensis* houve uma diminuição da percentagem de células CD4<sup>+</sup> em relação ao grupo controle, diminuindo de 37,2% no 10<sup>o</sup> dia para 14,5% no 42<sup>o</sup> dias. No grupo infectado com *L. major*, ocorreu também diminuição da percentagem destas células, porém esta foi mais discreta, diminuindo de 34,5% no 10<sup>o</sup> dia para 23,6% no 42<sup>o</sup> dia (Figura 6).

A frequência de células CD8<sup>+</sup> não diferiu nos três grupos em dois experimentos ficando em torno de 20% nos três pontos.

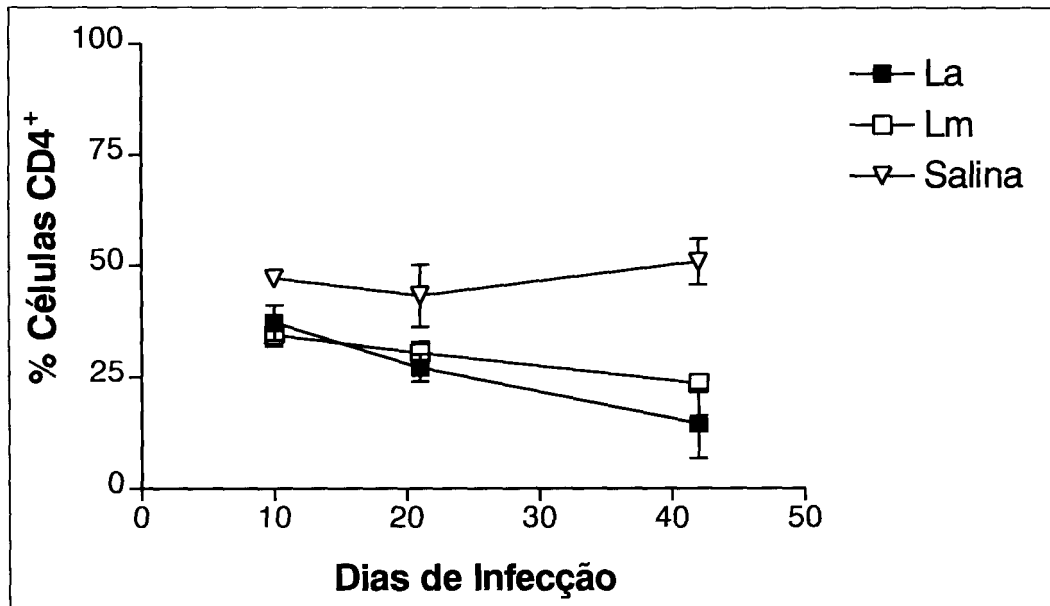


Figura 6

**Figura 6-**Freqüência de células CD4<sup>+</sup> do linfonodo de drenagem de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* (LA), *L. major* (LM) e inoculados com salina. Cada ponto no gráfico representa a média de dois experimentos. Foi analisado um pool de três linfonodos de cada grupo por ponto em cada experimento. **A)** Foram computadas células marcadas com anti-CD4<sup>+</sup>-PE, analisadas no citômetro de fluxo.



## 5.5 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS CD4<sup>+</sup> E CÉLULAS CD8 ANEXINA POSITIVA APÓS REESTÍMULO IN VITRO

Células do linfonodo de animais infectados com *L. amazonensis* e *L. major* e inoculados com salina foram cultivadas após 10, 21 e 42 dias de infecção. Re-estímulo in vitro foi realizado com a espécie de *Leishmania* infectante. Após 72 h de re-estímulo foi avaliada a frequência de apoptose de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> através da citometria de fluxo.

Ao comparar in vitro a frequência de células CD4<sup>+</sup> positivas para anexina entre os grupos infectados com *L. amazonensis* e *L. major* re-estimulados, observou-se com 10 dias a frequência de 12,2% e 15,2%, respectivamente, e isto correspondeu a um aumento em relação às células não estimuladas de 3,0 vezes e 2,3 vezes, respectivamente. Com 21 dias, a frequência de células anexina positivas dos animais infectados com *L. amazonensis* permaneceu a mesma do ponto anterior, enquanto que as células re-estimuladas dos animais infectados com *L. major* apresentaram frequência de apoptose semelhante às não estimuladas. Com 42 dias a frequência de apoptose nas células dos animais infectados com *L. amazonensis* foi 6% e dos animais infectados com *L. major* foi 7% e isto correspondeu a um aumento em relação ao controle de 4,5 vezes nos dois grupos (Figura 5-A).

Ao comparar a frequência de apoptose de células CD8<sup>+</sup> entre os grupos infectados com *L. amazonensis* e *L. major* re-estimulados, observou-se com 10 dias a frequência de 3,5% e 6%, respectivamente, e isto correspondeu a um aumento em relação às células não estimuladas de 3,2 vezes e 1,35 vezes,

respectivamente. Com 21 dias, a frequência de células apoptóticas das células dos animais infectados com *L. amazonensis* foi igual a 2% sendo 1,9 vezes maior em relação ao controle, enquanto que as células dos animais infectados com *L. major* re-estimuladas apresentaram frequência de apoptose inferior ao controle, com inibição de apoptose de 2,2 vezes. Com 42 dias a frequência de apoptose nas células dos animais infectados com *L. amazonensis* foi 4% e dos animais infectados com *L. major* foi 3,5% e isto correspondeu a um aumento em relação ao controle de 2,1 vezes no primeiro grupo e no segundo grupo o resultado foi semelhante ao não estimulado (Figura 7-B).

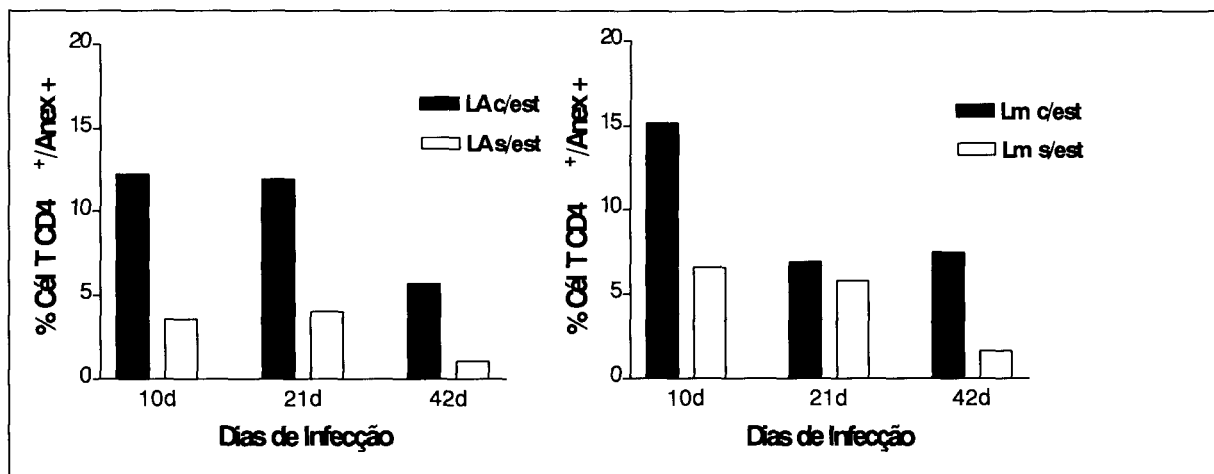


Figura 7-A

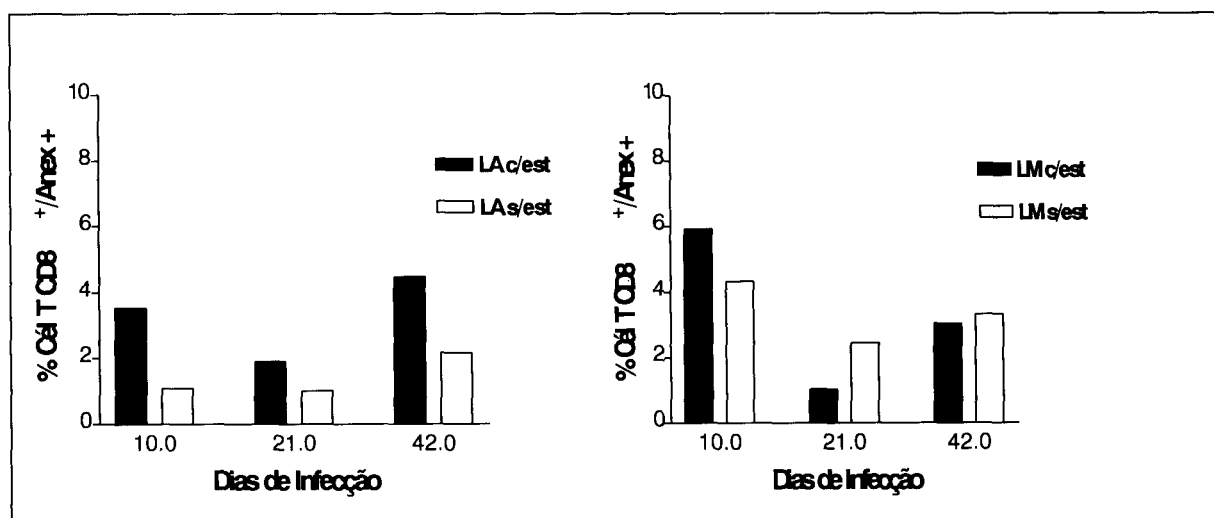


Figura 7-B

**Figura 7-**Freqüência de apoptose de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do linfonodo de drenagem de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* (La), *L. major* (Lm) e inoculados com salina, após 72h de reestímulo in vitro. Cada barra no gráfico representa a medida de um experimento. Foi analisado um pool de três poços de células estimuladas ou não com *Leishmania* promastigosta em fase estacionária da espécie infectante. **A)** Foram computadas células marcadas com anti-CD4<sup>+</sup>-PE e anexina-V-FITC simultaneamente, analisadas no citômetro de fluxo. **B)** Foram computadas células marcadas com anti-CD8<sup>+</sup>-PE e anexina-V-FITC simultaneamente, analisadas no citômetro de fluxo.

## 5.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS LINFONODOS DE DRENAGEM

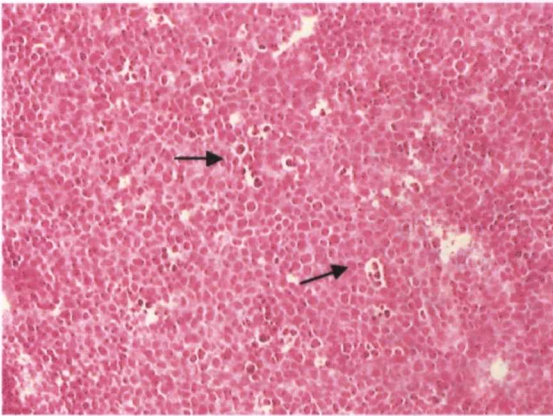
### 5.6.1 Descrição dos Linfonodos Popliteos

No sexto dia, os linfonodos dos animais infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* apresentaram um aumento na celularidade em relação aos linfonodos de camundongos inoculados com salina. Observou-se na região cortical dos dois grupos infectados folículos com centro germinativo reativos com muitos blastos e vários focos de apoptose (Figura 8-A e B). Veias com endotélio alto estavam presentes na região paracortical, onde também foram observados células com aspecto macrófágico, exibindo núcleo com cromatina frouxa, citoplasma abundante e vacuolizado.

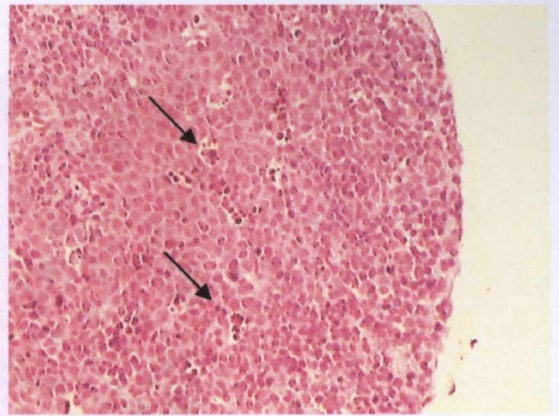
Com 23 dias de infecção havia algumas diferenças nos grupos infectados. O seio subcapsular dos linfonodos dos animais infectados com *L. amazonensis* estava repleto de células macrófágicas, várias delas infectadas com formas amastigotas do parasita. Em algumas áreas, estas células aglomeravam-se abaixo do seio subcapsular e infiltravam-se entre os linfócitos (Figura 8-C). Nos animais infectados com *L. major* verificava-se poucos macrófagos no seio subcapsular e não foram observados parasitos (Figura 8-D). Os folículos linfóides nos dois grupos estavam mais hiperplasiados em relação ao ponto anterior, com vários focos de apoptose. Sendo que apenas no grupo susceptível foi verificado macrófago parasitado na região folicular, estando próximo destas células em apoptose.

No 42º dia de infecção, os linfonodos do grupo infectado com *L. amazonensis* tinham arquitetura bastante modificada (Figura-8-E). As células macrófágicas estavam em número bem superior aos pontos anteriores, pareando com o número de linfócitos. Os macrófagos aglomeravam-se, delimitando áreas circulares preenchidas por linfócitos. O seio subcapsular apresentava-se dilatado com várias células macrófágicas infectadas ou contendo antígeno, evidenciados através da reação de imunohistoquímica anti-*Leishmania* (Figura-8-H). Células

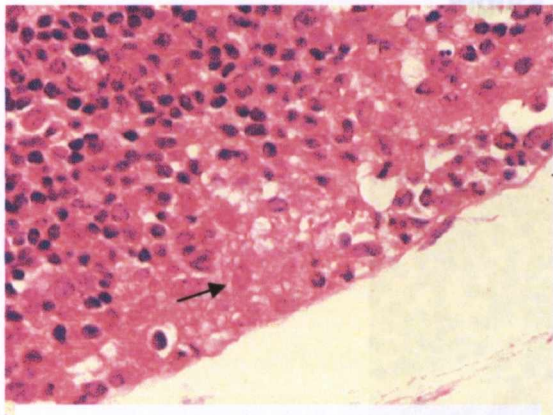
apoptóticas estavam presentes dispersas no linfonodo. Não era observado folículo com centro germinativo. Muitos vasos dilatados com células aderidas ao endotélio e dispersas na luz eram observados. Vários plasmócitos estavam presentes permeando as células da zona cortical, exibindo retículo endoplasmático dilatado com acúmulo de material protéico, corpúsculo de Russell (Figura-8-G). Enquanto que nos animais infectados com *L. major* verificava-se estruturas granulomatosas (Figura 8 – F) dispersas na zona cortical, sendo que raramente era possível verificar células parasitadas com formas amastigotas (Figura-8-I). Os folículos estavam pequenos com raras células em apoptose.



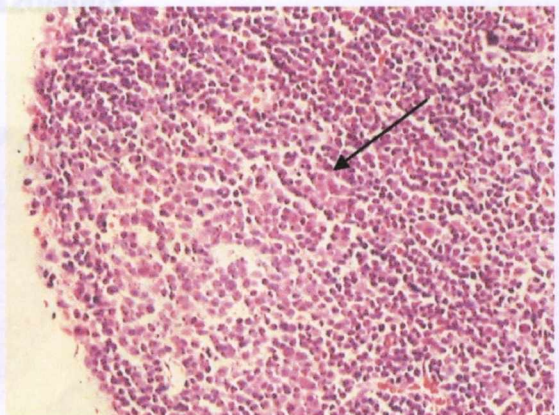
**Figura 8-A - La/6d/250x**



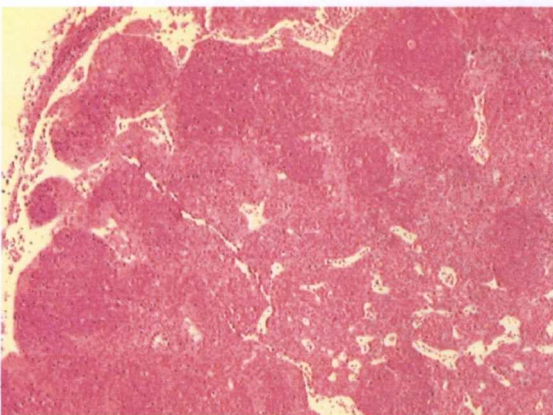
**Figura 8-B - Lm/6d/250x**



**Figura 8-C - La/23d/400x**



**Figura 8-D - Lm/23d/250x**



**Figura 8-E - La/42d/250x**



**Figura 8-F - Lm/42d/400x**

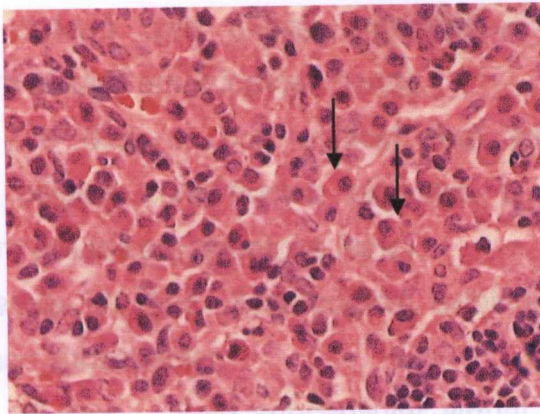
Figura 8-Corte histológico de esfregaço sanguíneo de camundongo CBA infectado com *L. amazonensis* ou *L. major* - 5, 23 e 42 dias

A) *L. amazonensis* / 6 dias - Zona cortical com presença de folículo, apresentando compatível com

B) *L. major* / 6 dias - Zona cortical com presença de folículo, apresentando compatível com

C) *L. amazonensis* / 23 dias - Zona cortical com acúmulo de células (seta) no espa

D) *L. major* / 23 dias - Zona cortical com folículo linfóide ativado (seta).



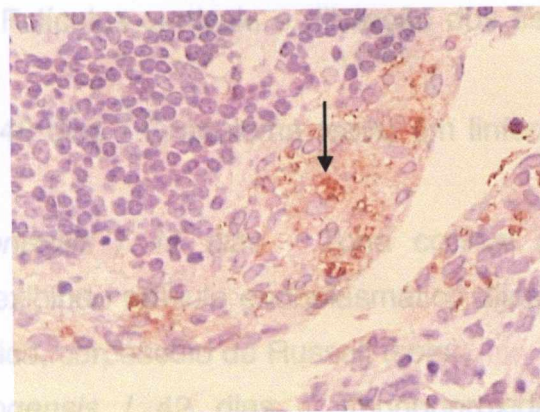
**Figura 8 - G - La/42d/400x**

E) *L. amazonensis* / 42 dias - Vista panorâmica do padrão arquitetural do linfonodo, com áreas subcapsulares e medulares.

F) *L. major* / 42 dias - Vista panorâmica do linfonodo com arquitetura preservada.

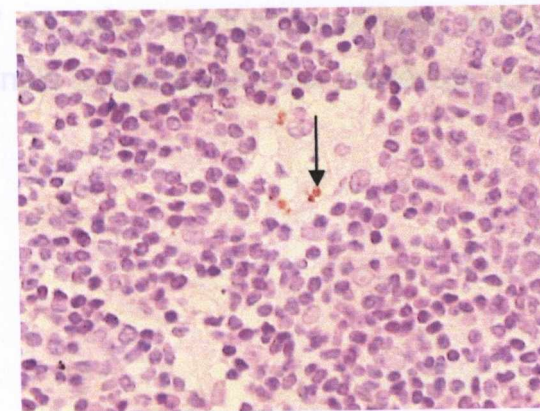
G) *L. amazonensis* / 42 dias - Vista panorâmica do linfonodo apresentando vários plasmócitos, e acúmulo de material protéico (seta).

H) *L. amazonensis* / 42 dias - Imunohistoquímica indireta/DAB, o pigmento castanho evidencia formas amastigotas e antígeno degradado (seta).



**Figura 8-H - La/42d/400x**

I) *L. major* / 42 dias - Imunohistoquímica indireta/DAB, o pigmento castanho assina granuloma (seta).



**Figura 8-I - Lm/42d/400x**

**Figura 8**-Corte histológico de linfonodo popliteo de camundongo CBA infectado com *L. amazonensis* ou *L. major* – 6, 23 e 42 dias

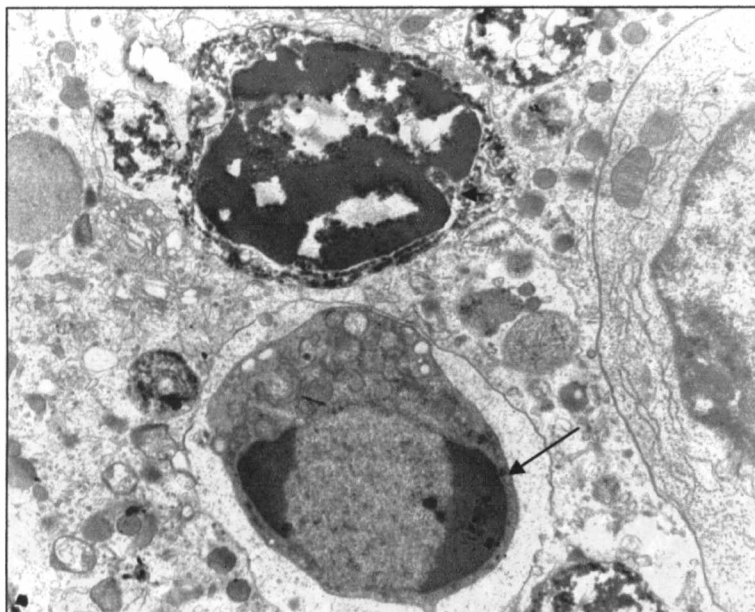
- A)** *L. amazonensis* / 6 dias - Zona cortical com presença de folículo, apresentando células com núcleo picnótico e com fragmentação, compatível com células em apoptose (seta).
- B)** *L. major* / 6 dias - Zona cortical com presença de folículo, apresentando células com núcleo picnótico e com fragmentação, compatível com células em apoptose (seta).
- C)** *L. amazonensis* / 23 dias - Zona cortical, exibindo acúmulo de células (seta) no espaço subcapsular.
- D)** *L. major* / 23 dias – Seio subcapsular virtual e área cortical com folículo linfóide ativado (seta).
- E)** *L. amazonensis* / 42 dias – Vista panorâmica do padrão arquitetural do linfonodo. Folículos corticais e dilatação dos seios subcapsulares e medulares.
- F)** *L. major* / 42 dias - Granuloma (seta) em linfonodo com arquitetura preservada.
- G)** *L. amazonensis* / 42 dias - Zona cortical apresentando vários plasmócitos, exibindo retículo endoplasmático dilatado com acúmulo de material protéico, corpúsculo de Russell (seta).
- H)** *L. amazonensis* / 42 dias – Imunoperoxidase indireta/DAB, o pigmento castanho evidencia numerosas formas amastigotas e antígeno degradado (seta).
- I)** *L. major* / 42 dias – Imunoperoxidase indireta/DAB, o pigmento castanho assinala os raros parasitos presentes no granuloma (seta).



### 5.6.2 Avaliação Ultra-Estrutural dos Linfonodos – Caracterização de Células Apoptóticas

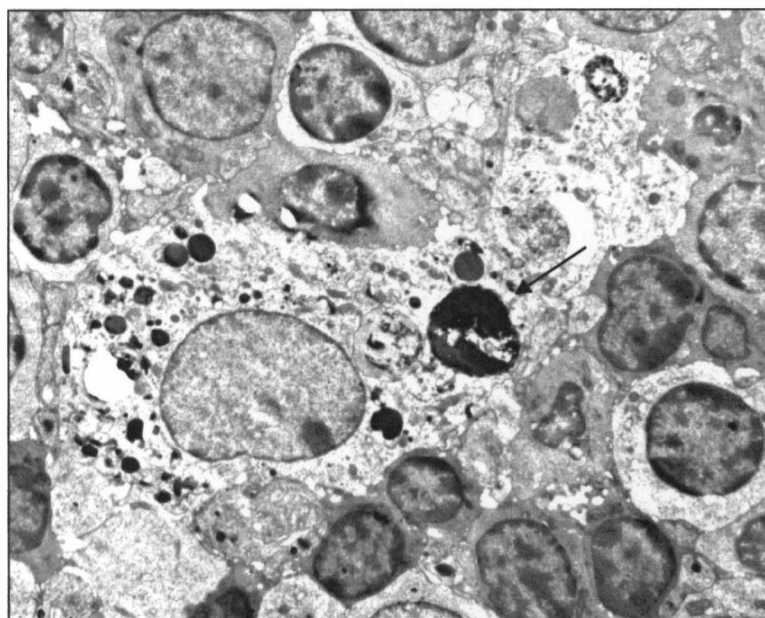
Nos grupos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major*, observaram-se células de núcleo com cromatina condensada, formação de figura de meia-lua, volume celular diminuído e fragmentos celulares apoptóticos, alterações características do processo de apoptose (Figura 9 A e B).

Nos animais infectados com *L. amazonensis* foi observado com 42 dias de infecção uma frequência maior de macrófagos infectados e com corpos apoptóticos internalizados (Figura 9 C).



**Figura 9A-L.a 21d** – Células em diferentes estágios do processo de apoptose. Cromatina condensada disposta na periferia em meia-lua (seta). Célula em estágio mais tardio de apoptose (cabeça de seta).

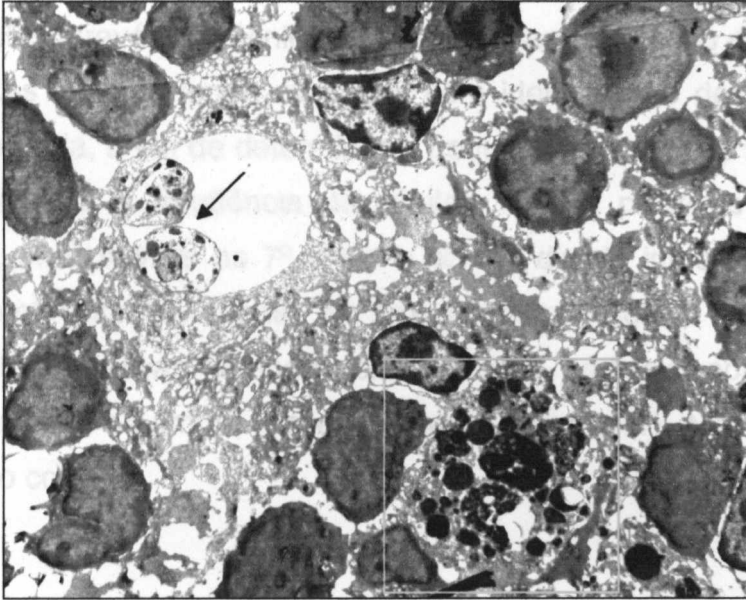
Figura 9C-Lm/ 23 dias – Macrófago com vacúolo parasitário contendo duas formas: amastigotas (seta) próximo de corpos apoptóticos internalizados (cabeça de seta)



**Figura 9B-Lm/ 23 dias** – Macrófago com corpos apoptóticos de diferentes dimensões no citoplasma.

## 73 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS EM APOPTOSE EM LINFONÓDOS DE DRENAGEM ATRAVÉS DA TÉCNICA DE TUNEL

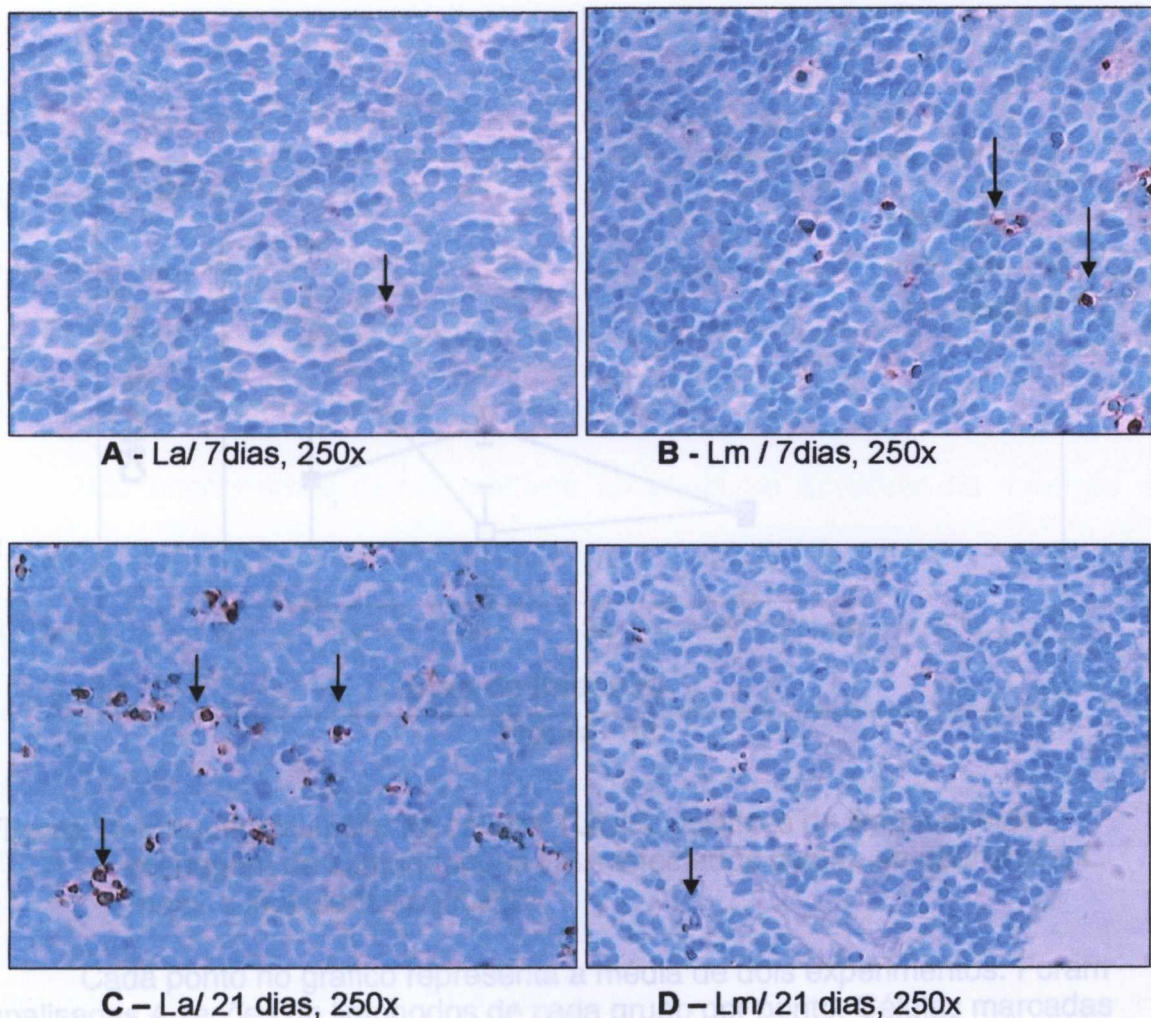
Porções de linfonodos dos três grupos estudados foram submetidas a reação de células TUNEL para detectar apoptose in situ (Figura 10). A análise de morfometria observada nos linfonodos com 42 dias de infecção foi  $61/\text{mm}^2$ ,  $42,4/\text{mm}^2$  e  $34,8/\text{mm}^2$ . O grupo de controle detectou-se uma frequência de apoptose no grupo de controle.



**Figura 9C-La/ 42dias** – Macrófago com vacúolo parasitífero contendo duas formas amastigotas (seta), próximo de corpos apoptóticos internalizados (destaque).

## 5.7 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS EM APOPTOSE EM LINFONODOS DE DRENAGEM ATRAVÉS DA TÉCNICA DE TUNEL

Secções de linfonodos dos três grupos estudados foram submetidos a marcação de células através da técnica de TUNEL para avaliação de apoptose in situ (Figura 10). As lâminas foram avaliadas com identificação desconhecida no sistema de morfometria, a fim de determinar a frequência de células marcadas por  $\text{mm}^2$ . Observou-se que a frequência de células TUNEL positivas dos animais infectados com *L.amazonensis* no 7º, 21ºd e no 42º dia de infecção foi  $61/\text{mm}^2$ ,  $88,5/\text{mm}^2$ ,  $42,4/\text{mm}^2$ , respectivamente. No grupo infectado com *L. major* detectou-se células TUNEL positivas também em folículos corticais com frequência  $141,4/\text{mm}^2$ ,  $34,8 \text{ mm}^2$  e  $44,4\text{mm}^2$ , respectivamente (Figura 11). Não foi detectada apoptose no grupo controle.



Cada ponto preto representa a média de dois testes. Foram analisados todos os pontos de cada grupo. As células TUNEL marcadas através da técnica de TUNEL foram contadas e relacionadas com a área. Nos dias 7 e 21 foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados, avaliadas através do teste estatístico One Way - ANOVA e pós-teste

**Figura 10**-Secções de linfonodos submetidos à marcação de TUNEL - Células TUNEL positivas marcadas em castanho (seta). **A e C** - Secções de linfonodo de camundongo CBA infectado com *L. amazonensis* após 7 e 21 dias, respectivamente. **B e D** - Secções de linfonodo de camundongo CBA infectado com *L. major* após 7 e 21 dias, respectivamente

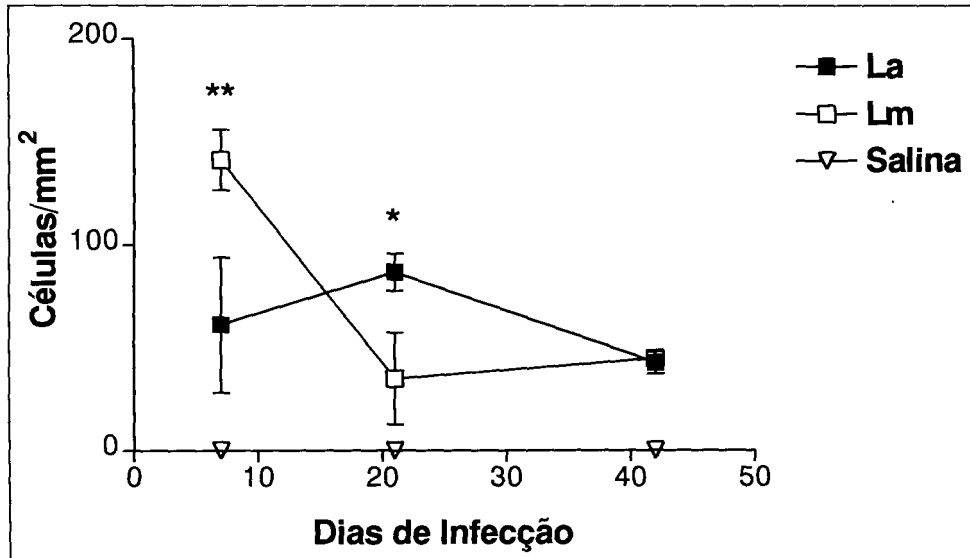


Figura - 11

**Figura 11-**Frequência in situ de células TUNEL positivas de linfonodos de drenagem de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis*, *L. major* e inoculados com PBS.

Cada ponto no gráfico representa a média de dois experimentos. Foram analisadas 4 seções de linfonodos de cada grupo por ponto. Células marcadas através da técnica de TUNEL foram contadas e relacionadas com a área. Nos dias 7 e 21 foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupo infectados, avaliadas através do teste estatístico One Way – ANOVA e pós-teste de múltipla comparação de Newman-Keuls (\*\* $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Poucos trabalhos na literatura têm dado conta que a ocorrência de apoptose pode estar relacionada à resistência em infecções de camundongos com *L. major* e que a suscetibilidade estaria relacionada a um retardo na ocorrência desse fenômeno (DESBARATS et al., 2000). Linhagens de camundongos resistentes quando depletados dos genes que codificam o Fas e Fas-L que induzem apoptose tornam-se susceptíveis (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 1998).

Não encontramos dados relativos ao papel da apoptose na infecção de camundongos infectados com *L. amazonensis*, uma espécie de *Leishmania* capaz de induzir susceptibilidade na maioria das linhagens de camundongos. Assim, decidimos comparar este fenômeno em infecções descontroladas pela *L. amazonensis* com infecções controláveis pela *L. major* em camundongos da linhagem CBA.

Foi realizado a avaliação da ocorrência de apoptose em linfonodos de drenagem em camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazonensis*, para verificar a associação deste evento de morte celular com a resposta de resistência e susceptibilidade. Diferentes metodologias foram aplicadas para evidenciar a ocorrência da apoptose, permitindo um estudo comparativo qualitativo e quantitativo.

Nossos resultados demonstram que até a três semana (21 dias) pós-infecção o número de células nos linfonodos de camundongos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* é semelhante, mas que na sexta semana (42 dias) a

quantidade total de células nos linfonodos de camundongos infectados com *L. amazonensis* é significativamente maior que o número de células no linfonodo de animais infectados com *L. major*. Estas diferenças se refletem nos tamanhos dos órgãos que são muito maiores nos animais infectados com *L. amazonensis*. O aumento do número de células nos linfonodos deve refletir um maior estímulo proliferativo ou um maior recrutamento de células para o linfonodo, ou ainda, que de algum modo as células no linfonodo não estão migrando para o sítio da infecção no local da inoculação, e que esses mecanismos estejam operando de modo diferente em animais infectados com diferentes espécies de *Leishmania*. Dados de outros pesquisadores e de nosso laboratório (WELBY-BORGES, 2000) dão conta de que talvez a hipótese de uma migração desigual de células para o sítio inflamatório esteja ocorrendo efetivamente. Na lesão de camundongos susceptíveis, o infiltrado é quase monomórfico macrófágico, havendo poucos linfócitos, enquanto nos animais resistente há nítida infiltração linfocitária e estes linfócitos poderiam estar sendo recrutados a partir do linfonodo de drenagem. Na análise histológica dos linfonodos também se verifica aumento progressivo de células nos animais susceptíveis. Dentre as células que se acumulam destaca-se plasmócitos e principalmente macrófagos e em contra partida a população linfocitária diminui.

Outra explicação para a diferença no número de células seria a ocorrência de morte celular por apoptose ou por outro mecanismo em maior quantidade no linfonodo de camundongos resistentes. Trabalho recentemente publicado na literatura demonstra que em camundongos CBA infectados com *L. major* ocorre maior morte celular que em camundongos BALB/c susceptíveis em fases iniciais da



infecção e que a morte de células depende de apoptose mediada por Fas e Fas-L (DESBARATS et al., 2000). Diferente dos nossos resultados no qual no décimo dia a quantidade de células mortas no linfonodo é semelhante nos dois grupos e nos 21 e 42 dias há significativamente mais morte celular nos linfonodos dos camundongos infectados com *L.amazonensis* que nos infectados com *L.major*. No entanto, estes dados são apenas parcialmente comparáveis com o referido trabalho, visto que foi utilizado o modelo de infecção com duas linhagens de camundongo, Balb/c e CBA, infectados com *L. major*.

Como a proporção de células mortas é semelhante nos dois grupos e se mantém relativamente constante durante o período de observação, pode-se deduzir que o maior aumento de celularidade nos animais infectados com *L. amazonensis* se dê devido a uma maior proliferação de células no linfonodo ou devido a uma maior migração de células para o linfonodo, além, talvez de dificuldades de saída de células do linfonodo para o local da inoculação. Dados obtidos de exames histológicos dos linfonodos e que serão comentados mais adiante mostram que nos linfonodos de camundongos infectados com *L. amazonensis*, aumenta progressivamente a população de macrófagos, inclusive a de macrófagos parasitados, ocorrendo por volta de 42 dias uma completa modificação da arquitetura do órgão. Já nos animais infectados com *L. major*, a quantidade de macrófagos que migram para o linfonodo é bem menor, poucos deles estão parasitados e a arquitetura geral do órgão está preservada, ocorrendo alguns granulomas.

A técnica da anexina-V em citometria de fluxo é usada para marcar células que expressam fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática.

Este fenômeno ocorre em células apoptóticas e funciona como estímulo para que as células sejam fagocitadas. Através deste método não se demonstrou diferença significativa no número de células apoptóticas entre os grupos infectados e o controle em nenhum dos pontos analisados. Este dado é diferente do apresentado por Desbarats *et al.* (2000), que descreve que houve correspondência entre o método do azul tripan e da anexina-V, mas que não mostrou estes dados no referido trabalho. Uma possibilidade é que a técnica não tenha funcionado a contento. Contra esta possibilidade é o fato de que os mesmos reagentes e técnica foram utilizada na re-estimulação de células do linfonodo *in vitro* e termos obtido marcação como será discutido adiante. O fato de não se ter marcado as células exclusivamente com anexina-V, critério considerado para indicação desta técnica, pode indicar que está havendo apoptose tardia. Neste estágio devido a perda de integridade da membrana, a célula marca simultaneamente com iodeto de propídio e anexina-V, porém não foi avaliado o percentual de células com esta marcação dupla. No entanto, os resultados obtidos através da marcação com azul de tripan, pode sinalizar que no estágio avaliado as células já não apresentavam membrana íntegra, podendo contribuir para a baixa marcação com anexina-V exclusivamente. O fato da fagocitose de células apoptóticas no tecido ser um processo rápido pode dificultar a detecção de apoptose *ex vivo*, visto que a marcação com anexina-V é uma marcação de superfície, impedindo que células internalizadas sejam detectadas. Outra possibilidade que é de que a morte celular ocorre através de outro mecanismo, como *oncos* (MAJNO & JORIS, 1995).

Uma outra abordagem foi investigar se a frequência de apoptose de células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> diferia nos diferentes grupos. Não houve diferença estatisticamente

significante e a frequência de células em apoptose foi baixa. Este dado, de certo modo parece conflitar com o achado de uma clara diminuição na frequência de células CD4<sup>+</sup> avaliada através de citometria de fluxo, *ex vivo*, sobretudo aos 42 dias pós-infecção nos dois grupos de animais infectados. Mais uma vez, a técnica da anexina não foi capaz de mostrar que houve apoptose significativa dessas células. Talvez o fenômeno de apoptose tenha ocorrido algum tempo entre 21 e 42 dias pós-infecção não sendo detectado pelo método, ou as células apoptóticas foram prontamente fagocitadas por macrófagos. A possibilidade de fagocitose por macrófagos é reforçada tanto pelos achados com a técnica do TUNEL quanto através da microscopia eletrônica. É interessante registrar que, apesar de não ser estatisticamente significativa, a redução no percentual de células CD4<sup>+</sup> foi maior nos animais infectados com *L. amazonensis*. Este dado está de acordo com a observação histológica que mostra, aos 42 dias pós-infecção, uma substituição de linfócitos por macrófagos nos animais infectados com *L. amazonensis*. Essa mesma técnica não mostrou redução no número de células CD8<sup>+</sup>, mantendo-se na proporção de 20% nos três pontos analisados. Este dado é importante pois demonstra que a redução de células CD4<sup>+</sup> pode ser um fenômeno específico e não resultado apenas de um aumento relativo de outros tipos de células no linfonodo.

Em seguida decidimos verificar se a re-estimulação *in vitro* induziria apoptose de modo diferente. Após re-estímulo *in vitro* observou-se que células CD4<sup>+</sup> dos animais estimuladas com *L. amazonensis* e *L. major* sofrem mais apoptose que células não estimuladas e não há diferenças significativas no percentual de células mortas por este mecanismo. Interessante notar que nos animais infectados com *L. major* ocorreu inibição de apoptose de células CD8<sup>+</sup> aos

21 dias pós-infecção e no 42º dia não houve diferença entre as culturas estimuladas e não estimuladas. Este dado pode ser interessante diante do conhecimento de que células CD8+ podem ter papel importante na resistência à infecção por *Leishmania* (BELKAID et al., 2002; TITUS et al., 1987). No entanto, estes dados devem ser confirmados com outros experimentos visto que foram obtidos de apenas um experimento.

A análise *in situ* através da técnica do TUNEL evidenciou a ocorrência de apoptose nos dois grupos de animais infectados. Observou-se através da análise morfométrica uma frequência maior de apoptose nos animais infectados com *L. major* no sétimo dia de infecção. No 21º dia o número de células em apoptose foi maior nos animais infectados com *L. amazonensis*, e no 42º dia não houve diferença. O fato de termos observado mais apoptose nas células dos camundongos infectados com *L. major* no sétimo dia nos coloca diante da possibilidade de que fenômenos de apoptose na fase precoce tenham alguma relevância na proteção como sugere o trabalho de Desbarats et al. (2000), que observou isto em seu estudo e sugere que a eliminação de células T do tipo Th1 favoreça a resolução da inflamação e o controle da lesão. A repetição deste estudo em fases mais precoces poderá elucidar este ponto. Nossa crítica à interpretação dada por aqueles autores é que a natureza da inflamação no sítio da lesão em camundongos resistentes e susceptíveis é muito diferente, com predomínio absoluto de macrófagos nos animais susceptíveis e de linfócitos nos resistentes e que não nos parece que a resolução da lesão se deva à eliminação das células que mantêm a inflamação. No nosso modelo a resolução da lesão está relacionada ao controle da infecção não à eliminação de células inflamatórias na fase precoce.

Talvez isso seja importante na patogênese da lesão humana em algumas formas de leishmaniose tegumentar onde parece que fenômenos de hipersensibilidade estejam atuando, mantendo um intenso processo inflamatório mesmo diante da escassez de parasitas.

A análise da distribuição de células apoptóticas no linfonodo, indicou que ocorria apoptose em células na área cortical, em regiões foliculares e perifoliculares nos dois grupos infectados, sendo que na região folicular era mais predominante. Sabe-se que na região folicular do linfonodo há uma concentração de linfócitos B. Estas células ao serem ativadas proliferam e muitas morrem por apoptose ao sofrerem o processo de hipermutação somática, processo pelo qual pode permitir um aumento na afinidade do receptor de célula B pelo seu antígeno específico através de uma mutação pontual na região hipervariável do receptor ou levar a alterações que inviabilizam a expressão do receptor ou então que diminua a afinidade do receptor, induzindo assim a célula a apoptose. Por conta disto, seria importante em estudos futuros investigar a ocorrência de apoptose na população de linfócitos B.

Nos animais infectados com *L. amazonensis* observou-se acúmulo de macrófagos, células hospedeiras necessárias para a replicação do parasita. Isto pode propiciar a manutenção da *Leishmania*, além de provocar uma diminuição na proporção entre linfócitos e macrófago, diminuindo a eficiência na ativação de macrófagos para ação microbicida através de IFN- $\gamma$ . Conceição-Silva et al. (1998), sugeriram que a morte de macrófagos expressando Fas por linfócitos T CD4+ expressando FasL, pode representar um papel importante por limitar, no sítio de

infecção, o número de macrófagos. Além disto, a redução do número de macrófagos no sítio da lesão resulta no aumento da razão de células CD4<sup>+</sup> Th1 produtora de IFN- $\gamma$ . Caso este mecanismo esteja atuando no nosso sistema, é possível que a *L. amazonensis* possa estar inibindo a apoptose destas células macrofágicas ao contrário da *L. major* que não consegue controlar esta via de apoptose.

A presença de vários macrófagos parasitados ou contendo antígenos parasitários, evidenciados através da reação de imunohistoquímica anti-*Leishmania*, observados nos linfonodos de drenagem dos animais infectados com *L. amazonensis*, chama atenção principalmente no 42º dia após infecção. Esta alta carga parasitária pode estar contribuindo para eliminação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, por um mecanismo de hiperestimulação. A análise através da microscopia eletrônica evidencia vários macrófagos parasitados e com frequência foram observadas na sua vizinhança células apoptóticas. A apoptose de linfócitos por hiperestimulação é mediada pela via Fas-FasL. Existem evidências que apoptose desencadeada por esta via, elimina preferencialmente células T CD4<sup>+</sup> Th1 (ZHANG et al., 1997). Lemos de Souza et al. (2000), verificaram que havia uma produção reduzida de IFN- $\gamma$  nos animais infectados com *L. amazonensis*. A indução de apoptose em linfócitos por hiperestimulação por fatores relacionados ao parasito pode preferencialmente eliminar linfócitos T CD4<sup>+</sup> protetores, contribuindo para o perfil de resposta de susceptibilidade nos camundongos CBA infectados por esta espécie de *Leishmania*.

A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos pode levar estas células a produzirem citocinas anti-inflamatórias como o TGF- $\beta$ , favorecendo o estabelecimento de infecção por parasitos intracelulares, como foi demonstrado no modelo murino da doença de Chagas (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000). No nosso modelo nós observamos uma grande quantidade de células mortas nos animais infectados com *L. amazonensis* através da coloração de azul de Tripán. A partir da técnica de TUNEL e na microscopia eletrônica nós evidenciamos a presença de vários macrófagos com corpos apoptóticos internalizados. É possível que este mecanismo de desativação macrofágica através da produção de citocinas TGF- $\beta$ , possa está atuando também no nosso modelo, levando os animais infectados com *L. amazonensis* não controlarem a infecção. Como já foi mostrado, esta citocina é um importante fator para determinação da resposta de susceptibilidade na infecção experimental por *L. amazonensis*.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram divergências entre os dados obtidos das diferentes técnicas para marcação de células apoptóticas, o que dificulta uma interpretação clara de como este evento celular está ocorrendo no curso da infecção experimental por *Leishmania*. No entanto, observou-se pelo menos através de duas abordagens diferenças significativas na frequência de células apoptóticas no padrão de resistência e susceptibilidade, sendo necessário a confirmação com outros experimentos.

Estes resultados abrem perspectivas para estudos posteriores a fim de investigar outros tipos celulares que podem estar morrendo por apoptose ou que são resistentes a este processo, sobretudo as células macrofágicas que se

apresentam com grande destaque nos linfonodos dos animais susceptíveis. A avaliação da ocorrência de apoptose no local da lesão também poderá contribuir para esclarecimento da participação deste evento celular para o estabelecimento do padrão de resistência e susceptibilidade.



## 7 RESUMO DOS RESULTADOS

- Camundongos CBA susceptíveis à infecção por *L. amazonensis* desenvolvem lesão progressiva juntamente com aumento do número de células do linfonodo poplíteo e morte celular neste compartimento. Por outro lado, camundongos infectados com *L. major* cicatrizam espontaneamente, mantêm o número de células a taxa de morte celular.
- Análise por citometria de fluxo através da marcação com anexina-V não mostrou diferenças na frequência de apoptose ex vivo em células totais, células T CD4+ e T CD8+ do linfonodo de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* e *L. major*.
- A análise in situ mostra diferenças na ocorrência de apoptose em células do linfonodo até a terceira semana de infecção. Sendo que com uma semana ocorre mais apoptose no grupo resistente e com três semanas ocorre mais apoptose no grupo susceptível.
- A análise por microscopia eletrônica evidenciou aspectos morfológicos de células em apoptose nos grupos infectados. Foi observado com mais frequência células macrofágicas com corpos apoptóticos internalizados nos animais infectados com *L. amazonensis*.

## 8 CONCLUSÕES

- Existem diferenças na cinética e na frequência de apoptose na resposta de resistência e susceptibilidade.
- O padrão de resistência do camundongo CBA está associado a ocorrência de apoptose em fases iniciais da infecção.
- O padrão de susceptibilidade está associado com a ocorrência de apoptose em fases mais tardias.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBISHER, T.; HARBECKE, D.; ILG, T. Proteophosphoglycan, a major secreted product of intracellular *Leishmania mexicana* amastigotes, is poor B-cell antigen and does not elicit a specific conventional CD4+ T-cell response. **Infect. Immun.**, **67**: 5379-5385, 1999.

ANDRADE, Z.A.; REED, S.; S.G.; ROTERS, S. B.; SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, **114**: 137-148, 1984.

BAHR, V.; STIERHOF, Y.D.; ILG, T.; DEMAR, M.; QUINTEN, M.; OVERATH, P. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **58**: 107-121, 1993.

BARCINSKI, M.A.; DOSREIS, G.A. Apoptosis in the parasites and parasites-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **32**: 395-401, 1999.

BARRAL-NETTO, M.; DE FREITAS, L. A.; ANDRADE, Z.A. Histopathologic changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of Balb/c mice. **Am. J. Pathol.**, **146**: 271-278, 1987.

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

BATES, P.A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, **79**: 215-218, 1994.

BELKAID, Y.; VON STEBUT, E.; MENDEZ, S.; LIRA, R.; CALER, E.; BERTHOLET, S.; UDEY, M.C.; SACKS, D. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, **168**: 3992-4000, 2002.

BITTENCOURT, A.L. & BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: DOERR, W. & SEIFERT, G. (Eds.). **Tropical Pathology**. Berlim: Sprincer-Verlag, 1995. p. 597-651.

BOGDAN, C.; GESSNER, A.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Curr. Opin. Immunol.**, **8**: 517-525, 1996.

BRADLEY, D.J.; KIRKLEY, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. the variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. **Clin. Exp. Immunol.**, **30**: 119-129, 1977.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana. Bol. Epidemiol., 3:15-16, 1999. Ed. Esp.

BRITTINGHAM, A.; MORRINSON, C.J.; MCMASTER, W.R.; MCGWIRE, B.S.; CHANG, K.P.; MOSSER, D.M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion and resistance to complement-mediated lysis. **J. Immunol.**, **155**: 3102-3111, 1995.

BRYCESON, A. D. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The clinical and histological features of the disease. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.**, **63**: 708-737, 1969.

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**: 4144-4148, 1985.

CASTES, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O.; RONDON, A.J.; Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **27**: 176-186, 1983.

CHANG, H.Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, **64**: 821-846, 2000.

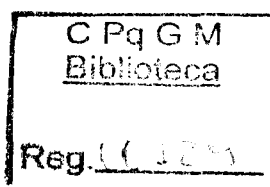
CONCEIÇÃO-SILVA, F.; HAHNE, M.; SCHOTER, M.; LOUIS, J.; TSCHOPP, J. The resolution induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. **Eur. J. Immunol.**, **28**: 237-245, 1998.

CUMMINGS, M.C.; WINTERFORD, C.M.; WALKER, N.I. Apoptosis. **Am. J. Surg. Pathol.**, **21**: 88-101, 1997.

DE FREITAS BALANCO, J. M.; MOREIRA, M.E.; BONOMO, A.; BOZZA, P.T.; AMARANTE-MENDES, G.; PIRMEZ, C.; BARCINSKI, M.A. Apoptotic mimicry by na obligate intracellular downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr. Biol.**, **11**: 1870-1873, 2001.

DESBARATS, J.; STONE, J.E.; LIN, L.; ZAKERI, Z.F.; DAVIS, G.S.; PFEIFFER, L.M.; TITUS, R.G. AND NEWELL, M.K. Rapid early onset lymphocyte cell death in mice resistant, but not susceptible to *Leishmania major* infection. **Apoptosis**, **5**: 189-196, 2000.

DESCOTEAUX, A.; MATLASHEWSKI, G.; TURCO, S.J. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **J. Immunol.**, **149**: 3008-3015, 1992.



DESCOTEAUX, A.; TURCO, S.J.; Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity.

**Biochim. Biophys. Acta.**, **1455**: 341-352, 1999.

EARNSHAW, W.C.; MARTINS, L.M.; KAUFMANN, S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. **Annu. Rev. Biochem.**,

**68**: 383-424, 1999.

ELLIS, R.E.; YUAN, J.Y, HORVITZ, H.R. Mechanisms and functions of cell death.

**Annu Rev Cell Biol.**, **7**: 663-698, 1991.

FADOK, V.A.; VOELKER, D.R.; CAMPBELL, P.A.; COHEN, J.J.; BRATTON, D.I.; HENSON, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J. Immunol. Methods**,

**148**: 2207, 1992.

FREIRE-DE-LIMA, C.G.; NASCIMENTO, D.O.; SOARES, M.B.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; DE MELLO, F.G.; DOSREIS, G.A.; LOPES, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophage. **Nature**, **403**: 199-203, 2000.

GAO, L.; ABU KWAIK, Y. Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens.

**Microbes Infect.**, **2**: 1705-1719, 2000.

GRANVILLE, D.J.; CARTHY, C.M.; HUNT, D.W, MCMANUS, B.M. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. **Lab. Invest.**,

**78**: 893-913, 1998.

GRANVILLE, D.J.; CARTHY, C.M.; HUNT, D.W, MCMANUS, B.M. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. **Lab. Invest.**,

**78**: 893-913, 1998. Apud KERR, J.F.R. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special referece to changes in lysosomes. **J. Pathol. Bacteriol.**

**90**: 419-435, 1965.

GRANVILLE, D.J.; CARTHY, C.M.; HUNT, D.W, MCMANUS, B.M. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. **Lab. Invest.**, **78**: 893-913, 1998.  
apud KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, **26**: 239-57, 1972.

GRIMALDI JUNIOR, G. Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **77**: 195-215, 1982.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, **6**: 230-250, 1993.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**, **14**: 229-243, 2001.

HANDMAN, E.; GODING, J. W. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. **EMBO J.**, **4**: 329-336, 1985.

HEINZEL, F. P.; AHMED, F.; HUJER, A.M.; RERKO, R.M. Immunoregulation of murine leishmaniasis by interleukin-12. **Res. Immunol.**, **146**: 575-581, 1995.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, **407**: 770-776, 2000.

HORVITZ, H.R.; SHAHAM, S.; HENGARTNER, M.O. The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, **59**: 377-385, 1994.

HUBER, M.; TIMMS, E.; TAK, M.W.; RÖLLINGHOFF, M. AND LOHOFF, M. Effective and Long-Lasting Immunity against the Parasite *Leishmania major* in CD8-Deficient Mice. **Infect. Immun.**, **66(8)**: 3968-70, 1998.

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

ILG, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. **Parasitol. Today**, **16**: 489-497, 2000.

ILG, T.; ETGES, R.; OVERATH, P.; MCCONVILLE, M. J.; THOMAS-OASTES, J.; THOMAS, J.; HOMANS, S.W.; FERGUSON, M.A. Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. **J. Biol. Chem.**, **267**: 6834-6840, 1992.

KANALY, S.T.; NASHLEANAS, M.; HONDOWICZ, B.; SCOTT, P. TNF receptor p55 is required for elimination of inflammatory cells following control of intracellular pathogens. **J. Immunol.**, **163**: 3883-3889, 1999.

KHAN, I.A.; MATSUURA, T.; KASPER, L.H. Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Int. Immunol.**, **8**: 887-896, 1996.

KRAMMER, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, **407**: 789-795, 2000.

KRAMMER, P.H.; BEHRMANN, I.; DANIEL, P.; DHEIN, J.; DEBATIN, K.M. Regulation of apoptosis in the immune system. **Curr. Opin. Immunol.**, **6**: 279-289, 1994.



KRAVTSOV, V.D.; DANIEL, T.O.; KOURY, M.J. Comparative analysis of different methodological approaches to the in vitro study of drug-induced apoptosis. **Am. J. Pathol.**, **155**: 582-585, 1999.

KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med.**, **6**: 513-519, 2000.

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**: 421-424, 1987.

LEISHMANIASIS. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/>>  
Acesso em: nov. 2002.

LEMOS DE SOUZA, V.; ASCENCAO SOUZA, J.; CORREIA SILVA, T.M.; SAMPAIO TAVARES VERAS, P.; RODRIGUES DE FREITAS, L.A. Different *Leishmanial* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes Infect.**, **2**: 1807-1815, 2000.

LOPES, M.F.; DA VEIGA, V. F.; SANTOS, A.R.; FONSECA, M.E.; DOSREIS, G.A. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas disease. **J. Immunol.**, **154**: 744-752, 1995.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, **146**: 3-15, 1995.

MAUEL, J.; BEHIN, R. Immunology of Leishmaniasis. In: LEVANDOWSKY, M.; HUTNER, S.H. (Eds.). **Biochemistry and Physiology of Protozoa**. 2. ed. New York: Academic Press, 1981. p. 385-429.

- MOREIRA, M.E.; DEL PORTILLO, H.A.; MILDER, R.V.; BALANCO, J.M.; BARCINSKI, M.A. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **J. Cell Physiol.**, **167**: 305-313, 1996.
- NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The FAS death factor. **Science**, **267**: 1449-1456, 1995.
- NICHOLSON, D.W.; THRNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem. Sci.**, **22**: 299-306, 1997.
- NUNES, M.P.; ANDRADE, R.M.; LOPES, M.F.; DOSREIS, G.A.; Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. **J. Immunol.**, **160**: 1313-1319, 1998.
- PEREZ, H.; ARREDONDO, B.; GONZALEZ, M. Comparative study of American cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis in two strains of inbred mice. **Infect. Immun.**, **22**: 301-307, 1978.
- PETERS, C.; KAWAKAMI, M.; KAUL, M.; ILG, T.; OVERATH, P.; AEBISHER, T. Secreted proteophosphoglycan of *Leishmania Mexicana* amastigotes activates complement by triggering the mannan binding lectin pathway. **Eur. J. Immunol.**, **27**: 2666-2672, 1997.
- PIANI, A.; ILG, T.; ELEFANTY, A. G.; CURTIS, J.; HANDMAN, E. *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. **Microbes Infect.**, **1**: 589-599, 1999.

PIMENTA, P.F.; TURCO, S. J.; McConville, M.J.; Lawyer, P.G.; Perkins, P.V.; Sacks, D.L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, **256**: 1812-1815, 1992.

PUNTES, S.M.; SACKS, D.L.; DA SILVA, R.P.; JOINER, K. A. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. **J. Exp. Med.**, **167**: 887-902, 1988.

REED, J.C. Mechanisms of apoptosis. **Am. J. Pathol.**, **157**: 1415-1430, 2000.

RIBEIRO, J.M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Agents Dis.**, **4**: 143-152, 1995.

SACKS, D.L.; MODI, G.; ROWTON, E.; SPATH, G.; EPSTEIN, L.; TURCO, S. J.; BERVELEY, S.M. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **97**: 406-411, 2000.

SCAFFIDI, C.; FULDA, S.; SRINIVASAN, A.; FRIESEN, C.; LI, F.; TOMASELLI, K.J.; DEBATIN, K.M.; KRAMMER, P.H.; PETER, M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **Embo J.**, **17**: 1675-1687, 1998.

SCHLEIN, Y.; SHNUR, L.F.; JACOBSON, R.L. Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **84**: 353-355, 1990.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; MANGOT, I.; CUNY, G.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J. L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **45**: 2064-2069, 2001.

THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, **267**: 1456-1462, 1995.

TITUS, R.G.; MILON, G.; MARCHAL, G.; VASSALLI, P.; CEROTTINI, J.C.; LOUIS, J.A. Involvement of specific Lyt-2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, **17**: 1429-1433, 1987.

TURCO, S.J.; DESCOUTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, **46**: 65-94, 1992.

VAN PARIJS, L.; ABBAS, A.K. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. **Curr. Opin. Immunol.**, **8**: 355-361, 1996.

VIEIRA, L.Q.; GOLDSCHMIDT, M.; NASHLEANAS, M. PFEFFER, K.; MAK, T.; SCOTT, P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. **J. Immunol.**, **157**: 827-835, 1996.

WELBURN, S.C.; LILLICO, S.; MURPHY, N.B. Programmed cell death in procyclic form *Trypanosoma brucei rhodesiense* – identification of differentially expressed genes during con A induced death. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 229-234, 1999.

WELBY-BORGES, M. **Expressão de RNAm de quimiocinas e citocinas na resposta imuno-inflamatória *in situ* de camundongos CBA infectados com diferentes espécies de *Leishmania***. 2000 . 96 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador.

YANG, D.; ROGERS, M.V.; BRETT, S.J.; LIEW, F.Y. Immunological analysis of the zinc-binding peptides of surface metalloproteinase (gp63) of *Leishmania major*. **Immunology**, **78**: 582-585, 1993.

YUAN, J.; SHAHAM, S.; LEDOUX, S.; ELLIS, H.M.; HORVITZ, H.R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. **Cell**, **75**: 641-652, 1993.

ZHANG, J.; ANDRADE, Z.A.; YU, Z.X.; ANDRADE, S.G.; TAKEDA, K, SADIRGURSKY, M.; FERRANS, V.J. Apoptosis in a canine model of acute Chagasic myocarditis. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, **31**: 581-596, 1999.

ZHANG, X.; BRUNNER, T.; CARTER, L.; DUTTON, R.W.; ROGERS, P.; BRADLEY, L.; SATO, T.; REED, J.C.; GREEN, D.; SWAIN, S. L. Unequal death in T helper cell Th1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL mediated apoptosis. **J. Exp. Med.**, **185**: 1837-1849, 1997.