



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

PAPEL DA INTERLEUCINA-4 E DA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub>  
DURANTE A INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR  
*Leishmania amazonensis*.

ELISALVA TEIXEIRA GUIMARÃES

Salvador - Bahia - Brasil  
2004



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

## **Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**PAPEL DA INTERLEUCINA-4 E DA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub>  
DURANTE A INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR  
*Leishmania amazonensis*.**

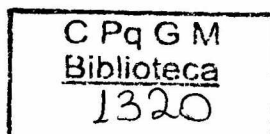
**ELISALVA TEIXEIRA GUIMARÃES**

**Orientador (a): MILENA BOTELHO PEREIRA SOARES**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia, como parte dos requisitos necessários para a obtenção de grau de mestre em Patologia Experimental.

**Salvador - Bahia – Brasil**

**2004**



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ  
Salvador - Bahia.

Guimarães, Elisalva Teixeira  
G963p Papel da interleucina-4 e da prostaglandina E2 durante a infecção de camundongos BALB/c por *Leishmania amazonensis* [manuscrito]. / Elisalva Teixeira Guimarães. - 2004.  
077 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2004.

Orientadora: Profa. Dra. Milena Botelho Pereira Soares. Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia

1. *Leishmania amazonensis*. 2. Camundongos BALB/c. 3. Indometacina.  
4. IL-4. I. Título.

CDU 599.323.4:616.993.161

599.323.4:616.993.161

G 963p

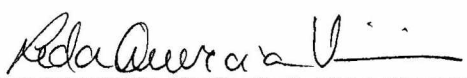
ME11300  
G-1673

PAPEL DA INTERLEUCINA-4 E DA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> DURANTE A INFECÇÃO DE  
CAMUNDONGOS BALB/c POR *Leishmania amazonensis*.

**ELISALVA TEIXEIRA GUIMARÃES**

FOLHA DE APROVAÇÃO

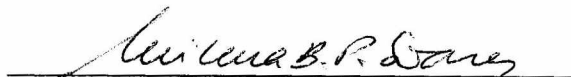
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Leda Quercia Vieira  
Professora adjunta IV  
Instituto de Ciências Biológicas -UFMG



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



Dra. Milena Botelho Soares  
Pesquisadora Adjunta  
CPqGM - FIOCRUZ



**Para as pessoas mais importantes da minha vida, o meu pai e a minha mãe, fontes de amor incondicional, as quais devo toda a minha formação pessoal e profissional.**

## **AGRADECIMENTOS**

---

### **Dra. Milena Botelho Pereira Soares**

Pelos ensinamentos e dedicação nesses quatro anos de convivência e principalmente por ser guia no processo da minha formação profissional

### **Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos**

Coordenador do laboratório, agradeço pelas críticas sugeridas e por tornar possível a realização deste trabalho

### **Dr. Washington Luis Conrado dos Santos**

Pelas correções, análises histopatológicas e estatísticas. É uma pessoa pela qual tenho muita admiração e que foi indispensável no desenvolvimento deste trabalho

### **Minha amiga Jaqueline Noronha**

Por estar presente e participar desde a fase inicial do desenvolvimento deste trabalho e por ser minha grande amiga e companheira de laboratório

### **Minhas amigas Dani e Dra Simone**

Pelos conselhos e pelo ombro amigo nos momentos de dificuldades

### **Meus colegas de mestrado Fernando e Ricardo**

Pela troca de ensinamentos e compartilhar momentos de companheirismo e correrias

### **Meus colegas do LETI**

Pelos momentos de alegria e descontração, além de contribuírem diretamente na realização deste trabalho

### **Todos do LPBI (antigo LIMC)**

Especialmente a Micely, a Daniela e a Lívia por serem bastante receptivas nas minhas visitas semanais

### **Minhas amigas Valéria, Bárbara e Márcia**

Pela torcida na seleção e incentivo no início do mestrado

### **Dr. Johan e Ricardo (LIMI)**

Pela ajuda e discussão de protocolo nas dosagens de óxido nítrico

### **Dra. Tânia Corrêa**

Pelas aulas minuciosas de imunistoquímica

### **Pessoal do biotério**

Em especial a Fabi, Márcio e a Jack, pela dedicação e pela paciência nos pedidos de fornecimento dos animais

**Pessoal da biblioteca**

Em especial a D. Fiscina, pela contribuição nas referências bibliográficas e ajuda no xerox

**Rosália e a Mara**

Por todo o carinho e atenção desprendida, são pessoas fundamentais ao curso de mestrado

**Minhas irmãs Elida, Diana e Nanda**

Pelas palavras de apoio nesta trajetória

**A André**

Pelo carinho e incentivo nas etapas finais deste trabalho

**CPqGM- FIOCRUZ/BA**

A todos deste centro que participaram de alguma forma na execução deste trabalho

**CAPES/FIOCRUZ**

Pela bolsa de estudo concedida

## RESUMO

PAPEL DA INTERLEUCINA-4 E DA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> DURANTE A INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR *L. amazonensis*. **ELISALVA TEIXEIRA GUIMARÃES.** [INTRODUÇÃO] O papel de citocinas durante a infecção experimental por *L. amazonensis* não é tão bem estudado quanto no modelo de infecção por *L. major*. Neste trabalho foi investigado o papel dos mediadores solúveis IL-4 e PGE<sub>2</sub> no curso da infecção de camundongos BALB/c por *L. amazonensis*. [MÉTODOS] Camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- foram infectados por diferentes inóculos de *L. amazonensis* e submetidos ao tratamento com indometacina, um inibidor da síntese de PGE<sub>2</sub>. A produção de IFN- $\gamma$  (no sobrenadante da cultura de células do linfonodo) e os níveis de anticorpos no soro foram determinados por ELISA. Os níveis de NO séricos foram determinados através de seus produtos, o nitrito e o nitrato, pela reação de Griess. [RESULTADOS] Apesar das lesões e da carga parasitária em camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- progredirem de forma similar quando infectados por  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis*, houve um aumento de resposta Th1 em camundongos IL-4 -/- como indicado pela produção elevada de IFN- $\gamma$  e de anticorpos anti-leishmania IgG2a neste grupo de animais. A produção de NO foi semelhante nos dois grupos de estudo. No entanto, camundongos IL-4 -/- desenvolvem lesões e carga parasitária menores que IL-4 +/+ após a infecção por  $10^5$ ,  $10^4$  ou  $10^3$  parasitos. Camundongos IL-4 -/- produzem cerca de 100 vezes mais NO que IL-4 +/+ após a infecção por  $10^4$  *L. amazonensis*. Após o tratamento com indometacina, há uma diminuição das lesões e da carga parasitária em camundongos BALB/c IL-4 +/+. Em contrapartida, apesar haver uma redução significativa no tamanho das lesões de camundongos BALB/c IL-4 -/- tratados com esta droga, nenhuma diferença na carga parasitária foi observada. As lesões dos grupos tratados com indometacina apresentavam macrófagos não vacuolados e pequenas ou ausentes áreas de necrose. [CONCLUSÃO] A PGE<sub>2</sub> e a IL-4 são fatores associados à susceptibilidade durante a infecção por *L. amazonensis*. [PALAVRAS-CHAVE] *Leishmania amazonensis*; BALB/c; IL-4; PGE<sub>2</sub>; indometacina.

## ABSTRACT

ROLE OF INTERLEUKIN-4 AND PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub> IN *Leishmania amazonensis* INFECTION OF BALB/c MICE. **ELISALVA TEIXEIRA GUIMARÃES.**

**[INTRODUCTION]** The role of cytokines in *Leishmania amazonensis* experimental infection has not been well studied as in the *L. major* infection model. Here we investigated the role of interleukin (IL)-4 and PGE<sub>2</sub> in *L. amazonensis* infection of susceptible BALB/c mice. **[METHODS]** Interleukin (IL)-4 deficient (IL-4<sup>-/-</sup>) or wild-type (IL-4<sup>+/+</sup>) BALB/c mice were infected with *L. amazonensis* promastigotes and submitted to treatment with indomethacin, an inhibitor of PGE<sub>2</sub> synthesis. Cytokine (in lymph node cell culture supernatants) and serum anti-leishmania antibody levels were determined by ELISA. Nitric oxide production was estimated by the assessment of the NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub> levels in sera using the Griess reaction.

**[RESULTS]** Lesions and parasitic load were similar in IL-4<sup>+/+</sup> and IL-4<sup>-/-</sup> mice upon infection with  $5 \times 10^6$  parasites, despite the higher production of interferon (IFN)- $\gamma$  and IgG2a in IL-4<sup>-/-</sup> mice compared to IL-4<sup>+/+</sup> mice. The NO levels were similar in both groups. However, IL-4<sup>-/-</sup> mice developed smaller lesions and parasitic loads upon infection with  $10^5$ ,  $10^4$  or  $10^3$  parasites, compared to IL-4<sup>+/+</sup> mice. The NO production was 100 times higher in sera from IL-4<sup>-/-</sup> than in IL-4<sup>+/+</sup> mice upon infection with  $10^4$  *L. amazonensis*. IL-4<sup>+/+</sup> mice treated with indomethacin during the first three weeks of infection developed smaller lesions and lower parasitic load when compared to the control group. However, although indomethacin treatment caused a significant reduction in lesion size of IL-4<sup>-/-</sup> mice, *no difference in the parasitic load was observed. The lesions of indomethacin treated groups contained most macrophages without vacuoles and small or absent necrotic areas.* **[CONCLUSION]** These results indicate that IL-4 and PGE<sub>2</sub> are susceptibility factors to *L. amazonensis* infection. **[KEYWORDS]** *Leishmania amazonensis*; BALB/c mice, IL-4; PGE<sub>2</sub>; indomethacin.

## SUMÁRIO

---

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
1.2 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE.....	14
1.2.1 Desenvolvimento de células Th1 e resistência.....	16
1.2.2 Desenvolvimento de células Th2 e susceptibilidade.....	18
1.2.3 Outros fatores associados à susceptibilidade.....	20
1.2.4 O papel da Prostaglandina E <sub>2</sub> .....	23
1.3 A INFECÇÃO POR <i>Leishmania amazonensis</i> .....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 ANIMAIS.....	31
4.2 PARASITO E ANTÍGENO.....	31
4.3 INFECÇÃO POR <i>L. AMAZONENSIS</i> .....	32
4.4 TRATAMENTO COM INDOMETACINA.....	32
4.5 COLETA DE SANGUE.....	33
4.6 SOROLOGIA.....	33
4.7 DOSAGEM DE NO.....	34
4.8 CULTURA DE CÉLULAS.....	34
4.9 DOSAGEM DE CITOCINAS.....	35
4.10 HISTOPATOLOGIA.....	36

<b>4.11 IMUNOHISTOQUÍMICA.....</b>	<b>37</b>
<b>4.12 QUANTIFICAÇÃO PARASITÁRIA.....</b>	<b>38</b>
<b>4.13 EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>5.1 Camundongos BALB/c IL-4 -/- desenvolvem lesões menores que IL-4 +/+ quando infectados por <math>10^3</math>, <math>10^4</math> e <math>5 \times 10^6</math> <i>L. amazonensis</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2 Quantificação parasitária no linfonodo de camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por <i>L. amazonensis</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3 Camundongos IL-4 -/- apresentam uma resposta Th1 aumentada.....</b>	<b>46</b>
<b>5.4 Produção de NO em camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por <i>L. amazonensis</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>5.5 Tratamento de camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- com indometacina.....</b>	<b>51</b>
<b>5.6 Análise histopatológica de camundongos BALB/c IL-4 -/- e IL-4 +/+ tratados ou não com indometacina.....</b>	<b>54</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

**Células NK:** células matadoras naturais (natural killer cells)

**Con A:** Concanavalina A

**COX-2:** ciclooxigenase-2

**ELISA:** ensaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay)

**HBSS:** solução salina balanceada de Hank (Hank's balanced salt solution)

**IFN- $\gamma$ :** interferon gama

**Ig:** imunoglobulina

**IL:** interleucina

**iNOS:** óxido nítrico induzível (inducible nitric oxide synthase)

**LIT:** infusão de fígado (liver infusion trypsin)

**LPS:** lipopolissacarídeo

**MHC:** complexo de histocompatibilidade principal (major histocompatibility complex)

**NO:** óxido nítrico (nitric oxide)

**PBS:** solução tampão fosfato (phosphate buffered saline)

**PGE<sub>2</sub>:** prostaglandina E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>)

**RNA:** ácido ribonucléico (ribonucleic acid)

**SBF:** soro bovino fetal

**TGF- $\beta$ :** fator de crescimento tumoral beta (tumor growth factor)

**Th:** linfócito T auxiliador (T helper)

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral alfa (tumor necrosis factor- $\alpha$ )



## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS:

Os protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos da leishmaniose, um grupo de doenças que acomete mais de 12 milhões de pessoas. Cerca de 350 milhões de indivíduos em 88 países de todo o mundo estão localizados em área de risco de adquirir a doença e estima-se o aparecimento de 1,5 a 2 milhões de novos casos ao ano, muitos dos quais não são registrados (WHO, 2000).

A leishmaniose está amplamente distribuída nos países tropicais e subtropicais, em áreas que abrangem desde as florestas úmidas das Américas Central e do Sul a áreas desérticas do oeste da Ásia, estando presente em áreas rurais e urbanas. O desenvolvimento econômico, mudanças ambientais e o fluxo migratório mundial são fatores que levam ao aumento da incidência desta doença (CUNNINGHAM, 2002).

A leishmaniose ocorre nas Américas desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile. A incidência da leishmaniose no Brasil tem aumentado nos últimos vinte anos em praticamente todos estados. Surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e na região Amazônica, relacionados ao processo predatório de colonização (MARZOCHI, 1992). Em 2002, foi registrado cerca de 30.087 novos casos de leishmaniose cutânea no país (MS-SVS, 2003).

O gênero *Leishmania* compreende espécies de protozoários unicelulares, digenéticos (heteroxenos), pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae (NEVES et al, 1997). Há aproximadamente 21 espécies de *Leishmania* que são transmitidas por cerca de 30 espécies de insetos vetores (CUNNINGHAM, 2002). As principais espécies são: *Leishmania donovani*, *L. infantum*, *L. major* e *Leishmania tropica* no Velho Mundo e *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi* no Novo Mundo. Estes parasitos são transmitidos na forma promastigota para o hospedeiro vertebrado pela picada do inseto flebotomíneo (KABUTUTU et al, 2003). Ao serem injetados no hospedeiro mamífero, os promastigotas são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear, onde se diferenciam e se replicam sob a forma amastigota, podendo causar uma doença assintomática ou uma grande variedade de quadros clínicos, tais como a leishmaniose cutânea, mucocutânea ou visceral (KABUTUTU et al, 2003).

Algumas lesões cutâneas podem curar espontaneamente ou evoluir para casos mais graves associados a outros sítios cutâneos ou mucocutâneos (HOWARD et al, 1980). A lesão primária ocorre no local da picada do inseto, com posterior formação de pápulas vermelhas que podem ulcerar ou não. Na leishmaniose mucocutânea, a infecção pode envolver também as mucosas nasais, da laringe, da faringe e da cavidade bucal (ROBERT S & JANOVY, 1995). A visceralização pode levar a uma infecção fatal se não for propriamente tratada, e é caracterizada pela hiperplasia e hipertrofia de células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente no baço, no fígado e na medula óssea, onde os parasitos se multiplicam rapidamente (CORBETT & LAURENTI, 1998).

Estudos têm demonstrado que a resposta imune do hospedeiro e a espécie de *Leishmania* infectante influenciam o curso da infecção, tanto em modelos experimentais como em seres humanos (UZONNA et al, 2001). A *Leishmania major* e a *Leishmania amazonensis*, por exemplo, multiplicam-se rapidamente em macrófagos humanos in vitro e infectam facilmente camundongos, enquanto que a *Leishmania braziliensis* é relativamente pouco patogênica em macrófagos cultivados e em camundongos (BARRAL et al, 1993). Outros fatores, tais como o estágio de desenvolvimento do parasito bem como suas condições de manutenção, a dose injetada do parasito, a rota da infecção e o “background” genético do camundongo também influenciam a manifestação da doença (KROPP et al, 2003).

A leishmaniose pode ser tratada com o uso local ou sistêmico de antimoniais pentavalentes e diaminas aromáticas. As formas mais utilizadas incluem os antimoniais sódio estiboclonato e o antimoniato meglumina. Contudo, estas drogas podem ter efeitos tóxicos graves. Pode haver também uma falha de cerca de 10 a 25% no tratamento, casos em que estas drogas podem ser substituídas pela anfotericina B e pentamidinas (CUNNINGHAM, 2002). Ainda há muita dificuldade no tratamento da leishmaniose pela complexidade da doença, dadas as inúmeras combinações de diferentes síndromes, espécies e áreas geográficas de aquisição da doença, cada combinação diversificando na apresentação clínica e na história natural da doença (HERWALDT, 1999). Além da complexidade da doença, deve-se avaliar a falta de quimioterápicos mais eficazes e com menor toxicidade do que os atualmente empregados.

## 1.2 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE

Um dos maiores avanços no entendimento do sistema imune foi a descoberta de que células T CD4<sup>+</sup> podem se diferenciar de um precursor comum em classes funcionalmente distintas. As distintas classes de células T podem mediar diferentes funções imunológicas efetoras na proteção e na patologia de muitas doenças infecciosas e autoimunes (O'GARRA, 1998).

O estudo da infecção de camundongos por *Leishmania spp.* tem contribuído para o entendimento de muitos dos eventos imunológicos que ocorre no hospedeiro em resposta ao protozoário parasito (JONES et al, 2002). O desenvolvimento diferencial de um padrão de resposta Th1 e Th2 em camundongos infectados por *L. major* constitui um excelente modelo para o estudo de fatores que regulam in vivo a polarização de células T CD4<sup>+</sup> (LI et al, 2002). Todavia, assim como outras infecções parasitárias, a leishmaniose é caracterizada pela cronicidade, um atributo que pode levar à despolarização desta resposta (WILSON et al, 2002). Avanços na área de experimentação, como o da tecnologia de transgênese em camundongos, têm contribuído para a identificação dos mecanismos que estão envolvidos na indução de imunidade em camundongos resistentes (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

Os eventos mediados por células T têm uma profunda influência sobre o resultado da leishmaniose. Contudo, esta resposta inicial de células T é subsequente à infecção de macrófagos por estes parasitos. A interação entre o parasito e o macrófago é importante na determinação do tipo de resposta imune que irá ser desenvolvida e influencia a ativação de macrófagos para eliminação

dos parasitos. Os macrófagos produzem um repertório amplo de citocinas que podem regular positiva ou negativamente estes eventos (NACY et al, 1991). A *Leishmania* também pode infectar células dendríticas e fibroblastos (RITTER & KORNER, 2002). As células dendríticas são críticas para a indução de uma resposta de células T parasito-específica, sobretudo nas fases iniciais da infecção. A atividade funcional das células dendríticas é regulada através da produção de citocinas (MOLL et al, 2002).

A infecção de macrófagos é dependente de uma série de mecanismos que possibilitam a sobrevivência da *Leishmania* no ambiente hostil das células fagocíticas (MATTE et al, 2001). A inibição da ativação de macrófagos infectados, da fusão do fagossoma com o endossoma, da apoptose, de enzimas hidrolíticas, da produção de óxido nítrico, de metabólitos oxidativos, a redução da expressão de moléculas de MHC II e a modulação da síntese de citocinas são mecanismos que facilitam a evasão deste parasito à resposta imune do hospedeiro. (CUNNINGHAM, 2002).

As primeiras demonstrações diretas da relevância da resposta Th1/Th2 na regulação da doença vieram a partir de estudos utilizando o modelo de infecção por *L. major* (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Neste sistema, algumas linhagens isogênicas de camundongos, como C3H e C57BL/6, são resistentes à infecção, e apresentam uma resposta dominante Th1, com lesões que se resolvem espontaneamente e uma imunidade à re-infecção (ASEFFA et al, 2002). Em oposição, camundongos BALB/c desenvolvem uma resposta imune Th2 e são incapazes de controlar a replicação parasitária (JONES et al, 2000).

### 1.2.1. Desenvolvimento de células Th1 e resistência:

A citocina IL-12 desempenha um papel central na geração da resposta imune tipo 1. A IL-12 é uma citocina heterodimérica produzida primariamente por células apresentadoras de antígeno. Ela é constituída por duas cadeias polipeptídicas, a p35 e a p40, ligadas covalentemente entre si e que em conjunto formam a molécula p70 biologicamente ativa. A sinalização via JAK/STAT induzida pela IL-12 desempenha um papel crítico no desenvolvimento de uma resposta imune efetiva específica à *L. major* (HEINZEL et al, 1993). Uma das suas principais propriedades é a capacidade de estimular a secreção de IFN- $\gamma$  por células T e por células NK (SEDER et al, 1993). A sinalização através da IL-12 e do seu receptor, o IL-12R, não apenas inicia o desenvolvimento de uma resposta Th1, mas também mantém esta resposta uma vez que ela foi estabelecida (PARK et al, 2002). Ambas as cadeias de IL-12R são expressas durante a ativação de células Th1, enquanto que células Th2 expressam apenas a cadeia IL-12R $\beta$ 1, mas não a cadeia IL-12R $\beta$ 2 do receptor (SZABO et al, 1995).

O IFN- $\gamma$  ativa macrófagos a destruir os parasitos intracelulares (NOBEN-TRAUTH et al, 2003), através da indução da expressão de óxido nítrico sintase. Esta enzima leva à produção de radicais reativos de nitrogênio, tóxicos ao parasito (PÉREZ-SANTOS & TALAMÁS-ROHANA, 2001). A neutralização de IFN- $\gamma$  in vitro inibe o desenvolvimento de células Th1 induzido pela IL-12 (WENNER et al, 1996). Camundongos geneticamente resistentes, quando são deficientes na produção de IFN- $\gamma$  ou no receptor de IFN- $\gamma$ , são incapazes de controlar a

replicação parasitária (WANG et al, 1994). Em adição, a neutralização utilizando anticorpos anti-IFN- $\gamma$  durante os primeiros dias de infecção por *L. major* levou à diferenciação de uma resposta tipo Th2 e à susceptibilidade (SCOTT et al, 1991).

A importância do NO na atividade leishmanicida exercida por macrófagos é evidenciada pelo aumento da carga parasitária após a inibição da sua síntese através do uso de antagonistas (EVANS et al, 1993). Linhagens de camundongos deficientes na expressão de iNOS desenvolvem uma doença progressiva quando infectados por *L. major* (WEI et al, 1995).

O TNF- $\alpha$  também está envolvido nos processos de destruição do parasito, através de um mecanismo que leva à produção de NO (BOGDAN et al, 1990). Camundongos resistentes à infecção por *L. major* apresentam quantidades significantes de TNF- $\alpha$  nos linfonodos, enquanto que esta citocina é indetectável em camundongos susceptíveis (THEODOS et al, 1991).

Recentes estudos têm demonstrado que uma subpopulação de células T CD4<sup>+</sup>, as células T regulatórias CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, além de suprimir outras populações de células T, também regula a resposta imune contra agentes infecciosos. A produção inicial de IL-4 em resposta à infecção por *L. major* é aumentada e há um conseqüente aumento da carga parasitária em camundongos BALB/c depletados de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (ASEFFA et al, 2002). No entanto, BELKAID e colaboradores (2002) demonstraram que camundongos C57BL/6 tratados por células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> purificadas de lesões crônicas são altamente susceptíveis à infecção por *L. major*. A IL-10 produzida por estas células regulatórias contribui diretamente na persistência do parasito nas lesões.

Camundongos BALB/c susceptíveis também podem desenvolver resistência à infecção por *L. major* quando infectados por inóculos com um número pequeno de parasitos (DOHERTY & COFFMAN, 1996; BRETSCHER et al, 1992). Camundongos BALB/c quando infectados com 1000 promastigotas desenvolvem uma resposta Th1 estável e resistem a um desafio subsequente, enquanto que a infecção com números maiores de promastigotas resulta em uma polarização para uma resposta Th2 e em susceptibilidade (BRETSCHER et al, 1992). Esta resistência é associada a um estado de memória que gera uma resposta Th1 ativa durante um desafio posterior. No entanto, camundongos C57BL/6 infectados por 100 promastigotas de *L. major* desenvolvem uma fase “silenciosa” de proliferação de parasitos que dura cerca de 4 a 5 semanas. Durante esta fase, apesar de não haver formação de lesão, há uma resposta Th2 transitória, com aumento da carga parasitária e dos níveis de IL-4. Após este período, há o desenvolvimento de uma lesão cutânea que coincide com a morte do parasita e posterior resolução da infecção (BELKAID et al, 2000). Esta resposta Th2 transitória é inibida principalmente pela produção de IFN- $\gamma$  por células T CD8<sup>+</sup> (UZONNA et al, 2004).

### 1.2.2. Desenvolvimento de células Th2 e susceptibilidade:

A susceptibilidade de camundongos BALB/c após a infecção por *L. major* tem sido associada à expansão de células Th2, as quais produzem IL-4 (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; REINER & LOCKSLEY, 1995). Como resultado, há uma doença progressiva, acompanhada pela proliferação não controlada do parasito,



um aumento de resposta Th2 e eventual morte dos animais (NOBEN-TRAUTH et al, 1996 e NOBEN-TRAUTH et al, 1999).

A produção de IL-4 durante a fase inicial da infecção de camundongos BALB/c é necessária e suficiente para instruir o desenvolvimento de células Th2, resultando no progresso da doença (HIMMELRICH et al, 2000). Há uma supressão do desenvolvimento de células Th1 pela inibição da síntese de IFN- $\gamma$ , o qual é necessário para ativar os macrófagos a destruir os parasitos (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Esta resposta inicial da IL-4 parece estar confinada a uma população oligoclonal de células T CD4<sup>+</sup>, com o receptor de células T V $\beta$ 4V $\alpha$ 8 que reconhece o antígeno de leishmania LACK e expressam mRNA para IL-4 de 12 a 14 horas após a infecção (LAUNOIS et al, 1997).

Apesar do papel da IL-4 em induzir a susceptibilidade à infecção, estudos têm demonstrado resultados contraditórios sobre a importância desta citocina na progressão da doença. A neutralização específica utilizando anticorpos anti-IL-4 no tempo do desafio resultou na cura de camundongos BALB/c, com o estabelecimento de uma resposta imune protetora (SADICK et al, 1990). Já o tratamento com o anti-IL-4, após duas semanas de infecção, foi eficaz apenas quando o inóculo inicial utilizado foi baixo (UZONNA & BRETSCHER, 2001). NOBEN-TRAUTH e colaboradores (1996) demonstraram que camundongos BALB/c deficientes na produção de IL-4 permanecem susceptíveis durante a infecção por *L. major*, enquanto KOPF e colaboradores (1996) obtiveram resultados opostos. A infecção de camundongos deficientes em IL-4R $\alpha$  revelou que a habilidade de *L. major* em escapar da defesa imune depende do isolado de

*L. major* (NOBEN-TRAUTH, 2000). A infecção pelo isolado de *L. major* IR173 foi controlada apenas parcialmente em camundongos BALB/c deficientes em IL-4 e totalmente em camundongos BALB/c deficientes em IL-4R $\alpha$ . Ambas as linhagens de camundongos BALB/c deficientes em IL-4 e em IL-4R $\alpha$  demonstraram susceptibilidade quando infectadas com outro isolado de *L. major*, o LV39 (NOBEN-TRAUTH et al, 1999). Em experimentos utilizando os isolados de *L. major* Seidman e FEBNI, camundongos BALB/c deficientes em IL-4 foram incapazes de controlar a replicação parasitária (KROPF et al, 2003). Adicionalmente, a administração exógena de IL-4 não foi suficiente para induzir uma doença progressiva em camundongos resistentes C57BL/6 infectados por *L. major* (SADICK et al, 1991). Estes dados sugerem que a IL-4 é necessária, porém não é o único fator que inibe a resposta Th1 levando à susceptibilidade à infecção (GORELIK et al, 2002).

### 1.2.3 Outros fatores associados à susceptibilidade

Outras citocinas podem inibir o desenvolvimento de células Th1, tais como a IL-13, IL-10 e o TGF- $\beta$  (LETTERIO & ROBERTS, 1998). Estudos de mapeamento genético têm identificado a região cromossômica associada à susceptibilidade em camundongos, região esta que contém o gene da IL-13 (ROBERTS et al, 1993). A IL-13 é uma citocina com propriedades semelhantes às da IL-4, que utiliza para a sua sinalização, além do seu receptor IL-13R $\alpha$ 1, a cadeia IL-4R $\alpha$ . Assim, em camundongos deficientes em IL-4R $\alpha$ , a IL-4 e a IL-13 não induzem sinalização

intracelular, enquanto que camundongos deficientes em IL-4 mantêm a função da IL-13. Como a ausência genética apenas da IL-4 não converte camundongos BALB/c ao fenótipo de resistência, os resultados obtidos com camundongos BALB/c deficientes em IL-4R $\alpha$ , os quais apresentavam um perfil de resistência, indicam um papel da IL-13 em promover a susceptibilidade na infecção por *L. major* (NOBEN-TRAUTH et al, 1999; MOHRS et al, 1999). Estudos utilizando camundongos transgênicos para IL-13 ou deficientes na produção desta citocina confirmaram que IL-13 é um fator de susceptibilidade durante a infecção por *L. major* (MATTHEWS et al, 2000).

Uma citocina adicional que pode suprimir a resposta Th1 e a ativação de macrófagos é a IL-10 (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). A IL-10 é uma potente citocina antiinflamatória e imunossupressora secretada por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, monócitos, células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e células B (MOORE et al, 1993). A IL-10 suprime a síntese de IFN- $\gamma$  e reduz a produção de NO, além de diminuir a expressão de moléculas de MHC classe I e MHC classe II e de moléculas co-estimulatórias em macrófagos, tais como as moléculas B7. A IL-10 era considerada inicialmente pouco importante na infecção por *L. major*, pois o tratamento de camundongos BALB/c com o anticorpo monoclonal anti-IL-10 não alterou significativamente a progressão da doença (CHATELAIN et al, 1999). Porém, vários estudos têm evidenciado que a IL-10 diminui a atividade leishmanicida in vitro de macrófagos humanos e murinos devido à inibição da síntese de óxido nítrico (VIETH et al, 1994; VOULDOUKIS et al, 1997). No homem, a gravidade da leishmaniose visceral tem sido associada ao aumento dos

níveis de IL-10 (KAYE et al, 1991). A produção de IL-10 também está associada com a progressão da lesão em pacientes com leishmaniose cutânea (LOUIZIR et al, 1998). Camundongos BALB/c deficientes em IL-10 são mais resistentes à infecção por *L. major* do que camundongos BALB/c selvagens, porém não são capazes de curar a lesão (KANE & MOSSER, 2001). NOBEN-TRAUTH e colaboradores (2003) sugerem que a sinalização de IL-4R e IL-10 contribui para a susceptibilidade, porém a IL-10 exerce um efeito maior no controle da infecção por *L. major*.

O TGF- $\beta$  é uma citocina pleiotrópica que exerce múltiplas funções regulatórias no sistema imune (LETTERIO & ROBERTS, 1998). O TGF- $\beta$  inibe a diferenciação de células T virgens em células T efetoras, além de inativar processos fisiológicos de macrófagos, influenciando a habilidade destas células em controlar parasitos intracelulares, como a *Leishmania* e o *T. cruzi* (SAD & MOSMANN, 1994; NELSON et al, 1991). Há um aumento da produção de IFN- $\gamma$  em células do linfonodo de camundongos BALB/c infectadas por *L. major*, após o tratamento com anti-TGF- $\beta$  (SCHARTON-KERSTEN et al, 1995). Alguns autores sugerem que o TGF- $\beta$  é também produzido por uma classe Th3 de linfócitos T, na presença ou não de IL-10 e sem a participação de IL-4, células estas com propriedades regulatórias e imunossupressoras (GROUX et al, 1997; STROBER et al, 1997). Altos níveis de TGF- $\beta$  foram encontrados em hamsters ou camundongos infectados por *L. chagasi* e *L. donovani*, respectivamente (RODRIGUES et al, 1998; MELBY et al, 2001). A infecção murina por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*

é exacerbada pela administração exógena de TGF- $\beta$  (BARRAL-NETTO et al, 1992; BARRAL et al, 1993).

#### 1.2.4 O papel da prostaglandina E<sub>2</sub>

A prostaglandina E<sub>2</sub> também pode afetar a gravidade da infecção por favorecer uma resposta Th2 exacerbada (WILBORN et al, 1995). Apesar da produção de IL-4 nos primeiros estágios de infecção por *L. major* aparecer como o fator central da regulação da baixa expressão de IL-12R $\beta$ 2 por células T CD4<sup>+</sup>, a PGE<sub>2</sub> pode também desempenhar um importante papel neste processo (LI et al, 2002).

As prostaglandinas são derivados do ácido araquidônico e estão entre os mediadores produzidos por macrófagos mais bem estudados (WILBORN et al, 1995). Este mediador lipídico é liberado da membrana celular, principalmente através da ação da fosfolipase A2. As prostaglandinas têm papel central em diversos processos patológicos e fisiológicos. A conversão a PGE<sub>2</sub> é catalizada pela enzima ciclooxigenase (COX), a qual existe como três isoformas. A COX-1 é expressa constitutivamente e é responsável pela produção de prostaglandinas nas funções fisiológicas na qual está envolvida. A descoberta da segunda isoenzima induzível, a COX-2, que é expressa apenas durante a inflamação pela estimulação de citocinas e produtos bacterianos, levou ao desenvolvimento de inibidores seletivos que poderiam ter eficácia clínica similar e poucos efeitos adversos (MAZARIO et al, 2001; WARNER & MITCHELL, 2004). Uma terceira enzima, a COX-3, foi descrita recentemente e é expressa em altos níveis no cérebro e no

coração. A COX-3 é responsável pela sensação de dor e febre (BOTTING et al, 2000).

A administração exógena de PGE<sub>2</sub> causa principalmente a inibição da ativação de macrófagos e da formação de radicais de oxigênio e nitrogênio, bem como da resposta celular a vários mediadores pró-inflamatórios e fatores de crescimento, resultando em uma diminuição da função imune e da fibrogênese (BELLEY et al, 1995).

Na leishmaniose, o pico de produção de PGE<sub>2</sub> ocorre durante as primeiras semanas de infecção. O aumento da produção de prostaglandinas é detectado com apenas uma semana de infecção em camundongos susceptíveis BALB/c infectados por *L. mexicana*, enquanto que em camundongos resistentes C57BL/6 este aumento não é detectado (PÉREZ-SANTOS & TALMÁS-ROHANA, 2001). A produção de PGE<sub>2</sub> é elevada durante a infecção de camundongos BALB/c por *L. major* (FARREL et al, 1987) e em macrófagos infectados in vitro por *L. donovani* (MATTE et al, 2001).

O tratamento de camundongos infectados por *Leishmania* com um potente inibidor da ciclooxigenase, a indometacina, diminui significativamente a gravidade da doença. Esta droga direciona a resposta imune a um perfil Th1 e causa um aumento dos níveis de IL-12, IFN- $\gamma$ , NO e de moléculas co-estimulatórias nestes camundongos, apesar de não induzir a cura (SAHA et al, 1995; FREITAS et al, 1999; FARREL et al, 1987). A adição de indometacina na cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados não altera a produção de IL-4 e de IL-10 (PÉREZ-SANTOS & TALMÁS-ROHANA, 2001). O tratamento combinado

utilizando a indometacina e a IL-12 controla a infecção de camundongos BALB/c por *L. major*, enquanto que o tratamento apenas com a droga ou apenas com a IL-12 não é eficaz no controle da doença (LI et al, 2002).

### 1.3 A INFECÇÃO POR *Leishmania amazonensis*

A regulação da resposta imune do hospedeiro é bem definida durante a infecção cutânea por *L. major* em linhagens de camundongos isogênicas que são geneticamente susceptíveis ou resistentes a este parasito (JI et al, 2002). Contudo, poucos estudos foram realizados para investigar a resposta imune do hospedeiro durante a infecção pelas espécies de *Leishmania* que causam doença no Novo Mundo, como a *L. amazonensis* (SOUZA et al, 2000).

A *Leishmania amazonensis* é um membro do complexo *Leishmania mexicana*. Em países da América do Sul, este parasito causa um amplo espectro de manifestações clínicas que variam desde lesões cutâneas simples a múltiplos nódulos desfigurantes ou mesmo complicações viscerais (JI et al, 2002). Esta espécie de parasito é descrita como o único agente etiológico da leishmaniose cutâneo difusa no Brasil, uma condição que está associada a uma pobre resposta imune mediada por células nos estágios iniciais da infecção (JI et al, 2002).

A infecção experimental murina por *L. amazonensis* causa um diferente padrão de susceptibilidade na leishmaniose (JONES et al, 2002). Este parasito causa uma infecção que não cura em linhagens de camundongos que são resistentes a *L. major*, tais como a C3H, C57BL/10, C57BL/6 (AFONSO & SCOTT, 1993; JONES et al, 2000). Apesar destes camundongos apresentarem um

fenótipo susceptível, a resposta imune não é completamente definida como uma resposta Th2 (JONES et al, 2000). Em camundongos C57BL/10, a produção de IL-4 é restrita apenas às primeiras semanas de infecção e, posteriormente, quando as lesões são evidentes, nenhuma IL-4 é detectada. Além disso, a neutralização de IL-4 endógena pelo anticorpo monoclonal 11B11, apesar de reduzir a lesão, não promove a cura da infecção, sugerindo que o fenótipo susceptível não é devido apenas a uma resposta Th2 induzida pela IL-4 (AFONSO & SCOTT, 1993).

JONES e colaboradores (2000) demonstraram que camundongos C57BL/6 deficientes em IL-4 não curam a infecção quando infectados com um número elevado de parasitos de *L. amazonensis*. Foi detectada uma expressão reduzida da subunidade  $\beta 2$  do receptor de IL-12, sugerindo que a susceptibilidade é devida à ausência funcional do IL-12R na população de células T CD4<sup>+</sup> e que esta resposta é independente da ação da IL-4. Em oposição a este estudo, SOUZA e colaboradores (2000) demonstraram que camundongos CBA, resistentes à infecção por *L. major*, apresentam um fenótipo de susceptibilidade, com altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- $\gamma$  em todo o curso da infecção por *L. amazonensis*. Durante a infecção de macrófagos J774-G8 ativados por LPS, a *L. amazonensis* suprime a expressão de iNOS e conseqüentemente a síntese de NO (BALESTIERE et al, 2002).

Alguns estudos indicam ainda que há um balanço na expansão de células Th1 e Th2 no curso da infecção por *L. amazonensis*. Com duas semanas de infecção, células T CD4<sup>+</sup> do linfonodo de camundongos BALB/c, além de produzirem IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , produzem também IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (JI et al,



2002). O desenvolvimento da lesão e a carga parasitária são exacerbadas na presença de células T CD4<sup>+</sup>, demonstrando que estas células contribuem significativamente para a imunopatologia da doença crônica (SOONG et al, 1997). As células T CD8<sup>+</sup> estão envolvidas na resposta imune protetora contra a infecção por *L. amazonensis*, através de mecanismos mediados pela produção de IFN- $\gamma$  e pela secreção de perforina, com potencial citolítico no local da infecção (COLMENARES et al, 2003).

Macrófagos peritoniais produzem TGF- $\beta$  ativo após 72 horas de infecção por *L. amazonensis*. Há também um aumento da produção de TGF- $\beta$  nos tecidos da pata de camundongos infectados por este parasito, bem como um aumento progressivo da lesão em camundongos C57BL/6 infectados e administrados exogenamente pelo recombinante de TGF- $\beta$  (BARRAL-NETTO et al, 1992). Camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e tratados com anti-TGF- $\beta$  expressam mais mRNA para IFN- $\gamma$  do que os controles não tratados, apesar de não curarem completamente a infecção (BARRAL-NETTO et al, 1992). A infecção progride de maneira similar em camundongos C57BL/6 IL-10 -/- (JONES et al, 2002) e em BALB/c IL-10 -/- (PADIGEL et al, 2003) quando comparados com camundongos selvagens, durante a infecção por  $5 \times 10^6$  e  $10^6$  *L. amazonensis*, respectivamente. Apesar de não haver diferença no curso da infecção, estes camundongos apresentam uma resposta Th1 exacerbada (PADIGEL et al, 2003; JONES et al, 2002).

## 2. JUSTIFICATIVA

---

As leishmanioses representam um sério problema de saúde pública em vários países subtropicais e tropicais, incluindo o Brasil. Cerca de 12 milhões de pessoas sofrem desta doença, com aproximadamente 2 milhões de indivíduos infectados anualmente (WHO, 2000).

O uso de infecções parasitárias experimentais para o estudo da doença tem facilitado não apenas a compreensão de como os processos imunes são induzidos e regulados *in vivo*, mas também os mecanismos que os parasitos possuem para escapar da vigilância imune (NOBEN-TRAUTH, 2000). A infecção experimental de camundongos por *L. major* é um dos modelos mais bem caracterizados para o estudo da resposta imune associada à diferenciação de linfócitos T (SCOTT et al, 1996). Muitos trabalhos evidenciaram o papel do IFN- $\gamma$  em promover resistência à infecção polarizando para uma resposta do tipo 1, enquanto que a citocina IL-4 leva a uma resposta do tipo 2 e é o principal fator em direção à susceptibilidade e progresso da doença. Porém, recentes estudos demonstraram muitas contradições sobre o papel do IL-4 em exacerbar a infecção. A depender do isolado de *L. major*, camundongos BALB/c deficientes em IL-4 e no seu receptor permanecem susceptíveis à infecção. BIEDERMANN e colaboradores (2001) demonstraram que a IL-4 pode induzir resistência em camundongos susceptíveis BALB/c infectados por *L. major*. Os autores observaram que, quando presente na fase inicial da ativação das células apresentadoras de antígeno, que precede a estimulação de células T, a IL-4 instrui células dendríticas a produzir IL-12 induzindo a maturação de células Th1 e a resistência. Porém, quando presente no

período da ativação das células T, a IL-4 inibe a cadeia  $\beta 2$  do receptor de IL-12, levando a uma resposta Th2 e à susceptibilidade. Em camundongos C57BL/6 deficientes em IL-12 infectados por *L. chagasi*, os níveis de IL-4 são baixos em todo o curso da doença (WILSON et al, 2002). Portanto, a depender da espécie do parasito, do inóculo utilizado e da linhagem de camundongo estudada, há uma resposta diferenciada em direção à susceptibilidade. Outros fatores que agem em conjunto ou de forma independente da IL-4 podem levar à susceptibilidade, como a IL-10, IL-13, TGF- $\beta$  e a PGE<sub>2</sub>.

Apesar da *L. amazonensis* ser responsável por uma ampla variedade de manifestações clínicas nos países sul-americanos, poucos estudos têm investigado a resposta do hospedeiro durante a infecção por este parasito (SOUZA et al, 2000). Portanto, o estudo de mediadores solúveis inibitórios como a IL-4 e a PGE<sub>2</sub> e as suas associações nos mecanismos os quais poderiam suprimir a eliminação dos parasitos durante a infecção de camundongos por *L. amazonensis*, é de grande relevância para o entendimento da patogênese da doença. As correlações entre aspectos histopatológicos e avaliações imunológicas deste modelo murino permitirão compreender alguns dos mecanismos envolvidos nos perfis de susceptibilidade durante à infecção. O entendimento dos eventos associados à polarização de células T é crítico para o desenvolvimento racional de vacinas e estratégias imunoterapêuticas para o controle da doença.

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. OBJETIVO GERAL:

Investigar o papel dos mediadores solúveis IL-4 e PGE<sub>2</sub> nos mecanismos que suprimem a eliminação dos parasitos durante a infecção experimental de camundongos BALB/c IL-4<sup>+/+</sup> e IL-4<sup>-/-</sup> por *L. amazonensis*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar, comparativamente, a progressão da infecção nas linhagens BALB/c IL-4<sup>+/+</sup> e IL-4<sup>-/-</sup>, com ou sem tratamento por indometacina, infectados com diferentes inóculos de *L. amazonensis*;
- Comparar o perfil de produção de IFN- $\gamma$  por células de linfonodo e anticorpos parasito-específicos no soro destes animais;
- Comparar o perfil de produção de NO nos grupos de estudo;
- Quantificar a carga parasitária nos linfonodos;
- Detectar a presença de parasitos no local da infecção;
- Comparar os aspectos morfológicos das lesões dos vários grupos de camundongos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados neste estudo camundongos das linhagens BALB/c IL-4 -/- e IL-4 +/+, fêmeas, com a idade entre 8 a 12 semanas. Os camundongos foram produzidos e mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ/BA, com fornecimento de água e ração comercial balanceada ad libitum até o dia do sacrifício. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz-BA.

### 4.2 PARASITOS E ANTÍGENO

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR88/BA-125 Leila strain) foram cultivadas em meio LIT contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab), 5% de urina humana estéril, 50 µg/ml de gentamicina (Hipolabor) e incubados a 26° C. Ao atingirem a fase estacionária de crescimento, novas passagens in vitro dos parasitos foram realizadas. Foram utilizados na infecção apenas parasitos provenientes de culturas recém-isoladas (até P3). A infectividade dos parasitos foi mantida através de passagens em camundongos. Para a preparação de antígeno solúvel, as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram lavadas três vezes em PBS a 3000 rpm por 10 minutos. O pellet contendo o extrato do parasito foi resuspendido em 1 ml de água estéril, e 3 a 4 sessões de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37° C foram realizadas. Foi acrescentado PBS 10x na proporção 1/10 do volume final. O antígeno foi

congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A dosagem de proteínas por fluorescência (GERASIMOVA et al, 1992) foi realizada no FluorosKan II (Labsystems, Minnesota, EUA), 24 horas após o congelamento.

### **4.3 INFECÇÃO POR *L. AMAZONENSIS***

Camundongos BALB/c IL-4  $+/+$  e IL-4  $-/-$  foram inoculados no coxim plantar da pata direita com  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  ou  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. amazonensis*. Foram utilizados diferentes inóculos para verificar a influência do inóculo inicial no curso da infecção em camundongos IL-4  $-/-$ . A medida da espessura das patas foi realizada semanalmente utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo, Japão). O tamanho da lesão foi determinado pela diferença da espessura da pata direita infectada e a pata esquerda não infectada. Os animais infectados por  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis* foram sacrificados após duas e cinco semanas de infecção. Os demais grupos foram sacrificados após um período de cinco a sete semanas de infecção, devido à ulceração e necrose das lesões.

### **4.4 TRATAMENTO COM INDOMETACINA**

Camundongos BALB/c IL-4  $-/-$  e IL-4  $+/+$  infectados por  $10^4$  *L. amazonensis* foram tratados com indometacina (Sigma, St. Louis, EUA). A droga foi dissolvida em etanol a 10 mg/ml e posteriormente diluída em salina a uma concentração final de 20  $\mu\text{g/ml}$ . Para os controles, foram utilizados apenas o etanol diluído em salina na mesma concentração da droga (veículo). O tratamento foi realizado durante as três primeiras semanas de infecção, diariamente, por via intraperitoneal. Foi

realizado também um tratamento prolongado (por sete semanas) para verificar o efeito desta droga por um período maior de infecção. Neste último experimento, a indometacina foi administrada por via oral em camundongos BALB/c IL-4  $-/-$ , a uma concentração de 20  $\mu\text{g/ml}$  diluída em 0,4% de etanol. Os camundongos controles receberam apenas 0,4% de etanol na água (veículo).

#### **4.5 COLETA DE SANGUE**

Os animais foram anestesiados com solução de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (90 mg/kg) para obtenção de sangue na região axilar após secção do plexo braquial. O sangue acumulado foi aspirado utilizando-se uma pipeta Pasteur. Após este procedimento, os animais foram imediatamente sacrificados em câmara de  $\text{CO}_2$  para remoção de órgãos e tecidos.

#### **4.6 SOROLOGIA**

Os níveis de anticorpos leishmania-específicos IgG1 e IgG2a foram determinados pela técnica de ELISA. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50  $\mu\text{l}$  de antígeno solúvel de leishmania diluído em tampão carbonato na concentração de 3  $\mu\text{g/ml}$  e incubados por 16 horas a 4°C. Após a sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com PBS/tween 20 a 0,05% e bloqueadas com 100  $\mu\text{l}$  de PBS + 5% leite desnatado por 2 horas. Após este período, os soros diluídos 1:50 e 1:500 foram plaqueados e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com PBS/tween 0,05%. A ligação de anticorpos IgG1 e IgG2a foi detectada através da adição de 50  $\mu\text{l/poço}$

dos anticorpos anti-IgG1 ou anti-IgG2a biotinizados (Pharmingen, Minneapolis, EUA) diluídos 1:500 durante 45 minutos. As placas foram lavadas por cinco vezes com PBS/tween 0,05% e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente com avidina-peroxidase diluída 1:1000. As placas foram novamente lavadas por oito vezes com PBS/tween 0,05%. A revelação foi realizada adicionando o substrato TMB (3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidine; Sigma) dissolvido em 10 ml do tampão citrato-fosfato 0,05 M e 2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e interrompida com ácido fosfórico a 0,05 M. A leitura da reação foi determinada utilizando o espectrofotômetro (Spectramax 190 – Molecular Devices, Califórnia, EUA), com filtro de 450 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1.

#### **4.7 DOSAGEM DE NO**

A dosagem de NO foi realizada no soro dos animais. As amostras foram desproteinizadas (GREEN et al, 1982) e a produção de NO foi determinada através de seus produtos oxidativos, o nitrito e nitrato, pelo método de Griess (DING et al, 1988). O nitrato foi oxidado a nitrito através da adição de 100  $\mu$ l de vanádio (MERK, Damstadt, Alemanha) nas amostras. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Spectramax), com filtro de 570 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1. Os resultados foram expressos em  $\mu$ M de nitrito, tendo por base uma curva padrão de nitrito de sódio com concentração inicial de 400  $\mu$ M.

#### **4.8 CULTURA DE CÉLULAS**



Durante o sacrifício dos diferentes grupos experimentais, o linfonodo poplíteo regional foi retirado para preparo de suspensão celular. Após lavagem em meio HBSS (Sigma), os linfonodos foram macerados e as suas células foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada. O pellet contendo as células foi resuspendido em 1 ml de meio RPMI suplementado com 7.5% de bicarbonato de sódio, hepes a 1M, piruvato a 100 Mm, L-glutamina a 200 mM, 50  $\mu$ M  $\beta$ -2-mercaptoetanol, 10% de SBF e 50  $\mu$ g/ml de gentamicina para determinação da concentração de células através da contagem em câmara de Neubauer. Foram plaqueadas  $5 \times 10^6$  células/poço em placas de 24 poços, em um volume final de 1 ml/ poço de meio RPMI (Sigma) contendo 10% SBF. Alguns poços foram estimulados com 1  $\mu$ g/ml de concanavalina A (Sigma) ou com 100  $\mu$ g/ml de antígeno de *L. amazonensis*. As células foram cultivadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37° C. Após 48 horas de cultura, os sobrenadantes foram coletados e mantidos a -20° C para posterior dosagem de citocinas.

#### **4.9 DOSAGEM DE CITOCINAS**

A dosagem de IFN- $\gamma$  foi realizada a partir do sobrenadante das culturas de células do linfonodo, pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando o protocolo, anticorpos e citocina recombinante do kit Duoset ELISA Developmet System (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Placas de ELISA (NUNC – IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) foram sensibilizadas com 50  $\mu$ l/ poço do anticorpo de captura, na concentração de 2  $\mu$ g/ml, diluído em PBS e incubadas por 16 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com PBS a 0,05% de

tween e bloqueadas com 100 µl/poço de PBS contendo 0,05% de nitrito de sódio, 1% de BSA e 5% de sacarose por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 50 µl/poço das amostras, do branco e da curva padrão de IFN- $\gamma$  diluídos no tampão Tris-salina (20 mM trizma base e 150 mM de NaCl) contendo 0,1% de BSA e 0,05% de tween 20, durante 2 horas, à temperatura ambiente. O padrão foi diluído seriadamente (1:2), a partir da concentração inicial de 2000 pg/ml, com onze diluições em duplicata. A placa foi lavada três vezes com PBS/tween 0,05% e incubada com 50 µl do anticorpo de detecção (biotinilado) na concentração de 400 ng/ml por um período de de 2 horas. A placa foi lavada três vezes com PBS/tween 0,05% e incubada durante 20 minutos com avidina-peroxidase diluída 1:200. A revelação foi realizada adicionando o substrato TMB dissolvido em 10 ml do tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0 e 2 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e interrompida com ácido fosfórico a 0,05 M. A leitura da reação foi determinada utilizando o espectrofotômetro (Spectramax), com filtro de 450 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1.

#### **4.10 HISTOPATOLOGIA**

As patas infectadas dos camundongos foram retiradas após o sacrifício destes animais, fixadas em formalina a 10% por 48 horas e posteriormente descalcificadas em solução contendo ácido nítrico a 7% durante 3 dias. Para a retirada do excesso de ácido, as patas foram lavadas durante 5 dias com água destilada e em seguida foram então encaminhadas para processamento histopatológico. Os fragmentos do tecido da pata foram incluídos em parafina e

secções com 5-7  $\mu\text{m}$  do corte foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina para análise. Alternativamente, secções não coradas foram submetidas à marcação com anticorpo anti-leishmania.

#### 4.11 IMUNOISTOQUÍMICA

A técnica de imunistoquímica foi realizada para a confirmação da presença de parasitos nas lesões. Lâminas tratadas com poli-L-lisina contendo secções do tecido da pata infectada em parafina foram processadas para desparafinização do tecido. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado utilizando metanol + 3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 20 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas três vezes em água destilada por cinco minutos e duas vezes com PBS. As reações inespecíficas foram bloqueadas com PBS + 5% de BSA durante 20 minutos. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-*L. braziliensis* (policlonal de coelho IgG, produzido no laboratório LPBI/Fiocruz/BA), diluído 1/1000 em PBS + 1% BSA, por 16 horas, a 4°C. Após este período de incubação, as lâminas foram mantidas por 30 min à temperatura ambiente e foram lavadas três vezes com PBS. Em seguida, o anticorpo secundário produzido em cabra anti-IgG de coelho conjugado à biotina (American Qualex, San Clemente, E.U.A) foi adicionado, diluído a 1/200 em PBS + 1% de BSA + 5% de soro normal de camundongo por 45 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados por duas vezes em PBS por 5 minutos e incubados com streptavidina-peroxidase, diluída 1/500 em PBS durante 30 minutos. Em seguida, os cortes foram novamente lavados duas vezes com PBS por 5 minutos e revelados com o

substrato DAB (diaminometilbenzidina, Sigma). A reação foi interrompida com água corrente. O tecido foi então contracorado utilizando a hematoxilina de Harris e montado com bálsamo do Canadá. As lâminas foram observadas em microscópio óptico para avaliação da marcação dos parasitos.

#### 4.12 QUANTIFICAÇÃO PARASITÁRIA

A quantificação parasitária foi realizada a partir de células do linfonodo utilizando um método de diluição limitante. O linfonodo poplíteo regional inteiro foi macerado em uma placa de Petri contendo HBSS. As células foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada. O pellet contendo as células foi ressuspendido em 1 ml de meio LIT completo para determinação da concentração de células através da contagem em câmara de Neubauer. Foram plaqueadas  $2 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços contendo um volume final de 100  $\mu$ l de meio LIT completo. A partir desta concentração inicial de células, foram realizadas diluições sucessivas (1:10). As placas foram então incubadas a 26° C. A presença de parasitas foi monitorada a partir do quinto dia de cultura pela observação ao microscópio óptico da presença ou não de formas promastigotas nos poços. A carga parasitária foi determinada pela média geométrica das recíprocas dos títulos correspondentes aos poços contendo maior diluição que se apresentaram positivos, utilizando-se a fórmula:

$$\sqrt[n]{p_{1\dots n}}$$

Onde: n = Número de animais

p = recíproca dos títulos no qual foi encontrado o último poço positivo

#### **4.13 EXPRESSÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS**

Os valores numéricos apresentados nos gráficos correspondem às médias  $\pm$  SE ou  $\pm$  SD de mensurações efetuadas nos diferentes grupos de animais, conforme indicado nas figuras. Nos gráficos correspondentes a parasitismo, esses resultados são expressos em  $\log(10)$  das médias geométricas das diluições máximas em que poços positivos foram encontrados. A significância das diferenças entre os grupos foi examinada utilizando teste  $t$  de Student para amostras independentes ou análise de variância (quadro de comparações envolvia mais que dois grupos). O limite crítico de significância foi estabelecido para  $P \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1. Camundongos BALB/c IL-4 -/- desenvolvem lesões menores que IL-4 +/+ quando infectados por $10^5$ , $10^4$ e $10^3$ *L. amazonensis*.

Para determinar se a IL-4 desempenha um papel na susceptibilidade durante a infecção por *L. amazonensis*, camundongos BALB/c IL-4 -/- foram infectados na pata direita com diferentes inóculos de *L. amazonensis* e o curso da infecção foi comparado com o de camundongos selvagens da mesma linhagem. Como pode ser visto na figura 1, a doença progride de forma similar em camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- quando infectados por  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. amazonensis*, tendo ambos os grupos apresentado lesões progressivas e semelhantes. No entanto, quando utilizamos inóculos mais baixos, como  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*, camundongos IL-4 -/- desenvolvem lesões menores que IL-4 +/+, apesar de não curarem a infecção. Este resultado indica que a IL-4 participa da susceptibilidade de camundongos BALB/c por *L. amazonensis* e que o tamanho do inóculo influencia o curso da infecção por este parasito.

FIGURA 1

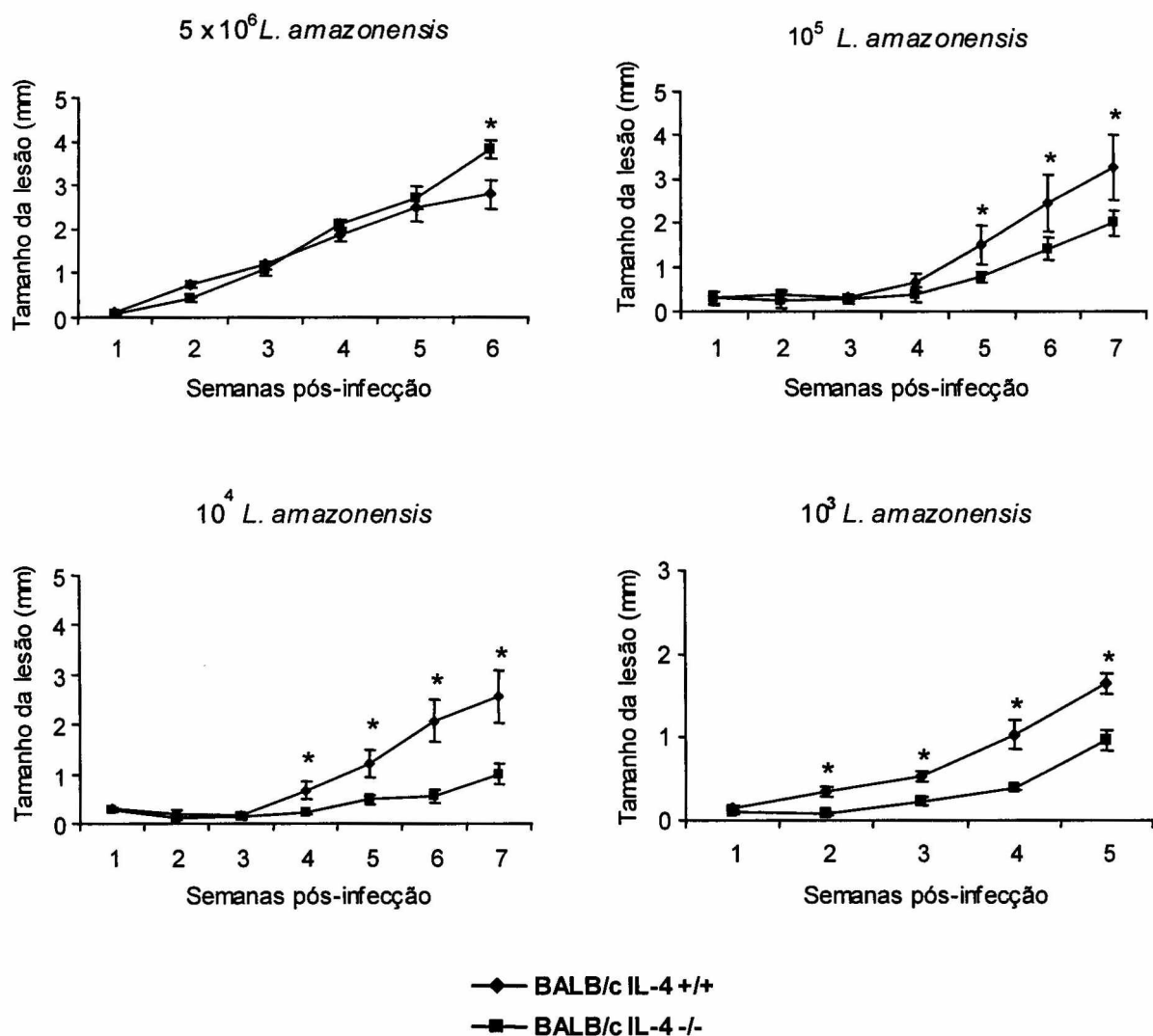


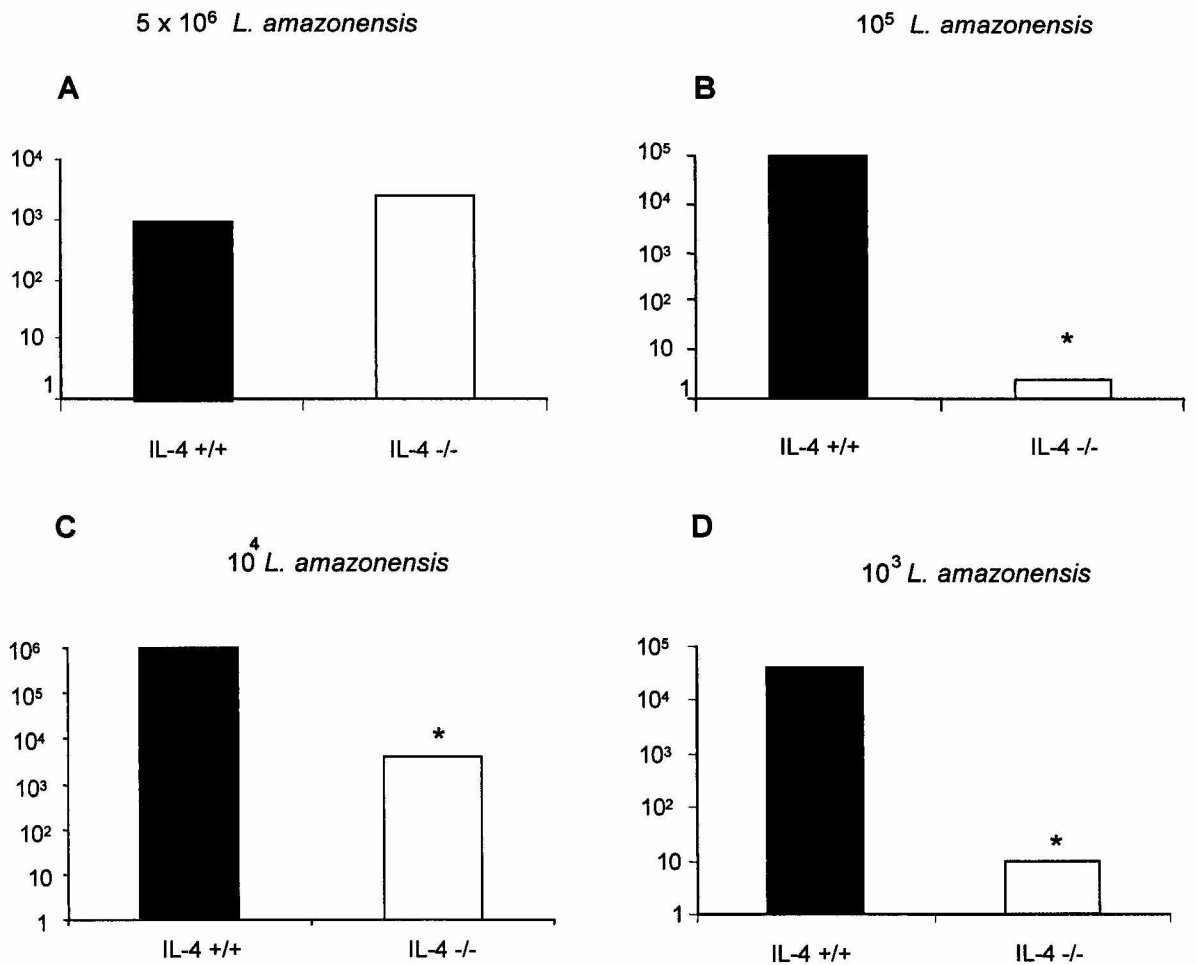
Fig. 1: Curso da infecção de camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- por 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> e 5 x 10<sup>6</sup> promastigotas de *L. amazonensis*. As lesões foram monitoradas semanalmente através da medida da espessura das patas, durante 5-7 semanas. Resultados semelhantes foram obtidos em outros dois experimentos. Valores representam as médias ± SE de 5 camundongos por grupo. \* P<0,04 referente ao teste *t* de Student.

## 5.2. Quantificação parasitária no linfonodo de camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por *L. amazonensis*

A quantificação parasitária foi realizada por diluição limitante no linfonodo de camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por diferentes inóculos de *L. amazonensis*. Com apenas duas semanas de infecção, não havia diferença na carga parasitária no linfonodo de camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis* (Fig. 2A). Em contrapartida, nenhum parasito foi detectado no linfonodo de camundongos infectados por  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  *L. amazonensis* com duas semanas de infecção neste estágio de infecção (dados não mostrados). Após cinco semanas de infecção, camundongos IL-4 -/- apresentavam uma carga significativamente menor de parasitos (cerca de 1000 vezes menor) quando comparados com IL-4 +/+ (Fig. 2B-D). Para confirmar estes resultados, nós realizamos imunistoquímica para a detecção de parasitos na pata infectada. Como mostra a figura 3, lesões de camundongos IL-4 +/+ infectados por  $10^4$  *L. amazonensis* apresentam muitos macrófagos com amplos vacúolos parasitóforos citoplasmáticos contendo inúmeros parasitos. No entanto, lesões de camundongos IL-4 -/- apresentam apenas focos isolados de parasitos nas lesões em meio de macrófagos predominantemente não vacuolados (Fig. 3).

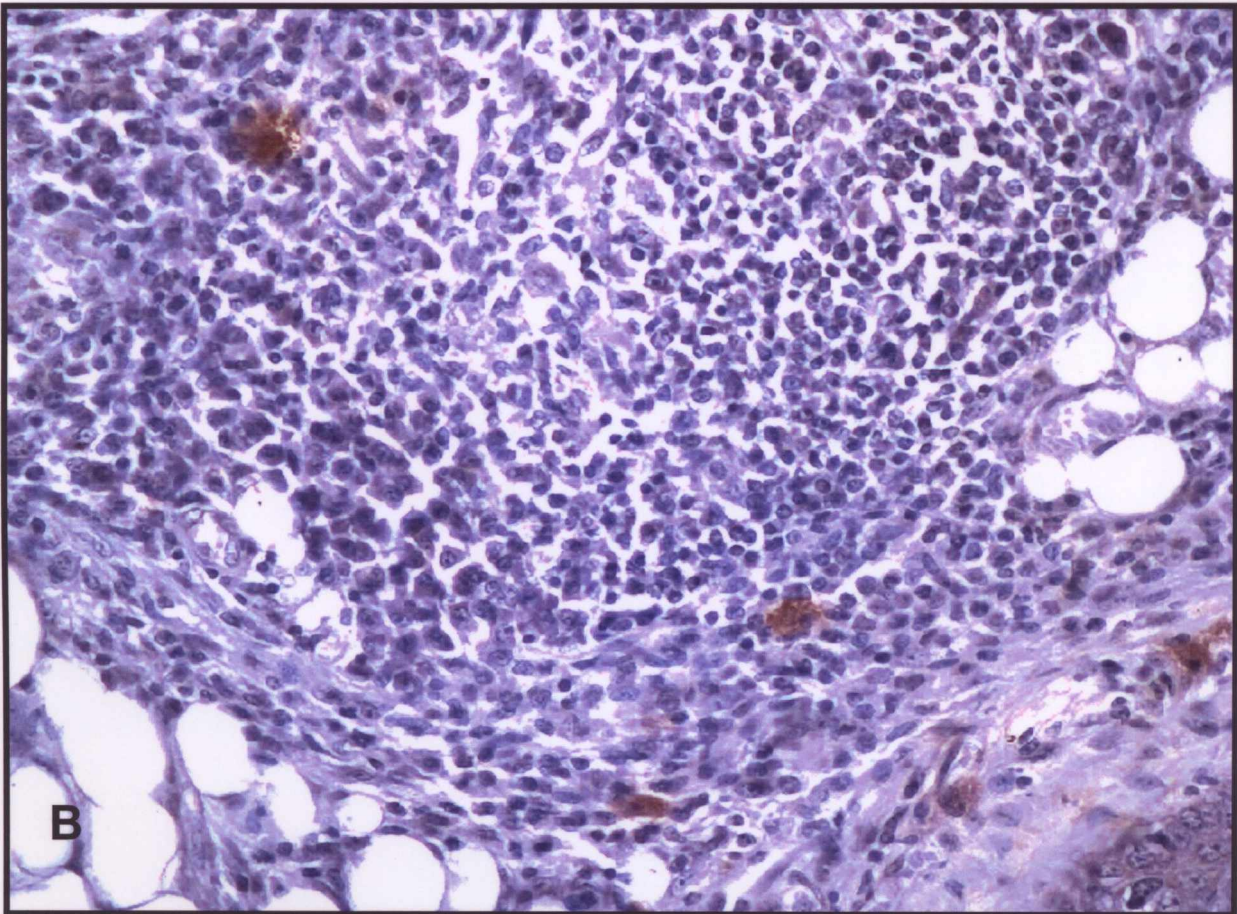
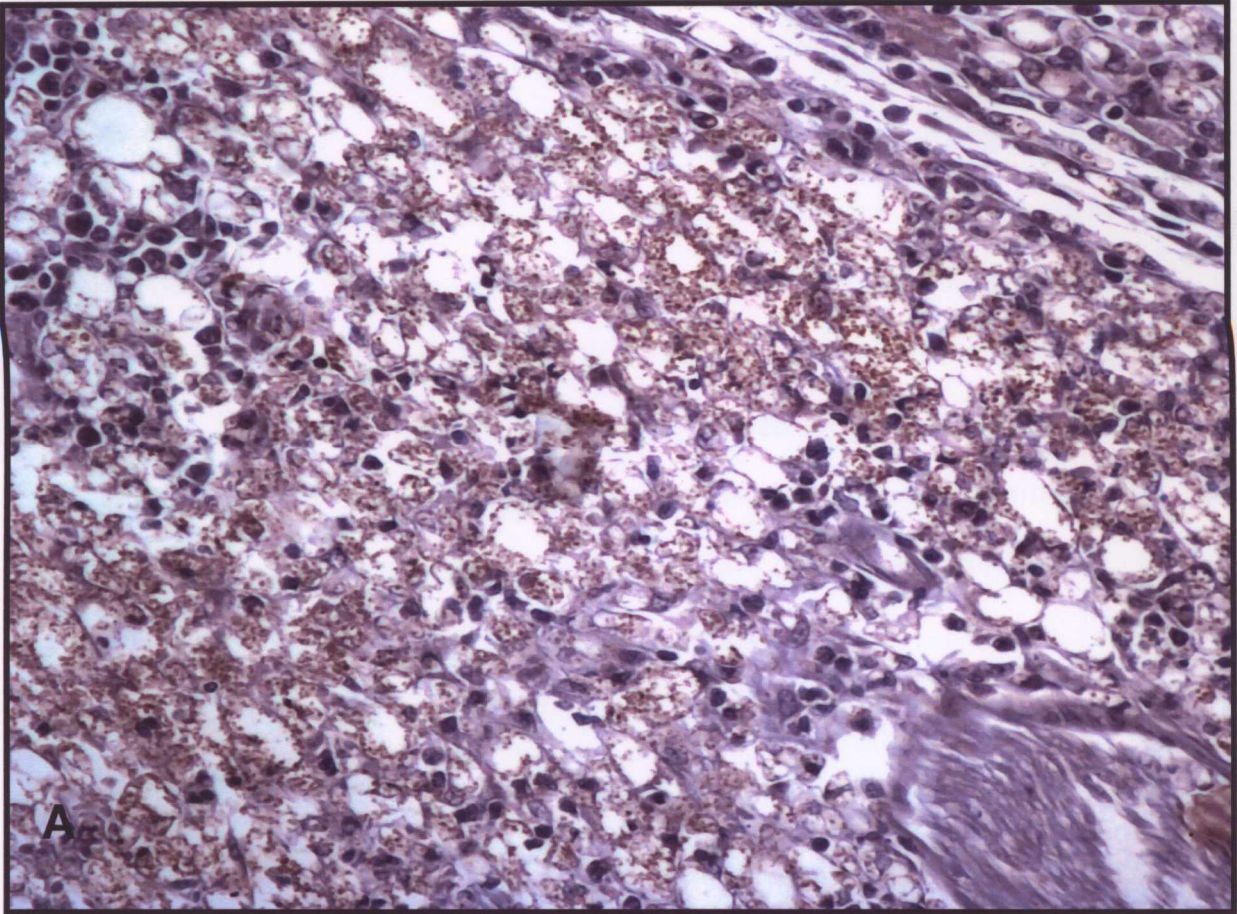


**FIGURA 2**



**Fig. 2: Quantificação parasitária de camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por *L. amazonensis*.** A carga parasitária foi determinada por diluição limitante no linfonodo de 5 camundongos BALB/c IL-4 +/+ (barras pretas) e de 5 camundongos IL-4 -/- (barras brancas) infectados por diferentes inóculos de *L. amazonensis* após 2 (A), 5 (D) e 7 (B e C) semanas pós-infecção. A quantificação dos parasitos foi determinada individualmente e as médias geométricas das diluições máximas de cada grupo foram expressas em log (10). Os dados correspondem a um experimento representativo de três realizados. \* P<0,01 referente ao teste *t* de Student.

FIGURA 3





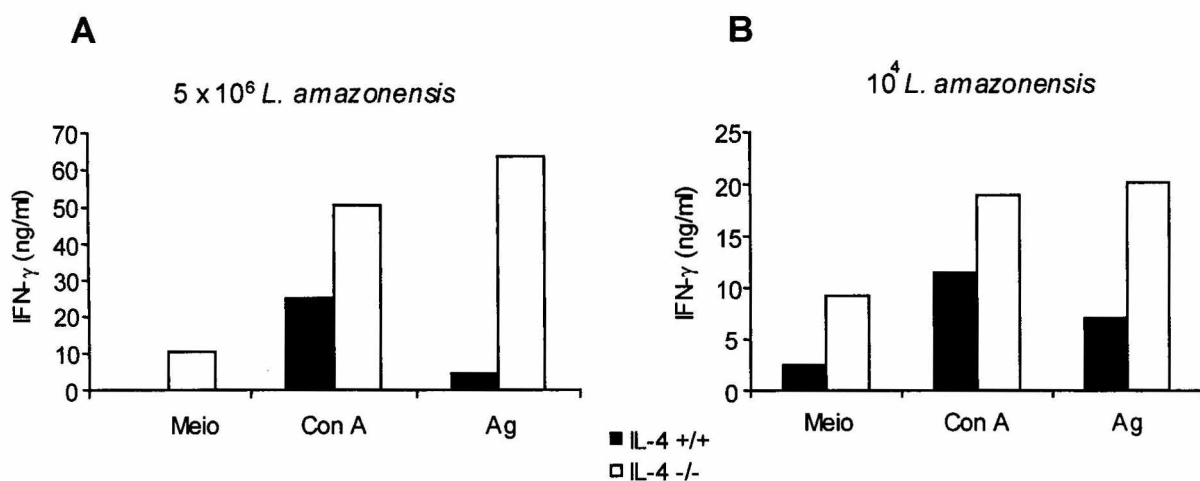
**Fig. 3: Detecção de parasitos na pata dos camundongos infectados.** A imunohistoquímica para a detecção de *L. amazonensis* foi realizada após 7 semanas de infecção nas secções de tecido da pata de camundongos infectados por  $10^4$  *L. amazonensis* (objetiva de 20x). Em (A), lesões de camundongos BALB/c IL-4 +/+ exibem muitos macrófagos vacuolados contendo inúmeros amastigotas. Em (B), lesões de camundongos BALB/c IL-4 -/- exibem apenas focos isolados de parasitas em meio a um infiltrado constituído predominantemente por macrófagos não vacuolados.

### **5.3. Resposta Th1 é mais elevada na ausência de IL-4 durante a infecção por *L. amazonensis***

Para avaliar o perfil da resposta imune em camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por *L. amazonensis*, células do linfonodo destes animais foram estimuladas por Con A ou por antígeno de *L. amazonensis* para dosagem de IFN- $\gamma$ . Após duas semanas de infecção, camundongos IL-4 -/- infectados por  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis* produziram níveis significativamente maiores de IFN- $\gamma$  que IL-4 +/+, quando estimuladas por Con A e por antígeno de leishmania (Fig. 4A). Resultado similar foi encontrado em sobrenadantes de células de camundongos infectados por  $10^4$  *L. amazonensis* após sete semanas de infecção (Fig. 4B).

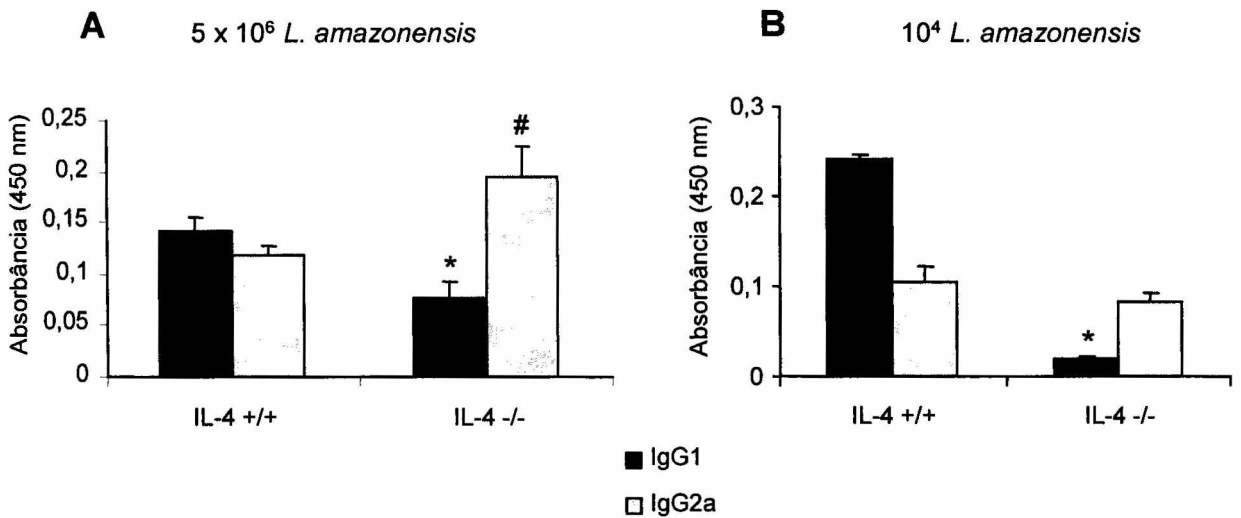
O padrão de resposta também foi avaliado através da dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para antígeno de *L. amazonensis*. Esta dosagem foi realizada por ELISA a partir do soro coletado dos camundongos infectados por  $5 \times 10^6$  e  $10^4$  *L. amazonensis* (Fig. 5). Camundongos IL-4 +/+ produzem mais IgG1 que IL-4 -/-, após 2 e 7 semanas de infecção por  $5 \times 10^6$  e  $10^4$  *L. amazonensis*, respectivamente (Fig 5A e B). Após duas semanas de infecção, camundongos IL-4 -/- apresentavam predominantemente níveis maiores do anticorpo IgG2a que camundongos IL-4 +/+ quando inoculados por  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis* (Fig. 5A). Em contrapartida, não foi observada diferença significativa nos níveis deste anticorpo durante a infecção de camundongos por  $10^4$  *L. amazonensis* (Fig. 5B).

FIGURA 4



**Fig. 4: Dosagem de IFN- $\gamma$  em sobrenadantes da cultura de células de camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por *L. amazonensis*.** Células de linfonodo (pool de células de 5 camundongos por grupo) foram incubadas apenas com o meio de cultura ou estimuladas por antígeno de *L. amazonensis* (Ag) ou por Concanavalina A (Con A). Após 48 horas de cultura, os níveis de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. (A), células de camundongos infectados por  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis* e (B) células de camundongos infectados por  $10^4$  *L. amazonensis*, após duas e sete semanas de infecção, respectivamente.

FIGURA 5

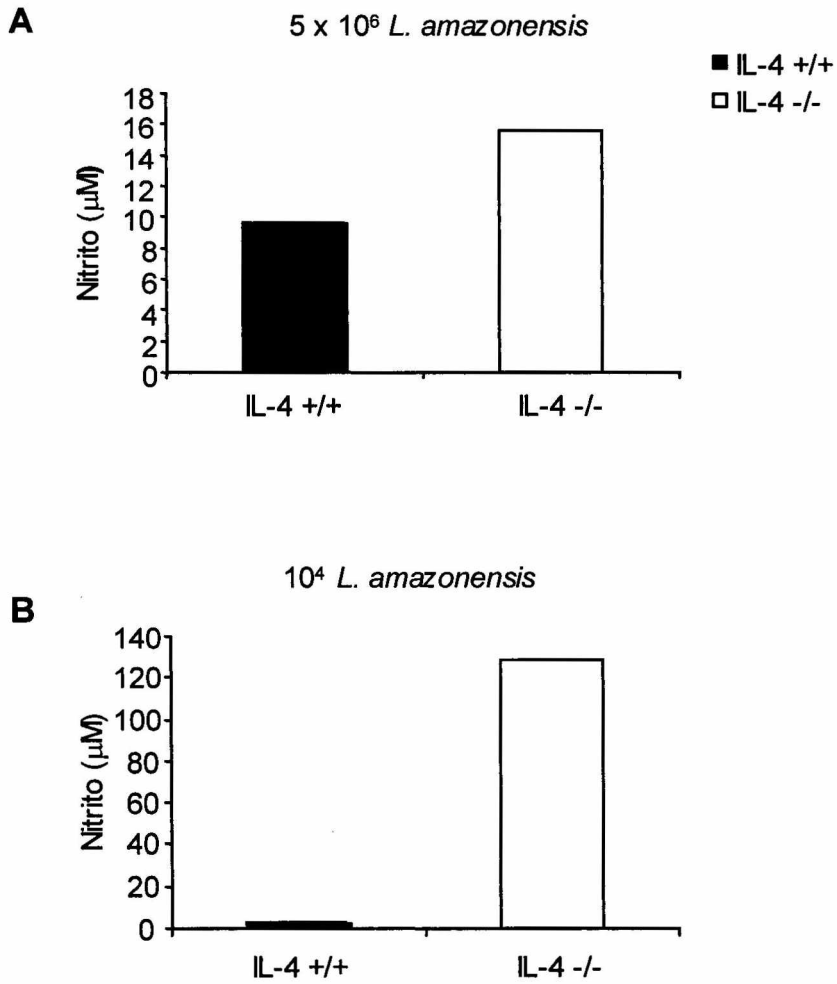


**Fig. 5: Dosagem de anticorpos séricos IgG1 e IgG2a de camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por *L. amazonensis*.** Os níveis de anticorpos leishmania específicos foram determinados por ELISA no soro destes animais. Em (A), dosagem de anticorpos no soro de camundongos infectados por  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis* e em (B), por  $10^4$  *L. amazonensis*, após 2 e 7 semanas de infecção respectivamente. Dados representativos de dois experimentos realizados. Valores representam as médias  $\pm$  SD de 5 camundongos por grupo. \* $P < 0,01$  e # $P < 0,03$ , ambos referentes ao teste *t* de Student.

#### **5.4. Produção de NO em camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por *L. amazonensis*.**

Como o NO é a principal molécula efetora na destruição da leishmania por macrófagos murinos, nós decidimos investigar se havia diferença nos níveis desta molécula em camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por *L. amazonensis*, através da medida de seus produtos oxidativos, o nitrito e o nitrato, pelo método de Griess. Nós observamos que camundongos BALB/c IL-4 -/- produzem 100 vezes mais NO que camundongos IL-4 +/+ quando infectados por  $10^4$  *L. amazonensis* (Fig. 6B). Camundongos infectados por  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis* produzem aproximadamente cerca de 10 vezes menos NO quando comparados aos animais infectados por  $10^4$  *L. amazonensis*. Não houve diferença nos níveis de NO entre BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- quando infectados por  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis* (Fig. 6A). Estes dados indicam que o inóculo de *L. amazonensis* na infecção pode interferir na capacidade de síntese de NO por macrófagos.

FIGURA 6



**Fig. 6: Dosagem de NO no soro de camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por *L. amazonensis*. A dosagem de NO foi realizada através da reação de Griess no pool dos soros de camundongos (5 por grupo) após 2 e 7 semanas de infecção por  $5 \times 10^6$  e por  $10^4$  *L. amazonensis*, respectivamente. Dados de um experimento representativo de dois realizados.**

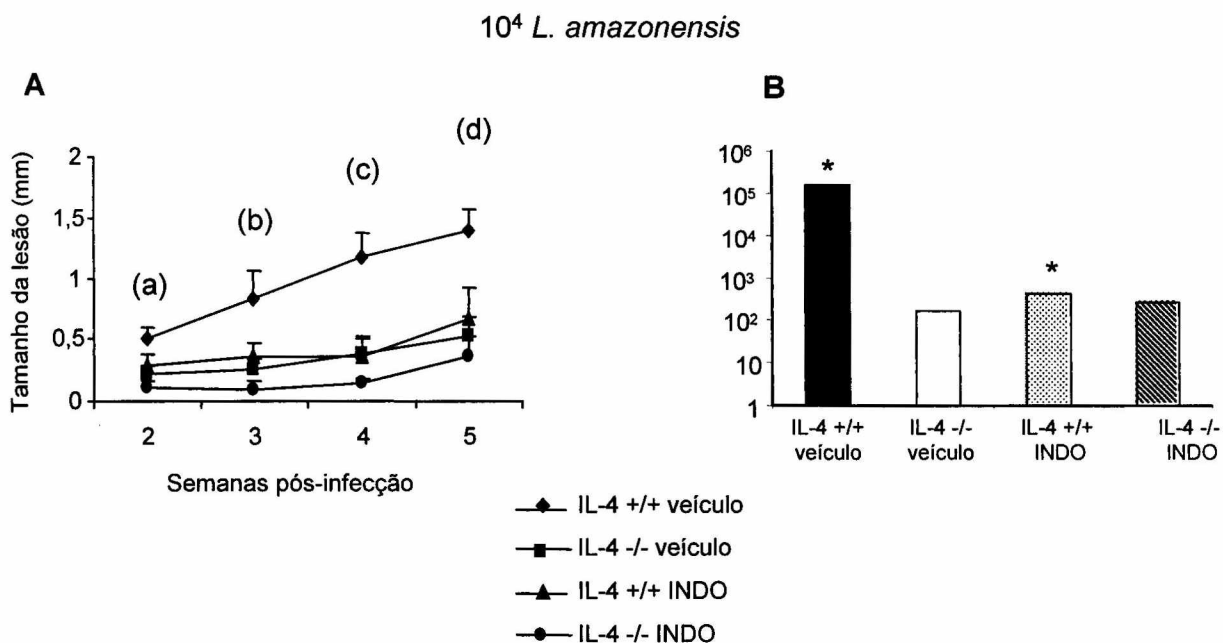


### **5.5. Tratamento de camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por *L. amazonensis* com indometacina**

A associação da ausência da citocina IL-4 e da prostaglandina E<sub>2</sub>, um mediador lipídico já conhecido por exacerbar a infecção por *L. major*, foi avaliada. Camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- foram infectados por 10<sup>4</sup> *L. amazonensis* e tratados ou não com indometacina, um inibidor da síntese da ciclooxigenase, a enzima responsável pela produção da PGE<sub>2</sub>. Após cinco semanas de infecção, houve uma redução significativa no tamanho das lesões de camundongos IL-4 +/+ e IL-4 -/- tratados com indometacina quando comparados aos camundongos controles não tratados (Fig. 7A). Houve também uma diminuição significativa no número de parasitos no linfonodo dos camundongos IL-4 +/+ tratados com indometacina (Fig. 7B). Apesar de camundongos IL-4 -/- tratados com a droga apresentarem redução no tamanho das lesões, não foram observadas diferenças na carga parasitária no linfonodo destes animais (Fig. 7B).

Como foi visto na Fig. 7, as lesões voltam a crescer após o término do tratamento de três semanas com indometacina. Portanto, para acompanhar o efeito do bloqueio da PGE<sub>2</sub> por um período maior de tempo, foi realizado o tratamento prolongado com indometacina por via oral, em camundongos BALB/c IL-4 -/- infectados por 10<sup>3</sup> *L. amazonensis*. Como mostra a figura 8, a lesão evolui nos dois grupos de estudo com o decorrer das semanas, apesar de ser significativamente menor no grupo tratado com indometacina.

**FIGURA 7**



**Fig. 7: Efeito do tratamento com indometacina por via intraperitoneal em camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- infectados por  $10^4$  *L. amazonensis*. Em (A), acompanhamento semanal da medida da espessura das patas, em animais tratados com indometacina (INDO) ou tratados apenas com o veículo da droga. Valores correspondem às médias  $\pm$  SE de 5 camundongos por grupo. Em (B), quantificação parasitária por diluição limitante nas células do linfonodo destes animais. Os camundongos foram sacrificados após 5 semanas de infecção. Em (a), IL-4 +/+ veículo vs IL-4 +/+ INDO:  $P < 0.001$ , (b) IL-4 +/+ veículo vs IL-4 +/+ INDO:  $P < 0.001$ ; IL-4 -/- veículo vs IL-4 -/- INDO:  $P < 0.01$ , (c) IL-4 +/+ veículo vs IL-4 +/+ INDO:  $P < 0.001$ ; IL-4 -/- veículo vs IL-4 -/- INDO:  $P < 0.01$ , (d) IL-4 +/+ veículo vs IL-4 +/+ INDO:  $P < 0.001$ ; IL-4 -/- veículo vs IL-4 -/- INDO:  $P < 0.01$ . Valores referentes ao teste one-way ANOVA.**

FIGURA 8

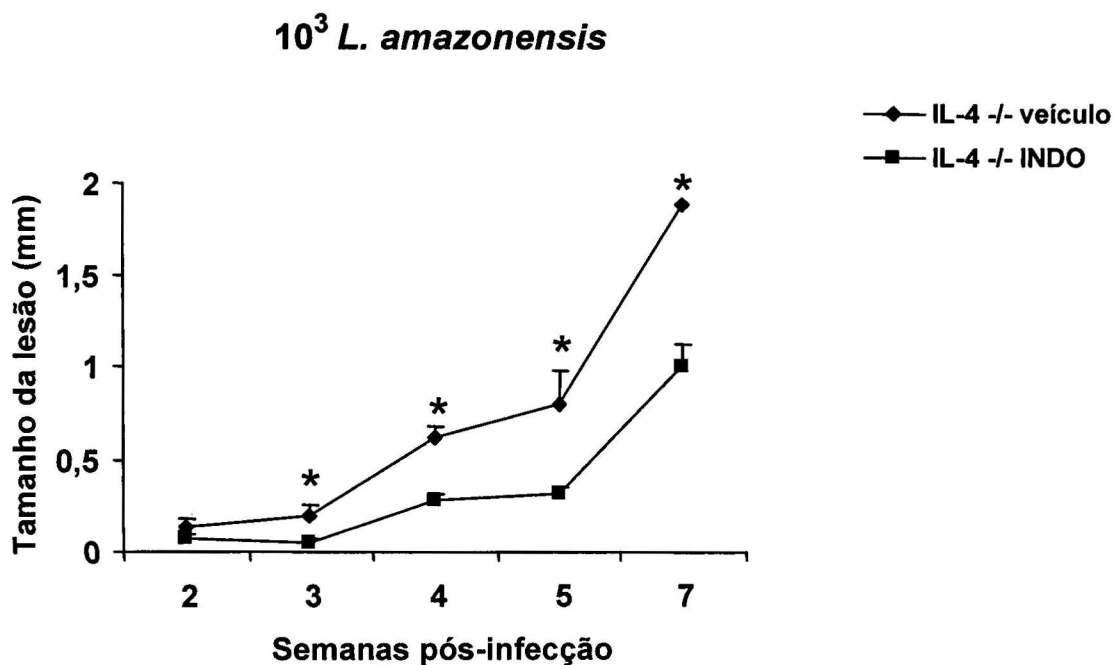


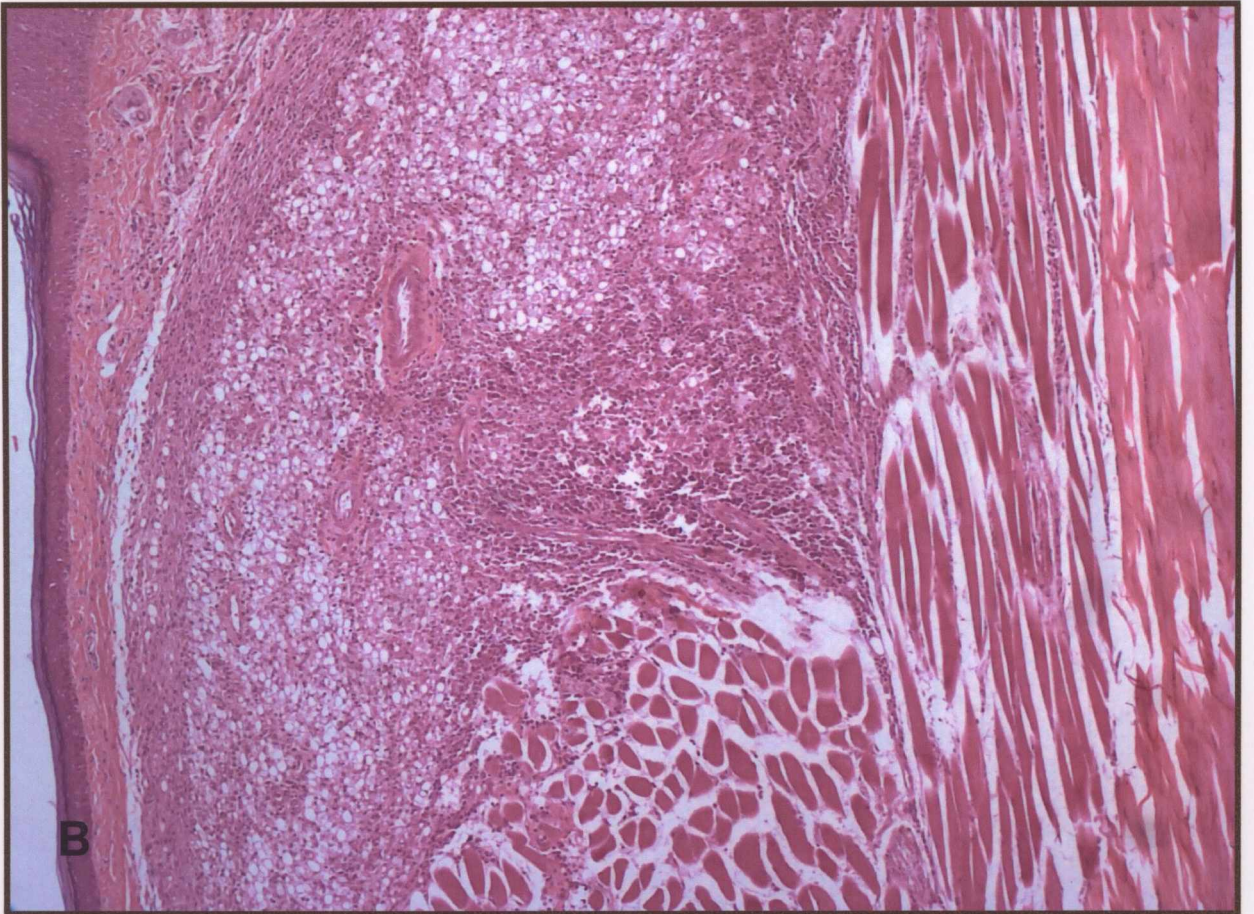
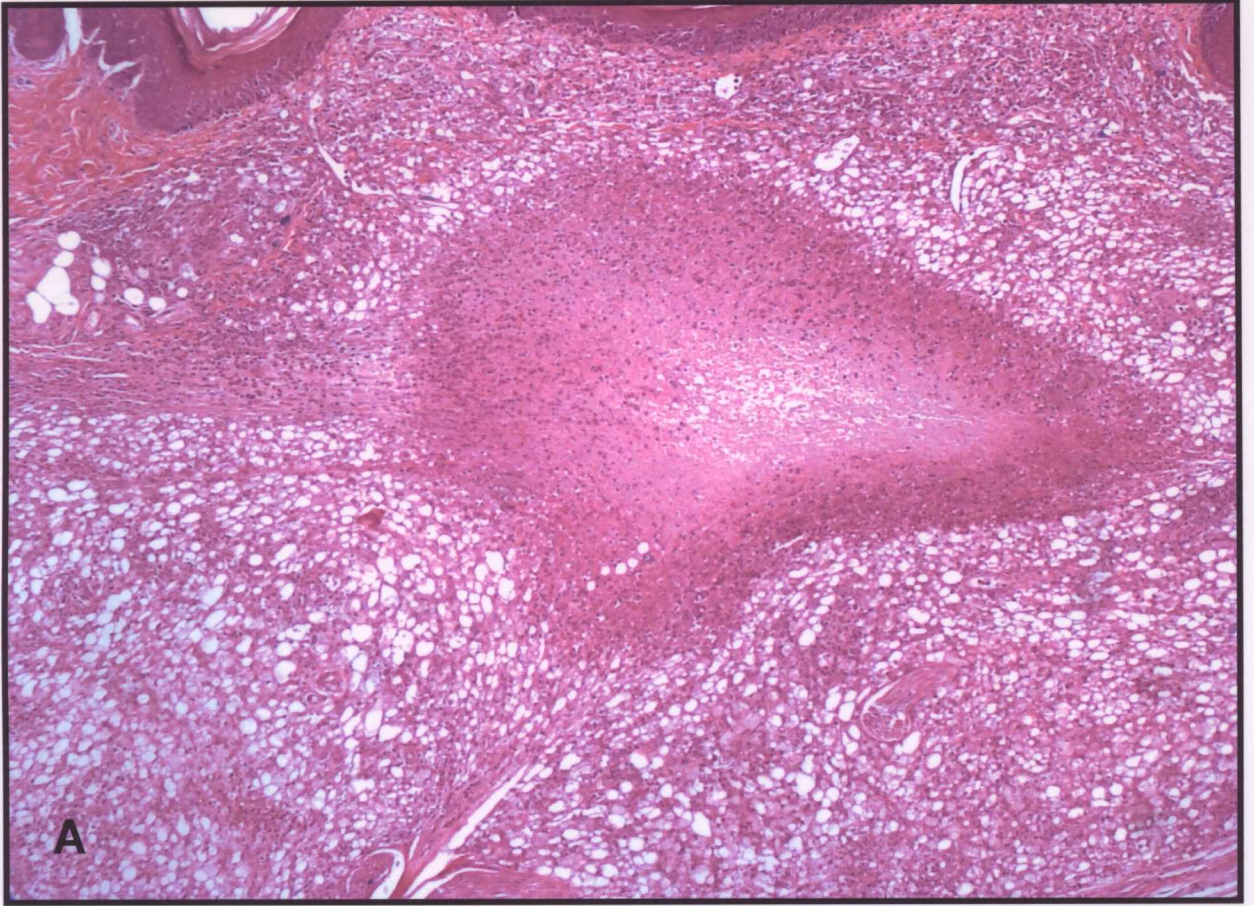
Fig. 8: Tratamento prolongado com indometacina por via oral em camundongos BALB/c IL-4 -/- infectados por *L. amazonensis*. Camundongos IL-4 -/- foram infectados por  $10^3$  *L. amazonensis* e tratados com indometacina (INDO) ou apenas com o veículo da droga por via oral. O progresso da lesão foi monitorado a partir da medida da espessura das patas. Valores representam às médias  $\pm$  SE de 5 camundongos por grupo. \*  $P < 0,03$  referente ao teste *t* de Student.

## **5.6. Análise histopatológica das lesões de camundongos BALB/c IL-4 -/- e IL-4 +/+ tratados ou não com indometacina.**

Foi realizada a análise histopatológica de secções do tecido da pata infectada coradas por hematoxilina e eosina dos diferentes grupos de estudo. Camundongos IL-4 +/+ tratados com o veículo da droga apresentavam lesões grandes, com infiltrado inflamatório crônico e monomórfico, do tipo “virchowiano”, com muitos macrófagos vacuolados contendo inúmeros parasitos. Este aspecto monótono da lesão foi apenas alterado pelas áreas de necrose, extensas em dois animais. Foi observada também a formação de microabscessos circundados por neutrófilos e eosinófilos (Fig. 9A). Em camundongos BALB/c IL-4 +/+ tratados com indometacina, o tamanho da lesão variava de pequeno (3 animais), a médio (1 animal) e grande (1 animal). Estas lesões tinham o aspecto virchowiano exceto em um dos animais, onde o infiltrado era constituído por uma mistura de macrófagos vacuolados e não vacuolados. As áreas de necrose estavam presentes em 2/5 animais, sendo discreta em 1 deles (Fig. 9B). Camundongos IL-4 -/- não tratados apresentavam lesões de tamanho pequeno a médio, com um infiltrado que varia do virchowiano (em 2 animais) ou pleomórfico (em 3 animais) contendo macrófagos vacuolados e não vacuolados. Pequena área de necrose e microabscessos foi observado apenas 1 animal (Fig 10A). Camundongos IL-4 -/- tratados com indometacina apresentavam lesões pequenas em 3/4 animais e de tamanho médio em outro. O infiltrado tinha aspecto virchowiano em 2 animais e um infiltrado misto contendo macrófagos vacuolados e não vacuolados nos demais animais. Áreas de necrose estão ausentes (Fig 10B).



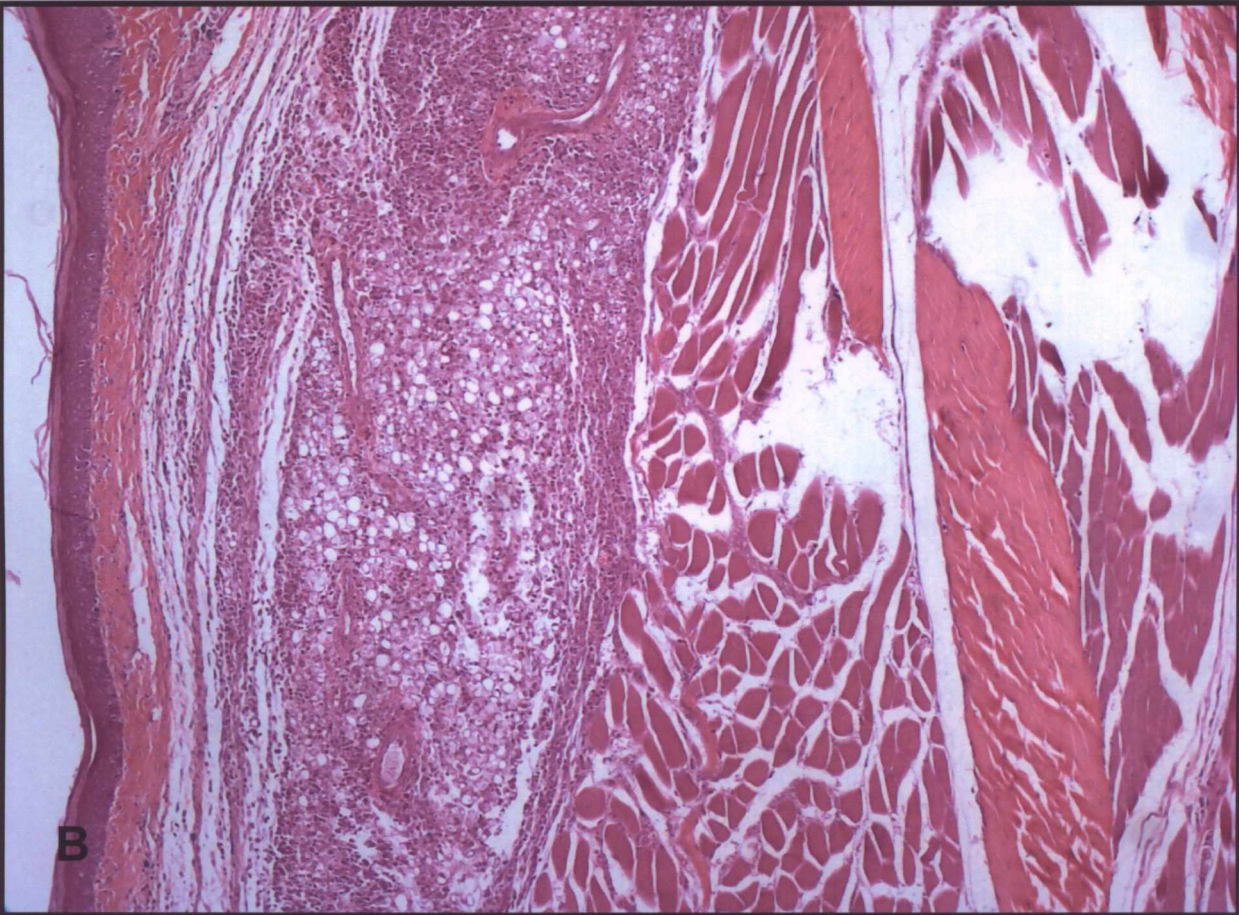
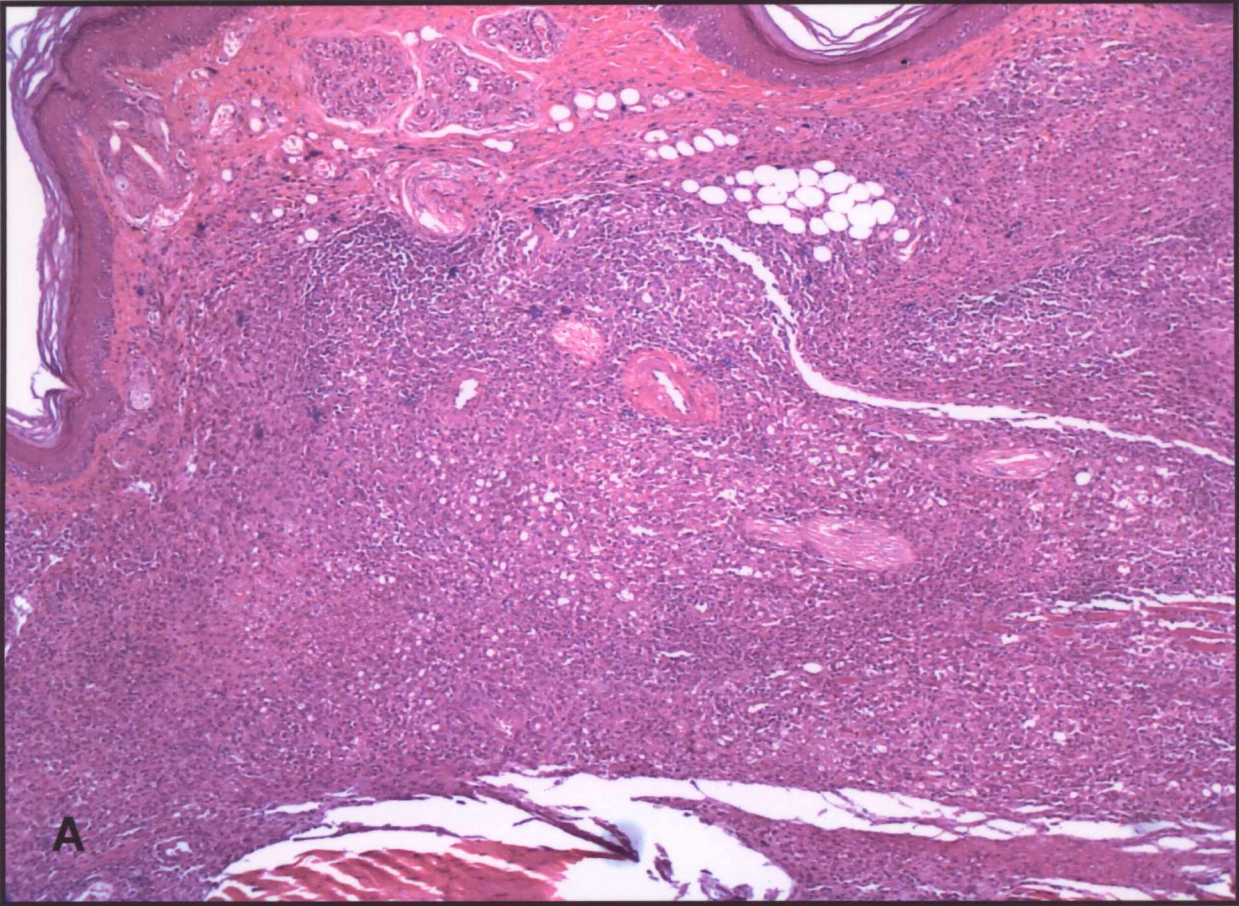
**FIGURA 9**





**Fig. 9: Histopatologia da pata de camundongos BALB/c IL-4 +/+ infectados por  $10^4$  *L. amazonensis* e tratados ou não com indometacina.** Camundongos BALB/c IL-4 +/+ foram tratados com indometacina ou apenas com o veículo da droga durante as três primeiras semanas de infecção. Após 5 semanas, os animais foram sacrificados e as patas foram removidas. Os fragmentos do tecido foram incluídos em parafina e os cortes foram corados com H&E. A análise foi realizada ao microscópio óptico (objetiva de 4x). Em (A), camundongos BALB/c tratados apenas com o veículo da droga apresentavam lesões grandes, com coleções de macrófagos vacuolados contendo parasitos. Presença de áreas de necrose e microabscessos. Em (B), lesões pequenas, com infiltrado virchowiano, e poucas áreas de necrose na pata de camundongos BALB/c IL-4 +/+ tratados com indometacina.

FIGURA 10





**Fig. 10: Histopatologia da pata de camundongos BALB/c IL-4 -/- infectados por  $10^4$  *L. amazonensis* após o tratamento com indometacina.** Camundongos BALB/c IL-4 -/- foram tratados com indometacina ou apenas com o veículo da droga durante as três primeiras semanas de infecção. Após 5 semanas, os animais foram sacrificados e as patas foram removidas. Os fragmentos do tecido foram incluídos em parafina e os cortes foram corados com H&E. A análise foi realizada ao microscópio óptico (objetiva de 4x). Em (A), predomínio de células mononucleares não vacuoladas entremeadas por algumas células vacuoladas, nas lesões de BALB/c IL-4 -/- tratados com o veículo da droga. Em (B), a lesão em camundongos BALB/c IL-4 -/- tratados com indometacina apresentava aspecto semelhante, porém, com o tamanho reduzido.



## 6. DISCUSSÃO

---

No modelo de infecção de linhagens de camundongos isogênicos com leishmanias causadoras de leishmaniose cutânea, os animais podem ser classificados como susceptíveis ou resistentes à doença tendo como base o curso da infecção. Os camundongos BALB/c são susceptíveis à infecção por muitas espécies de leishmania. Em oposição, várias linhagens de camundongos possuem graus variados de resistência, a depender da espécie utilizada na infecção. Camundongos C57BL/6 e C3H/HeN são resistentes à *L. major*, como evidenciado pela sua habilidade em curar, enquanto que infecções destes camundongos por *L. mexicana* ou *L. amazonensis* estão associadas a lesões crônicas, as quais podem sofrer metástases em todo o organismo (AFONSO & SCOTT, 1993). De fato, há muitas evidências de que a resposta imune do hospedeiro à *L. amazonensis* é diferente em muitos aspectos da que é encontrada durante a infecção por *L. major*, incluindo na diferenciação e na expansão de células Th (JI et al, 2002).

Durante o seu repasto sanguíneo, o inseto vetor da leishmaniose inocula no hospedeiro vertebrado cerca de 10 a 1000 promastigotas de leishmania. Na leishmaniose cutânea experimental geralmente é utilizado um inóculo com um elevado número de parasitos, que varia de  $10^5$  a  $10^7$  parasitos (COURRET et al, 2003). Nestas condições, a *L. major* causa uma doença progressiva em camundongos BALB/c que são incapazes de controlar a expansão parasitária no local da inoculação e nos linfonodos drenantes. Entretanto, poucos trabalhos

refletem o que acontece durante as condições naturais permissivas à perpetuação deste parasito.

Neste estudo, foi investigado o papel da IL-4 e da prostaglandina E<sub>2</sub> nos mecanismos que levam à eliminação de parasitos no curso da infecção por diferentes inóculos de *L. amazonensis*. Para este fim, foram utilizados camundongos BALB/c deficientes em IL-4 e camundongos selvagens do mesmo “background” genético infectados por 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> e 5 x 10<sup>6</sup> *L. amazonensis*. Alguns grupos de animais foram tratados com indometacina, um inibidor da síntese das prostaglandinas. Inóculos variados foram utilizados para verificar a influência do número de parasitos no curso da infecção.

Em nossos resultados foi observado que, a depender do inóculo utilizado, a doença progride de forma diferente nos grupos estudados. Camundongos IL-4 -/- apresentam lesões menores que IL-4 +/+ quando infectados por 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> *L. amazonensis*, apesar de não curarem completamente da doença. O número de parasitos também é bastante reduzido, sendo cerca de 1000 vezes menor em alguns grupos quando comparados aos animais IL-4 +/+, os quais desenvolvem lesões progressivas. Em contrapartida, quando nós utilizamos um inóculo com um maior número de parasitos (de 5 x 10<sup>6</sup> *L. amazonensis*), nenhuma diferença foi observada no curso da infecção e na carga parasitária entre camundongos IL-4 +/+ e IL-4 -/-, com duas e seis semanas de infecção. Estes resultados sugerem que a IL-4 é um fator associado à susceptibilidade em camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*, e que a falta desta citocina leva a uma resistência parcial, sobretudo quando inóculos com pequenos números de parasitos são utilizados.

JONES e colaboradores (2000) concluíram que a susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis* é independente da citocina IL-4, uma vez que as lesões em camundongos C57BL/6 IL-4  $-/-$  progrediam de forma similar aos IL-4  $+/+$ . Entretanto, o número de parasitos utilizados no inóculo inicial foi elevado ( $5 \times 10^6$  parasitas), o que poderia explicar porque os autores não observaram diferenças no curso da infecção entre os dois grupos de estudo.

Outros trabalhos também sugerem que existe uma ausência de resposta Th2 durante a infecção por *L. amazonensis*. A susceptibilidade de camundongos C3H, C57BL/6 e C57BL/10 a *L. amazonensis* estaria associada à falta de uma resposta imune celular Th1, mais especificamente da cadeia  $\beta 2$  do receptor de IL-12, e não relacionada ao desenvolvimento de uma resposta Th2 (AFONSO & SCOTT, 1993; JONES et al, 2000). A progressão da doença não estaria, portanto, associado aos níveis de IL-4. (AFONSO & SCOTT, 1993). Entretanto, SOUZA e colaboradores (2000) demonstraram que camundongos CBA infectados por *L. amazonensis* produzem cerca de 5 vezes mais IL-4 do que em camundongos infectados por *L. major*. Em adição, o tratamento com o anticorpo monoclonal anti- IL-4 reduz o tamanho das lesões quando camundongos BALB/c são infectados por *L. amazonensis*, reforçando a importância da IL-4 na susceptibilidade à infecção por este parasito ( AFONSO & SCOTT, 1993).

Em relação ao perfil de citocinas produzidos durante a infecção, foi observado que camundongos BALB/c IL-4  $-/-$  apresentam níveis maiores de IFN $\gamma$  quando comparados aos IL-4  $+/+$ , mesmo durante a infecção por  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis*. Apesar de não haver diferença no curso da infecção e na carga

parasitária quando este inóculo foi utilizado, houve um aumento de uma resposta imune Th1 (produção elevada de IFN- $\gamma$  e modificação da produção dos isotipos de IgG). Em contrapartida, a produção de NO é consideravelmente reduzida quando camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- são infectados por  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis*. O mesmo não é observado após infecção por  $10^4$  *L. amazonensis*, onde camundongos IL-4 -/- produzem níveis significativamente maiores de NO que IL-4 +/+. O número elevado de parasitos utilizado no inóculo inicial poderia ser um dos fatores inibitórios da ativação de macrófagos e que conseqüentemente causam a supressão dos mecanismos efetores de eliminação destes parasitos. A supressão da síntese de NO pode ser um mecanismo de escape inicial para a propagação da *L. amazonensis* no hospedeiro.

GOMES e colaboradores (2003) demonstraram que a administração exógena de IFN- $\gamma$  na cultura de macrófagos de camundongos CBA não reduz a infecção por *L. amazonensis*, enquanto que este tratamento causa uma redução significativa do número de células parasitadas por *L. major*. Estes dados reforçam a hipótese que a *L. amazonensis* é capaz de interferir na resposta imune do hospedeiro, influenciando a sua capacidade de controlar a infecção.

Como foi visto em nossos resultados, camundongos IL-4 -/- desenvolvem lesões menores que IL-4 +/+, têm uma carga parasitária menor e apresentam uma resposta polarizada para um perfil Th1, com níveis mais elevados de IFN- $\gamma$ . Porém, estes animais não curam a infecção, sugerindo que outros fatores, em conjunto com a IL-4, podem contribuir para a progressão da doença. Deste modo, foi avaliada se a associação da falta da IL-4 e da PGE<sub>2</sub>, poderia

proporcionar a cura no curso da infecção por *L. amazonensis*. Camundongos BALB/c IL-4 +/+ e IL-4 -/- foram tratados com indometacina, um inibidor da síntese das prostaglandinas, por via intraperitoneal, durante as três primeiras semanas de infecção por *L. amazonensis*. Nós observamos que houve uma diminuição das lesões e da carga parasitária em camundongos BALB/c IL-4 +/+ após o tratamento com indometacina. Em contrapartida, apesar haver uma redução significativa no tamanho das lesões de camundongos BALB/c IL-4 -/- tratados com a droga, nenhuma diferença na carga parasitária foi observada. A PGE<sub>2</sub> inibe a resposta Th1 e aumenta a produção de citocinas Th2 tais como IL-4, IL-5 e IL-10 (FEDYK & PHIPPS, 1996).

Como o desenvolvimento das lesões ocorreu apenas após o término do tratamento com indometacina (após as três primeiras semanas de infecção), foi realizado um tratamento prolongado com esta droga em camundongos IL-4 -/-, a fim de verificar o seu efeito por um período maior de tempo. Foi observado que o tratamento prolongado com indometacina em camundongos IL-4 -/-, apesar de reduzir as lesões, não causou a sua cura. FREITAS e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento com indometacina em camundongos BALB/c infectados por *L. major* diminui o tamanho das lesões e a carga parasitária, contudo, o efeito da droga é insuficiente para promover a cura da infecção. Os autores sugerem que os efeitos benéficos da indometacina foram predominantemente observados tardiamente na infecção, um período no qual a droga foi incapaz de bloquear suficientemente uma resposta Th2 já estabelecida e curar.

Apesar de a maioria dos trabalhos científicos em leishmaniose abordarem apenas a inibição da síntese da PGE<sub>2</sub> pela indometacina, esta droga pode inibir também a produção de outros tipos de prostaglandinas. Contudo, o papel destes outros mediadores solúveis ainda é pouco estudado. REINER & MALEMUD (1985) descreveram que macrófagos infectados por *L. donovani* produzem níveis aumentados de PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> e que estes fatores podem influenciar a função imune celular e exacerbar a infecção.

O parasitismo de macrófagos por *Leishmania spp.* pode desencadear diferentes tipos de reações inflamatórias no local da infecção (JI et al, 2003). Neste estudo, nós examinamos também as diferenças histológicas nas patas dos camundongos tratados com indometacina ou apenas com o veículo da droga após cinco semanas de infecção. Tendências de mudanças no padrão histológico das lesões foram observadas nos animais tratados com a indometacina. Em camundongos BALB/c não tratados com a droga, foram observadas lesões grandes, de aspecto monótono, com muitos macrófagos vacuolados contendo parasitos, e moderadas a extensas áreas de necrose, características que são típicas da infecção de camundongos BALB/c por *L. amazonensis* (ANDRADE et al, 1984; BARRAL-NETTO et al, 1987). Uma vez tratados com a indometacina, camundongos BALB/c apresentavam lesões de tamanho menor e infiltrado predominantemente virchowiano. Áreas de necrose foram reduzidas e observada apenas em 2/5 animais. Estas observações sugerem que o tratamento com indometacina pode alterar os aspectos histopatológicos da lesão dos animais, principalmente em relação ao tamanho da

lesão e necrose, como reflexo de mudanças para um quadro de resistência parcial. Em adição, camundongos IL-4  $-/-$  tratados com a indometacina apresentavam lesões pequenas e um infiltrado que variava de virchowiano em alguns animais a misto em outros, com a presença de células vacuoladas e não vacuoladas. Áreas de necrose estavam ausentes. Alterações histológicas semelhantes foram observadas após a imunização de camundongos BALB/c por antígeno solúvel de leishmania (BARRAL-NETTO et al, 1987) e após o tratamento com indometacina em camundongos BALB/c infectados por *L. major* (FREITAS et al, 1999). O aspecto monótono das lesões em BALB/c não tratados assemelhava-se à aparência homogênea e regular dos macrófagos na leishmaniose cutânea difusa humana e murina (ANDRADE et al, 1984; BARRAL-NETTO et al, 1987). Na fase inicial da infecção de camundongos BALB/c por *L. major*, uma inflamação mais intensa e um maior estímulo para o recrutamento de células inflamatórias no local da inoculação do parasito está correlacionado aos elevados níveis de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> (MILANO et al, 1996). Portanto, em nossos resultados, o infiltrado crônico observado em camundongos BALB/c não tratados poderia estar associado à presença de PGE<sub>2</sub>. Adicionalmente, a indometacina é capaz de alterar alguns mecanismos imunoregulatórios (FREITAS et al, 1999), o que pode ter levado a essa resistência parcial observada em BALB/c IL-4  $+/+$  e IL-4  $-/-$  tratados com esta droga. Adicionalmente, as diferentes composições celulares no foco inflamatório da lesão são resultado de processos quimiotáticos celulares específicos. Em camundongos infectados por *L. amazonensis*, a expressão de vários mediadores inflamatórios nos linfonodos e na pata não são detectados nas primeiras semanas de infecção (JI et al, 2003). A infecção por

este parasito retarda a indução da resposta imune do hospedeiro na sua fase inicial em favor do estabelecimento da infecção, levando ao recrutamento de macrófagos imaturos que resulta na propagação de parasitas, contribuindo portanto para a patogênese da doença (JI et al, 2003). Estas observações são consistentes com estudos clínicos que demonstram que a expressão de RNAm para IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e CCL-2/MCP-1 é elevada em pacientes com lesões cutâneas que curam mas não em pacientes com leishmaniose cutânea difusa (RITTER et al, 1996).

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a *L. amazonensis* pode interferir nos processos de ativação de macrófagos, suprimindo os mecanismos efetores de destruição dos parasitos através da modulação de alguns mediadores, tais como a IL-4 e a PGE<sub>2</sub>. Apesar destes mediadores desempenharem um papel na susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis*, a deficiência destes dois fatores apenas não é suficiente para promover a cura da infecção por este parasito. É possível que outras citocinas como a IL-10, a IL-13 e o TGF- $\beta$ . possam atuar em conjunto.



## 7. CONCLUSÕES

---

1. O inóculo de parasitos influencia o curso da infecção por *L. amazonensis*;
2. Camundongos BALB/c IL-4 -/- desenvolvem menor lesão e menor carga parasitária que IL-4 +/+, sobretudo quando inóculos de parasitos menores que  $10^5$  são utilizados;
3. Camundongos BALB/c IL-4 -/- produzem mais IFN- $\gamma$  que IL-4 +/+;
4. A inibição da síntese de NO é um dos mecanismos de escape utilizados por *L. amazonensis* para evadir o sistema imune;
5. O tratamento com indometacina reduz o tamanho da lesão, a carga parasitária e a inflamação em camundongos BALB/c IL-4 +/+;
6. A IL-4 e a PGE<sub>2</sub> são fatores associados à susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis*;
7. Os nossos resultados indicam que a *L. amazonensis* suprime os mecanismos efetores de destruição dos parasitos através da modulação de alguns mediadores, tais como a IL-4 e a PGE<sub>2</sub> e sugerem que outras citocinas/ mediadores solúveis podem atuar na susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, **61**: 2952-2959, 1993.
2. ASEFFA, A.; GUMY, A.; LAUNOIS, P.; MACDONALD, H. R.; LOUIS, J. A.; TACCHINI- COTTIER, F. The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells. **J. Immunol.**, **169**: 3232-324, 2002.
3. BALESTIERI, F. M. P.; QUEIROZ, A. R. P.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M. A.; BARRAL-NETTO, M.; ABRAHAMSOHN, I. A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microb. Infect.**, **4**: 23-29, 2002.
4. BARRAL- NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A. W.; 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.
5. BARRAL-NETTO, M., FREITAS, L. A., ANDRADE, Z. A. Histopathologic changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of BALB/c mice. **Am. J. Pathol.** **127**: 271-277, 1987.
6. BARRAL, A.; BARRAL- NETTO, M.; YONG, E. C.; BROWNELL, C. E. ;TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor  $\beta$  as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **90**: 3442-3446, 1993.
7. BELKAID, Y., PICCIRILLO, C. A., MENDEZ, S., SHEVACH, E. M., SACKS, D. L. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**. **420**: 502-507, 2002.
8. BELKAID, Y., MENDEZ, S., LIRA, R., KADAMBI, N., MILON, G., SACKS, D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged silent phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J. Immunol.** **165**: 969-977, 2000.
9. BELLEY, A.; CHADEE, K. Eicosanoide production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation?. **Parasitol. Today**, **11**: 327-330, 1995.

10. BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms clinical efficacy and future strategies. **Rev. Infect. Dis.**, **10**: 560-586, 1988.
11. BIEDERMANN, T.; ZIMMERMANN S.; HIMMELRICH H.; GUMY A.; EGETER O.; SAKRAUSKI A. K.; SEEGMULLER I.; VOIGT H.; LAUNOIS P.; LEVINE A. D.; WAGNER H.; HEEG K.; LOUIS J. A.; ROCKEN M. IL-4 instructs Th1 responses and resistance to *L. major* infection in susceptible BALB/c mice. **Nat. Immunol.**, **2**: 1054-1060, 2001.
12. BOGDAN, C.; MOLL, H.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **Eur. J. Immunol.**, **20**: 1131-1135, 1990.
13. BOTTING, R. M. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? **Clin. Infect. Dis.**, **5**: 202-21, 2000.
14. BRETSCHER, P. A.; WEI, G.; MENON, J. N.; BIELEFELDT- OHMANN, H. Establishment of stable cell immunity that makes susceptible mice to resistant to *Leishmania major*. **Science**, **257**: 539-542, 1992.
15. CHATELAIN, R.; MAUZE, S.; COFFMAN, R. L. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. **Parasite Immunol.**, **21**: 211-218, 1999.
16. CHEN, G.; DARRAH, P. A.; MOSSER, D. M. Vaccination against the intracellular pathogens *Leishmania major* and *L. amazonensis* by directing CD40 ligand to macrophages. **Infect. Immun.**, **69**: 3255-3263, 2001.
17. COLMENARES, M.; KIMA, P. E.; SAMORFF, E.; SOONG, L.; MCMAHON-PRATT, D. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T- cell- mediated responses in vaccine- induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. **Infect. Immun.**, **71**: 3172-3182, 2003.
18. CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Early detection of *Leishmania chagasi* in draining lymph node after subcutaneous inoculation in hamster. **Parasitol. Int.** **47**: 307-310, 1998.
19. COURRET, N.; LANG, T.; GENEVIEVE, M.; ANTOINE, J. C. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic process and status of protection in BALB/c mice. **Int. J. Parasitol.**, **33**: 1373-1383, 2003.
20. CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**, **72**: 132-141, 2002.

21. DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, **141**: 2407-2412, 1988.
22. DOHERTY, T. M.; COFFMAN, R. L. *Leishmania major*. Effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c mice. **Exp. Parasitol.**, **84**: 124-135. 1996.
23. EVANS, T. G.; THAI, L.; GRANGER, D. L.; HIBBS, J. B. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. **J. Immunol.**, **151**: 907-915, 1993.
24. FARREL, J. P.; KIRKPATRICK, C. E. Experimental cutaneous leishmaniasis. II A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major* infected BALB/c mice. **J. Immunol.**, **138**: 902-907, 1987.
25. FEDYK E. R.; PHIPPS, R. P. Prostaglandin E2 receptors of the EP2 and EP4 subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE secreting cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **93**: 10978-10983, 1996.
26. FREITAS, L. A. R.; MBOW, M. L.; ESTAY, M.; BLEYENBERG, J. A.; TITUS, R. G. Indomethacin treatment slows disease progression and enhances a Th1 response in susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **Parasite Immunol.**, **21**: 273-277, 1999.
27. GERASIMOVA, N. S.; SAMUTIN, A. A.; STEKLOVA, I. V.; TUUMINEM, T. Phenylketonuria screening in Moscow using a microplate fluorometric method. **Sreeninger**, **1**: 27-35, 1992.
28. GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F. C.; TAVARES, R. S.; WITZERBIN, J.; FREITAS, L. A. R.; VERAS, P. S. T. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microb. Infect.**, **5**: 251-260, 2003.
29. GORELIK, L.; CONSTANT, S.; FLAVELL, R. A. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. **J. Exp. Med.**, **195**: 1499-1505, 2002.
30. GREEN, L. C.; WAGNER, J. G.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, **126**: 131-138, 1982.
31. GROUX, H.; O'GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; DE VRIES, J. E.; RONCAROLO, M. G. A CD4+ T cell subset inhibits antigen-specific T cell responses and prevents colitis. **Nature**, **389**: 737-742, 1997.

32. HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin- 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **177**: 1505-1509, 1993.
33. HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, **354**: 1191-1199, 1999.
34. HILTON, D. J.; ZHANG, J. G.; METCALF, D.; ALEXANDER, W. S.; NICOLA, N. A.; WILLSON, T. A. Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **93**: 497-501, 1996.
35. HIMMELRICH, H.; LAUNOIS, P.; MAILLARD, I.; BIEDERMANN, T.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOCKSLEY, R. M.; ROCKEN, M.; LOUIS, J. A. In BALB/c Mice IL-4 Production During the Initial Phase of Infection with *Leishmania major* Is Necessary and Sufficient to Instruct Th2 Cell Development Resulting in Progressive Disease. **J. Immunol.**, **164**: 4819-4825, 2000.
36. HLA, T.; NEILSON, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **89**: 7384-7388, 1992.
37. HOWARD, J. G.; HALE, C.; LIEW, W. Immunological regulation of cutaneous leishmaniasis. I. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunol.**, **2**: 303-314, 1980.
38. JI, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **66**: 338-345, 2002.
39. JONES, D. E.; ACKERMANN, M. R.; WILLE, U.; HUNTER, C. A.; SCOTT, P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin 10 deficient mice does not lead to resolution of infection. **Infect. Immun.**, **70**: 2151-2158, 2002.
40. JONES, D. E.; BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. IL-4- Independent Inhibition of IL-12 Responsiveness during *Leishmania amazonensis* Infection. **J. Immunol.**, **165**: 364-372, 2000.
41. KABUTUTU, Z.; MARTIN, S. M.; NOKASI, T.; KAWASU, S.; OKADA, T.; MUNDAY, C. J.; DUSZENKO, M.; LAZARUS, M.; THUITA, L. W.; URADE, Y.; KUBATA, B. K. Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 911- endoperoxide prostaglandin H2 reductase in *Leishmania*. **Int. J. Parasitol.**, **33**: 221-228, 2003.
42. KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J. Immunol.**, **166**: 1141-1147, 2001.

43. KAYE, P. M.; CURRY, A.; BLACKWELL, J. Differential production of Th1 and Th2 derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine- induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, **146**: 2763-2770, 1991.
44. KOPF, K.; BROMBACHER, F.; KOHLER, G.; KIENZLE, G.; WIDMANN, K. H.; LEFRANG, K.; HUMBORG, C.; LEDERMANN, B.; SOLBACH, W. IL-4-deficient mice resist infection with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **184**: 1127-1136, 1996.
45. KROPF, P.; HERATH, S.; WEBER, V.; MODOLELL, M.; MULLER, I. Factors influencing *Leishmania major* infection in IL-4- deficient BALB/c mice. **Parasite Immunol.**, **25**: 439-447, 2003.
46. LAUNOIS, P.; MAILLARD, I.; PINGEL, S; SWIHART, K. G.; XENARIOS, I.; ACHA-ORBEA, H.; DIGGELMANN, H.; LOCKSLEY, R. M.; MACDONALD, H. R. LOUIS J. A. IL-4 rapidly produced by V $\beta$ 4 $\alpha$ 8 CD4 T cell instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. **Immunity**, **6**: 541-549, 1997.
47. LETTERIO, J. J.; ROBERTS, B. Regulation of immune response by TGF- $\beta$ . **Annu. Rev. Immunol.**, **16**: 137-161, 1998.
48. LI, J.; PADIGEL, U. M.; SCOTT, P.; FARRELL, J. P. Combined Treatment with Interleukin-12 and Indomethacin Promotes Increased Resistance in BALB/c Mice with Established *Leishmania major* Infections. **Infect. Immun.**, **70**: 5715-5720, 2002.
49. LOUZIR, H.; MELBY, P. C.; BEN SALAH, A.; MARRAKCHI, H.; AOUN, K.; BEN ISMAIL, R.; DELLAGI, K. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **J. Infect. Dis.**, **177**: 1687-1695, 1998.
50. MARZOCHI, M. C. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **J. Bras. Med.**, **63**: 82-104, 1992.
51. MATTE, C.; MAION, G.; MOURAD, W.; OLIVIER, M. *Leishmania donovani* induced macrophages cyclooxygenase 2 and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis. **Parasite Immunol.**, **23**: 177-184, 2001.
52. MATTHEWS, D. J.; EMSON, C. L.; GRAHAME, J. M.; JOLIN, H. E.; BLACKWELL, J. M.; MCKENZIE, A. N. J. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, **164**: 1458-1462, 2000.

53. MELBY, P. C.; CHANDRASHEKAR, R.; ZHAO, W.; COE, J. E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of prominent Th1- like cytokine response. **J. Immunol.**, **166**: 1912-1920, 2001.
54. MOHRS, M.; LEDERMANN, B.; KOHLER, G.; DORFMULLER, A.; GESSNER, A.; BROMBACHER, F. Differences Between IL-4 and IL-4 Receptor  $\alpha$ -Deficient Mice in Chronic Leishmaniasis Reveal a Protective Role for IL-13 Receptor Signaling. **J. Immunol.**, **162**: 7302-7308, 1999.
55. MOLL, H.; SCHARNER, A.; KAMPGEM, E. Increased interleukin 4 (IL-4) receptor expression and IL-4-induced decrease in IL-12 production by Langerhans cells infected with *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, **70**: 1627-1633, 2002.
56. MOORE, K. J.; LABRECQUE, S.; MATLASHEWSKI, G. Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. **J. Immunol.**, **150**: 4457-4465, 1993.
57. NACY, C.; MELTZER, M. S. T cell mediated activation of macrophages. **Curr. Opin. Immunol.**, **3**: 330-335, 1991.
58. NELSON, B. J.; RALPH, P.; GREEN, S. J.; NACY, C. A. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor-beta 1. **J. Immunol.**, **146**: 1849-1857, 1991.
59. NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 9.ed São Paulo: Atheneu, 1997. p. 35-37.
60. NOBEN- TRAUTH, N. Susceptibility to *Leishmania major* infection in the absence of IL-4. **Immunol. Lett.**, **175**: 41-44, 2000.
61. NOBEN- TRAUTH, N.; KROPF, P.; MULLER, I. Susceptibility to *L. major* infection in interleukin-4- deficient mice. **Science**, **271**: 987-989, 1996.
62. NOBEN- TRAUTH, N.; LIRA, R.; NAGASE, H.; PAUL, W. E.; SACKS, D. L. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. **J. Immunol.**, **170**: 5152-5158, 2003.
63. NOBEN-TRAUTH, N.; PAUL, W. E.; SACKS, D. L. IL-4 and IL-4 Receptor-Deficient BALB/c Mice Reveal Differences in Susceptibility to *Leishmania major* Parasite Substrains. **J. Immunol**, **162**: 6132-6140, 1999.
64. O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity**, **8**: 275-283, 1998.



65. PADIGEL, U. M.; ALEXANDER, J.; FARREL, J. P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. **J. Immunol.** **171**: 3705-3710, 2003.
66. PARK, A. P.; HONDOWICZ, B.; KOPF, M.; SCOTT, P. The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. **J. Immunol.**, **168**: 5771-5777, 2002.
67. PEREZ- SANTOS, J. L. M.; TALAMAS- ROHANA, P. In vitro indomethacin administration upregulates interleukin- 12 production and polarizes the immune response towards a Th1 type in susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*. **Parasite Immunol.**, **23**: 599-606, 2001.
68. REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annu. Rev. Immunol.**, **13**: 151-17, 1995.
69. REINER, N. E., MALEMUD, C. J. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxigenase pathways. **J. Immunol.** **134**: 556-563, 1983.
70. RITTER, U., MOLL, H., LASKAY, T., BROKER, E., VELAZCO, O., BECKER, I., GILLITZER, R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous american leishmaniasis. **J. Infect. Dis.** **173**: 699-709; 1996.
71. RITTER, U.; KORNER, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, **24**: 295-301, 2002.
72. ROBERTS, L. S.; JANOVY, J. **Foundations of Parasitology**. 5. ed. Dubuque IA 1995. p. 68-77 .
73. ROBERTS, M.; MOCK, B. A.; BLACKWELL, J. M. Mapping of genes cotrolling *Leishmania major* in CXS recombinant inbred mice. **Eur. J. Immunogenet.**, **20**: 349-362, 1993.
74. RODRIGUES, V.; DA SILVA, J. S.; CAMPOS- NETO, A. Transforming growth factor  $\beta$  and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **66**: 1233-1236, 1998.
75. SACKS, D.; NOBEN- TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.**, **2**: 845-85,8 2002.



76. SAD, S.; MOSMANN, T. R. Single IL-2 secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. **J. Immunol.**, **153**: 3514-3522, 1994.
77. SADICK, M. D.; STREET, N.; MOSMANN, T. R.; LOCKSLEY, R. M. Cytokine regulation of murine leishmaniasis: interleukin 4 is not sufficient to mediate progressive disease in resistant C57BL/6 mice. **Infect. Immun.**, **59**: 4710-4714, 1991.
78. SADICK, M.D.; HEINZEL, F. P.; HOLADAY, B. J.; PU, R. T.; DAWKINS, R. S.; LOCKSLEY, R. M. Cure of murine leishmaniasis with anti- interleukin 4 monoclonal antibody. **J. Exp. Med.**, **171**: 115-127, 1990.
79. SAHA, B.; DAS, G.; VOHRA, H.; GANGULY, N. K.; MISHRA, G. C. Macrophages T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on Leishmania infected macrophages and its implication in the suppression of cell mediated immunity. **Eur. J. Immunol.**, **25**: 2492-2498, 1995.
80. SAÚDE. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Serviço de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/pub00.htm#>.
81. SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L. C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOT, P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **J. Immunol.**, **154**: 5320-5330, 1995.
82. SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, **147**: 3149-3155, 1991.
83. SCOTT, P.; EATON, A.; GAUSE, W. C.; ZHOU, X. D.; HONDOWICS, B. Early IL-4 production does not predict susceptibility to *Leishmania major*. **Exp. Parasitol.**, **84**: 178-187, 1996.
84. SEDER, R. A.; GAZZINELLI, R.; SHER, A.; PAUL, W. E. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **90**: 10188-10192, 1993.
85. SOONG, L.; CHANG, C. H.; SUN, J.; LONGLEY, J.R.; RUDDLE, N. H.; FLAVELL, R. A. ;MCMAHON-PRATT, D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, **158**: 5374-5383, 1997.

86. SOUZA, V. L.; SOUZA, J. L.; SILVA, T. M. C.; VERAS, P. S. T.; FREITAS, L. A. R. Different *Leishmania* Species Determine Distinct Profiles of Immune and Histopathological responses in CBA mice. **Microb. Infect.**, **2**: 1807-1815, 2000.
87. STROBER, W.; KELSALL, B.; FUSS, I.; MARTH, T.; LUDVIKSSON, B. ; EHRHARDT, R. ;NEURATH, M. Reciprocal IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. **Immunol. Today**, **18**: 61-64, 1997.
88. SZABO, S. J.; JACOBSON, N. G.; DIGHE, A. S.; GUBLER, U.; MURPHY, K. M. Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. **Immunity**, **2**: 665-675, 1995.
89. THEODOS, C. M.; POVINELLI, L.; MOLINA, R.; SHERRY, B.; TITUS, R. G. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. **Infect. Immun.**, **59**: 2839-2842, 1991.
90. UZONNA, J. E.; WEI GUOJIAN, W.; YURKOWSKI, D.; BRETSCHER, P. Immune Elimination of *Leishmania major* in Mice: Implications for Immune Memory Vaccination and Reactivation Disease. **J. Immunol.**, **167**: 6967-6974, 2001.
91. UZONNA, J. E., JOYCE, K. L., SCOTT, P. Low dose *Leishmania major* promotes a transiente T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon- $\gamma$  producing CD8<sup>+</sup> T cells. **J. Exp. Med.** **199**: 1559-1566, 2004.
92. VIETH, M.; SCHROPPEL, K.; ROLLINGHOFF, M.; GESSNER, A. Interleukin-10 inhibits antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. **Scand. J. Immunol.**, **40**: 403-409, 1994.
93. VOUDOUKIS, I.; BECHEREL, P. A.; RIVEROS- MORENO, V. Interleukin- 10 and interleukin- 4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. **Eur. J. Immunol.**, **27**: 860-865, 1997.
94. WANG, Z. E.; REINER, S. L.; ZHENG, S.; DALTON, D. K.; LOCKSLEY, R. M.CD4 effector cells default to the Th2 pathway in interferon- $\gamma$ -deficient mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **179**: 1367-1371, 1994.
95. WARNER, T. D., MITCHELL, J. A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **Faseb J.** **18**: 790-804; 2004.
96. WE, X. Q.; CHARLES, I. G.; SMITH, A.; URE, J.; FENG, G. J.; HUANG, F. P.; XU, D.; MULLER, W.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Altered immune responses

in mice lacking inducible nitric oxide synthase.  
**Nature**, **375**: 408-411, 1995.

97. WENNER, C. A.; GULE, M. L.; MACATONIA, S. E.; O'GARRA, A.; MURPHY, K. M. Roles of IFN- $\gamma$  and IFN- $\alpha$  in IL-12-induced T helper cell-1 development. **J. Immunol.**, **156**: 1442-1447, 1996.
98. WILBORN, J.; DEWITT, D. L.; PETERS, M. G. Expression and role of cyclooxygenase isoforms in alveolar and peritoneal macrophages. **Am. J. Physiol.**, **268**: 294-301, 1995.
99. WILSON, M. E.; RECKER, T. J.; RODRIGUEZ, N. E.; YOUNG, B. M.; BURNELL, K. K.; STREIT, J. A.; KLINE, J. N. The TGF- $\beta$  response to *Leishmania chagasi* in the absence of IL-12. **Eur. J. Immunol.**, **32**: 3556-3565, 2002.
100. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Infectious Disease Leishmaniasis. Disponível em: <[http:// www.who.int/emc/disease/leish/leisdis1.html](http://www.who.int/emc/disease/leish/leisdis1.html)> Acesso em 20 de novembro de 2003.