



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



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

FIOCRUZ

## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EXPRESSÃO DE RNAm DE QUIMIOCINAS E  
CITOCINAS NA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA  
*IN SITU* DE CAMUNDONGOS CBA INFECTADOS  
COM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Leishmania*.**

**MARCUS WELBY-BORGES**

Salvador - Bahia  
2000



001762

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

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**EXPRESSÃO DE RNAm DE QUIMIOCINAS E  
CITOCINAS NA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA *IN  
SITU* DE CAMUNDONGOS CBA INFECTADOS COM  
DIFERENTES ESPÉCIES DE *Leishmania*.**

**MARCUS WELBY-BORGES**

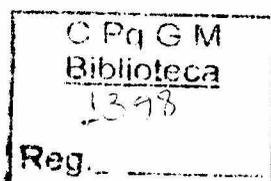
PROFESSOR ORIENTADOR:

**LUIZ ANTÔNIO RODRIGUES DE FREITAS**

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

Salvador – Bahia

2000



Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ  
Salvador – Bahia

Welby-Borges, Marcus

W438e      Expressão de RNAm de quimiocinas e citocinas na resposta imuno-  
inflamatória *in situ* de camundongos CBA infectados com diferentes  
espécies de *Leishmania* / Marcus Welby-Borges. \_ Salvador: Faculdade  
de Medicina da UFBA/FIOCRUZ/CPqGM, 2000.

96p.:il.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da  
Bahia, 2000.

1. Camundongo CBA. 2. Leishmaniose. 3. *Leishmania major*. 4.  
*Leishmania amazonensis*. 5. Imunopatologia. 6. Citocinas.  
7. Quimiocinas. I. Título.

CDU 599.323: 593.1

599.323:593.1

W438e

**EXPRESSÃO DE RNAm DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS NA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA IN SITU DE CAMUNDONGOS CBA INFECTADOS COM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Leishmania*.**

Marcus Welby Borges Oliveira

FOLHA DE APROVAÇÃO

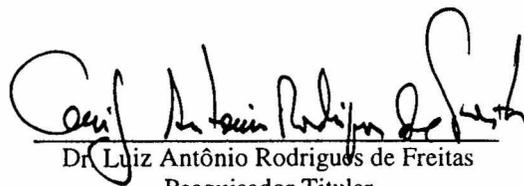
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Ricardo T. Gazzinelli  
Professor Titular  
UFMG



Dra. Milena Botelho Pereira Soares  
Pesquisadora Assistente  
CPqGM- FIOCRUZ



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

Fontes de Financiamento:  
PAPES - 0250.250.354  
CNPq – 523005/96-2  
PRONEX

Aos meus pais, irmãos e em especial à minha mãe  
por todo o incentivo, paciência, dedicação, amor,  
compreensão e alegria.

À Prof<sup>a</sup>. Miriam Tavares  
pela orientação dedicada e confiança  
recebida durante a graduação.

## AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento à todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

Obrigado:

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

Dr. Ricardo Gazzinelli pela disponibilização dos reagentes utilizados neste trabalho.

À Helton Santiago pelo auxílio na minha chegada à Belo Horizonte.

Dra. Tânia Correia, Valderes, Thaís e Eduardo pela contribuição em algumas atividades deste estudo.

Dra. Patrícia Veras , Tânia Silva, Ivana Gomes, Paulo, Cláudio, Keilan, Juliana, Ana Paula, Aknar, Felipe, Leandro, Cláudia Dias e Gabriela, pelo companheirismo.

Aos companheiros do Laboratório de Imunoparasitologia (ICB/UFMG) pelo agradável convívio durante a minha estadia em Belo Horizonte.

Dr. Geraldo Gileno e Dra. Marilda pelos esclarecimentos de dúvidas à respeito de alguns procedimentos técnicos.

Dr. Ricardo Ribeiro e Dra. Milena Soares pela disponibilização de equipamentos do Laboratório de Imunofarmacologia.

À toda equipe da Biblioteca do CPqGM, pela boa vontade e dedicação no atendimento.

Tânia de Farias e Itamar Crispim pela documentação fotográfica do material.

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

Dr. Manoel Barral-Netto pela disponibilidade, atenção, organização, respeito e dedicação na resolução dos problemas relacionados com o curso.

Rosália Meires pela atenção, dedicação e amizade.

Aos amigos dos demais laboratórios deste centro pelos diversos empréstimos e contribuições, sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

À direção deste Centro de Pesquisas pela oportunidade e pela excelente infra-estrutura.

Aos companheiros de turma do mestrado pelo incentivo e companheirismo.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	XII
RESUMO .....	XIV
ABSTRACT .....	XV
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	1
1.2 O PARASITO .....	2
1.3 LEISHMANIOSES: ASPECTOS CLÍNICOS.....	4
1.4 O MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	6
1.5 O CBA COMO MODELO DE RESISTÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO POR DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i> .....	12
1.6 QUIMIOCINAS .....	15
1.6.1 <i>CXC quimiocinas</i> .....	17
1.6.2 <i>CC quimiocinas</i> .....	18
1.6.3 <i>Receptores de quimiocinas</i> .....	19
1.6.4 <i>Quimiocinas: Doenças inflamatórias e leishmaniose</i> .....	23
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1 OBJETIVO GERAL: .....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>29</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
4.1 ANIMAIS .....	31
4.2 PARASITOS.....	31
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	32
4.4 INFECÇÃO.....	33
4.5 MONITORAMENTO DO TAMANHO DAS LESÕES .....	33
4.6 EXTRAÇÃO DO RNA DA PATA DE CAMUNDONGOS .....	34
4.7 PREPARAÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA) POR RT-PCR .....	35
4.8 AMPLIFICAÇÃO DO cDNA POR PCR .....	35
4.9 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA39	
4.10 ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DAS BANDAS .....	40
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40

<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
5.1 MONITORAMENTO DO TAMANHO DAS LESÕES DE CAMUNDONGOS CBA INFECTADOS COM <i>L. MAJOR</i> , <i>L. AMAZONENSIS</i> E INJETADOS COM PBS.....	42
5.2 EXPRESSÃO DE RNAm PARA HPRT, CXC E CC QUIMIOCINAS E CITOCINAS NAS LESÕES DE CAMUNDONGOS CBA .....	42
5.3.1 <i>Expressão de RNAm para CXC quimiocinas</i> .....	46
5.3.1 <i>Expressão de RNAm para CC quimiocinas</i> .....	52
5.3.1 <i>Expressão de RNAm para citocinas</i> .....	58
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BCA-1** - "B-cell attracting chemokine" (quimiotático de células B)
- C5a** - produto derivado da clivagem do componente do complemento C5
- CCR** - receptores de CC quimiocinas
- cDNA** - DNA complementar
- CRG** - "chemokine regulated by interferon- $\gamma$ " (quimiocina regulada por interferon- $\gamma$ )
- CX<sub>3</sub>CR** - receptores de CX<sub>3</sub>C quimiocinas
- CXCR** - receptores de CXC quimiocinas
- DARC** - "Duffy antigen receptor for chemokines"
- DEPC** - "diethyl pyrocarbonate" (pirocarbonato dietílico)
- DNA** - ácido desoxiribonucleico
- dNTPs** - desoxinucleotídeos trifosfatados
- ELR** - seqüência dos aminoácidos glutamato-leucina-arginina
- ENA** - "epithelial-cell-derived neutrophil activating peptide" (peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais)
- GIPLs** - glicoinositolfosfolipídeos
- gp63** - protease de superfície de promastigotas
- GRO** - "growth-related oncogene" (oncogene relacionado ao crescimento)
- HIV** - "immunodeficiency virus" (vírus da imunodeficiência)
- HPRT** - "hipoxantine-phosphoribosil-transferase"
- I-309** - "polypeptide secreted by activated human T lymphocytes" (polipeptídeo secretado por linfócitos T humanos ativados)
- IFN** - "interferon"
- IL**- interleucina
- iNOS** - "inducible nitric oxide synthase" (óxido nítrico sintetase induzível)
- IP-10** - "interferon- $\gamma$  inducible protein" ( proteína induzida por interferon- $\gamma$ )
- JE** - homólogo murino para a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) humano
- KC** - homólogo murino para o oncogene relacionado ao crescimento- $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ) humano

**kD**- kilodalton

**La** - *Leishmania amazonensis*

**LCD** - leishmaniose cutânea difusa

**LCL** - leishmaniose cutânea localizada

**LCM** - leishmaniose cutâneo-mucosa

**LIT** - “liver infusion tryptose”(infusão de fígado-triptose)

**LIX** - “lipopolysaccharide-induced CXC chemokine” (CXC quimiocina induzida por LPS)

**Lm** - *Leishmania major*

**LPG** - lipofosfoglicano

**LPS** - lipopolissacarídeo

**LTB4** – leucotrieno 4

**MCP** - “monocyte chemotatic protein” ( proteína quimiotática de monócitos)

**MIF** - “migration inhibitory factor “ (fator inibidor da migração)

**MIG** - “monokine induced by interferon- $\gamma$  “ (monocina induzida por interferon- $\gamma$ )

**MIP** - “macrophage inflammatory protein “ ( proteína inflamatória de macrófagos)

**NAP** - “neutrophil-activating peptide“ (peptídeo ativador de neutrófilos)

**NK** - “natural killers” (células matadoras naturais)

**NO** - “nitric oxide” (óxido nítrico)

**pb** - pares de base

**PBMC** - “peripheral blood mononuclear cells“ (células mononucleares do sangue periférico)

**PBS** - “phosphate buffered saline” (salina fosfatada a 150mM, pH 7,4)

**PCR** - “polimerase chain reaction” (reação da polimerase em cadeia )

**PF** - “platelet factor“ (fator plaquetário)

**PKC** - proteína cinase C

**PPG** - proteofosfoglicano

**q.s.p** - quantidade suficiente para

**RANTES** - “regulated on activation, normal T cell expressed and secreted“ (quimiocina regulada pela ativação de linfócitos T normais)

**RNA** - ácido ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>** - RNA mensageiro

**RT-PCR** - “reverse transcriptase polimerase chain reaction” (transcrição reversa seguida de reação da polimerase em cadeia )

**SDF** - “stromal-cell-derived factor” (fator derivado de células estromais)

**TCA-3** - “T cell activation gene”(gene regulador da ativação de células T)

**TGF** - “transforming growth factor” (fator de crescimento transformador)

**Th** - “T helper” ( linfócitos T auxiliares)

**TNF** - “tumor necrosis factor” (fator de necrose tumoral)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura e localização das principais famílias de quimiocinas nos cromossomos humanos e murinos. . . . .	16
Tabela 1: Principais CXC quimiocinas ELR e não ELR e principais células-alvo nas quais elas atuam. . . . .	18
Tabela 2: Principais CC quimiocinas e células-alvo nas quais elas atuam. . . . .	19
Tabela 3: Receptores de quimiocinas, células em que são predominantemente expressos e seus respectivos ligantes . . . . .	22
Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores de transcrição (“primers”) de CXC quimiocinas. . . . .	37
Tabela 5: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores de transcrição (“primers”) de CC quimiocinas. . . . .	38
Tabela 6: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores de transcrição (“primers”) de citocinas. . . . .	39
Figura 2: Curso da infecção de camundongos CBA infectados com <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> e inoculados com PBS . . . . .	44
Figura 3: Análise dos produtos de amplificação para HPRT em camundongos CBA infectados com <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> e inoculados com PBS . . . . .	45
Figura 4: Expressão de RNAm para KC em lesões de camundongos CBA infectados com <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> e inoculados com PBS. . . . .	49

Figura 5: Expressão de RNAm para MIG em lesões de camundongos CBA infectados com <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> e inoculados com PBS .....	50
Figura 6: Expressão de RNAm para CRG-2 em lesões de camundongos CBA infectados com <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> e inoculados com PBS .....	51
Figura 7: Expressão de RNAm para JE em lesões de camundongos CBA infectados com <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> e inoculados com PBS .....	55
Figura 8: Expressão de RNAm para MCP-5 em lesões de camundongos CBA infectados com <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> e inoculados com PBS .....	56
Figura 9: Expressão de RNAm para RANTES em lesões de camundongos CBA infectados com <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> e inoculados com PBS .....	57
Figura 10: Expressão de RNAm para TNF- $\alpha$ em lesões de camundongos CBA infectados com <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> e inoculados com PBS .....	60
Figura 11: Expressão de RNAm para IL-4 em lesões de camundongos CBA infectados com <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> e inoculados com PBS .....	61
Figura 12: Expressão de RNAm de quimiocinas e citocinas em patas de camundongos CBA infectados com <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> ou inoculados com PBS.....	63

## RESUMO

### EXPRESSÃO DE RNAm DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS NA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA *IN SITU* DE CAMUNDONGOS CBA INFECTADOS COM DIFERENTES ESPÉCIES DE *Leishmania*. MARCUS WELBY-BORGES.

Camundongos CBA são resistentes a infecção com *L. major* (*Lm*) e altamente susceptíveis a *L. amazonensis* (*La*). A resistência à infecção por *Lm* é mediada por uma resposta imune do tipo Th1 enquanto a susceptibilidade a *La* está associada com uma resposta imune do tipo Th2. As lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* apresentam um infiltrado mononuclear misto, composto por poucos macrófagos infectados, granulomas e um aumento progressivo do número de linfócitos na lesão. Camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* apresentam uma reação tecidual caracterizada pela presença de um infiltrado monomórfico, com macrófagos altamente parasitados e poucos linfócitos nas lesões desses animais. Considerando-se o papel de quimiocinas nos eventos relacionados com o recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios, ~~foi~~ analisou-se se as diferenças existentes na composição do infiltrado de lesões de camundongos infectados com *Lm* ou *La* correlacionam-se com uma expressão diferenciada dessas moléculas. Para isso, infectou-se camundongos CBA com  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. major* (*Lm*), *L. amazonensis* (*La*) e avaliou-se a expressão de RNAm para CXC quimiocinas (KC, MIG e CRG-2), CC quimiocinas (JE, MCP-5 e RANTES) e algumas citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-4) nas lesões desses animais através da técnica de RT-PCR semi-quantitativa. Os resultados apresentados demonstraram que a expressão de RNAm para as quimiocinas MIG e MCP-5 foi significativamente maior nas lesões de camundongos do grupo *Lm* nos diferentes períodos após infecção. Camundongos infectados com *La* apresentaram uma baixa expressão de MIG, CRG-2, KC e TNF- $\alpha$  no primeiro dia após a infecção e um aumento na expressão de IL-4 no 40º dia. Esses dados demonstram uma expressão diferenciada de RNAm para quimiocinas e citocinas em camundongos CBA infectados com *Lm* e *La* que pode estar relacionada com os diferentes perfis de infiltrado inflamatório e resposta imuno-celular envolvidos com resistência ou susceptibilidade.

Palavras-chave: 1. Camundongo CBA. 2. Leishmaniose. 3. *Leishmania major*. 4. *Leishmania amazonensis*. 5. Imunopatologia. 6. Citocinas. 7. Quimiocinas.

## ABSTRACT

**mRNA EXPRESSION OF CHEMOKINES AND CYTOKINES IN THE *IN SITU* IMMUNE-INFLAMMATORY RESPONSE OF CBA MICE INFECTED WITH DIFFERENT SPECIES OF *Leishmania*. MARCUS WELBY-BORGES.** CBA mice are resistant to *L. major* (*Lm*) and are highly susceptible to *L. amazonensis* (*La*) infection. Resistance and susceptibility in this model are associated with a Th1 and a Th2 type-immune response, respectively. Resistance to *Lm* is mediated by a Th1 type-immune response, whereas susceptibility to *La* is associated with a Th2 type-immune response. Lesions of *Lm* infected CBA mice present a mixed mononuclear inflammatory cell infiltrate composed of few infected macrophages, granulomas and a progressive increase in the number of lymphocytes. In contrast, CBA mice infected with *La* show a tissue reaction constituted by a monomorphic infiltrate of heavily parasitized macrophages and scanty lymphocytes. Given the role of chemokines in the recruitment of leukocytes, we decided to analyze whether differences in inflammatory infiltration observed in the CBA infected with *La* or *Lm* could be due to a differential expression of chemokine genes. CBA Mice were infected in the hind footpad with  $5 \times 10^6$  promastigotes of *La* or *Lm* and a semi quantitative RT-PCR was used to measure the mRNA expression of CXC chemokines (KC, MIG and CRG-2), CC chemokines (JE/MCP-1, MCP-5 and RANTES) and some cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-4). Our results show that the mRNA expression of MIG and MCP-5 was significantly increased in mice infected with *Lm* in the different times after infection. Mice infected with *La* showed a reduced expression of MIG, CRG-2, KC and TNF- $\alpha$  by the first day post-infection and an increase in the expression of IL-4 forty days after infection. Taken together, the results present here show a differential expression of chemokine mRNA in CBA mice infected with *Lm* as compared to those infected with *La*. These differences may be implicated in the different inflammatory cell infiltrate and cellular immune response that correlate with resistance or susceptibility.

1. CBA mice; 2. Leishmaniasis; 3. *Leishmania major*; 4. *Leishmania amazonensis*; 5. Immunopathology; 6. Cytokines; 7. Chemokines.

# 1 INTRODUÇÃO:

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A leishmaniose é uma doença endêmica, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que ocorre em diversas regiões tropicais e subtropicais do globo, incluindo o Brasil. Representa uma das seis mais importantes endemias do mundo e constitui um sério problema de saúde pública (GRIMALDI et al., 1989).

Em humanos, a infecção por *Leishmania* apresenta diversas formas clínicas, relacionadas com a espécie do parasito e com a capacidade do hospedeiro em montar uma resposta imune eficaz contra o patógeno (TURK & BRYCESON, 1971). A doença pode envolver pele e mucosas, na forma tegumentar, e órgãos internos na forma visceral (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

A incidência de leishmaniose no Brasil vêm aumentando nos últimos anos, principalmente nas regiões cujos sistemas ecológicos têm sofrido maior interferência do homem, bem como nas áreas urbanas desprovidas de infra-estrutura sanitária, permitindo a expansão de novos focos e favorecendo a ocorrência de epidemia (MERCHÁN-HAMANN, 1997). No período de 1984 a 1994, foram notificados 14.964 casos de leishmaniose visceral, sendo 70,4% dos casos registrados nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (BRASIL, 1996). Em relação à leishmaniose tegumentar, foram descritos 63.078 casos das formas cutânea localizada e cutâneo-mucosa da doença, entre 1971 e 1980, sendo a maior incidência no estado do Ceará (GRIMALDI et al., 1989). Na Bahia, a Fundação Nacional de Saúde (FNS) registrou um

total de 2.877 novos casos em 1989 e de 4.105 casos em 1994, sendo Ilhéus a cidade mais atingida, com 70,89% dos casos registrados no período (MERCHÁN-HAMANN, 1997). O Ministério da Saúde, juntamente com a FNS, registrou um aumento na incidência de leishmaniose tegumentar de 10,45 para 22,81 casos/ 100.000 habitantes, no período de 1985 a 1995 (SILVA et al., 1997).

## 1.2 O PARASITO

*Leishmania* são parasitos digenéticos, pertencentes ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, cujo ciclo de vida apresenta três estágios em diferentes hospedeiros: um flebótomo (vetor) e um hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas de fase estacionária (metacíclicas) e logarítmica de crescimento são encontradas no interior do trato digestivo do inseto vetor, enquanto a forma amastigota é parasito intracelular de células do sistema fagocítico mononuclear. O ciclo de vida desses protozoários têm início quando flebátomos fêmeas infectados pelo parasito, ao realizarem um novo repasto sangüíneo, injetam formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* junto com saliva na pele do hospedeiro mamífero. Esses parasitos são posteriormente fagocitados por macrófagos e no seu interior assumem a forma amastigota, iniciando um processo de replicação intracelular no interior de compartimentos fagolisossomais, que permite a manutenção dos parasitos no tecido (TITUS et al, 1993).

A capacidade de sobrevivência no interior das células do hospedeiro vertebrado reflete a adaptação evolutiva desses parasitos para evadir e resistir aos mecanismos efetores das respostas imunes do hospedeiro (HOWARD et al., 1980; MOSSER &

ROSSENTHAL, 1994). Diversas estratégias podem ser utilizadas por estes organismos para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, dentre as quais pode-se destacar a atividade de moléculas secretadas ou expressas na superfície do parasito, a exemplo de PPG (proteofosfoglicano), LPG (lipofosfoglicano), gp63 ou PSP (protease de superfície de promastigotas) e GIPLs (glicoinositolfosfolipídeos).

Diversos trabalhos têm evidenciado que o LPG e o gp63, principais moléculas de superfície de *Leishmania*, funcionam como importantes fatores de virulência do parasito (TURCO & DESCOTEAUX, 1992; KELLEHER et al., 1995; BRITTINGHAM et al., 1995; STREIT et al., 1996). O LPG constitui o principal glicoconjugado da superfície de formas promastigotas de *Leishmania* e protege o parasito contra destruição intracelular, através da inibição de moléculas envolvidas nos processos relacionados com ativação e quimiotaxia de monócitos, a exemplo da proteína cinase C (PKC) e IL-1 $\beta$  (DESCOTEAUX et al., 1992). Além disso, o LPG também está envolvido na inibição da ativação de células endoteliais humanas, diminuindo a produção de quimiocinas como MCP-1 e na proteção do parasito contra lise mediada pelo complemento e por metabólitos reativos de oxigênio (LO et al., 1998; TURCO & DESCOTEAUX, 1992; BEVERLEY & TURCO, 1998). O gp63 constitui uma glicoproteína com atividade proteolítica capaz de se ligar ao receptor de complemento expresso na superfície de macrófagos, impedindo a fixação do complemento e favorecendo o estabelecimento da infecção nessas células (BRITTINGHAM et al., 1995).

### 1.3 LEISHMANIOSES: ASPECTOS CLÍNICOS

As leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies de *Leishmania* e a depender da espécie infectante pode apresentar-se clinicamente sob duas formas diferentes : tegumentar ou visceral.

A leishmaniose tegumentar apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, podendo causar lesões desfigurantes, a depender da resposta imune do hospedeiro à infecção (TURK & BRYCESON, 1971). A leishmaniose cutânea localizada (LCL) e a cutâneo-mucosa (LCM) constituem o polo responsivo ou alérgico da doença, enquanto a leishmaniose cutânea difusa (LCD) representa o polo não responsivo ou anérgico.

Parasitas do complexo *L. donovani* estão relacionados, tanto no Novo quanto no Velho Mundo, com a infecção de células do sistema fagocítico mononuclear de órgãos internos como fígado, baço e medula óssea. No entanto, *L. infantum*, *L. donovani* e *L. chagasi* podem também causar LCL e LCM . No Novo Mundo os parasitos que causam LCL e LCM são agrupados nos complexos *L. braziliensis* e *L. mexicana* . Parasitos do complexo *L. braziliensis* geralmente causam LCL e LCM enquanto parasitos do complexo *L. mexicana*, na maioria dos casos, não afetam a mucosa, causando apenas lesões cutâneas limitadas que curam espontaneamente (BARRAL et al., 1991; GHALIB et al.,1992).

A *L. amazonensis*, associada comumente com lesões localizadas de pele, pode também estar relacionada com LCM e leishmaniose visceral (LV) em alguns casos (BARRAL et al., 1991). No Velho Mundo, *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. major* são

agentes causadores da LCL, entretanto *L. tropica* pode causar doença visceral (BITTENCOURT & BARRAL-NETO, 1995).

Na LCL as lesões surgem no local da picada do flebótomo sob a forma de uma pequena pápula que se desenvolve em um nódulo ulcerado no centro. O aspecto mais freqüente observado nos casos de pacientes com LCL é uma úlcera localizada, com bordas elevadas e fundo plano, presente nas áreas mais expostas do corpo, que tende a cicatrizar espontâneamente ou a apresentar curso indolente. Com menos freqüência, as lesões podem aumentar de tamanho, tornando-se nodulares ou verrucosas, com ou sem ulcerações (GRIMALDI, 1982).

Nos pacientes com LCM a lesão mucosa pode aparecer algumas semanas ou anos após o desaparecimento da lesão inicial, devido a um provável quadro de disseminação hematogênica do parasito, para sítios da mucosa nasal, palato, úvula, faringe e lábio superior, causando destruição desses sítios e podendo ocorrer perfuração do septo nasal (MAUEL & BEHIN, 1981; MARSDEN, 1986). Alguns autores, frente a natureza crônica e destrutiva da LCM, têm considerado essa forma clínica como pólo hiperérgico da doença devido a intensa resposta imune mediada por células aos antígenos de *Leishmania* (CASTES et al., 1983; CARVALHO et al., 1985; COUTINHO, 1987).

Na LCD as lesões evoluem formando pápulas, nódulos ou infiltrações difusas, de distribuição simétrica na face, tronco e membros, podendo disseminar-se para todo o corpo. Os pacientes com esta forma da doença não apresentam resposta de hipersensibilidade do tipo tardia a antígenos do parasito, apresentando uma reação de Montenegro negativa (CASTES et al., 1983). Nestes casos verifica-se disseminação

dos parasitos de um sítio para outro através do sistema linfático, sem ocorrer visceralização (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995; MAUEL & BEHIN, 1981).

#### 1.4 O MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Diversos modelos vêm sendo desenvolvidos para se estudar as relações entre *Leishmania*, seus hospedeiros mamíferos e seus insetos vetores, dentre os quais pode-se destacar o modelo murino, que constitui um importante instrumento para pesquisa dessas relações, pelo fato de camundongos isogênicos apresentarem padrões distintos de resposta à infecção por uma única ou por diferentes espécies de *Leishmania*. Na leishmaniose tegumentar, esses animais reproduzem experimentalmente algumas características das manifestações clínicas observadas na doença humana.

A gravidade e o resultado da infecção são geneticamente determinados, podendo estar relacionados com o “background” genético do hospedeiro e da *Leishmania*. Algumas linhagens de camundongos como C3H/He, C57BL/6, C57BL/10, ATL e CBA são resistentes à infecção por *L. major* e são susceptíveis à infecção por parasitos do complexo Mexicana, como *L. mexicana*, enquanto camundongos da linhagem BALB/c são susceptíveis a infecção por ambas as espécies de *Leishmania* (ALEXANDER & BLACKWELL, 1986). Na infecção com *L. amazonensis* verifica-se uma maior variação no espectro de susceptibilidade, a depender da linhagem de camundongo. A maioria das linhagens investigadas desenvolve lesões que não curam (CALABRESE & COSTA, 1992; SOONG et al., 1997). Estes estudos reforçam a importância de fatores relacionados à espécie de *Leishmania* no curso da infecção.

Os camundongos que apresentam um perfil de resistência desenvolvem um padrão histológico semelhante ao observado na LCL humana, com um aumento no número de linfócitos nas lesões, formação de granulomas e escasso parasitismo. Estes animais apresentam lesões localizadas e são capazes de montar uma resposta imune protetora e destruir os parasitos, apresentando cura espontânea das lesões. Nos camundongos com perfil de susceptibilidade observa-se um número reduzido de linfócitos, não se formam granulomas e o parasitismo é intenso em macrófagos. As lesões apresentam um crescimento progressivo, com ulceração e necrose lítica, podendo ocorrer visceralização, metástase e morte dos animais. Além disso, não se observa resposta imune celular protetora (BRADLEY & KIRKLEY, 1977; PÉREZ et al., 1978; BEHIN et al., 1979; ANDRADE et al., 1984).

Grande parte do conhecimento acerca da resposta imune na leishmaniose resulta de estudos que se utilizaram da infecção experimental de diferentes linhagens de camundongos isogênicos com *L. major*, um dos agentes causadores da leishmaniose cutânea localizada humana no Velho Mundo. Diversos estudos têm demonstrado que a imunidade protetora contra o parasito está relacionada com o desenvolvimento de uma resposta imune mediada por células enquanto uma resposta humoral tem pouca importância na resolução das lesões (LIEW et al, 1986; SCOTT, 1989; MÜLLER et al., 1992; LIEW & O'DONNELL, 1993; MCSORLEY et al., 1996). A transferência passiva de soro ou frações de anticorpos de camundongos imunes, por um período prolongado, não altera o curso da infecção em camundongos BALB/c (HOWARD, 1984). Experimentos utilizando camundongos Biozzi AB/L (seleção I), deficientes na resposta humoral, demonstram que esses animais são resistentes à infecção por *L. major*, apresentando lesões pequenas que curam espontaneamente

(HALE & HOWARD, 1981 apud LIEW & O'DONNELL, 1993 e MCSORLEY et al., 1996). FALCOFF et al. (1991) também demonstraram que camundongos H<sub>I</sub> e H<sub>II</sub>, selecionados por produzirem níveis elevados de anticorpos, são susceptíveis à infecção com *L. amazonensis*, enquanto camundongos L<sub>I</sub> e L<sub>II</sub>, que apresentam baixa produção de anticorpos, são resistentes. Por outro lado, estes dados não excluem a possibilidade de que anticorpos específicos contra o parasito, presentes no momento da inoculação, venham a interferir na fase inicial da infecção, já que algumas formas promastigotas de *Leishmania* não são imediatamente internalizadas pelos macrófagos presentes no sítio de inoculação. Alguns estudos têm demonstrado que o soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. mexicana amazonensis* aumenta a internalização do parasito por macrófagos peritoneais *in vitro* (REIS et al., 1987). A administração de anticorpos monoclonais contra uma glicoproteína de 46 kD de *L. amazonensis* previne a infecção de camundongos com parasitos virulentos (ANDERSON et al., 1983; CHAMPSI & McMAHON-PRATT, 1988). A imunização de camundongos com a glicoproteína M-2 de membrana de *L. amazonensis*, antes de um subsequente desafio, também foi capaz de prevenir a infecção (CHAMPSI & McMAHON-PRATT, 1988).

Se por um lado não há evidências de que os anticorpos exerçam uma papel chave na resolução da doença, o envolvimento de células T CD4<sup>+</sup> constitui fator crucial na determinação dos padrões de resposta relacionados com resistência ou susceptibilidade à infecção com *Leishmania*. A importância dessas células têm sido demonstrada por diversos grupos através da transferência adotiva de células T CD4<sup>+</sup> normais, conferindo resistência à camundongos nude (nu/nu), transferência de células T CD4<sup>+</sup> imunes, que conferem proteção à camundongos normais, ou pela depleção de células T CD4<sup>+</sup>, que reverte camundongos resistentes em susceptíveis à infecção

(MITCHELL et al. 1980; TITUS et al., 1987; MÜLLER et al., 1992). Por outro lado, como mencionado acima, as células T CD4+ também estão relacionadas com susceptibilidade à infecção com *Leishmania*, já que camundongos BALB/c, altamente susceptíveis à infecção com *L. major*, controlam a infecção quando são irradiados ou depletados de células T CD4+ antes da infecção (HOWARD et al., 1981; TITUS et al., 1985b). Essa resistência adquirida pode ser revertida através da transferência de células T CD4+ de animais com doença progressiva para camundongos irradiados de células T (HOWARD et al., 1981).

O envolvimento de células T CD4+ nos padrões de resistência ou susceptibilidade na infecção de camundongos com *Leishmania* reflete uma heterogeneidade nesse compartimento que está relacionada com o perfil de citocinas produzido por essas células. Em camundongos infectados com *L. major*, que apresentam um perfil de resistência, observa-se a expansão de uma subpopulação de células T CD4+ que expressam preferencialmente RNAm para citocinas do tipo Th1 como IFN- $\gamma$  e IL-2, enquanto células T CD4+ de camundongos susceptíveis demonstram uma maior expressão de citocinas do tipo Th2 como IL-4 e IL-10 (HEINZEL et al., 1989; HEINZEL et al., 1991; LOCKSLEY et al., 1987).

O IFN- $\gamma$  é tido como o principal mediador de resistência à infecção com *Leishmania*, devido a sua capacidade de ativar macrófagos, habilitando-os à destruir formas amastigotas intracelulares do parasito (NATHAN et al., 1983; TITUS et al., 1984). O uso de anticorpos monoclonais anti-IFN- $\gamma$  administrado em camundongos resistentes durante ou nas fases mais iniciais da infecção resulta em aumento da produção de IL-4, aumentando o tamanho das lesões (BELOSEVIC et al., 1989;

MÜLLER et al., 1989; SADICK et al., 1990). O IFN- $\gamma$  recombinante sozinho, quando administrado em camundongos BALB/c durante o curso da infecção, não é capaz de gerar imunidade contra o parasito (LOCKSLEY et al., 1987). Provavelmente a ação de outras citocinas podem estar contribuindo no mecanismo de ativação de macrófagos e na conseqüente destruição dos parasitos. A ação sinérgica de IFN- $\gamma$  com TNF- $\alpha$  ou LPS sobre os macrófagos é capaz de estimular a síntese de NO, que representa um dos principais mecanismos leishmanicidas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BOGDAN et al., 1990; GREEN et al., 1990; LIEW et al., 1990a).

A IL-4 funciona como uma citocina que inibe a ativação de macrófagos, juntamente com IL-10 e TGF- $\beta$ , e apresenta um importante papel na progressão da doença (NACY et al., 1991; LIEW et al., 1989; BOGDAN et al., 1991). IL-4 modula respostas Th1 e constitui o principal fator para gerar respostas do tipo Th2, possivelmente por um efeito direto sobre o macrófago ou estimulando a síntese de IL-10, que atua inibindo a produção de IFN- $\gamma$  e, conseqüentemente, modulando a ativação dessas células (FIORENTINO et al., 1991; HSIEH et al., 1992; TANAKA et al., 1993). O tratamento de camundongos BALB/c com anti-IL4 na fase inicial da infecção, torna-os capazes de produzir níveis elevados de IFN- $\gamma$ , convertendo-os em resistentes à *L. major* (SADICK et al., 1990).

Além de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10, outras citocinas como IL-12, TNF- $\alpha$ , e TGF- $\beta$ , podem estar envolvidas na determinação de um ou outro tipo de fenótipo Th. IL-12 é um fator produzido por células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas, e está relacionada com a estimulação de células Th1, embora na presença de IL-4 possa também induzir células Th2 (TRINCHIERI, 1995; LAMONT &

ADORINI, 1996). O tratamento de camundongos susceptíveis com IL-12 recombinante é capaz de curar a infecção com *L. major* nesses animais, desde que o tratamento seja realizado na primeira semana de infecção (HEINZEL et al., 1993; SYPEK et al., 1993).

O TNF- $\alpha$  também apresenta um importante papel no controle das lesões cutâneas de camundongos infectados com *Leishmania*. O tratamento de camundongos resistentes ou susceptíveis com TNF- $\alpha$  resulta na diminuição do tamanho das lesões e do número de parasitos em relação à camundongos não tratados. Além disso, o tratamento com anti-TNF- $\alpha$  exacerba a doença (TITUS et al., 1989; LIEW et al., 1990b). O mecanismo de ação de TNF- $\alpha$  está relacionado com o aumento da ativação de macrófagos e conseqüente destruição de parasitos (LIEW et al., 1990a). ARNOLDI & MOOL (1998) demonstraram que a depleção de TNF- $\alpha$ , *in vivo*, reduz a carga de parasitos e a quantidade de células de Langerhans infectadas no linfonodo de drenagem de camundongos BALB/c infectados com *L. major*. Nesse mesmo trabalho, os autores demonstraram ainda que a administração de TNF- $\alpha$  recombinante reverte esse efeito, estimulando a migração e acumulação dessas células no linfonodo desses animais (ARNOLDI & MOOL, 1998). Esses dados demonstram a participação do TNF- $\alpha$  nos eventos relacionados com a quimiotaxia e migração de células para sítios distantes.

A ação do TGF- $\beta$  têm sido descrita nos eventos iniciais da infecção relacionados com os mecanismos que promovem a inativação de macrófagos. O tratamento de camundongos BALB/c infectados com TGF- $\beta$  recombinante exacerba a infecção com *L. braziliensis* nesses animais, correlacionando-se com o aumento na expressão de RNAm para IL-10 (BARRAL et al., 1993). Além disso, TGF- $\beta$  está relacionado com a inibição da expressão de iNOS por macrófagos ativados por MIF nas lesões cutâneas

de camundongos infectados com *L. major* (CUNHA et al., 1993; STENGER et al., 1994).

## 1.5 O CBA COMO MODELO DE RESISTÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO POR DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*

Alguns trabalhos têm demonstrado que camundongos da linhagem CBA apresentam um padrão de resistência quando infectados com *L. major*, desenvolvendo lesões cutâneas localizadas que evoluem para cura espontânea e tornando esses animais imunes à reinfecção (BEHIN et al., 1979). A infecção com *L. amazonensis* têm sido pouco explorada, no entanto os poucos trabalhos existentes na literatura demonstram que a infecção induz lesões de crescimento progressivo nesses camundongos, sendo considerados susceptíveis à essa espécie de *Leishmania* após experimentos de imunização, mas relativamente resistentes quando comparados com camundongos da linhagem BALB/c (CHAMPSI & PRATT, 1988; SOONG et al., 1995).

Os estudos de SOUZA (1998) demonstraram que camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazonensis* apresentam distintos perfis morfológicos de resposta tecidual, no linfonodo de drenagem e no sítio de inoculação dos parasitos. Na infecção por *L. major* observa-se um infiltrado mononuclear misto, com um aumento progressivo do número de linfócitos na lesão, fibrose, necrose fibrinóide e formação de granulomas, que culmina na eliminação dos parasitos e cura espontânea das lesões. Na infecção por *L. amazonensis* observa-se um infiltrado macrofágico difuso, monomórfico, com intenso parasitismo, áreas de necrose lítica, micro-abcessos e úlceras, seguida de disseminação dos parasitos, que resulta na morte desses animais. O perfil de

resistência desses camundongos na infecção por *L. major* correlaciona-se com o fenótipo Th1, com produção aumentada de IFN- $\gamma$ , enquanto o perfil de susceptibilidade observado na infecção por *L. amazonensis* está relacionado com o fenótipo Th2, com produção de IL-4 e ausência de resposta Th1, como amplamente descrito na literatura para outras linhagens de camundongos infectados com *Leishmania* (BOTTOMLY, 1988; LIEW & O'DONNELL, 1993; MCSORLEY et al., 1996; MÜLLER et al., 1992; MOSSMANN & COFFMAN, 1989).

Os aspectos histopatológicos relacionados com resistência nos camundongos CBA assemelham-se aos observados por BARRAL-NETTO et al. (1987b) em estudos com camundongos BALB/c imunizados previamente com antígenos solúveis de *L. amazonensis* e desafiados posteriormente, enquanto animais não imunizados demonstraram o mesmo aspecto observado nas lesões de camundongos CBA susceptíveis. ANDRADE et al. (1984) também demonstraram padrões diferentes de resposta tecidual em camundongos A/J e BALB/c infectados com *L. amazonensis*, semelhantes aos observados no modelo de infecção do CBA. Camundongos A/J apresentaram lesões cutâneas caracterizadas pela presença de um nódulo localizado, com infiltrado celular misto e focal, constituído de muitos linfócitos, plasmócitos, fibroblastos e dispersos macrófagos parasitados. As lesões desses animais apresentaram áreas focais de necrose fibrinóide, presença de pequenos granulomas e fibrose intersticial e periférica. Nos camundongos BALB/c as lesões apresentaram extensas áreas de necrose coagulativa, com um infiltrado monomórfico composto basicamente de macrófagos vacuolados de citoplasma amplo e densamente parasitados (ANDRADE et al., 1984). Os mecanismos responsáveis pelas diferenças na

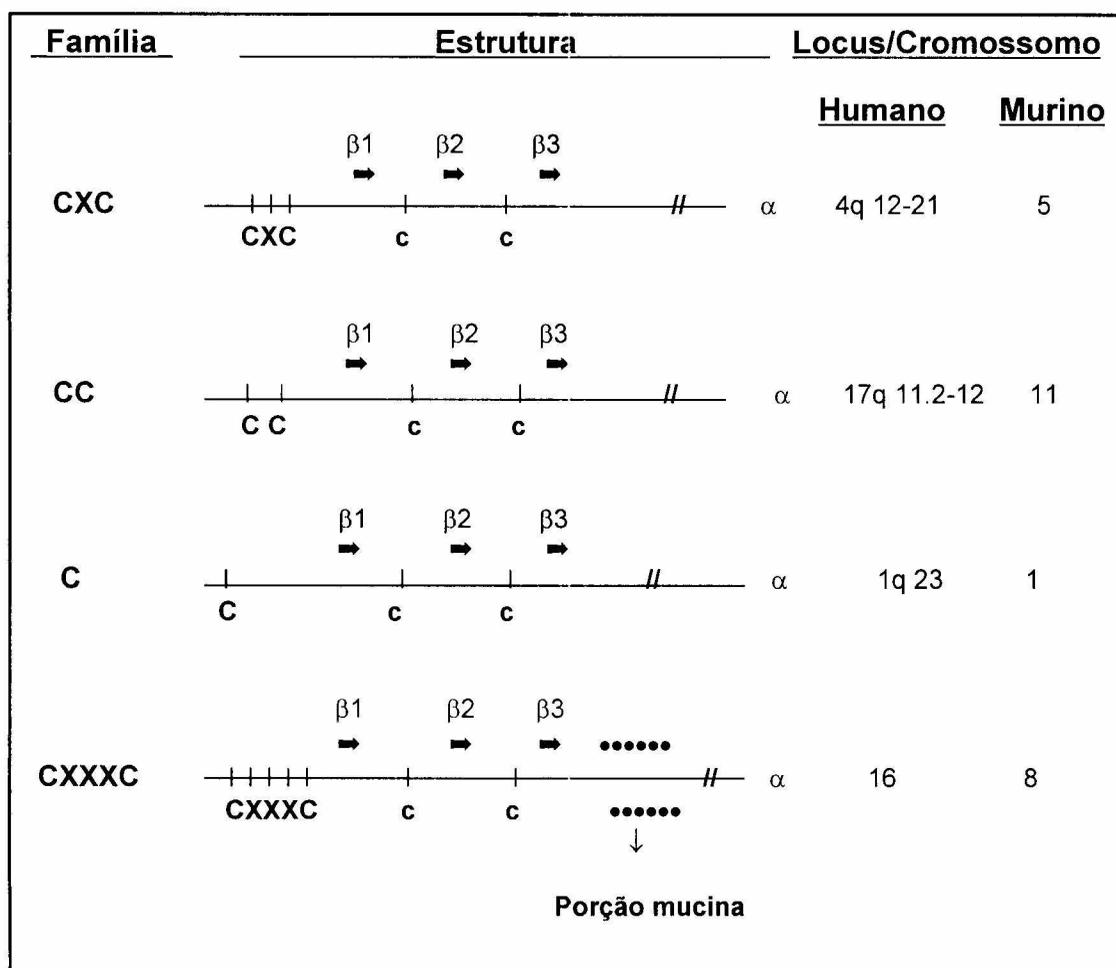
composição de células do infiltrado inflamatório de camundongos que apresentam perfis de resistência ou susceptibilidade à diferentes espécies de *Leishmania* não têm sido amplamente explorados.

## 1.6 QUIMIOCINAS

As quimiocinas constituem uma grande família de citocinas de 8 a 10 kD com ação quimiotática e que apresentam 20 a 70% de homologia entre si nas suas seqüências de aminoácidos (LUSTER, 1998). A função das quimiocinas está relacionada com a habilidade de estimular a movimentação, o direcionamento e a infiltração de leucócitos através do endotélio, permitindo que essas células cheguem ao tecido e desempenhem as suas atividades inflamatórias. São produzidas por muitos tipos celulares como monócitos, macrófagos alveolares, neutrófilos, plaquetas, eosinófilos, mastócitos, células epitelióides, linfócitos T, células NK, queratinócitos, células endoteliais, fibroblastos, células musculares e hepatócitos. Os estímulos para que estas células produzam quimiocinas podem ser diversos, incluindo produtos bacterianos, C5a, LTB<sub>4</sub>, IFN's e citocinas pró-inflamatórias da fase aguda como IL-1 e TNF- $\alpha$  (STRIETER et al., 1996).

Esses fatores quimiotáticos estão agrupados em subfamílias, com base na posição dos resíduos de cisteína que compõem a molécula madura. As CXC ou  $\alpha$ -quimiocinas possuem um aminoácido não conservado separando os dois primeiros resíduos de cisteína enquanto que nas CC ou  $\beta$ -quimiocinas estes resíduos de cisteína são adjacentes. Existem ainda dois novos grupos de citocinas quimiotáticas denominados de C e CX<sub>3</sub>C quimiocinas. A subfamília das C quimiocinas, representada apenas pela "linfotactina", apresenta apenas um resíduo de cisteína na região N-terminal. A CX<sub>3</sub>C quimiocina, também referida como "fractalcina" ou "neurotoxina", apresenta três aminoácidos entre os dois primeiros resíduos de cisteína e além disso é

caracterizada pela presença de um extenso domínio mucina N-terminal, cuja função ainda não é conhecida (ROLLINS, 1997; LUSTER, 1998). As quimiocinas, de uma maneira geral, apresentam semelhanças estruturais entre si, possuindo pelo menos três folhetos  $\beta$  pregueados, além de uma  $\alpha$ -hélice na região C-terminal, como evidenciado na Figura 1( $\beta$ 1-3 e  $\alpha$ ).



**Figura 1: Estrutura e localização das principais famílias de quimiocinas nos cromossomos humanos e murinos.** As homologias estruturais entre os grupos é evidenciada pelos folhetos  $\beta$  pregueados ( $\beta$ 1-3),  $\alpha$ -hélice C-terminal ( $\alpha$ ) e resíduos de cisteína (C e c). (Baseado no modelo de ROLLINS, 1997)

### 1.6.1 CXC quimiocinas

A maioria dos genes que codificam as CXC quimiocinas está localizada no cromossomo humano 4q12-21 e em camundongos localiza-se no cromossomo 5 (BAGGIOLINI et al., 1994; RAPORT et al., 1996; ROLLINS, 1997). As CXC quimiocinas podem ser subdivididas em quimiocinas ELR e não ELR, de acordo com a presença ou ausência de uma seqüência conservada de aminoácidos glutamato-leucina-arginina (ELR) presente entre a região N-terminal da proteína e a primeira cisteína. As quimiocinas ELR possuem esta seqüência e são potentes quimiótaticos para neutrófilos, enquanto as que não apresentam atuam predominantemente sobre linfócitos (BAGGIOLINI et al., 1994; ROLLINS, 1997; LUSTER, 1998). Dentre as quimiocinas ELR destacam-se a IL-8 (interleucina-8), os GRO- $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (oncogene relacionado ao crescimento- $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), o NAP-2 (peptídeo ativador de neutrófilos-2), o ENA-78 (peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais-78) e o LIX (CXC quimiocina induzida por LPS), dentre outras. As principais quimiocinas não ELR são PF-4 (fator plaquetário-4), IP-10 (proteína induzida por interferon- $\gamma$ ), MIG (monocina induzida por interferon- $\gamma$ ) e SDF-1 (fator derivado de células estromais -1) (CLARK-LEWIS, 1991; SCHALL & BACON, 1994; BAGGIOLINI et al., 1994; LOETSCHER, 1996; ROLLINS, 1997; LUSTER, 1998). Os homólogos murinos para essas moléculas, bem como as principais células-alvo em que elas agem diretamente, são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1: Principais CXC quimiocinas ELR e não ELR e principais células-alvo nas quais elas atuam.**

CXC QUIMIOCIAS		CÉLULAS-ALVO
HUMANO	CAMUNDONGO	
<b>• ELR</b>		
IL-8	-	Neutrófilos, linfócitos T, basófilos, céls. endoteliais (?)
GRO- $\alpha$ (MGSA)	KC	Neutrófilos, melanócitos, céls. endoteliais (?)
GRO- $\beta$	MIP-2 $\alpha$	Neutrófilos, melanócitos, céls. endoteliais (?)
GRO- $\gamma$	MIP-2 $\beta$	Neutrófilos, melanócitos, céls. endoteliais (?)
ENA-78	?	Neutrófilos
NAP-2	?	Neutrófilos; basófilos
LIX	?	Neutrófilos
<b>• não ELR</b>		
PF-4	PF-4	Fibroblastos; céls. endoteliais
IP-10	CRG-2	Linfócitos T ativados; céls. NK; céls. endoteliais (?)
MIG	MIG	Linfócitos T ativados
SDF-1	SDF-1	Linfócitos T e B

( STRIETER et al., 1996; ROLLINS, 1997; LUSTER, 1998)

### 1.6.2 CC quimiocinas

Os genes que codificam as CC quimiocinas estão agrupados no cromossoma humano 17q11.2-12, enquanto no camundongo eles localizam-se no cromossomo 11 (BAGGIOLINI et al., 1994; RAPORT et al., 1996; ROLLINS, 1997). Dentre as principais moléculas que integram esta subfamília pode-se destacar os MCP-1, 2, 3, 4 e 5 (proteína quimiotática de monócitos-1, 2, 3, 4 e 5), o RANTES (quimiocina regulada pela ativação de células T normais), os MIP-1  $\alpha$  e  $\beta$  (proteína inflamatória de

macrófagos  $\alpha$  e  $\beta$ ), o I-309 e a Eotaxina. As CC quimiocinas não parecem ter uma ação direta sobre neutrófilos e atuam, preferencialmente, na quimiotaxia de monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos para os tecidos, como descrito na Tabela 2 (LUSTER, 1998; SCHALL & BACON, 1994);

**Tabela 2: Principais CC quimiocinas e células-alvo nas quais elas atuam.**

CC quimiocinas		CÉLULAS ALVO
HUMANO	CAMUNDONGO	
Eotaxina	Eotaxina	Eosinófilos
I-309	TCA-3	Monócitos
MCP-1/MCAF	JE-	Monócitos, linfócitos T de memória, basófilos, céls. NK
MCP-2, 3 e 4	?	Monócitos, linf. T e de memória; eosinófilos, céls. NK
-	MCP-5	Monócitos, linfócitos T; eosinófilos
MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\alpha$	Monócitos, linfócitos T, basófilos; eosinófilos; céls. dendríticas e NK
MIP-1 $\beta$	MIP-1 $\beta$	Monócitos, linfócitos T, basófilos; eosinófilos; céls. dendríticas e NK
-	MIP-1 $\gamma$	Linfócitos T ativados e em repouso
RANTES	RANTES	Monócitos, linfócitos T, basófilos; eosinófilos; céls. dendríticas e NK

( STRIETER et al., 1996; ROLLINS, 1997; LUSTER, 1998)

### 1.6.3 Receptores de quimiocinas

Os eventos que determinam a ativação, movimentação e endereçamento de leucócitos através do endotélio parecem ser bastante complexos e multirregulados,

envolvendo a participação de diversas moléculas expressas na membrana dessas células, como quimiocinas, selectinas, integrinas e os próprios receptores de quimiocinas. Esses receptores apresentam sete passagens pela membrana e são estruturalmente relacionados, estando normalmente acoplados a proteínas G (PREMACK & SCHALL, 1996; MURPHY, 1994). As selectinas permitem a ligação e o rolamento dos leucócitos sobre a superfície das células endoteliais, enquanto a ligação das quimiocinas a seus receptores aciona uma série de eventos que estimulam o aumento do cálcio intracelular e a conseqüente ativação de diversas isoformas de proteínas cinase C, relacionadas com ativação das funções desses leucócitos. Além disso, as interações quimiocina/receptor aumentam a afinidade das ligações mediadas pelas selectinas e intensifica a expressão de integrinas por essas células, permitindo o ancoramento no endotélio e a migração desses leucócitos para o tecido adjacente, onde estarão aptos a desenvolver suas funções, relacionadas com fagocitose de microorganismos, secreção de grânulos contendo enzimas degradadoras e agentes microbianos e ativação de vias relacionadas com a produção de metabólitos reativos do oxigênio (GERARD E GERARD, 1994; BOKOCH, 1995; PREMACK & SCHALL, 1996).

Um dos principais problemas encontrados no estudo da fisiologia das quimiocinas é o fato de que essas moléculas ligam-se a diferentes tipos de receptores (ROLLINS, 1997). Entretanto, apesar das muitas discussões a respeito dos receptores de quimiocinas e seus ligantes, existe um certo consenso no fato de que não existe ligação cruzada entre receptores de CXC quimiocinas (CXCR) e CC quimiocinas, nem tão pouco entre CXC quimiocinas e receptores de CC quimiocinas (CCR).

Atualmente , são conhecidos pelo menos cinco receptores do grupo CXCR, nove do grupo CCR e um receptor específico para CX<sub>3</sub>C quimiocina (CX<sub>3</sub>CR), que se liga à “fractalcina” . Além desses receptores existe o DARC (“duffy antigen receptor for chemokines”) que é estruturalmente homólogo aos demais receptores de quimiocinas. Este receptor é expresso na superfície de eritrócitos e células endoteliais, sendo considerado de ação “promíscua” pelo fato de se ligar a diversas CC e CXC quimiocinas, sem que haja indução do influxo de cálcio nas células alvo, como ocorre com receptores de outros grupos ao serem ativados (NEOTE et al., 1993; HORUK et al., 1993; LUSTER, 1998).

Os receptores de quimiocinas são expressos em diferentes tipos de leucócitos e podem ser compartilhados por quimiocinas de um mesmo grupo ou podem apresentar um ligante específico. Alguns são restritos a determinadas células, como é o caso de CXCR1, ligante da IL-8, expressos apenas em neutrófilos. Outros receptores são expressos em diversos tipos celulares, a exemplo dos receptores do grupo CCR. Determinados receptores podem estar relacionados com a natureza da resposta imune, sendo diferentemente expressos em subpopulações de linfócitos Th1 e Th2 (Tab. 3).

**Tabela 3: Receptores de quimiocinas, células em que são predominantemente expressos e seus respectivos ligantes.**

RECEPTOR	CÉLULAS EM QUE PREDOMINAM	LIGANTES
CXCR1	Neutrófilos	IL-8
CXCR2	Neutrófilos	IL-8, GRO- $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ , NAP-2, ENA-78
CXCR3	Linfócitos T ativados (Th1)	IP-10, MIG
CXCR4	Linfócitos T e B	SDF-1
CXCR5	Linfócitos B	BCA-1
CCR1	Monócitos, linfócitos T ativados, eosinófilos, céls. dendríticas	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-3
CCR2	Monócitos, macrófagos, linf. T ativados,	MCP-1, 2, 3, 4 e 5,
CCR3	Basófilos, eosinófilos, linf. T ativados (Th2)	Eotaxina, RANTES, MCP-3, MCP-4
CCR4	Basófilos, plaquetas, linf. T ativados (Th2)	MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-1, TARC
CCR5	Monócitos, macrófagos, céls. dendríticas, linfócitos T ativados (Th1)	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES
CCR6	Linfócitos T, céls. dendríticas	MIP-3 $\alpha$ /LARC
CCR7	Linfócitos T e B	MIP-3 $\beta$ /ELC
CCR8	Monócitos, macrófagos	I-309
CCR9	Céls. não hematopoiéticas	CC quimiocinas
DARC	Eritrócitos	IL-8, GRO-, RANTES, MCP-1
CX <sub>3</sub> CR	Células NK e céls. CD8+	"fractalcina"

( STRIETER et al., 1996; ROLLINS, 1997; SALLUSTO, 1997; BONECCHI, et al., 1998; LUSTER, 1998; WELLS, et al., 1998)

#### 1.6.4 Quimiocinas: Doenças inflamatórias e leishmaniose

A expressão de quimiocinas e de seus receptores vem sendo estudada em diversos processos inflamatórios crônicos como psoríase (GILLITZER et al., 1993), reações de hipersensibilidade tardia relacionadas com sarcoidose e tuberculose (DEVERGNE et al., 1994), inflamação gengival (YU et al., 1993), formação de granulomas na esquistossomose (LUKACS et al., 1993), infecção por HIV (COCCHI et al., 1995; CHOE, et al., 1996) e miocardites relacionadas com a infecção por *Trypanosoma cruzi* (ALIBERTI et al., 1997; SILVA, 1998).

Alguns trabalhos têm revelado que as quimiocinas e seus receptores podem desempenhar um importante papel na regulação da resposta imune, devido à capacidade dessas moléculas de promover o recrutamento seletivo de diferentes tipos celulares para os sítios inflamatórios. Além disso, esses tipos celulares podem apresentar uma expressão diferencial dessas moléculas. SCHRUM et al. (1996) demonstraram recentemente que as quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES, pertencentes à subfamília das CC quimiocinas, estão associadas à uma resposta imune do tipo Th1, ao estudarem a resposta de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de linhagens e clones de linfócitos T humanos à antígenos de *Yersinia enterocolítica*. Nesse mesmo trabalho os autores demonstram que PBMC e clones de linfócitos do fenótipo Th2, estimulados com antígenos de *Ascaris suum*, apresentaram uma baixa expressão dessas quimiocinas.

A participação de receptores de quimiocinas na determinação da natureza da resposta imune tem portanto sido descrita, sendo sua expressão modulada por

citocinas (WELLS et al., 1998). Linfócitos T “naive” apresentam uma maior expressão de CXCR4, um achado consistente com o fato de seu respectivo ligante, o SDF-1, estar associado com o recrutamento de linfócitos T “naive” (OBERLIN et al., 1996). Linfócitos T ativados que expressam CCR3 e CCR4, são predominantemente do tipo Th2, enquanto linfócitos Th1 apresentam uma maior expressão de CXCR3 e CCR5 (BONECCHI, et al., 1998; LUSTER, 1998; WELLS, et al., 1998) (Tab. 3)

Na leishmaniose cutânea os poucos trabalhos relacionando quimiocinas à patogenia da doença têm demonstrado que a grande quantidade de macrófagos presentes tanto nas lesões da forma localizada (LCL) quanto da forma difusa (LCD), bem como as diferenças na composição de subpopulações de células T, estão relacionadas com um padrão diferente de expressão dessas moléculas e que a cura espontânea na LCL está associada com níveis elevados de MCP-1, enquanto a progressão da doença na LCD correlaciona-se com altos níveis MIP-1 $\alpha$  (RITTER et al., 1996). Por outro lado, estas diferenças observadas nas duas formas da doença podem também ser correlacionadas com a atividade de determinadas moléculas expressas na superfície dos parasitas, a exemplo de LPG (lipofosfoglicano), que além de exercerem um efeito inibidor sobre as funções das células fagocíticas, como quimiotaxia, fagocitose e geração de produtos oxidativos (FRANKENBURG et al., 1990; BRANDONÍSIO et al., 1994), podem também diminuir a produção de algumas quimiocinas por células endoteliais, como observado em relação aos níveis de MCP-1 produzidos por monócitos humanos *in vitro* (LO et al., 1998). BADOLATO et al. (1996) também observaram que a infecção de macrófagos humanos com promastigotas de *L. major* estimula a produção de IL-8 e MCAF/MCP-1 nas primeiras horas da infecção, e

discutiram a possibilidade de que estas quimiocinas estejam envolvidas no recrutamento de células-alvo que favorecem a replicação intracelular do parasito. O problema dos estudos com material humano é que estes não permitem a análise temporal da expressão de quimiocinas. Provavelmente, ocorrem variações na expressão destas moléculas no decorrer da infecção.

Alguns modelos animais de doença têm sido utilizados no estudo das relações entre expressão de quimiocinas e processos patológicos (STRIETER et al., 1996), entretanto trabalhos relacionando o envolvimento dessas moléculas na infecção de linhagens isogênicas de camundongos com *Leishmania* são praticamente inexistentes. Estudos, como o de RACCOSIN & BEVERLEY (1997), utilizando Northern blots e sondas de cDNA, demonstraram que macrófagos murinos de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. major* em fase estacionária, expressam transcritos de RNAm para as quimiocinas JE e KC (os homólogos murinos do MCAF/MCP-1 e GRO- $\alpha$  humanos, respectivamente) uma hora após a infecção, sendo que outras quimiocinas e citocinas como TGF- $\beta$ , IL-10, IL-12 ou iNOS não foram induzidas nas primeiras 24 horas. Embora esses dados tenham contribuído na caracterização dos perfis de quimiocinas produzidas por macrófagos infectados com *Leishmania*, os estudos *in vivo* relacionando susceptibilidade ou resistência à infecção de camundongos por *Leishmania* têm sido escassos, bem como trabalhos que descrevam as relações entre a natureza do infiltrado inflamatório e quimiocinas nas lesões desses animais.

SANTIAGO et al. (1998), estudando o modelo de infecção com *L. major* em linhagens de camundongos de diferentes “backgrounds” genéticos, demonstraram que

camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c apresentaram uma maior expressão de RNAm para as quimiocinas MCP-5, IP-10 e RANTES nos primeiros dois dias após infecção em relação aos camundongos resistentes C57BL/6. Entre o 42º e 77º dia de infecção, esses autores observaram uma inversão no padrão de expressão dessas quimiocinas que foram moduladas negativamente nos animais susceptíveis enquanto camundongos resistentes além de demonstrarem, nesse mesmo tempo, uma maior expressão de MCP-5, IP-10 e RANTES, também apresentaram um aumento na expressão de RNAm para MIG.

Alguns trabalhos têm utilizado o estudo das quimiocinas para avaliar o papel de determinados tipos celulares na infecção de camundongos com *L. major*. A análise da expressão de RNAm para algumas quimiocinas ativadoras de células NK no linfonodo de camundongos BALB/c e C57BL/6, após os três primeiros dias de infecção com *L. major* demonstrou uma maior expressão de IP-10, MCP-1 e “linfotactina” em células de camundongos resistentes C57BL/6, enquanto RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  foram igualmente expressas em células de ambas as linhagens. O tratamento de camundongos susceptíveis BALB/c com IP-10 recombinante após infecção, apesar de aumentar a atividade de células NK nos linfonodos de drenagem desses animais, não promoveu redução no tamanho das lesões (VESTER et al., 1999). ARNOLDI & MOOL (1998) demonstraram que o tratamento de camundongos BALB/c com MIP-1 $\alpha$  recombinante e *L. major* reduziu de forma significativa a taxa de migração de células de Langerhans para o linfonodo de drenagem desses animais, enquanto que o tratamento com MCP-1 e parasitos não altera a migração destas células.

No presente trabalho investigou-se se as diferenças observadas na composição do infiltrado inflamatório de lesões de camundongos resistentes e susceptíveis à infecção por *Leishmania*, descritas por SOUZA (1998), estão relacionadas com diferentes perfis de expressão de algumas quimiocinas e citocinas. A utilização de camundongos isogênicos CBA, que são resistentes à *L. major* e susceptíveis à *L. amazonensis*, oferece a vantagem de evitar a influência do “background” genético do hospedeiro na determinação do tipo de resposta, ao mesmo tempo em que permite considerar o papel do agente na determinação dos diferentes perfis de resposta.

Atualmente , são conhecidos pelo menos cinco receptores do grupo CXCR, nove do grupo CCR e um receptor específico para CX<sub>3</sub>C quimiocina (CX<sub>3</sub>CR), que se liga à “fractalcina” . Além desses receptores existe o DARC (“duffy antigen receptor for chemokines”) que é estruturalmente homólogo aos demais receptores de quimiocinas. Este receptor é expresso na superfície de eritrócitos e células endoteliais, sendo considerado de ação “promíscua” pelo fato de se ligar a diversas CC e CXC quimiocinas, sem que haja indução do influxo de cálcio nas células alvo, como ocorre com receptores de outros grupos ao serem ativados (NEOTE et al., 1993; HORUK et al., 1993;LUSTER, 1998).

Os receptores de quimiocinas são expressos em diferentes tipos de leucócitos e podem ser compartilhados por quimiocinas de um mesmo grupo ou podem apresentar um ligante específico. Alguns são restritos a determinadas células, como é o caso de CXCR1, ligante da IL-8, expressos apenas em neutrófilos. Outros receptores são expressos em diversos tipos celulares, a exemplo dos receptores do grupo CCR. Determinados receptores podem estar relacionados com a natureza da resposta imune, sendo diferentemente expressos em subpopulações de linfócitos Th1 e Th2 (Tab. 3).

**Tabela 3: Receptores de quimiocinas, células em que são predominantemente expressos e seus respectivos ligantes.**

<b>RECEPTOR</b>	<b>CÉLULAS EM QUE PREDOMINAM</b>	<b>LIGANTES</b>
CXCR1	Neutrófilos	IL-8
CXCR2	Neutrófilos	IL-8, GRO- $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ , NAP-2, ENA-78
CXCR3	Linfócitos T ativados (Th1)	IP-10, MIG
CXCR4	Linfócitos T e B	SDF-1
CXCR5	Linfócitos B	BCA-1
CCR1	Monócitos, linfócitos T ativados, eosinófilos, céls. dendríticas	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-3
CCR2	Monócitos, macrófagos, linf. T ativados,	MCP-1, 2, 3, 4 e 5,
CCR3	Basófilos, eosinófilos, linf. T ativados (Th2)	Eotaxina, RANTES, MCP-3, MCP-4
CCR4	Basófilos, plaquetas, linf. T ativados (Th2)	MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-1, TARC
CCR5	Monócitos, macrófagos, céls. dendríticas, linfócitos T ativados (Th1)	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES
CCR6	Linfócitos T, céls. dendríticas	MIP-3 $\alpha$ /LARC
CCR7	Linfócitos T e B	MIP-3 $\beta$ ,/ELC
CCR8	Monócitos, macrófagos	I-309
CCR9	Céls. não hematopoiéticas	CC quimiocinas
DARC	Eritrócitos	IL-8, GRO-, RANTES, MCP-1
CX <sub>3</sub> CR	Células NK e céls. CD8+	"fractalcina"

( STRIETER et al., 1996; ROLLINS, 1997; SALLUSTO, 1997; BONECCHI, et al., 1998; LUSTER, 1998; WELLS, et al., 1998)

#### 1.6.4 Quimiocinas: Doenças inflamatórias e leishmaniose

A expressão de quimiocinas e de seus receptores vem sendo estudada em diversos processos inflamatórios crônicos como psoríase (GILLITZER et al., 1993), reações de hipersensibilidade tardia relacionadas com sarcoidose e tuberculose (DEVERGNE et al., 1994), inflamação gengival (YU et al., 1993), formação de granulomas na esquistossomose (LUKACS et al., 1993), infecção por HIV (COCCHI et al., 1995; CHOE, et al., 1996) e miocardites relacionadas com a infecção por *Trypanosoma cruzi* (ALIBERTI et al., 1997; SILVA, 1998).

Alguns trabalhos têm revelado que as quimiocinas e seus receptores podem desempenhar um importante papel na regulação da resposta imune, devido à capacidade dessas moléculas de promover o recrutamento seletivo de diferentes tipos celulares para os sítios inflamatórios. Além disso, esses tipos celulares podem apresentar uma expressão diferencial dessas moléculas. SCHRUM et al. (1996) demonstraram recentemente que as quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES, pertencentes à subfamília das CC quimiocinas, estão associadas à uma resposta imune do tipo Th1, ao estudarem a resposta de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de linhagens e clones de linfócitos T humanos à antígenos de *Yersinia enterocolitica*. Nesse mesmo trabalho os autores demonstram que PBMC e clones de linfócitos do fenótipo Th2, estimulados com antígenos de *Ascaris suum*, apresentaram uma baixa expressão dessas quimiocinas.

A participação de receptores de quimiocinas na determinação da natureza da resposta imune tem portanto sido descrita, sendo sua expressão modulada por

citocinas (WELLS et al., 1998). Linfócitos T “naive” apresentam uma maior expressão de CXCR4, um achado consistente com o fato de seu respectivo ligante, o SDF-1, estar associado com o recrutamento de linfócitos T “naive” (OBERLIN et al., 1996). Linfócitos T ativados que expressam CCR3 e CCR4, são predominantemente do tipo Th2, enquanto linfócitos Th1 apresentam uma maior expressão de CXCR3 e CCR5 (BONECCHI, et al., 1998; LUSTER, 1998; WELLS, et al., 1998) (Tab. 3)

Na leishmaniose cutânea os poucos trabalhos relacionando quimiocinas à patogenia da doença têm demonstrado que a grande quantidade de macrófagos presentes tanto nas lesões da forma localizada (LCL) quanto da forma difusa (LCD), bem como as diferenças na composição de subpopulações de células T, estão relacionadas com um padrão diferente de expressão dessas moléculas e que a cura espontânea na LCL está associada com níveis elevados de MCP-1, enquanto a progressão da doença na LCD correlaciona-se com altos níveis MIP-1 $\alpha$  (RITTER et al., 1996). Por outro lado, estas diferenças observadas nas duas formas da doença podem também ser correlacionadas com a atividade de determinadas moléculas expressas na superfície dos parasitas, a exemplo de LPG (lipofosfoglicano), que além de exercerem um efeito inibidor sobre as funções das células fagocíticas, como quimiotaxia, fagocitose e geração de produtos oxidativos (FRANKENBURG et al., 1990; BRANDONÍSIO et al., 1994), podem também diminuir a produção de algumas quimiocinas por células endoteliais, como observado em relação aos níveis de MCP-1 produzidos por monócitos humanos *in vitro* (LO et al., 1998). BADOLATO et al. (1996) também observaram que a infecção de macrófagos humanos com promastigotas de *L. major* estimula a produção de IL-8 e MCAF/MCP-1 nas primeiras horas da infecção, e

discutiram a possibilidade de que estas quimiocinas estejam envolvidas no recrutamento de células-alvo que favorecem a replicação intracelular do parasito. O problema dos estudos com material humano é que estes não permitem a análise temporal da expressão de quimiocinas. Provavelmente, ocorrem variações na expressão destas moléculas no decorrer da infecção.

Alguns modelos animais de doença têm sido utilizados no estudo das relações entre expressão de quimiocinas e processos patológicos (STRIETER et al., 1996), entretanto trabalhos relacionando o envolvimento dessas moléculas na infecção de linhagens isogênicas de camundongos com *Leishmania* são praticamente inexistentes. Estudos, como o de RACCOSIN & BEVERLEY (1997), utilizando Northern blots e sondas de cDNA, demonstraram que macrófagos murinos de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. major* em fase estacionária, expressam transcritos de RNAm para as quimiocinas JE e KC (os homólogos murinos do MCAF/MCP-1 e GRO- $\alpha$  humanos, respectivamente) uma hora após a infecção, sendo que outras quimiocinas e citocinas como TGF- $\beta$ , IL-10, IL-12 ou iNOS não foram induzidas nas primeiras 24 horas. Embora esses dados tenham contribuído na caracterização dos perfis de quimiocinas produzidas por macrófagos infectados com *Leishmania*, os estudos *in vivo* relacionando susceptibilidade ou resistência à infecção de camundongos por *Leishmania* têm sido escassos, bem como trabalhos que descrevam as relações entre a natureza do infiltrado inflamatório e quimiocinas nas lesões desses animais.

SANTIAGO et al. (1998), estudando o modelo de infecção com *L. major* em linhagens de camundongos de diferentes "backgrounds" genéticos, demonstraram que

camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c apresentaram uma maior expressão de RNAm para as quimiocinas MCP-5, IP-10 e RANTES nos primeiros dois dias após infecção em relação aos camundongos resistentes C57BL/6. Entre o 42º e 77º dia de infecção, esses autores observaram uma inversão no padrão de expressão dessas quimiocinas que foram moduladas negativamente nos animais susceptíveis enquanto camundongos resistentes além de demonstrarem, nesse mesmo tempo, uma maior expressão de MCP-5, IP-10 e RANTES, também apresentaram um aumento na expressão de RNAm para MIG.

Alguns trabalhos têm utilizado o estudo das quimiocinas para avaliar o papel de determinados tipos celulares na infecção de camundongos com *L. major*. A análise da expressão de RNAm para algumas quimiocinas ativadoras de células NK no linfonodo de camundongos BALB/c e C57BL/6, após os três primeiros dias de infecção com *L. major* demonstrou uma maior expressão de IP-10, MCP-1 e “linfotactina” em células de camundongos resistentes C57BL/6, enquanto RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  foram igualmente expressas em células de ambas as linhagens. O tratamento de camundongos susceptíveis BALB/c com IP-10 recombinante após infecção, apesar de aumentar a atividade de células NK nos linfonodos de drenagem desses animais, não promoveu redução no tamanho das lesões (VESTER et al., 1999). ARNOLDI & MOOL (1998) demonstraram que o tratamento de camundongos BALB/c com MIP-1 $\alpha$  recombinante e *L. major* reduziu de forma significativa a taxa de migração de células de Langerhans para o linfonodo de drenagem desses animais, enquanto que o tratamento com MCP-1 e parasitos não altera a migração destas células.

No presente trabalho investigou-se se as diferenças observadas na composição do infiltrado inflamatório de lesões de camundongos resistentes e susceptíveis à infecção por *Leishmania*, descritas por SOUZA (1998), estão relacionadas com diferentes perfis de expressão de algumas quimiocinas e citocinas. A utilização de camundongos isogênicos CBA, que são resistentes à *L. major* e susceptíveis à *L. amazonensis*, oferece a vantagem de evitar a influência do “background” genético do hospedeiro na determinação do tipo de resposta, ao mesmo tempo em que permite considerar o papel do agente na determinação dos diferentes perfis de resposta.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a expressão de RNAm de algumas quimiocinas e citocinas na resposta imuno-inflamatória *in situ* de camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazonensis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de expressão de RNAm de CXC quimiocinas (KC, MIG e CRG-2) e CC quimiocinas (JE/MCP-1, MCP-5 e RANTES) nestes animais, através da técnica de RT-PCR semi-quantitativo;
- Avaliar o perfil de expressão de RNAm das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-4;
- Estabelecer relações entre expressão de RNAm de quimiocinas e os diferentes padrões de infiltrado inflamatório relacionados com resistência ou susceptibilidade à infecção, já descritos.

### 3. JUSTIFICATIVA

A resposta imuno-inflamatória na leishmaniose tegumentar tem sido amplamente estudada através da infecção experimental de camundongos com *Leishmania* e a maioria dos estudos têm demonstrado que o desenvolvimento de uma resposta mediada por células é determinante no desenvolvimento de imunidade contra o parasito.

O envolvimento de quimiocinas na leishmaniose precisa ser melhor compreendido, devido a importância dessas moléculas nos eventos relacionados com quimiotaxia, tráfego leucocitário e processos inflamatórios, no entanto são escassos trabalhos que procurem relacionar o papel de quimiocinas nos mecanismos relacionados com resistência e susceptibilidade na leishmaniose tegumentar murina, bem como estudos que permitam uma investigação mais direta da resposta imuno-inflamatória *in situ*.

No presente trabalho analisa-se a influência de duas diferentes espécies de *Leishmania* na expressão de RNAm para CXC e CC quimiocinas e para algumas citocinas, em lesões de pata de camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazonensis*. O camundongo CBA apresenta diferentes padrões de reatividade imunológica e histopatológica quando infectados com essas espécies de *Leishmania*. Os padrões morfológicos de reação tecidual correlacionam-se com a resposta imune desenvolvida por esses camundongos. Os camundongos CBA resistentes desenvolvem uma resposta imune do tipo Th1, enquanto os susceptíveis fazem uma resposta Th2. A

existência de distintos padrões de infiltrado inflamatório em camundongos CBA infectados com diferentes espécies de *Leishmania*, sugere a participação de quimiocinas na determinação desses fenótipos, considerando-se o papel dessas moléculas nos eventos relacionados com a migração de diferentes tipos celulares para os sítios inflamatórios. Deste modo, este estudo avalia se as diferenças existentes na composição do infiltrado de ambos os grupos correlacionam-se com uma expressão diferente das quimiocinas investigadas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

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

### 4.2 PARASITOS

Utilizou-se duas espécies de *Leishmania*: *L. major* (cepa MHOM/IR/-173) e *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR88/BA-125), provenientes do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES/UFBA/SSA) que foram doadas ao laboratório pela Dra. Aldina Barral.

A virulência e infectividade dos parasitos foi mantida através de passagens em camundongos C57BL/6.

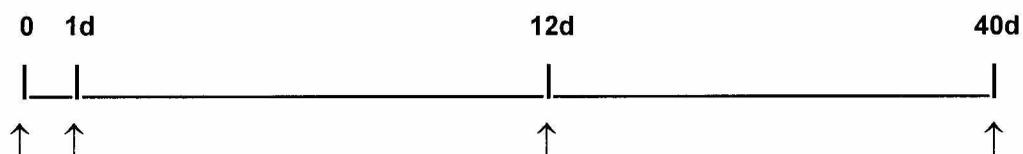
Antes da utilização das referidas cepas nos experimentos, os parasitos foram isolados do linfonodo popliteo desses camundongos e mantidos em cultura axênica em

meio LIT total suplementado com soro fetal bovino inativado à 10% (Hyclone) e Gentamicina (SIGMA) numa concentração de 50 µg/ml.

#### 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

---

### CAMUNDONGOS CBA



#### Infecção (pata):

- Gr. PBS (04) | \_\_\_\_\_ |
- Gr. *Lm* (04)
- Gr. *La* (04)



#### 4.4 INFECÇÃO

As culturas de ambas as espécies de *Leishmania*, entre a 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> passagens, foram monitoradas diariamente através de contagens do número de parasitos em câmara de Neubauer. Após entrarem em fase estacionária, as formas promastigotas eram lavadas com PBS estéril por duas vezes (3.000 rpm por 15 minutos), para que o meio de cultivo fosse removido e os inóculos ajustados de modo a conter  $5 \times 10^6$  parasitos em 20  $\mu$ l de PBS estéril.

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

- Grupo Controle (N=4): 20  $\mu$ l de PBS estéril;
- Grupo *La* (N=4):  $5 \times 10^6$  *L. amazonensis* /20  $\mu$ l de PBS estéril;
- Grupo *Lm* (N=4):  $5 \times 10^6$  *L. major* /20  $\mu$ l de PBS estéril.

#### 4.5 MONITORAMENTO DO TAMANHO DAS LESÕES

A infecção dos grupos experimentais foi monitorada durante 40 dias através da medição semanal da pata infectada e da pata não infectada utilizando-se um paquímetro (MITUTOYO, Brasil). O tamanho da lesão, expresso em milímetros (mm), foi determinado pela diferença entre a espessura da pata infectada (esquerda) e a não infectada (direita).

#### 4.6 EXTRAÇÃO DO RNA DA PATA DE CAMUNDONGOS

Os animais foram sacrificados em três diferentes tempos após a infecção: 1 dia, 12 dias e 40 dias. Estes tempos foram escolhidos em virtude de já existirem estudos anteriores demonstrando diferenças no perfil do infiltrado inflamatório de camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazonensis*.

Após sacrifício, o coxim plantar da pata infectada foi retirado e imediatamente imerso em 0,5 ml de Trizol<sup>®</sup> (GIBCO) à 4° C. Em seguida os fragmentos de patas foram triturados utilizando-se um homogeneizador elétrico (OMNI) e os homogenados centrifugados à 14.000 rpm por 10 minutos (4° C) para remover os resíduos. Os sobrenadantes foram coletados em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml, livres de Rnases, onde foi adicionado 0,1 ml de clorofórmio (SIGMA). Em seguida os tubos foram agitados e centrifugados à 14.000 rpm durante 15 minutos (4° C). Após centrifugação foi possível observar três diferentes fases: fase-fenólica, rica em DNA, (parte inferior do tubo), fase protéica (parte intermediária) e fase aquosa, contendo RNA (parte superior do tubo), que era cuidadosamente removida e transferida para um outro tubo novo. Adicionou-se à fase aquosa o mesmo volume de isopropanol (SIGMA), agitou-se e incubou-se “overnight” à -20° C para que ocorresse a precipitação do RNA. Após o período de incubação, o material foi novamente centrifugado à 12.000 rpm por 10 minutos (4° C), em seguida efetuou-se a retirada e o descarte do sobrenadante, permitindo a visualização de um “pellet” gelatinoso aderido ao fundo do tubo. Para efetuar a lavagem do RNA precipitado, adicionou-se 0,5 ml de etanol 75% e centrifugou-se à 8.500 rpm por 5 minutos (4° C). O etanol foi em seguida descartado e o

RNA deixado à temperatura ambiente para secar durante 10 minutos, período após o qual o RNA foi diluído em 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}/\text{DEPC}$  0,1%, quantificado em espectrofotômetro e congelado à  $-70^\circ\text{C}$ .

#### 4.7 PREPARAÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA) POR RT-PCR

Para preparação do cDNA adicionou-se 1  $\mu\text{g}$  de RNA aos tubos contendo uma solução de 5 mM de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), tampão de PCR 1X, 1 mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs/GIBCO), 1 U/ $\mu\text{l}$  de inibidor de Rnase (PROMEGA), 2,5  $\mu\text{M}$  de oligo d(T) (GIBCO) para atuarem como “primers” na síntese do cDNA, 2,5 U/ $\mu\text{l}$  de transcriptase reversa (GIBCO) e água bidestilada.

As reações com um volume final de 20  $\mu\text{l}$  foram levadas à máquina de PCR sendo submetidas a um único ciclo de incubação à  $42^\circ\text{C}$  por 50 minutos,  $99^\circ\text{C}$  por 5 minutos e  $4^\circ\text{C}$  por, pelo menos, 5 minutos. Após o ciclo de incubação foram adicionadas às amostras 80  $\mu\text{l}$  de água bidestilada e o cDNA foi posteriormente congelado à  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 4.8 AMPLIFICAÇÃO DO cDNA POR PCR

A amplificação do cDNA por PCR consiste em um aumento exponencial do número de DNAs-alvo, a partir da utilização de “primers” específicos e da ação da Taq

DNA polimerase. Para a amplificação adicionou-se 3  $\mu$ l de cDNA a uma solução contendo 2 mM de  $MgCl_2$  (GIBCO), tampão de PCR 1X (GIBCO), 2,5 mM de dNTPs, água bidestilada, 0,025 U/ $\mu$ l de Taq DNA polimerase (GIBCO) e 0,5 pM/ $\mu$ l dos “primers” 5' e 3' (GIBCO) para as diferentes moléculas analisadas no trabalho. As reações com um volume final de 10  $\mu$ l foram levadas à máquina de PCR sendo submetidas às seguintes condições:

- 1) Desnaturação: 95° C – 3 minutos;
- 2) Desnaturação: 94° C – 1 minuto;
- 3) Anelamento dos “primers”: variável (vide Tab. 1, 2 e 3)\*;
- 4) Extensão: 72° C – 2 minutos;
- 5) Extensão: 72° C – 7 minutos.

\* Número de ciclos (passos 2, 3 e 4): variável (vide Tab. 1, 2 e 3)

**Tabela 4:** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores de transcrição (“primers”) de CXC quimiocinas

<b>Molécula</b>	<b>Sequências</b>	<b>TM</b>	<b>Nº de ciclos</b>	<b>Produto de amplificação</b>
<b>KC</b>	5' CGCGGAT CCTTGACCCTGAAGCTCCCTTGGTTC	62° C	35	506 pb
	3' CGCGGATCC CGTGCGTGTTGACCATAACAATATG			
<b>MIG</b>	5' GATCAAACCTGCCTAGATCC	54° C	32	398 pb
	3' GGCTGTGTAGAACACAGAGT			
<b>CRG-2</b>	5' CGCGGATCC TGAGCAGAGATGTCTGAATC	54° C	32	382 pb
	3' CGCGGATCC TCGCACCTCCACATAGCTTACAG			

**Tabela 5:** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores de transcrição (“primers”) de CC quimiocinas

<b>Molécula</b>	<b>Sequências</b>	<b>TM</b>	<b>Nº de ciclos</b>	<b>Produto de amplificação</b>
<b>JE</b>	5' CCGGAATT CCACTCACCTGCTGCTACTCATTAC	62° C	35	489 pb
	3' CCGGAATTCGGATTCGGATTCACAGAGAGGGAAAAATGG			
<b>MCP-5</b>	5' GTTCCTGACTCCTCTAGCTTTC	62° C	35	370 pb
	3' CTCAAGGTTTTTGAGAATGCA			
<b>RANTES</b>	5' CGCGGATCCCCACGTCAAGGAGTATTTCTACACC	62° C	35	310 pb
	3' CGCGGATCCCTGGTTTCTTGGGTTTGCTGTG			

**Tabela 6:** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores de transcrição (“primers”) de citocinas:

<b>Molécula</b>	<b>Sequências</b>	<b>TM</b>	<b>Nº de ciclos</b>	<b>Produto de amplificação</b>
<b>IL-4</b>	5' GAATGTACCAGGAGCCATATC	60° C	36	385 pb
	3' CTCAGTACTACGAGTAATCCA			
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	5' GATCTCAAAGACAACCAACTAGTG	60° C	35	254 pb
	3' CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG			

#### 4.9 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Após amplificação do cDNA as amostras foram misturadas ao tampão da amostra, contendo 1mM de EDTA pH 8,0, 0,4% de xileno-cianol (SIGMA), 0,4% de azul de bromofenol (SIGMA) e 50% de Glicerol, e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6 %, em corrente contínua a 80V. Após corrida, o gel foi incubado em solução fixadora (750  $\mu$ l de ácido acético, 15 ml de etanol, 150 ml de água q.s.p.) durante 15 minutos sob agitação. Em seguida o gel foi transferido para uma solução corante de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) 0,2% onde permanecia sob incubação por 15 minutos. Após a solução corante, o gel era submetido a uma lavagem rápida em água

bidestilada e uma lavagem de 15 minutos sob agitação. Seguida as lavagens, o gel foi incubado em solução reveladora, composta de NaOH 0,75M e formaldeído 0,1 M, sob agitação. A solução reveladora foi descartada com o aparecimento das bandas no gel e em seguida o mesmo foi novamente incubado na solução fixadora, previamente reservada, até o momento da plastificação em papel celofane.

#### 4.10 ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DAS BANDAS

A análise densitométrica das bandas foi realizada em densitômetro **SCHIMADZU CS-9301 PC, Dual Wavelength, Flying Spot**, no comprimento de onda de 600 nm. Os dados densitométricos obtidos são semi-quantitativos e referem-se à área ocupada pelas bandas no gel. Os resultados, apresentados em unidades arbitrárias, estão ajustados pela densitometria do HPRT (hipoxantina-fosforibosil-transferase) de cada animal .

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da medida do tamanho das lesões nos grupos de camundongos CBA inoculados com PBS ou infectados com *L. major* ou *L. amazonensis* foram submetidos a análise estatística para determinar se as diferenças observadas entre os três grupos eram estatisticamente significativas quando comparados. Nós utilizamos o teste paramétrico para análise de variâncias One Way -ANOVA - **Programa GraphPad**

**Prism, versão 2.00, GraphPad Software Incorporated** -, pois os grupos estudados apresentaram distribuição normal. O pós-teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, foi utilizado para identificar em cada ponto do estudo sítios das diferenças entre os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $p < 0,05$ .

O teste estatístico utilizado para comparar a expressão de RNAm de quimiocinas e citocinas entre os diferentes grupos , foi o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis - **Programa GraphPad Prism** - em virtude do número de camundongos ter sido inferior a cinco (N=4 animais por grupo). Para se detectar os sítios das diferenças entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Dunn's. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

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

O curso da infecção de camundongos CBA infectados com  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. major* ou *L. amazonensis* foi monitorado entre a 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas pós-infecção através da medida do tamanho das lesões presentes na pata desses animais. Os resultados demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos já na 3<sup>a</sup> semana após infecção ( $p < 0,001$ ). A partir desse ponto as diferenças se tornaram mais evidentes. Entre a 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas as lesões no grupo infectado com *L. major* diminuíram, tendendo à resolução, enquanto o grupo infectado com *L. amazonensis* apresentava lesões que cresciam progressivamente (Fig. 2). As diferenças entre os grupos foram detectadas através do teste de análise de variâncias One Way -ANOVA. Na 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos infectados em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).

### 5.2 EXPRESSÃO DE RNAm PARA HPRT, CXC E CC QUIMIOCINAS E CITOCINAS NAS LESÕES DE CAMUNDONGOS CBA

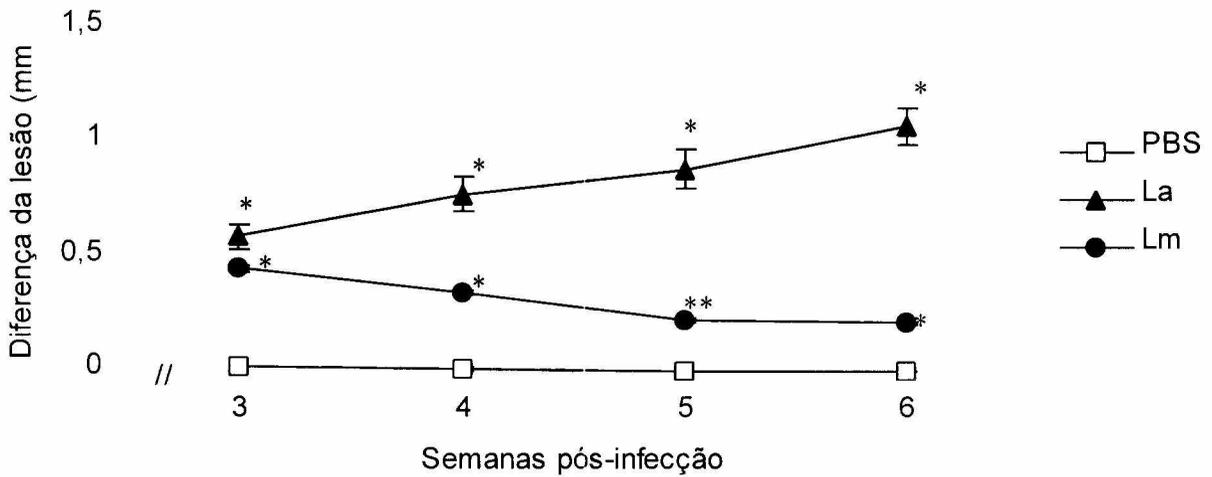
Os diferentes grupos de camundongos CBA infectados com *L. major*, *L. amazonensis*, e inoculados com PBS foram sacrificados nos períodos de 1, 12 e 40 dias após a infecção. Seguida a extração do RNAm do coxim plantar da pata dos

camundongos tratados, realizou-se o RT-PCR para HPRT, algumas CXC quimiocinas (KC, MIG e CRG-2), CC quimiocinas (JE e MCP-5) e citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-4). Após amplificação, os produtos foram analisados em gel de poliacrilamida à 6%, cujas bandas foram submetidas à análise densitométrica a fim de se avaliar possíveis diferenças no perfil de expressão dessas moléculas entre os grupos estudados.

Os resultados representados nos gráficos (Fig. 4A à 11A) referem-se à expressão do RNAm para as moléculas analisadas, ajustadas pela densitometria do HPRT de cada animal, e são apresentados sob a forma de unidades arbitrárias. O gene que codifica a expressão de RNAm para HPRT apresenta expressão constitutiva e por isso foi utilizado como controle da qualidade do RNAm extraído (Fig. 3).

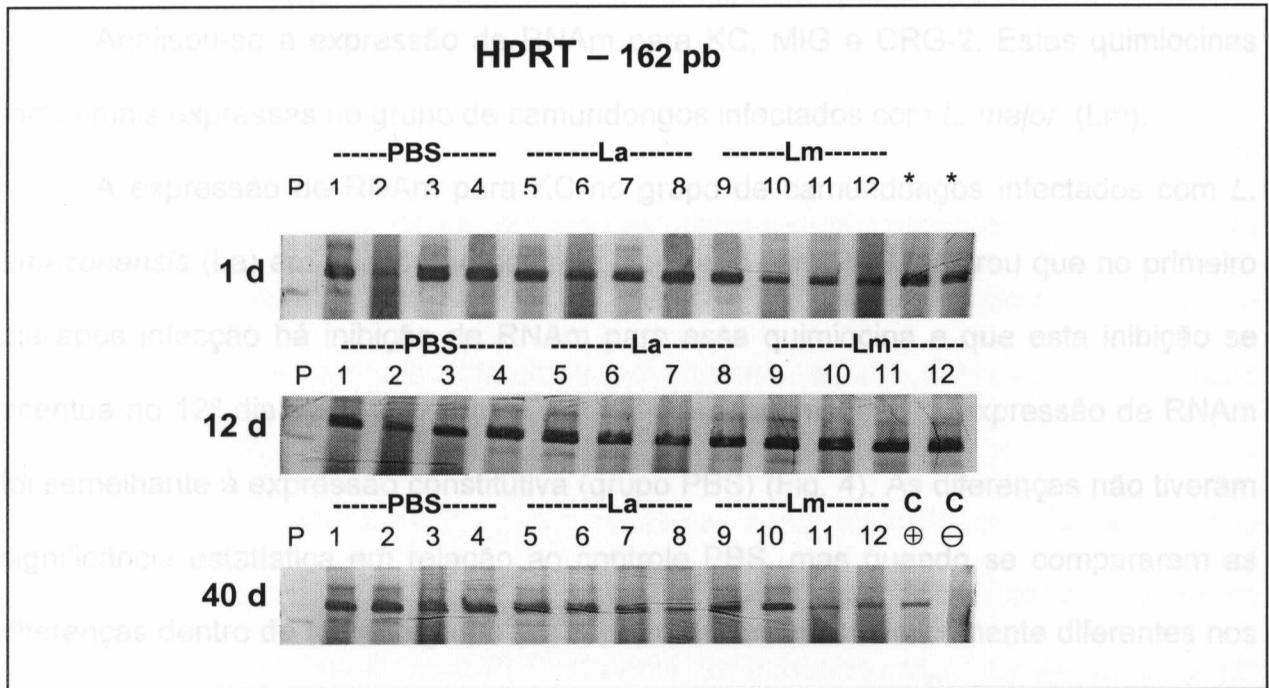
Adotou-se, como controle da expressão constitutiva de RNAm para as quimiocinas e citocinas estudadas, os animais sacrificados no 40º dia após inoculação com PBS, que serviram como parâmetro para determinar a inibição da expressão de RNAm de algumas quimiocinas e citocinas.

**Monitoramento do tamanho da lesão da pata de camundongos CBA infectados com *Leishmania major* ou *L. amazonensis***



**Figura 2: Curso da infecção de camundongos camundongos CBA infectados com *L. major* (●), *L. amazonensis* (▲) e inoculados com PBS (□).** Grupos de 05 animais foram infectados com  $5 \times 10^6$  formas promastigotas de *L. major* ou *L. amazonensis*. Cada ponto da semana representa a média da diferença da lesão e as barras os valores médios do erro padrão. A significância estatística das diferenças entre os grupos foram avaliadas através do teste de análise de variâncias One Way - ANOVA Na 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas foram encontradas diferenças significativas nos grupos infectados em relação ao grupo controle (\* p < 0,001; \*\* p < 0,05).

### 5.3.1 Expressão de RNAm para KC e quimiocinas



**Figura 3: Análise dos produtos de amplificação para HPRT em camundongos CBA infectados com *L. major*, *L. amazonensis* e inoculados com PBS.** Detecção de um fragmento de 162 pares de base, referente à amplificação do HPRT em lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* (Lm), *L. amazonensis* (La) e inoculados com PBS. Os resultados referem-se a avaliações feitas um dia (1d), 12 dias (12d) e 40 dias (40d) após infecção. Cada coluna numerada representa o resultado obtido a partir do material de um camundongo individual. (P) padrão ou peso molecular mostrando uma banda de 125 pb; C<sup>-</sup> e C<sup>+</sup> controles negativo e positivo da reação; \* amostras não analisadas.

### 5.3.1 Expressão de RNAm para CXC quimiocinas

Analisou-se a expressão de RNAm para KC, MIG e CRG-2. Estas quimiocinas foram mais expressas no grupo de camundongos infectados com *L. major* (Lm).

A expressão de RNAm para KC no grupo de camundongos infectados com *L. amazonensis* (La) em relação ao controle inoculado com PBS mostrou que no primeiro dia após infecção há inibição de RNAm para essa quimiocina e que esta inibição se acentua no 12º dia após a infecção. No 40º dia após infecção, a expressão de RNAm foi semelhante à expressão constitutiva (grupo PBS) (Fig. 4). As diferenças não tiveram significância estatística em relação ao controle PBS, mas quando se compararam as diferenças dentro do mesmo grupo (La X La) elas foram estatisticamente diferentes nos 12º e 40º dias após infecção ( $p=0,0194$ ).

Nos camundongos infectados com Lm a expressão de RNAm para KC no primeiro dia após a infecção foi semelhante à do grupo PBS. No 12º dia observou-se uma redução na expressão de RNAm para KC que se acentuou no 40º dia após a infecção. Neste último ponto apenas um animal apresentou expressão do RNAm para esta quimiocina. Também aqui as diferenças não tiveram significância estatística quando comparadas com o controle PBS (Fig. 4). No entanto, comparando-se as diferenças dentro do mesmo grupo (Lm X Lm), houve diferença significativa na expressão de KC entre o primeiro e o 40º dia após a infecção ( $p=0,0076$ ).

Em relação à expressão de RNAm para KC não se detectaram diferenças significativas entre os grupos. Observam-se, porém, padrões inversos de expressão temporal desta quimiocina nos dois grupos infectados.

Nos camundongos infectados com La não foi observada a expressão de MIG no primeiro dia após a infecção, de modo que a expressão de RNAm para esta quimiocina foi estatisticamente menor em relação ao grupo PBS neste período ( $p=0,0107$ ). Nos 12º e 40º dias houve um discreto aumento, sem significância estatística, na expressão de RNAm para esta quimiocina, em relação aos camundongos inoculados com PBS (Fig. 5). Apesar das diferenças não terem sido estatisticamente significantes em relação ao controle PBS, quando se compararam as diferenças dentro do mesmo grupo (La X La) elas foram estatisticamente diferentes no primeiro e 40º dias após a infecção ( $p=0,0107$ ).

MIG apresentou uma discreta inibição, sem significância estatística, na sua expressão nos camundongos infectados com *L. major* no primeiro dia após infecção em relação ao grupo inoculado com PBS. No entanto, aumentou significativamente no 12º dia em relação ao grupo PBS ( $p=0,0215$ ). No 40º dia após a infecção a expressão de MIG foi mantida neste grupo de animais e continuou sendo significativamente diferente dos camundongos do grupo controle (PBS), que não apresentaram expressão desta quimiocina ( $p=0,0014$ ) (Fig. 5).

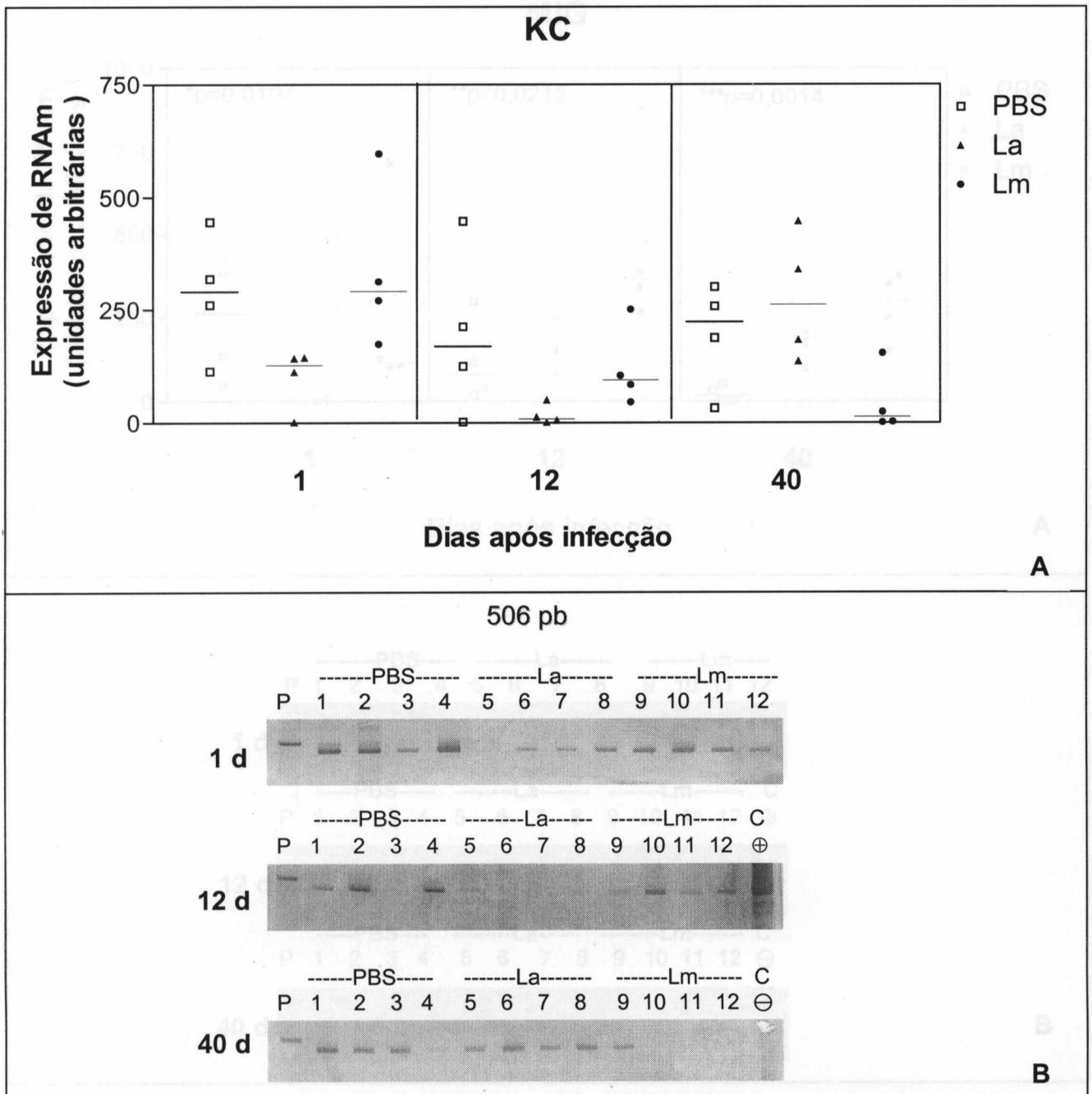
Em síntese, a expressão de RNAm para MIG esteve significativamente inibida no primeiro dia após infecção nos camundongos infectados com *L. amazonensis* em relação aos animais inoculados com PBS. Por outro lado, a expressão desta quimiocina aumentou significativamente durante a infecção nos animais infectados com *L. major*, sendo esse aumento estatisticamente significativo no 12º e 40º dias após a infecção.

A expressão de RNAm para CRG-2 mostrou-se inibida no grupo de camundongos infectados com La no primeiro dia após a infecção, em relação ao grupo inoculado com PBS. No 12º dia observou-se um discreto aumento na expressão desta

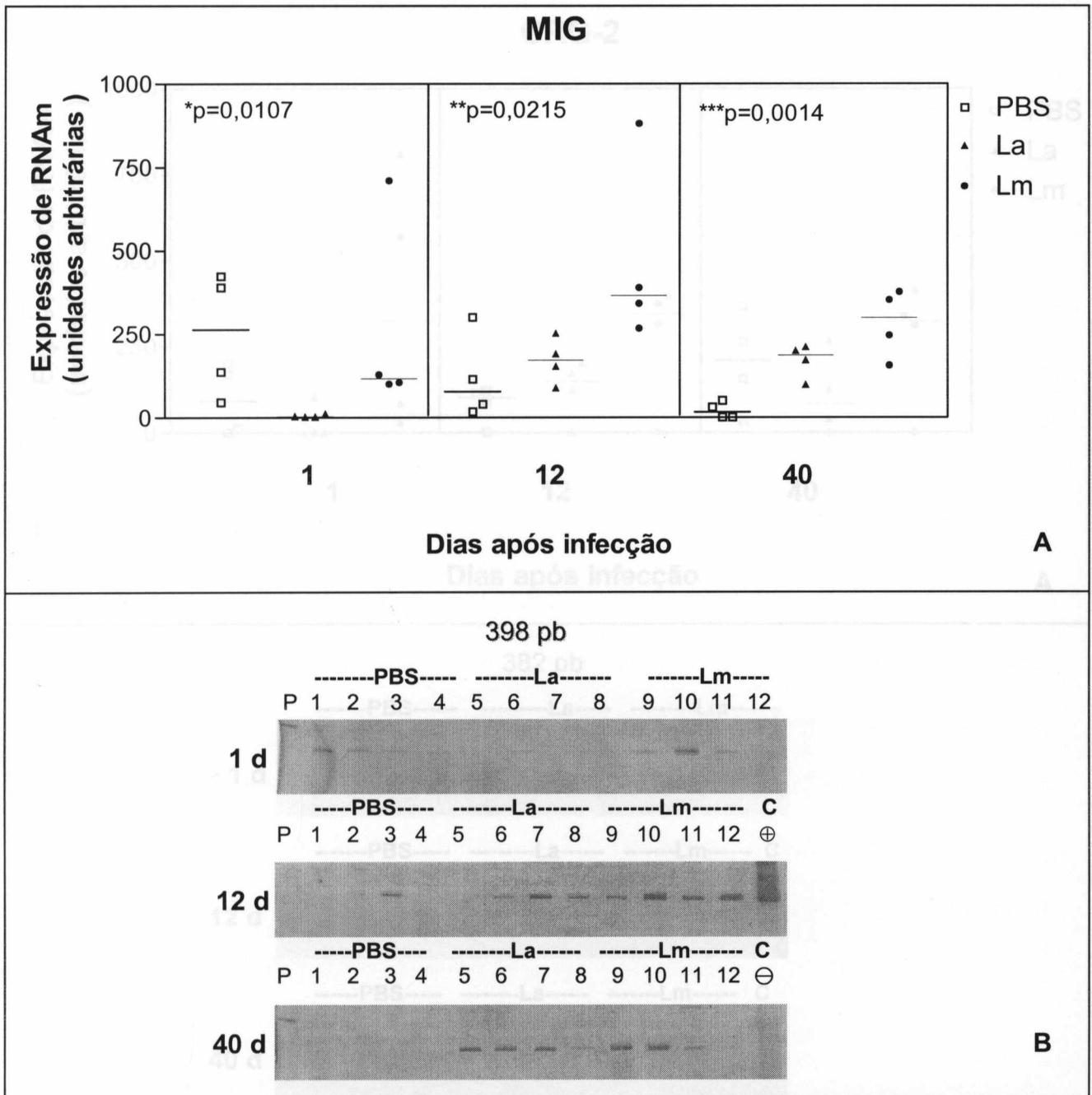
quimiocina em relação ao grupo controle, que foi mantido até o 40º dia após infecção, no entanto as diferenças entre estes grupos não tiveram significância estatística (Fig. 6).

Nos camundongos infectados com Lm a expressão de RNAm para CRG-2 foi constante na maioria dos tempos estudados. Após o primeiro dia de infecção observou-se um discreto aumento na expressão desta quimiocina, por parte de dois dos quatro animais que compunham este grupo, em relação ao grupo inoculado com PBS. No 12º dia observou-se um aumento da expressão de CRG-2 na maioria dos animais estudados, em relação ao grupo controle (PBS). Após o 40º dia de infecção não foram observadas alterações no perfil de expressão de RNAm para CRG-2 nestes animais (Fig. 6). As diferenças entre estes grupos também não tiveram significância estatística mesmo quando foram comparados em tempos de sacrifício distintos.

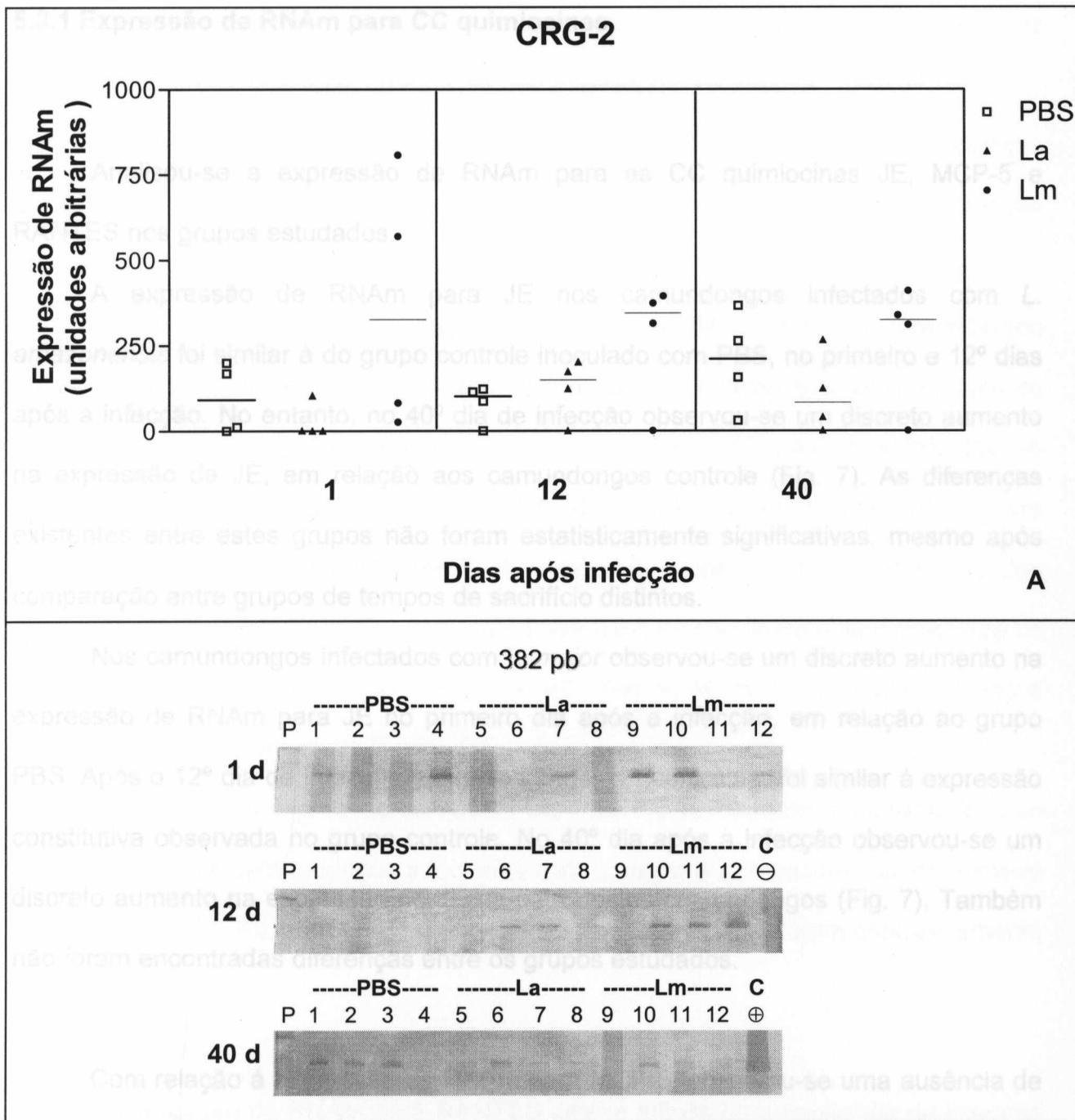
Em resumo, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes na expressão de RNAm para CRG-2 entre os grupos estudados.



**Figura 4: Expressão de RNAm para KC em lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* (Lm), *L. amazonensis* (La) e inoculados com PBS. A) Análise densitométrica de KC. As barras representam a mediana da expressão de RNAm nos diferentes grupos em unidades arbitrárias. As diferenças entre os grupos La/12d e La/40d ( $p=0,0194$ ) e grupos Lm/1d e Lm/40d ( $p=0,0076$ ) foram detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis ; B) Detecção de um fragmento de 506 pares de bases (pb), referente à amplificação de KC.**



**Figura 5: Expressão de RNAm para MIG em lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* (Lm), *L. amazonensis* (La) e inoculados com PBS. A) Análise densitométrica de MIG. As barras representam a mediana da expressão de RNAm nos diferentes grupos em unidades arbitrárias. As diferenças entre os grupos PBS/1d e La/1d (\* p=0,0107), grupos PBS/12d e Lm/12d (\*\* p= 0,0215), grupos PBS/40d e Lm/40d (\*\*\*) p=0,0014) foram detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis ; B) Detecção de um fragmento de 398 pb, referente à amplificação de MIG.**



**Figura 6: Expressão de RNAm para CRG-2 em lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* (Lm), *L. amazonensis* (La) e inoculados com PBS. A) Análise densitométrica de CRG-2. As barras representam a mediana da expressão de RNAm nos diferentes grupos em unidades arbitrárias. A análise comparativa através do teste de Kruskal-Wallis não evidenciou diferenças significativas entre os grupos B) Detecção de um fragmento de 382 pb, referente à amplificação de CRG-2.**

### 5.3.1 Expressão de RNAm para CC quimiocinas

Analisou-se a expressão de RNAm para as CC quimiocinas JE, MCP-5 e RANTES nos grupos estudados.

A expressão de RNAm para JE nos camundongos infectados com *L. amazonensis* foi similar à do grupo controle inoculado com PBS, no primeiro e 12º dias após a infecção. No entanto, no 40º dia de infecção observou-se um discreto aumento na expressão de JE, em relação aos camundongos controle (Fig. 7). As diferenças existentes entre estes grupos não foram estatisticamente significativas, mesmo após comparação entre grupos de tempos de sacrifício distintos.

Nos camundongos infectados com *L. major* observou-se um discreto aumento na expressão de RNAm para JE no primeiro dia após a infecção, em relação ao grupo PBS. Após o 12º dia de infecção a expressão desta quimiocina foi similar à expressão constitutiva observada no grupo controle. No 40º dia após a infecção observou-se um discreto aumento na expressão de JE na pata destes camundongos (Fig. 7). Também não foram encontradas diferenças entre os grupos estudados.

Com relação à expressão de RNAm para MCP-5, observou-se uma ausência de expressão desta quimiocina na maioria dos camundongos infectados com *La*, em relação aos demais grupos, no primeiro dia após a infecção. No 12º dia, entretanto, observou-se um aumento transitório para MCP-5, neste grupo de animais, retornando à expressão constitutiva no 40º dia após infecção (Fig. 8). As diferenças entre os grupos

La e PBS não tiveram significância estatística, no entanto existem diferenças significativas entre os grupos La e Lm no primeiro dia após a infecção ( $p=0,0132$ ).

Comparando-se camundongos inoculados com PBS, observou-se diferenças significativas na expressão de MCP-5 entre o primeiro e 40º dias após inoculação ( $p=0,0327$ ).

No grupo infectado com *L. major* a expressão de RNAm para MCP-5 apresentou um aumento estatisticamente significativo ( $p=0,0132$ ) em relação aos camundongos do grupo La, no primeiro dia após a infecção. No 12º e 40º dias após infecção os camundongos do grupo Lm apresentaram uma diminuição na expressão de RNAm para esta quimiocina, demonstrando níveis de expressão constitutiva, similares aos dos camundongos controle. (Fig. 8). Comparando-se a expressão desta quimiocina entre os camundongos do grupo Lm no primeiro e 40º dias após infecção houve diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,0107$ ).

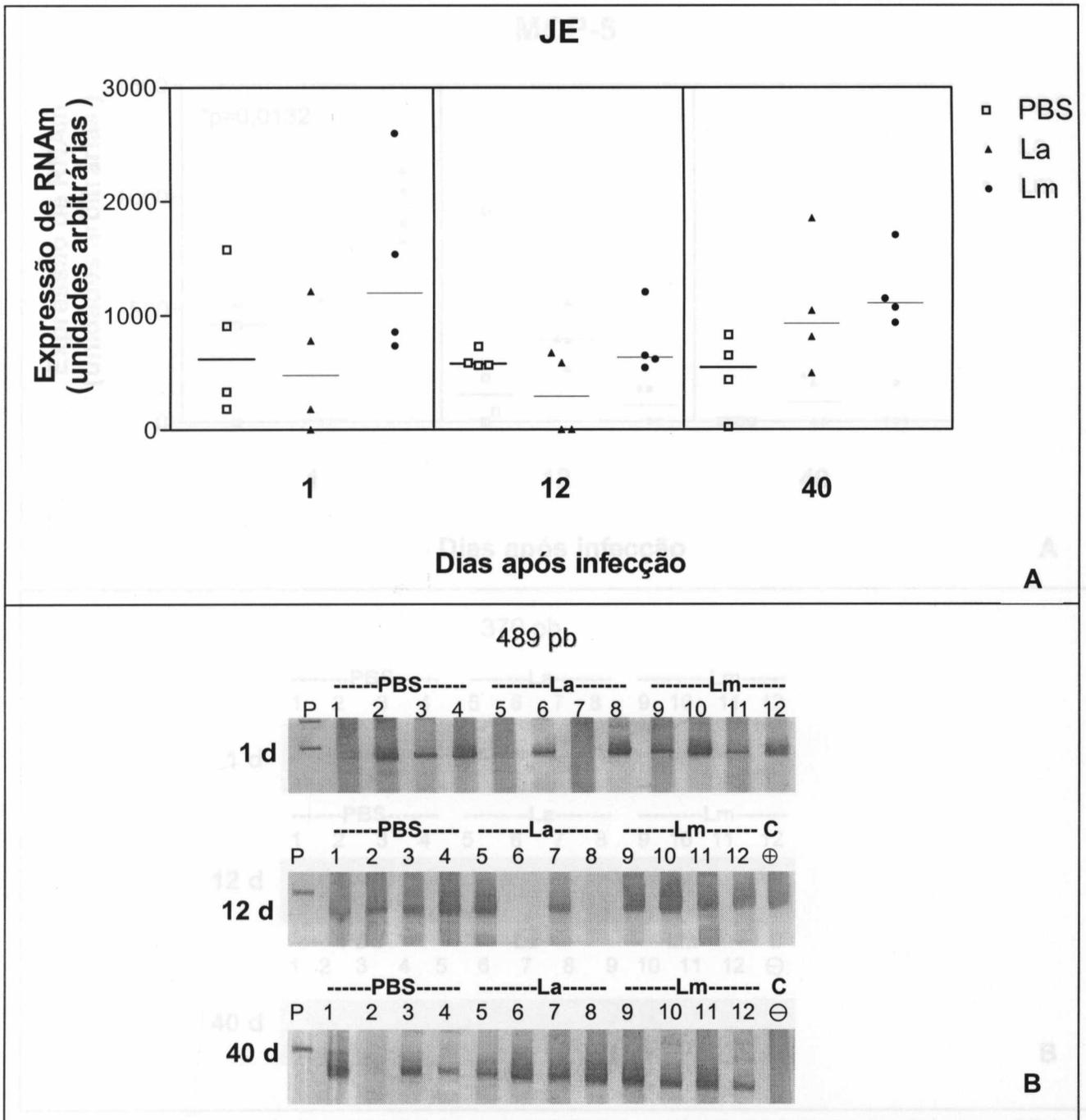
Em síntese, a expressão de RNAm para MCP-5 apresentou um padrão inverso de expressão nos camundongos infectados com *L. major* e *L. amazonensis* no primeiro dia após infecção. As diferenças observadas entre estes grupos foram estatisticamente significativas.

A expressão de RNAm para RANTES esteve inibida no primeiro dia de infecção nos camundongos infectados com La em relação ao grupo inoculado com PBS. No 12º observou-se um discreto aumento na expressão desta quimiocina em relação ao grupo controle. Esse aumento foi mantido até o 40º dia após infecção (Fig. 9). As diferenças em relação ao grupo PBS e Lm não tiveram significância estatística.

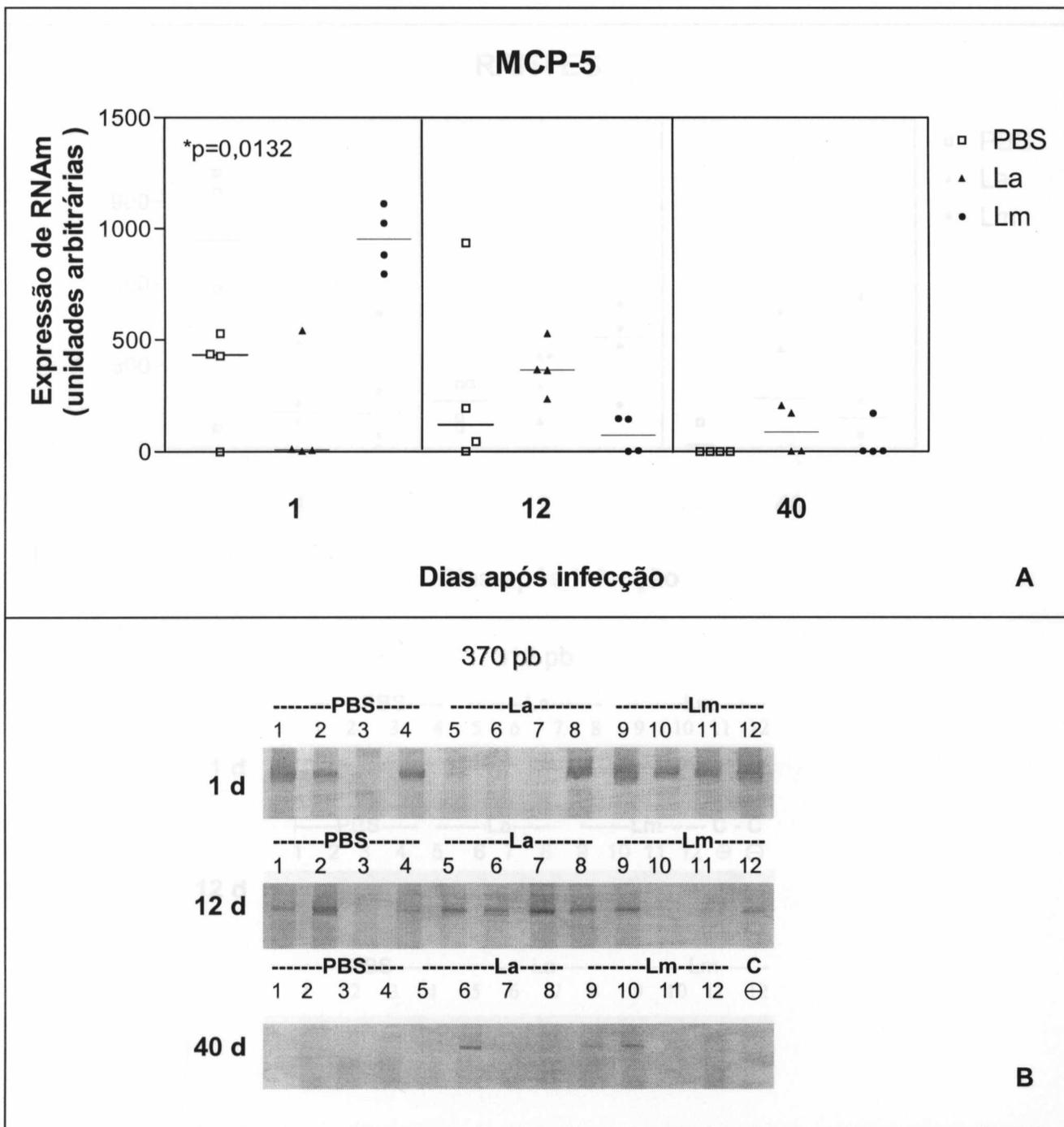
A comparação entre camundongos inoculados com PBS, demonstrou diferenças estatisticamente significativas na expressão de RANTES, no primeiro e 40º dias após a inoculação ( $p=0,0215$ ).

Os camundongos infectados com Lm também apresentaram uma inibição na expressão de RNAm para RANTES no primeiro dia após a infecção, em relação ao grupo controle. Entretanto, no 12º dia observou-se um aumento transitório na expressão desta quimiocina na maioria dos camundongos estudados, em relação ao grupo PBS. No 40º dia após a infecção a expressão de RANTES nestes animais foi reduzida (Fig. 9). As diferenças observadas entre os grupos não foram estatisticamente significativas, mesmo após comparação entre grupos de tempos de sacrifícios distintos.

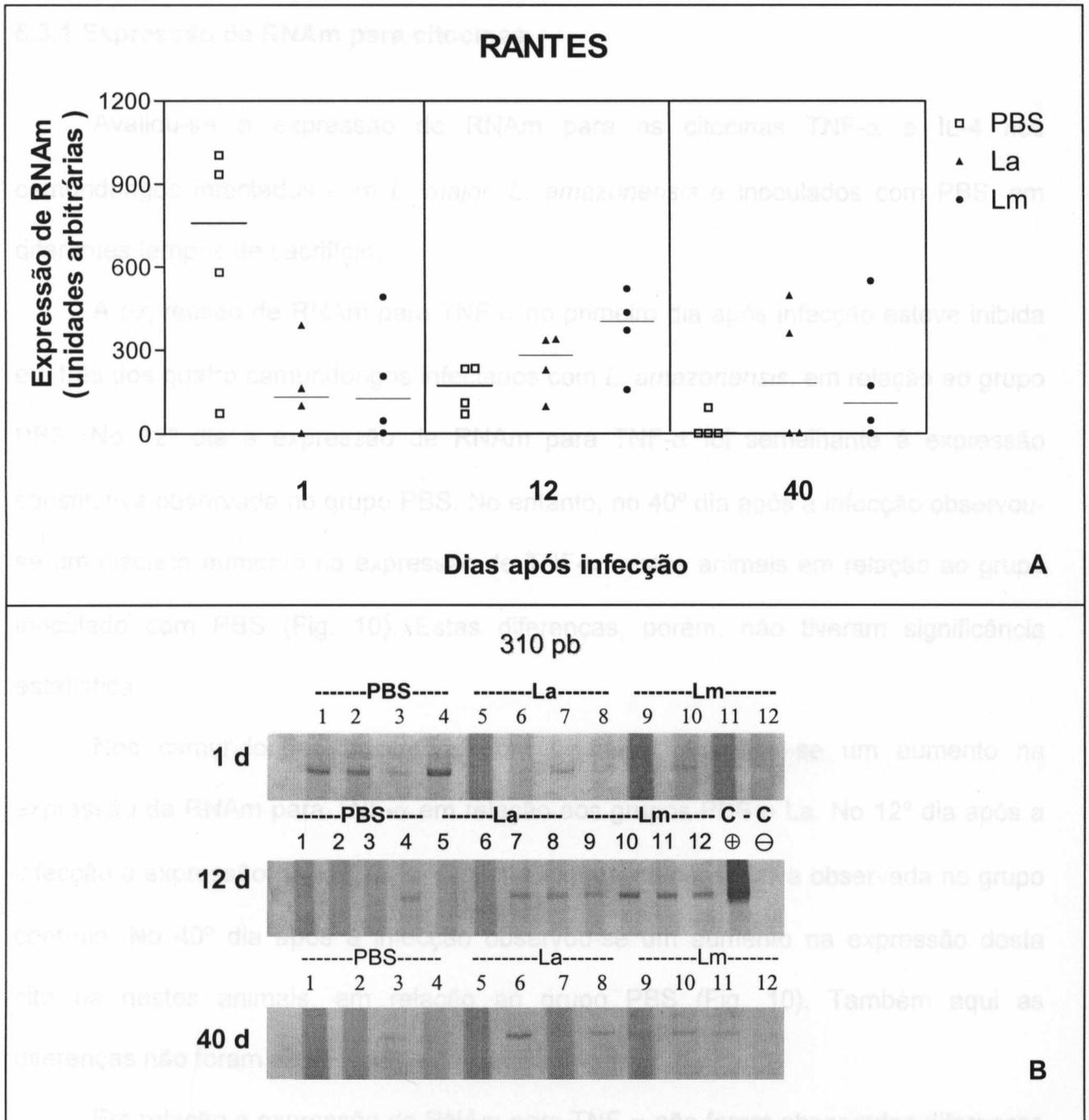
Em resumo, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes na expressão de RNAm para RANTES entre os grupos estudados.



**Figura 7: Expressão de RNAm para JE em lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* (Lm), *L. amazonensis* (La) e inoculados com PBS. A) Análise densitométrica de JE. As barras representam a mediana da expressão de RNAm nos diferentes grupos em unidades arbitrárias. A análise comparativa através do teste de Kruskal-Wallis não evidenciou diferenças significativas entre os grupos B) Detecção de um fragmento de 489 pb, referente à amplificação de JE.**



**Figura 8: Expressão de RNAm para MCP-5 em lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* (Lm), *L. amazonensis* (La) e inoculados com PBS. A) Análise densitométrica de MCP-5. As barras horizontais representam a mediana da expressão de RNAm nos diferentes grupos em unidades arbitrárias. As diferenças entre os grupos La/1d e Lm/1d (\* p=0,0132), grupos PBS( p= 0,0215), grupos Lm/1d e Lm/40d (p=0,0107) foram detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis ; B) Detecção de um fragmento de 370 pb, referente à amplificação de MCP-5.**



**Figura 9: Expressão de RNAm para RANTES em lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* (Lm), *L. amazonensis* (La) e inoculados com PBS. A) Análise densitométrica de RANTES. As barras horizontais representam a mediana da expressão de RNAm nos diferentes grupos em unidades arbitrárias. A análise comparativa através do teste de Kruskal-Wallis evidenciou diferenças significativas apenas entre o grupo PBS no primeiro e 40º dia após inoculação B) Detecção de um fragmento de 310 pb, referente à amplificação de RANTES.**

### 5.3.1 Expressão de RNAm para citocinas

Avaliou-se a expressão de RNAm para as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-4 nos camundongos infectados com *L. major*, *L. amazonensis* e inoculados com PBS, em diferentes tempos de sacrifício.

A expressão de RNAm para TNF- $\alpha$  no primeiro dia após infecção esteve inibida em três dos quatro camundongos infectados com *L. amazonensis*, em relação ao grupo PBS. No 12º dia a expressão de RNAm para TNF- $\alpha$  foi semelhante à expressão constitutiva observada no grupo PBS. No entanto, no 40º dia após a infecção observou-se um discreto aumento na expressão de TNF- $\alpha$  nestes animais em relação ao grupo inoculado com PBS (Fig. 10). Estas diferenças, porém, não tiveram significância estatística.

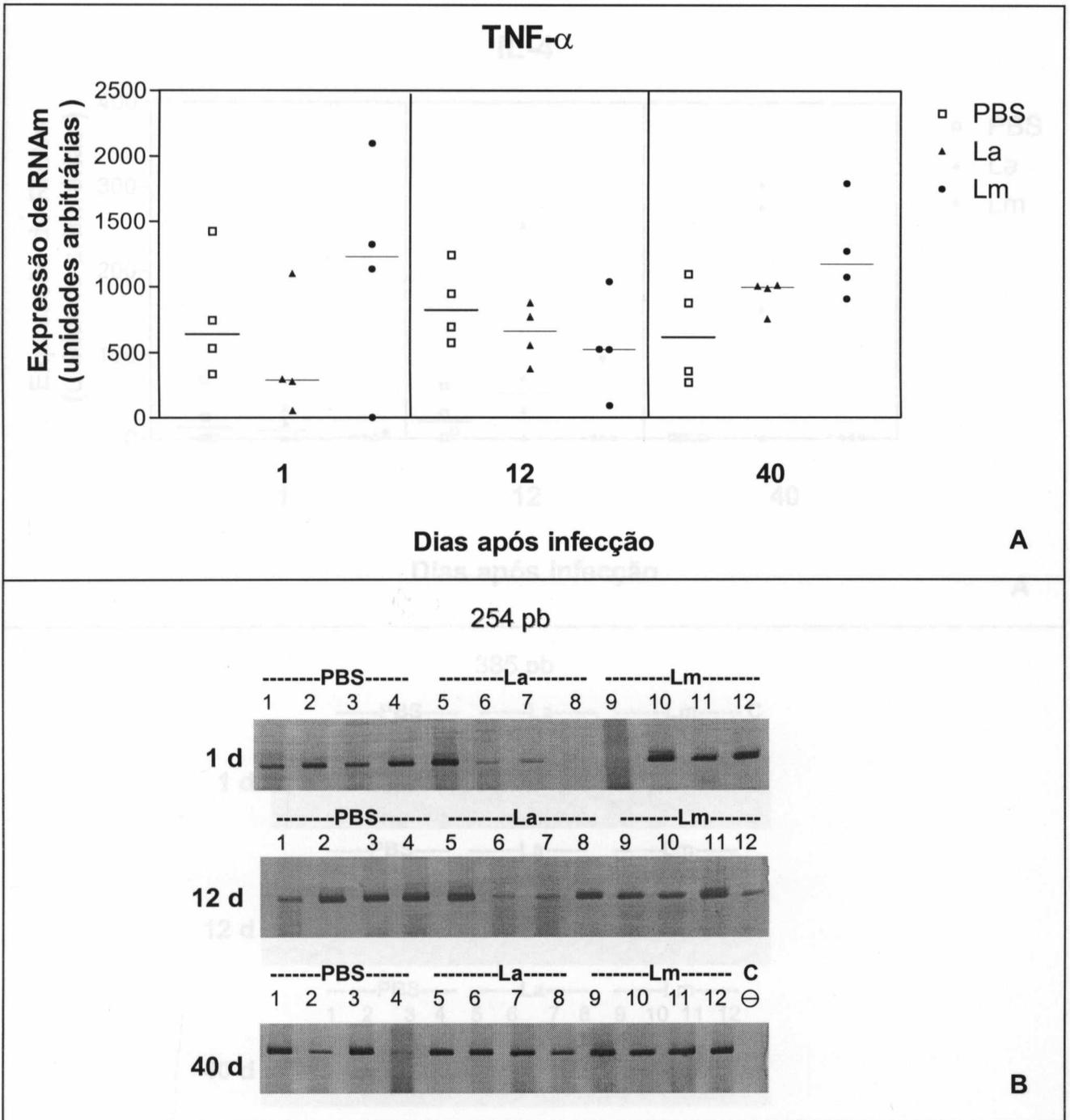
Nos camundongos infectados com *L. major*, observou-se um aumento na expressão de RNAm para TNF- $\alpha$  em relação aos grupos PBS e La. No 12º dia após a infecção a expressão de TNF- $\alpha$  foi similar à expressão constitutiva observada no grupo controle. No 40º dia após a infecção observou-se um aumento na expressão desta citocina nestes animais, em relação ao grupo PBS (Fig. 10). Também aqui as diferenças não foram estatisticamente significativas.

Em relação à expressão de RNAm para TNF- $\alpha$  não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, embora tenha havido uma inibição na expressão desta citocina na maioria dos camundongos infectados com *L. amazonensis*, no primeiro dia após a infecção.

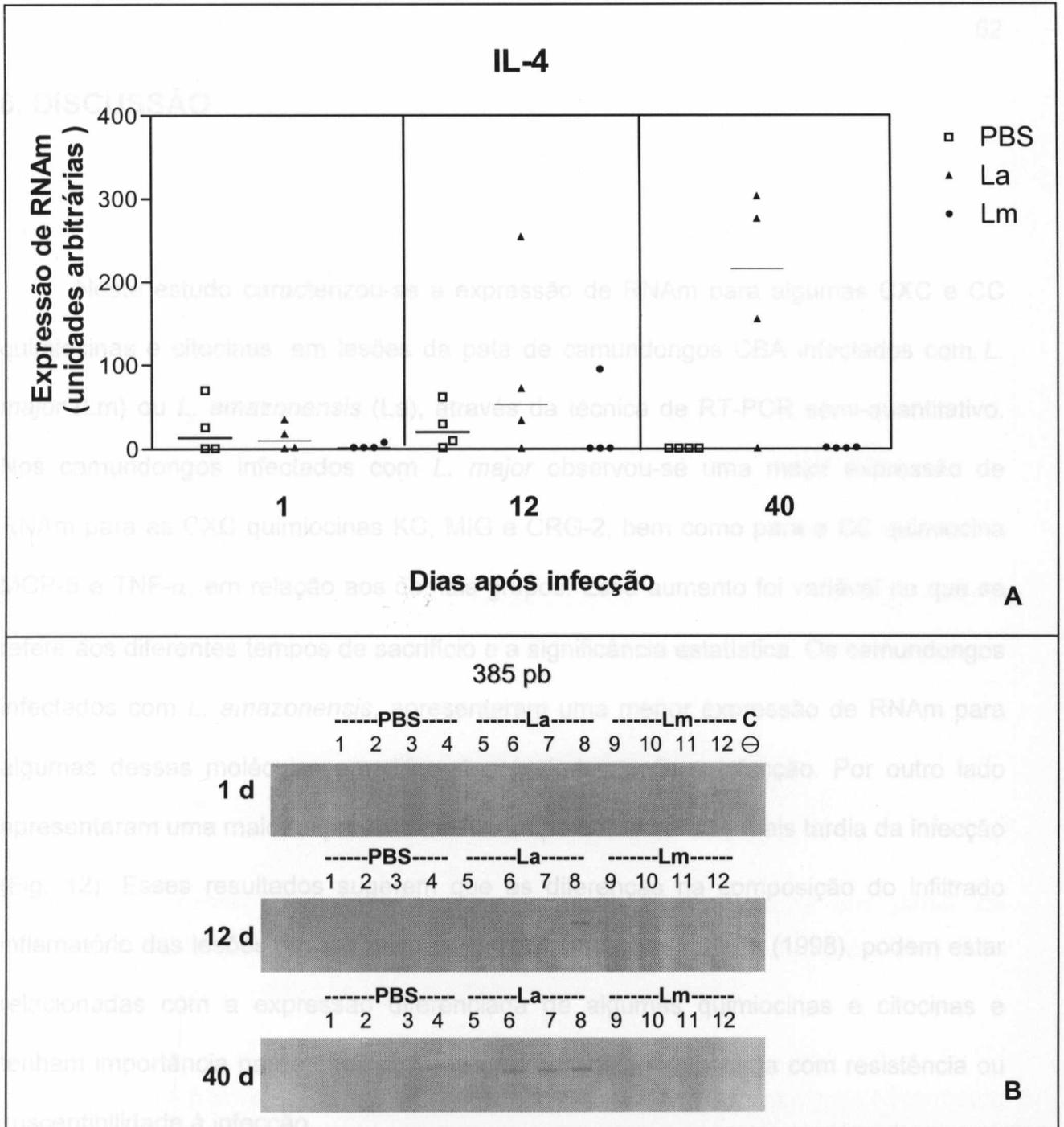
A expressão de RNAm para IL-4 esteve ausente no primeiro e 12º dias após a infecção nos camundongos infectados com *L. amazonensis*. No entanto, no 40º dia após a infecção observou-se um aumento na expressão de IL-4 em três dos quatro camundongos deste grupo (Fig. 11). A análise estatística, através do teste de Kruskal-Wallis, não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, inclusive no 40º dia após infecção, mesmo após comparação entre grupos de tempos de sacrifício distintos.

Nos camundongos infectados com *L. major* não foi observada expressão de RNAm para IL-4 em nenhum dos tempos analisados, com exceção de um único camundongo no 12º dia após a infecção (Fig. 11).

Em síntese, a expressão de RNAm para IL-4 foi detectada na maioria dos camundongos infectados com *L. amazonensis* no 40º dia após a infecção, no entanto as diferenças em relação aos grupos PBS e Lm não foram estatisticamente significativas.



**Figura 10: Expressão de RNAm para TNF- $\alpha$  em lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* (Lm), *L. amazonensis* (La) e inoculados com PBS. A) Análise densitométrica de TNF- $\alpha$ . As barras representam a mediana da expressão de RNAm nos diferentes grupos em unidades arbitrárias. A análise comparativa através do teste de Kruskal-Wallis não evidenciou diferenças significativas entre os grupos B) Detecção de um fragmento de 254 pb, referente à amplificação de TNF- $\alpha$ .**



**Figura 11: Expressão de RNAm para IL-4 em lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* (Lm), *L. amazonensis* (La) e inoculados com PBS. A) Análise densitométrica de IL-4. As barras representam a mediana da expressão de RNAm nos diferentes grupos em unidades arbitrárias. A análise comparativa através do teste de Kruskal-Wallis não evidenciou diferenças significativas entre os grupos B) Detecção de um fragmento de 385 pb, referente à amplificação de IL-4.**

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo caracterizou-se a expressão de RNAm para algumas CXC e CC quimiocinas e citocinas, em lesões da pata de camundongos CBA infectados com *L. major* (Lm) ou *L. amazonensis* (La), através da técnica de RT-PCR semi-quantitativo. Nos camundongos infectados com *L. major* observou-se uma maior expressão de RNAm para as CXC quimiocinas KC, MIG e CRG-2, bem como para a CC quimiocina MCP-5 e TNF- $\alpha$ , em relação aos demais grupos. Esse aumento foi variável no que se refere aos diferentes tempos de sacrifício e a significância estatística. Os camundongos infectados com *L. amazonensis*, apresentaram uma menor expressão de RNAm para algumas dessas moléculas em diferentes períodos após a infecção. Por outro lado apresentaram uma maior expressão de RNAm para IL-4 na fase mais tardia da infecção (Fig. 12). Esses resultados sugerem que as diferenças na composição do infiltrado inflamatório das lesões desses animais, demonstrada por SOUZA (1998), podem estar relacionadas com a expressão diferenciada de algumas quimiocinas e citocinas e tenham importância na determinação de uma resposta relacionada com resistência ou susceptibilidade à infecção.

Camundongo CBA		La			Lm		
		1 d	12 d	40 d	1 d	12 d	40 d
CXC	KC	↓↓↓	↓↓	↑	-	-	↓↓
	MIG	↓↓↓*	-	↑↑	-	↑↑↑*	↑↑↑*
	CRG-2	↓	-	-	↑↑	↑	-
CC	JE	-	-	↑↑	↑↑	-	↑↑
	MCP-5	↓	-	-	↑↑↑*	↓↓	-
	RANTES	↓↓	-	↑	↓↓	↑	↑
Citocinas	TNF- $\alpha$	↓	-	-	↑	-	↑
	IL-4	-	↑	↑↑↑	-	-	-

**Figura 12: Expressão de RNAm de quimiocinas e citocinas em patas de camundongos CBA infectados com *L. major*, *L. amazonensis* ou inoculados com PBS. (↑) aumento; (↓) redução; (\*) estatisticamente significativa.**

O KC é o homólogo murino para o GRO- $\alpha$  humano e a expressão de RNAm para esta quimiocina esteve reduzida nos camundongos infectados com *L. amazonensis* no primeiro e 12º dias após infecção, em relação aos animais dos grupos PBS e Lm (Fig. 4). Essa redução pode estar relacionada com fatores de virulência expressos por esta espécie de *Leishmania*, já que camundongos infectados com *L. major* ou inoculados com PBS apresentaram níveis similares de expressão de RNAm para esta quimiocina. Estudos anteriores demonstraram que a infecção de macrófagos murinos derivados de

medula óssea, de camundongos BALB/c, com cepas avirulentas de *L. major* induz uma maior expressão de transcritos de RNAm para KC em relação à infecção com cepas virulentas (RACOOSIN & BEVERLEY, 1997). Apesar do KC estar envolvido com a quimiotaxia de neutrófilos (BOZIC et al., 1995), não existem diferenças observáveis, a nível de microscopia óptica, na quantidade destas células nas lesões de camundongos CBA infectados com *Leishmania*, até o 3º dia de infecção (FREITAS, 1998, Comunicação pessoal).

As diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significativas em relação à expressão de RNAm para KC nos tempos analisados, no entanto a comparação dentro dos grupos de diferentes períodos de sacrifício demonstrou diferenças significativas entre os grupos La/12d e La/40d ( $p=0,0194$ ) e entre os grupos Lm/1d e Lm/40d ( $p=0,0076$ ). A baixa expressão de KC observada nas lesões de camundongos infectados com *L. amazonensis* poderia estar ocasionando diferenças no estado de ativação dos neutrófilos presentes no sítio inflamatório, tornando-os menos efetivos na destruição parasitária e, conseqüentemente, favorecendo a proliferação dos parasitos. O aumento nos níveis de expressão de KC observado nesse grupo de animais, no 40º dia após a infecção, pode ser decorrente dos produtos gerados pela intensa necrose tecidual local, que terminam por estimular a expressão desta quimiocina e induzir uma maior resposta inflamatória. Neste trabalho, observou-se ainda que a redução na expressão de RNAm para KC, no 40º dia de infecção, em camundongos infectados com *L. major*, correlacionou-se com a diminuição no tamanho das lesões destes animais. Sabe-se que a cura da infecção com *L. major* no camundongo CBA e em outras linhagens resistentes está relacionada com uma resposta imune do tipo Th1, com alta produção de IFN- $\gamma$ . Alguns trabalhos têm discutido

que IFN- $\gamma$  parece inibir a expressão de KC (GAZZINELLI et al., 1998). Neste estudo, não foi avaliada a expressão de IFN- $\gamma$  em virtude de problemas relacionados com a especificidade dos “primers” disponíveis para a amplificação desta citocina. Entretanto a cura das lesões nos camundongos infectados com *L. major*, a diminuição da expressão de RNAm para KC, no 40º dia de infecção, e a ausência da expressão de IL-4 sugerem a presença de IFN- $\gamma$  nas lesões destes animais. Como referido anteriormente, SOUZA (1998) realizou estudos com o modelo do CBA demonstrando que a resposta protetora nesses animais após infecção com *L. major* está relacionada com o perfil Th1, com níveis elevados de IFN- $\gamma$ .

Com relação à MIG e CRG-2, observou-se que a expressão de RNAm para estas quimiocinas foi maior nos camundongos infectados com *L. major* em diferentes períodos da infecção, embora não tenha sido encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação a expressão de CRG-2. MIG e CRG-2 são CXC quimiocinas que não apresentam a seqüência ELR e estão relacionadas com a quimiotaxia de linfócitos T ativados e células NK. Além disso, ambas as quimiocinas são induzidas por IFN- $\gamma$  (STRIETER et al., 1996; FARBER, 1997; ROLLINS, 1997; LUSTER, 1998). MIG apresentou uma baixa expressão nos camundongos infectados com *L. major* no primeiro dia após infecção, porém aumentou significativamente no 12º e 40º dias em relação ao grupo inoculado com PBS ( $p=0,0215$  e  $p= 0,0014$ , respectivamente). Nos camundongos infectados com *L. amazonensis* não foi observada a expressão de MIG no primeiro dia de infecção, de modo que a expressão de RNAm para esta quimiocina foi estatisticamente menor em relação ao grupo PBS neste período ( $p=0,0107$ ) , enquanto que no 12º e 40º dias houve um discreto aumento nos níveis de RNAm para

essa quimiocina, em relação aos camundongos do grupo controle (Fig. 5). A comparação entre os grupos La/1d e La/40d demonstrou diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,0107$ ). Em relação à CRG-2, observou-se um aumento nos níveis de RNAm para essa quimiocina no grupo infectado com *L. major* no primeiro dia de infecção que foi mantido até o 40º dia. Nos camundongos do grupo infectado com *L. amazonensis* CRG-2 esteve completamente inibida no primeiro dia, apresentando um discreto aumento nos demais tempos.

A existência de certa expressão de MIG e CRG-2 em camundongos infectados com *L. amazonensis*, após 12 dias de infecção, pode estar correlacionada com a presença de poucos linfócitos na periferia da lesão desses animais diferente do grande número de linfócitos no centro das lesões, de permeio aos macrófagos, em camundongos infectados com *L. major*, como previamente descrita por SOUZA (1998). A presença marcante de MIG e CRG-2 neste último grupo de animais, pode estar relacionada com a quimiotaxia de linfócitos T presentes nas lesões desses camundongos. Além disso, sugere que IFN- $\gamma$  esteja sendo produzido nestas lesões, ativando macrófagos à destruírem o parasito e estimulando a síntese destas quimiocinas por estes tipos celulares. A expressão precoce de CRG-2 observada nos animais infectados com *L. major* no primeiro dia após infecção pode ser dependente da indução de IFN- $\gamma$  secretado por células NK nas fases mais iniciais, enquanto que a infecção com *L. amazonensis* talvez iniba a produção desta citocina por estas células. Esta afirmação é reforçada pelo fato de não ter sido observada a expressão de MIG e CRG-2 nas lesões destes animais após o primeiro dia de infecção com formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Estudos *in vivo* têm demonstrado que IFN- $\gamma$  é realmente necessário para a indução de MIG durante a infecção de camundongos com *T. gondii* ou com vírus da vaccinia. Já a indução de CRG-2 não parece ser completamente dependente desta citocina (AMICHAY et al. 1996). Esta correlação também foi demonstrada no modelo de infecção com *Leishmania*. SANTIAGO et al. (1998) demonstraram que camundongos C57BL/6, resistentes à infecção com *L. major*, também apresentam uma maior expressão de RNAm para MIG e CRG-2 nas lesões, entre o 42º e 77º dia após infecção, enquanto que em camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c estas quimiocinas são pouco expressas neste período.

Camundongos CBA infectados com *L. major* apresentam um aumento progressivo no influxo de macrófagos e linfócitos nas lesões, a partir do 7º dia, bem como aumento na produção de IFN- $\gamma$  por células do linfonodo de drenagem, formação de granulomas e fibrose. Já na infecção com *L. amazonensis* observa-se um predomínio de macrófagos e ausência de linfócitos, com produção de níveis elevados de IL-4 e ausência de granulomas e fibrose (SOUZA, 1998). Com base nestes dados e nos resultados apresentados neste estudo, é possível sugerir que o aumento na quantidade de linfócitos, a conseqüente ativação de macrófagos, a determinação das subpopulações de linfócitos e a eventual formação de granulomas nas lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* esteja relacionada com o aumento na expressão de MIG e CRG-2, quimiocinas induzidas por IFN- $\gamma$ , que atuam como quimiotáticos para linfócitos T e células NK. A baixa expressão ou ausência dessas quimiocinas nos camundongos infectados com *L. amazonensis*, poderia estar limitando tanto o número quanto as subpopulações de linfócitos T que são direcionados para as

lesões desses animais, favorecendo uma resposta Th2, e conseqüentemente exacerbando a infecção.

Na doença humana também observam-se diferenças no perfil fenotípico de células mononucleares em lesões de pacientes com diferentes formas da doença: lesões de pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) demonstram iguais proporções de macrófagos, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+; na leishmaniose cutânea localizada (LCL) observa-se um padrão escalonado (macrófagos > linfócitos T CD4+ > linfócitos T CD8+) enquanto nas lesões de pacientes com a forma cutânea difusa (LCD) ocorre um predomínio absoluto de macrófagos contra uma escassez de linfócitos T CD4+ e CD8+ (SILVA, 1999) . As diferenças nas quantidades de macrófagos e linfócitos T observadas nas lesões de pacientes com diferentes formas de leishmaniose estão correlacionadas com uma expressão de quimiocinas específicas, à exemplo de MCP-1 na LCL e MIP- $\alpha$  na LCD (RITTER et al., 1996).

Diversos estudos têm demonstrado uma associação entre resistência e a formação de granulomas e presença de células eptelióides na leishmaniose (SOUZA, 1998; SILVA, 1999). Estudos relacionando a formação de granulomas e quimiocinas na leishmaniose tegumentar são escassos, no entanto alguns trabalhos têm demonstrado a participação de quimiocinas na formação e manutenção de granulomas induzidos por diversos agentes. COTTERELL et al. (1999) demonstraram o aumento nos níveis de RNAm para IP-10, o homólogo humano para CRG-2, no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* e sugerem um modelo que coloca essa quimiocina como o principal quimiotático para monócitos e células T envolvidos na formação de granulomas no fígado desses animais. Camundongos BALB/c previamente infectados

com *L. donovani* e tratados com anti-CTLA-4 apresentam uma maior expressão de RNAm para IP-10 e uma maior capacidade de formar granulomas maduros no fígado, em relação a camundongos não tratados (MURPHY et al., 1998). A análise imunohistoquímica de linfonodos de pacientes, que exibem granulomas sarcóides proeminentes, demonstrou que as células positivas para IP-10 são células epitelióides e macrófagos CD68+, localizados no interior de áreas granulomatosas (AGOSTINI et al., 1998). O RANTES e o MCP-1 estão envolvidos na modulação de granulomas pulmonares do tipo 1 e tipo 2, induzidos por bolas de látex recobertas com antígenos de *Mycobacterium bovis* ou *Schistosoma mansoni*, respectivamente (CHENSUE et al., 1999; HOGABOAN et al., 1999).

A análise da expressão de RNAm para as CC quimiocinas JE e RANTES não revelou diferenças marcantes entre os grupos estudados. No entanto, nos camundongos infectados com *L. major*, observou-se um discreto aumento dos níveis de RNAm para JE e um significativo aumento na expressão de MCP-5 ( $p=0,0132$ ), no primeiro dia após a infecção. O JE está relacionado com a quimiotaxia de monócitos, linfócitos T de memória, basófilos e células NK, enquanto MCP-5 atrai monócitos, linfócitos e eosinófilos para os sítios inflamatórios (STRIETER et al., 1996; ROLLINS, 1997; LUSTER, 1998). O MCP-5 foi identificado recentemente apenas em camundongos e, assim como o JE, atua sobre os diversos tipos celulares através da ligação com o CCR2. Além disto, está envolvido tanto nas reações alérgicas quanto na resposta do hospedeiro a patógenos (JIA et al., 1996; ROLLINS, 1997; SARAFI et al., 1997). Até o momento, esta quimiocina tem sido pouco estudada e os escassos trabalhos têm descrito a sua participação nos eventos relacionados com a quimiotaxia de eosinófilos em reações alérgicas (JIA et al., 1996).

RITTER et al. (1996) demonstraram que o aumento nos níveis de RNAm para MCP-1, o homólogo humano para JE, em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL), pode estar relacionado com a presença de macrófagos, monócitos e linfócitos e com a cura espontânea das lesões, enquanto que a progressão da doença correlaciona-se com níveis elevados de MIP- $\alpha$ . Estudos experimentais utilizando o modelo de infecção com *L. major*, têm demonstrado que MCP-5 é altamente expresso em lesões de camundongos resistentes C57BL/6, nas fases mais tardias da infecção, enquanto camundongos susceptíveis BALB/c apresentam uma baixa expressão desta quimiocina (SANTIAGO, 1998, Comunicação pessoal). Neste trabalho, o aumento estatisticamente significativo de MCP-5 e o discreto aumento de JE nas lesões de camundongos infectados com *L. major* no primeiro dia de infecção, pode estar favorecendo uma maior ativação de monócitos e macrófagos presentes nas lesões desses animais e, conseqüentemente, estimulando a destruição do parasito no interior dessas células. O fato de camundongos CBA infectados com *L. major* apresentarem menor grau de parasitismo, por volta do 7º dia de infecção, em relação aos camundongos infectados com *L. amazonensis* (SOUZA, 1998), e as semelhanças estruturais e funcionais entre MCP-5 e JE reforçam essa hipótese.

O RANTES é uma quimiocina que tem como células-alvo muitos tipos celulares como monócitos, linfócitos T de memória, basófilos, eosinófilos, células dendríticas e células NK (STRIETER et al., 1996; ROLLINS, 1997; LUSTER, 1998). Além disto, liga-se à maioria dos receptores de CC quimiocinas (CCR1, 3, 4 e 5). A ação complexa de RANTES sobre diversos tipos celulares dificulta o estabelecimento da relação desta quimiocina com uma resposta imune do tipo Th1 ou Th2. No entanto, trabalhos

anteriores utilizando reestimulação de PBMC humanos com antígenos de *Yersinia enterocolitica* têm demonstrado que RANTES está associado com uma resposta Th1 (SCHRUM et al., 1996). Os dados de SANTIAGO et al. (1998) revelam que RANTES é mais expresso em lesões de camundongos C57BL/6, em relação aos camundongos BALB/c, no 42º dia após infecção com *L. major*, demonstrando o envolvimento desta quimiocina com o perfil de resistência. Neste estudo RANTES não apresentou diferenças quanto ao nível de expressão de RNAm, nos grupos estudados (Fig. 9). Entretanto, é possível que RANTES, mesmo em baixas concentrações, possa ter uma ação sinérgica com outras quimiocinas que atraem linfócitos T e que estejam em níveis elevados, a exemplo de MIG e CRG-2 no grupo de camundongos infectados com *L. major*. Essa ação cooperativa poderia favorecer e aumentar o influxo destes tipos celulares nas lesões destes animais e determinar o tipo de resposta imuno-inflamatória desenvolvida por eles na infecção com *L. major*. Por outro lado, camundongos de diferentes “backgrounds” genéticos podem apresentar diferentes padrões de expressão para RANTES em diferentes períodos da infecção.

Com relação à TNF- $\alpha$ , observou-se que camundongos infectados com *L. major* apresentaram uma maior expressão de RNAm para esta citocina no primeiro dia de infecção, enquanto que três dos quatro camundongos infectados com *L. amazonensis* exibiram uma inibição na expressão de RNAm para TNF- $\alpha$ . Nos tempos de 12 e 40 dias após infecção não parecem existir diferenças entre os grupos (Fig. 10). TNF- $\alpha$  é uma citocina inflamatória envolvida com a ativação de macrófagos e de fatores de transcrição para diversas citocinas. A expressão precoce de TNF- $\alpha$  nos animais infectados com *L. major* talvez seja suficiente para ativar as células inflamatórias

presentes nas lesões destes camundongos a produzirem quimiocinas. A baixa expressão de TNF- $\alpha$  no grupo infectado com *L. amazonensis* pode, por sua vez, estar relacionada com a possibilidade desta espécie de *Leishmania* inibir a produção de TNF- $\alpha$  nas fases mais iniciais da infecção.

Neste estudo observou-se ainda que a diminuição de TNF- $\alpha$ , na maioria dos camundongos após o primeiro dia de infecção com *L. amazonensis*, correlacionou-se com a ausência ou diminuição da expressão de RNAm para diversas quimiocinas estudadas, a exemplo de KC, MIG, CRG-2 e MCP-5, nesse mesmo tempo. Sendo assim, estes dados permitem a especulação de que o TNF- $\alpha$  também esteja relacionado com a ativação de fatores envolvidos na transcrição dos genes dessas quimiocinas. BLISS et al. (1999) demonstraram recentemente que o TNF- $\alpha$  exógeno atua como um potente estímulo para a expressão das quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  por neutrófilos humanos estimulados com antígeno de *Toxoplasma gondii* e que o bloqueio do TNF- $\alpha$  nas culturas dessas células diminui a expressão dessas quimiocinas. O trabalho de CZERMAK et al. (1999) reforça esta hipótese ao demonstrar que tanto o TNF- $\alpha$  quanto produtos resultantes da ativação do complemento, como C5a, funcionam como ativadores autócrinos da produção de algumas CXC e CC quimiocinas por macrófagos alveolares, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A depleção de TNF- $\alpha$  *in vivo* reduz a quantidade de células de Langerhans infectadas com *L. major* no linfonodo de camundongos BALB/c, enquanto que a administração de TNF- $\alpha$  recombinante reverte esse efeito (ARNOLDI & MOLL, 1998).

A análise da expressão de RNAm para IL-4 demonstrou que essa citocina aparece tardiamente nas lesões de camundongos infectados com *L. amazonensis*. Nos

camundongos dos grupos controle ou infectado com *L. major*, não foi detectada a expressão de RNAm para IL-4 em nenhum dos pontos analisados, com exceção de um único camundongo que apresentou uma baixa expressão de RNAm para esta citocina no 12º dia de infecção (Fig. 11). Estes dados confirmam a natureza Th2 da resposta imune desenvolvida por camundongos infectados com *L. amazonensis* descrita por SOUZA (1998). A estimulação *in vitro* de células de linfonodos de camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazonensis* resulta no aumento de IL-4 no 7º dia de infecção. No entanto, a partir do 49º dia os níveis desta citocina são mantidos apenas pelas células do grupo infectado com *L. amazonensis* (SOUZA, 1998). Estes resultados sugerem que, embora ocorra a produção de IL-4 por células de linfonodo de camundongos infectados com diferentes espécies de *Leishmania* nos primeiros sete dias após infecção, não deve estar havendo migração destas células para o sítio inflamatório nesta fase e por isto observou-se a ausência de expressão desta citocina em ambos os grupos. A manutenção de uma resposta Th2 no grupo infectado com *L. amazonensis* após o 40º dia de infecção e o provável influxo de células produtoras de IL-4 poderia explicar a expressão tardia desta citocina nas lesões desses animais. Além disto, a falta de estímulos, a exemplo dos mediados por algumas quimiocinas e TNF- $\alpha$ , aliada à presença de IL-4 nas lesões de camundongos infectados com *L. amazonensis*, pode estar contribuindo para a inibição da atividade leishmanicida de macrófagos, favorecendo a proliferação dos parasitos e o aumento progressivo das lesões nesses animais.

Os grupos experimentais utilizados neste estudo apresentam um número pequeno de animais e este fato pode estar interferindo na significância estatística dos

dados para algumas quimiocinas e citocinas, a exemplo de KC, CRG-2 e TNF- $\alpha$ , já que existiu uma certa variação na resposta individual dos camundongos estudados. Por outro lado, o fato de não haver diferenças estatisticamente significativas entre os grupos não implica que as diferenças encontradas não tenham algum significado biológico. A aplicação de estudos funcionais através da inibição de determinadas quimiocinas ou a utilização de camundongos “knockout” para estas moléculas poderiam auxiliar na melhor compreensão do papel de quimiocinas nos mecanismos que envolvem resistência ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania*. Além disso, os resultados apresentados neste estudo representam tendências, já que foi utilizada a mediana de um experimento realizado. O aumento do número de animais e a repetição do experimento em número superior a dois, tornaria o estudo inviável em virtude do elevado custo dos reagentes para biologia molecular e do número de moléculas avaliadas. No entanto a repetição dos experimentos se faz necessária para que os resultados possam ser confirmados e validados.

Outro ponto que não pode deixar de ser abordado, refere-se a técnica utilizada neste trabalho. O RT-PCR baseia-se na transcrição reversa de moléculas de RNAm, presentes na amostra, em cDNA e subsequente amplificação por PCR. Desse modo, estes estudos fornecem apenas informações à respeito do RNAm que contém a mensagem para a síntese da quimiocina estudada. Alguns trabalhos têm demonstrado existir uma estreita correlação entre a presença do RNAm e a proteína ativa (BADOLATO et al., 1996; CHENSUE et al., 1999). Muitos laboratórios utilizam este recurso para o estudo de quimiocinas e outros fatores protéicos, pelo fato da acumulação da mensagem, em resposta à estímulos diversos, ocorrer dentro de

poucos minutos. Ademais, estas moléculas apresentam uma difusão rápida quando presentes nos tecidos sob a forma de proteínas ativas e interagem com componentes da matriz extracelular (RANSOHOFF et al., 1997). Esses fatores dificultam os estudos que visam a detecção da molécula madura e justificam o uso de técnicas de biologia molecular, a exemplo do RT-PCR, na determinação da expressão de quimiocinas e de outras moléculas.

Os resultados apresentados neste estudo abrem perspectivas para estudos relacionando a expressão de quimiocinas e características fenotípicas das células inflamatórias presentes nas lesões de camundongos CBA infectados com diferentes espécies de *Leishmania*, principalmente em relação à expressão de CD4, CD8 e produção de IL-4 e IFN- $\gamma$  por subpopulações de linfócitos T.

Os dados apresentados neste trabalho mostram que a expressão de RNAm para algumas moléculas como KC, MIG, CRG-2, MCP-5 e TNF- $\alpha$  encontra-se diminuída ou ausente, no primeiro dia após infecção, em lesões de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis*, ao passo que, na infecção com *L. major* observa-se um aumento na expressão dessas moléculas. Estes resultados demonstram que fatores relacionados com a espécie de *Leishmania* podem estar influenciando o tipo de resposta desenvolvido por camundongos CBA e que a identificação destes fatores poderia ampliar os conhecimentos a respeito dos mecanismos relacionados com a indução da resposta imuno-inflamatória nesses camundongos. Além disso, a expressão diferenciada de quimiocinas nos grupos estudados apontam para a participação destas moléculas na determinação do infiltrado inflamatório e da reação imune que

correlaciona-se com resistência ou susceptibilidade à infecção, nas lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazonensis* .

## 7. CONCLUSÕES

1. Camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazonensis* apresentam distintos perfis de expressão de RNAm para as CXC quimiocinas KC, MIG e CRG-2 e para a CC quimiocina MCP-5 em diferentes períodos após infecção.
2. A infecção de camundongos CBA com *L. amazonensis* induz a inibição na expressão de RNAm para algumas quimiocinas como KC, MIG, CRG-2 e MCP-5, ao passo que na infecção com *L. major*, ocorre um aumento na expressão destas moléculas.
3. A inibição da expressão de RNAm para TNF- $\alpha$  nas lesões de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis*, no 1º dia de infecção, correlaciona-se com a inibição da expressão das quimiocinas KC, MIG, CRG-2 e MCP-5 e sugere a participação desta citocina na indução dessas moléculas.
4. Camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* apresentam uma maior expressão de RNAm para IL-4, na fase mais tardia da infecção (40 dias), confirmando a natureza Th2 da resposta imune desenvolvida por estes animais.

5. A inibição da expressão de KC nas lesões de camundongos infectados com *L. major*, o aumento da expressão de MIG e CRG-2, quimiocinas induzidas por IFN- $\gamma$ , bem como a cura da infecção nestes camundongos, sugerem a presença de níveis aumentados de IFN- $\gamma$  nas lesões destes animais.
6. A expressão diferencial de quimiocinas nos grupos estudados indicam a participação destas moléculas na determinação do infiltrado inflamatório e da reação imune, relacionados com resistência ou susceptibilidade à infecção, nas lesões de camundongos CBA infectados com *L. major* ou *L. amazonensis*.
7. Os resultados apresentados sugerem que fatores relacionados com a espécie de *Leishmania* podem estar influenciando o tipo de resposta e o perfil de expressão de genes de quimiocinas e citocinas na infecção de camundongos CBA.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, C.; CASSATELLA, M.; ZAMBELLO, R.; TRENTIN, L.; GASPERINI, S.; OERIN, A.; PIAZZA, F.; SIVIERO, M.; FACCO, M.; DZIEJMAN, M.; CHILOSI, M. QIN, S.; LUSTER, A.D.; SEMENZZATO, G. Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. **J. Immunol.**, **161**:6413-20, 1998.
- ALEXANDER, J. & BLACKWELL, J.M. The immunological significance of genetically determinant cross reactivity between taxonomically distinct *Leishmania* species. IMEEE, Montpellier, 1986, p.185-91.
- ALIBERTI, J. C.; TALVANI, A.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokine gene expression in *Trypanosoma cruzi* infected mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92**: 59-60, 1997. Suppl. 1.
- AMICHAY, D.; GAZZINELLI, R. T.; KARUPIAH, G.; MOENCH, T. R.; SHER, A.; FARBER, J.M. Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles *in vivo*. **J. Immunol.**, **157** : 4511-20, 1996.
- ANDERSON, S; DAVID, J. R.; McMAHON-PRATT, D. *In vivo* protection against *Leishmania mexicana* mediated by monoclonal antibodies. **J. Immunol.**, **131**: 1615-1618, 1983.
- ANDRADE, Z.A.; REED, S. G.; ROTERS, S. B.; SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, **114**: 137-48, 1984.

- ARNOLDI, J.& MOLL, H. Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: Regulation by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , and Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ . **Dev. Immunol.**, **6**:3-11, 1998.
- BADOLATO, R.; SACKS, D. L.; SAVOIA, D.; MUSSO, T. *Leishmania major*. Infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. **Exp. Parasitol.**, **82**: 21-26, 1996.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotatic cytokines - CXC and CC chemokines. **Adv. Immunol.**, **55**: 97-179, 1994.
- 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.**, **90**: 3442-46, 1993.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, R. G.; MOMEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON JUNIOR, W.D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **44**: 536-46, 1991.
- BARRAL-NETTO, M.; FREITAS, L.A.R; ANDRADE, Z.A. Histopathologic changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of BALB/c mice. **Am. J. Pathol.**, **127**: 271-78, 1987b.
- BEHIN, R.; MAUEL, J.; SORDAT, B. *Leishmania tropica*: pathogenicity and *in vitro* macrophage function in strains of inbred mice. **Exp. Parasitol.**, **48**: 81-91, 1979.

- BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D.S.; MEIDE, P.H. van der; SLAYTER, M.V.; NACY, C. A. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies *in vivo* abrogates resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, **143**: 266-74, 1989.
- BEVERLEY, S. M. & TURCO, S.J. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. **Trends Microbiol.**, **6**: 35-40, 1998.
- BITTENCOURT, A.L. & BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: DOERR, W. & SEIFERT, G. (eds.) *Tropical Pathology*. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.597-651.
- BLISS, S. K.; MARSHALL A. J. ; ZHANG, Y.; DENKERS, E. Y. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF- $\alpha$ , and the chemokines Macrophage-Inflammatory Protein-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  in response to *Toxoplasma gondii* antigens. **J. Immunol.**, **162**: 7369-75, 1999.
- BOGDAN, C.; MOLL, H.; SOLBACH, W.; RÖLLINGHOFF, M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **Eur. J. Immunol.**, **20**:1131-35, 1990.
- BOGDAN, C.; STENGER, S.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. Interleukin 4 synergizes with interferon- $\gamma$  to activate murine macrophages for killing of *Leishmania major* amastigotes. **Eur. J. Immunol.**, **21**: 327-333, 1991.

- BOKOCH, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation . **Blood**, **86**: 1649-60, 1995.
- BONECCHI, R.; BIANCHI, G.; BORDIGNON, P. P.; D'AMBROSIO, D.; LANG, R. BORSATTI, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; GRAY, P. A.; MANTOVANI, A.; SINIGAGLIA, F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. **J. Exp. Med.**, **187**:129-34, 1998.
- BOTTOMLY, K. Afunctional dichotomy in CD4+ T lymphocytes. **Immunol. Today**, **9**(9): 268-74
- BOZIC, C. R.; KOLAKOWSKI, L.F. JR; GERARD, N.P.; GARCIA-RODRIGUEZ, C.; VON UEXKULL-GULDENBAND C; CONKLYN, M.J.; BRESLOW, R.; SHOWELL, H.J.; GERARD, C. Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. **J. Immunol.**, **154**: 6048-57,1995.
- BRADLEY, D.J. & KIRKLEY, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host.I.The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. **Clin. Immunol.**, **30**: 119-29, 1977.
- BRANDONISIO, O.; PANARO, M. A.; MARZIO, R.; MARANGI, A. FALIERO, S. M.; JIRILLO, E. Impairment of the human phagocyte oxidative response caused by *Leishmania* lipophosphoglican (LPG): *in vitro* studies. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, **8**: 57, 1994.
- BRASIL. *Controle, Diagnóstico e Tratamento de Leishmaniose Visceral (Calazar). Normas Técnicas*. Brasília: Ministério da Saúde/Fundação Nacional da Saúde, 1996. 86 p.

- BRITTINGHAM, A ; MORRISSON, C. J.; MCMASTER, W. R.; MCGWIRE, B. S.;  
CHANG, K. P.; MOSSER, D. M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in  
complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis.  
**J. Immunol.**, **155**:3102-11, 1995.
- CALABRESE, K.S. & COSTA, S.C.G. Enhancement of *Leishmania amazonensis*  
infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. **Mem. Inst.  
Oswaldo Cruz**, **87**: 49-56, 1992. Suppl.I.
- CARVALHO E.M.; JOHNSON, W.D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P.D.; COSTA J.L.M.;  
REED, S.G.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and  
mucosal leishmaniasis. **J. Immunol.**, **135**: 4144-48, 1985.
- CASTES, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O.; RONDÓN J. Characterization of the cellular  
immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Immunol.  
Immunopathol.**, **27**: 176-86, 1983.
- CHAMPSI, J.& McMAHON, P.D. Membrane glycoprotein M-2 protects against  
*Leishmania amazonensis* infection. **Infect. Immunol.**, **52**: 3272-79, 1988.
- CHENSUE, S. W.; WARMINGTON, K. S.; ALLENSPACH, E. J.; LU, B.; GERARD, C.;  
KUNKEL, S.; LUKACS, N. W. Differential expression and cross-regulatory function  
of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-  
elicited granulomatous inflammation. **J. Immunol.**, **163**: 165-73, 1999.
- CHOE, H.; FARZAN, M.; SUN, Y.; SULLIVAN, N.; ROLLINS, B.; PONATH, P. D., WU,  
L. MACKAY, C. R.; LaROSA, G. NEWMAN, W.; GERARD, N.; GERARD, C.;  
SODROSKI, J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection  
by primary HIV-1 isolates. **Cell**, **85**:1135-448, 1996.

- CLARCK-LEWIS, I.; SCHUMACHER, BAGGIOLI, M.; MOSER, B. Structure-activity relationships of interleukine-8 determined using chemically synthesized analogs: critical role of NH<sub>2</sub>-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. **J. Biol. Chem.**, **266**: 23128-34, 1991.
- COCCHI, F.; DeVICO, A. L.; GARZINO, D. A.; ARYA, S. K.; GALLO, R. C.; LUSSO, P. Identification of RANTES, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  as the major HIV-suppressive factors produced by CD8<sup>+</sup> T cells. **Science**, **270**: 1811-15, 1995.
- COTTERELL, S. E. J.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. **Eur. J. Immunol.**, **29**: 203-14, 1999.
- COUTINHO, S. G.; PIRMEZ, C.; MENDONÇA, S. C. F.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; DÓREA, R. C. C. Pathogenesis and immunopathology of Leishmania. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82**: 214-18, 1987. Suppl. 1.
- CUNHA,, F. Q.; WEISER, W. Y.; DAVID, J. R.; MOSS, D. W.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Recombinant migration inhibitory factor induces nitric oxide synthase in murine macrophages. **J. Immunol.**, **150**:1908-12, 1993.
- CZERMAK, B. J.; SARMA, V.; BLESS, N. M.; SCHMAL, H.; FRIEDL, H. P.; WARD, P. A. *In vitro* and *in vivo* dependency of chemokine generation on C5a and TNF- $\alpha$ . **J. Immunol.**, **162**: 2321-25, 1999.
- DESCOTEAUX, A.; MATLASHEWSKI, G.; TURCO, S. J. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **J. Immunol.**, **149**: 3008-15, 1992.

- DEVERGNE, O.; MARFAING-KOKA, A.; SCHALL, T. J.; LEGER-RAVET, M. B.; SADICK, M.; PEUCHMAUR, M.; CREVON, M. C.; KIM, K. J. Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells. **J. Exp. Med.**, **179**: 1689-94, 1994.
- FALCOFF, R.; BARRAL-NETTO, M.; STIFFEL, C.; BOUTHILLIER, Y.; BARRAL, A.; FREITAS, L. A.R.; MEVEL, J.C.; MOUTON, D. Variations in susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection in lines of mice selected for high or low immunoresponsiveness. **Parasite Immunol.**, **13**: 639-47, 1991.
- FARBER, J. M. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. **J. Leukoc. Biol.**, **61**: 246-57, 1997.
- FIORENTINO, D. F.; ZLOTINIK, A.; VIEIRA, P.; MOSSMANN, T. R. HOWARD, M.; MOORE, K. W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, **146**: 3444-51, 1991.
- FRANKENBURG, S.; LEIBOVICI, V.; MANSBACH, N. TURCO, S. J.; ROSEN, G. Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. **J. Immunol.**, **145**:4284, 1990.
- GAZZINELLI, R. T.; TALVANI, A.; CAMARGO, M. M.; SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, M. A. P.; VIEIRA, L.Q.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C. S.; SILVA, J. S. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. **Braz. J. Med. Res.**, **31**: 89-104, 1998.
- GERARD, C. & GERARD, N. P. The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte. **Curr. Opin. Immunol.**, **6**:865-873, 1994.

- GHALIB, H. W.; ELTOUM, E. A.; KROON, C. C. M.; EL HASSAN, A. M. Identification of *Leishmania* from mucosal leishmaniasis by recombinant DNA probes. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **86**:158-160, 1992.
- GILLITZER, R.; WOLFF, K.; TONG, D.; MULLER, C.; YOSHIMURA, T.; HARTMANN, A. A.; STINGL, G.; BERGER, R. MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. **J. Invest. Dermatol.**, **101**:127-31, 1993.
- GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol.**, **145**: 4290-97, 1990.
- GRIMALDI, G. J. Leishmanioses Tegumentares: Aspectos clínicos e imunopatológicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **77**: 195-215, 1982.
- GRIMALDI, G.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **41**: 88-400, 1989.
- HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY B. J; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon-g or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, **169**: 59-72, 1989.
- HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; MUTHA, S.S.; LOCKSLEY, R.M. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **88**: 7011-15, 1991.

- HEINZEL, F.P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L.E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **177**:1505-1509, 1993.
- HOGABOAN, C. M.; BONE-LARSON, C. L.; LIPINSKI, S.; LUKACS, N. W.; CHENSUE, S. W.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Differential monocyte chemoattractant protein-1 and chemokine receptor 2 expression by murine lung fibroblasts derived from Th1- and Th2-type pulmonary granuloma models. **J. Immunol.**, **163**: 2193-2201, 1999.
- HORUK, R.; CHITNIS, CE; DARBONNE, W. C.; COLBY, T. J.; RYBICKI, A.; HADLEY, T. J.; MILLER, L. H. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor . **Science**, **261**: 1182-4, 1993.
- HOWARD, J. G.; HALE, C.; LIEW, F.Y. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. IV. Prophylactic effect of sublethal irradiation as a result of abrogation of suppressor T cell generation in mice genetically susceptible to *Leishmania tropica*. **J. Exp. Med.**, **153**: 557-68, 1981.
- HOWARD, J. G.; HALE, C.; LIEW, F.Y. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. IV. Prophylactic effect of specific suppression of cell-mediated immunity. **J. Exp. Med.**, **152**: 594-607, 1980.
- HOWARD, J. G.; LIEW, F.Y.; HALE, C.; NICKLIN, S. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. II. Further characterization of the protective immunity against fatal *L. tropica* infection induced by irradiated promastigotes. **J. Immunol.**, **132**: 450-55, 1984.

- JIA, G.Q.; GONZALO, J. A.; LLOYD, C.; KREMER, L.; LU, L.; MARTINEZ-A, C.; WERSHIL, B. K.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C. Distinct Expression and function of the novel mouse chemokine monocyte chemotactic protein-5 in lung allergic inflammation. **J. Exp. Med.**, **184**: 1939-51, 1996.
- KELLEHER, M.; MOODY, S. F.; MIRABILE, P. OSBORN, A. H.; BACIC, A.; HANDMAN, E. Lipophosphoglycan blocks attachment of *Leishmania major* amastigotes to macrophages. **Infect. Immun.**, **63**: 43-50, 1995.
- LAMONT, A. G. & ADORINI, L. IL-12: a key cytokine in immune regulation. **Immunol. Today.**, **17**: 214-17, 1996.
- LIEW, F.Y. & O'DONNELL, C.A. Immunology of Leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, **32**: 161-59, 1993.
- LIEW, F.Y. Cell-mediated immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitol. Tod**, **2**: 264-70, 1986.
- LIEW, F.Y.; Li, Y.; MILLOT, S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  synergizes with IFN- $\gamma$  in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.**, **145**: 4306-4310, 1990a.
- LIEW, F.Y.; MILLOT, S.; Li, Y.; LELCHUCK, R.; CHAN, W. L.; ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon gamma from host-protective T-cells is inhibited by interleukin IL-3 and IL-4 produced by disease promoting T-cells in leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, **19**: 1227-32, 1989.

- LIEW, F.Y.; PARKINSON,C.; MILLOT, S.; SEVERN, A.; CARRIER, M. J. Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in leishmaniasis. I. TNF- $\alpha$  mediates host-protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, **69**: 570-73, 1990b.
- LO, S. K.; BOVIS, L.; MATURA, R.; ZHU, B.; HE, S.; LUM,H.; TURCO, S. J.; HO, J. L. *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: Modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. **J. Immunol.**, **160**: 1857-65, 1998.
- LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; GARDNER, K. D.; Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T cells subsets. **Ann. Inst. Pasteur/Immunol.**, **138**: 744-749, 1987
- LOETSCHER, M.; GERBER, B.; LOETSCHER,P. Chemokine receptor specific for IP-10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. **J. Exp. Med.**, **184**: 1101-59, 1996.
- LUKACS, N. W.; KUNGEL, S. L.; STRITER, R. M.; WARMINGTON, K.; CHENSUE, S. W. The role of macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. **J. Exp. Med.**, **177**: 1551-9, 1993.
- LUSTER, A. D. Chemokines: Chemotactic cytokines that mediate the inflammation. **N. Engl. J. Med.**, **12**:436-45, 1998.
- MAUEL, J. & BEHIN, R. Immunology of Leishmaniasis. (eds.). In: LEVANDOWSKY, M. & HUTNER, S.H. *Biochemistry and physiology of protozoa*. 2.ed. New York: Academic Press,1981. v.4. p. 385-429.

- McSORLEY, S.; PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, C.A.; LIEW, F.-Y. Immunology of Murine Leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, **14**: 451-64, 1996.
- MERCHÁN-HAMANN, E. Diagnóstico macroregional das situações das endemias das regiões Norte e Nordeste. **Inf. Epidemiol. SUS**, **6**: 43-114, 1997.
- MITCHELL, G.F.; CURTES, J.M.; HADMAN, E. Cutaneous leishmaniasis in mice: Disease patterns in reconstituted nude mice of several genotypes infected with *Leishmania tropica*. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, **58**: 521-32, 1980.
- MOSSER, D.M. & ROSSENTHAL, L.A. Divergent strategies used by the promastigote and amastigote forms of *Leishmania* to invade mammalian cells. 1994 Baillière's. **Clin. Infect. Dis.**, **1**: 191-212, 1994.
- MOSSMANN, T.R., & COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol.**, **7**:145-73, 1989.
- MÜLLER, I.; FREITH, U.; LOUIS, J.A. Immunobiology of experimental leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, **181**: 1-12 1992.
- MÜLLER, I.; PEDRAZZINI, T.; FARREL, J. P.; LOUIS, J.A. T-cell response and immunity to experimental infection with *Leishmania major*. **Annu. Rev. Immunol.**, **7**: 561-578, 1989.
- MURPHY, M. L.; COTTERELL, S. E. J.; GORAK, P. M. A.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, *Leishmania donovani*. **J. Immunol.**, **161**: 4153-60, 1998.

MURPHY, P. M.; The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, **12**: 593-633, 1994.

NACY, C. A.; NELSON, B. J.; MELTZER, M. S.; GREEN, S. J. Cytokines that regulate macrophage production of nitrogen oxides and expression of antileishmanial activities. **Res. Immunol.**, **142**: 573-576, 1991.

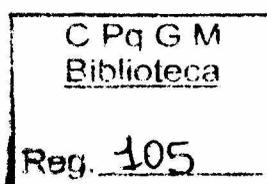
NATHAN, C.; MURRAY, H. W.; WIBE, M. E.; RUBIN, B. Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, **158**:670-89, 1983.

NEOTE, K.; DARBONNE, W.; OGEZ, J.; HORUK, R.; SCHALL, T. J.; Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. **J. Biol. Chem.**, **268**:12247-49, 1993.

OBERLIN, E.; AMARA, A.; BACHELERIE, F.; BESSICA, C; VIRELIZIER, J. L.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; SCHWARTZ, O.; HEARD, J. M.; CLARCK-LEWIS, I.;LEGLER, D. F.; LOETSHER, M.; MOSER, B. The chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line adapted-HIV-1. **Nature**, **382**:833-35, 1996

PEREZ, H.; ARREDONDO, B.; GONZALEZ, M. Comparative study of American cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis in two strains of inbred mice. **Infect. Immun.** **22**:301-07, 1978.

PREMACK, B. A. & SCHALL, T. J. Chemokine receptor: Gateways to Inflammation and infection. **Nature Med.**, **2**: 1174-1178, 1996.



- RACOOSIN, E. & BEVERLEY, S.M. *Leishmania major*. Promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. **Exp. Parasitol.**, **85**: 283-95, 1997.
- RANSOHOFF, R. M.; TANI, M.; GLABINSKI, A. R.; CHERNOSKY, A.; KRIVACIC, K.; PETERSON, J. W.; CHIEN, H.; TRAPP, B. D. Chemokines and chemokine receptors in model neurological pathologies: Molecular and Immunocytochemical approaches. **Methods Enz.**, **287**:319-48, 1997
- RAPORT, C. SCHWEICKART, V. L.; CHANTRY, D.; J-EDDY, R. L.; SHOWS, T. B.; GODISKA, R. GRAY, P. New members of the chemokine receptor gene family. **J. Leukoc. Biol.**, **59**:18-23, 1996.
- REIS, M. G.; ROTERS, B.; BARRAL-NETTO, M. Immune serum from both susceptible and resistant strains of mice increases phagocytosis of *Leishmania mexicana amazonensis* by macrophages. **Acta Tropica**, **44**: 339-42, 1987.
- RITTER U.; MOLL, H.; LASKAY, T.; BRÖCKER, E. B.; VELAZCO, O.; BECKER, I.; GILLITZER, R. Differential expression of chemokines in patients localized and diffuse cutaneous american leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **173**: 699-09, 1996.
- ROLLINS, B. Chemokines. **Blood**, **90**: 909-28, 1997.
- SADICK, M.D.; HEINZEL, F.; HOLADAY, B.J.; PU, R.T.; DAWKINS, R.S.; LOCKSLEY, R.M. Cure of murine leishmaniasis with a anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. **J. Exp. Med.**, **171**: 115-27, 1990.

- SALLUSTO, F.; MACKAY, C. R.; LANZAVECCHIA, A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. **Science**, **277**: 2005-7, 1997.
- SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, C. F.; SANTIAGO, L.; NOGUEIRA, T. S.; BAMBIRRA, E. A.; WVIEIRA, L. Q. V.; GAZZINELLI, R. T. The *in vivo* chemokine gene expression in inflammatory site from susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice infected with *Leishmania major*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**: 283, 1998. Suppl. II.
- SARAFI, M. N.; GARCIA-ZEPEDA, E. A.; MACLEAN, J. A.; CHARO, I. F.; LUSTER, A. D. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. **J. Exp. Med.**, **185**:99-109, 1997.
- SCHALL, T. J. & BACON, K. B. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. **Curr. Op. Immunol.**, **6**: 865-73, 1994.
- SCHRUM, S.; PROBST, P.; FLEISCHER, B.; ZIPFEL, P. F. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and RANTES is associated with a type 1 immune response. **J. Immunol.**, **157**: 3598-3604, 1996.
- SCOTT, P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, **68**: 369-72, 1989.
- SILVA, A. T. P. **Estudo da expressão de RNA mensageiro de quimiocinas em tecido cardíaco durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*.** Belo Horizonte: 1998. 118 p. il. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Instituto de Ciências Biológicas UFMG. Belo Horizonte, 1998.

- SILVA, O.A.; SOUSA, M.E.C.; SANTOS, F.A.B.; MEIRELLES, A.C.F.; SILVA, J.I. Leishmaniose tegumentar americana na zona da mata de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 15., Salvador, 1997. p.TL-040
- SILVA, T. M. C. **A resposta imuno-inflamatória na leishmaniose tegumentar humana.** Salvador: 1999. 116p. il. Tese (Doutorado em Patologia Humana)- Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1999.
- SOONG, L.; CHANG, C-H.; SUN, J.; LONGLEY, JUNIOR, B.; RUDDLE, N.H.; FLAVELL, R.A.; McMAHON-PRATT, D. Role of CD4<sup>+</sup> T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, **158**: 5374-83, 1997.
- SOONG, L.; DUBOISE, M.; KIMA, P.; McMAHON-PRATT, D. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **63**: 3559-66, 1995.
- SOUZA, V. L. **Estudo comparativo das infecções por *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis* em camundongos CBA.** Salvador. 1998. 120 p. il. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1998.
- STENGER, S.; THÜRING, H.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **180**: 783-93, 1994.
- STREIT, J. A.; DONELSON, J. E.; AGEY, M. W.; WILSON, M. E. Developmental changes in the expression of *Leishmania chagasi* gp63 and heat shock protein in a human macrophage cell line. **Infect. Immun.**, **64**: 1810-18, 1996.

- STRIETER, R. M.; STANDIFORD, T. J. ; HUFFNAGLE, G. B.; COLLETTI, L. M.; LUCKAS, N. W.; KUNKEL , S. L. "The good , the bad, and the ugly". The role of chemokines in models of human disease. **J. Immunol.**, **156**:3583-3586, 1996.
- SYPEK, J.P.; CHUNG, C.L.; MAYOR, S.E.H.; SUBRAMANYAN, J.M.; GOLDMAN, S.J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S.F.; SCHAUB, R.G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **J. Exp. Med.**, **177**: 1797-802, 1993.
- TANAKA, T; HU-LI, j.; sEDER, R. A.; DE ST. GROTH, B. F.; PAUL, W. E. Interleukin 4 supresses interleukin 2 and interferon gamma production by naive T cells stimulated by acessory cell-dependent receptor engagement. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **90**: 5914-18, 1993.
- TITUS, G. R.; THEODOS, C. M.; SHANKAR A.; HALL, L. R. Interactions between *Leishmania major* and macrophages. In: ZWILLING, T. & EISENSTEIN, T. (Eds.). *Macrophage-Pathogen Interactions*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. p.437-459.
- TITUS, R.G.; CEREDIG, R.; CEROTTINI, J. C.; LOUIS, J.A. Therapeutic effect of anti-L3T4 monoclonal antibody gk 1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically susceptible BALB/c mice. **J. Immunol.**, **135**: 2108-14, 1985b.
- TITUS, R.G.; LIMA, G.C.; ENGERS, H.D.; LOUIS, J.A. Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite-specific helper T cell populations capable of mediating *Leishmania major*-specific delayed type hypersensitivity. **J. Immunol.**, **133**: 1594-600, 1984.

- TITUS, R.G.; MILON, G.; MARCHAL, G.; VASSALLI, P.; CEROTTINI, J. C.; LOUIS, J.A. Involvement of specific Lyt-2<sup>+</sup> T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, **17**: 1429-33, 1987.
- TITUS, R.G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, **170**: 2097-2104, 1989.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory adaptative immunity. **Ann. Rev. Immunol.**, **13**: 252-76, 1995.
- TURCO, S. J. & DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, **46**: 65-94, 1992.
- TURK, J. L. & BRYCESON, A. D. M. Immunological phenomena in leprosy and related diseases. **Adv. Immunol.**, **13**: 209-66, 1971.
- VESTER, B.; MÜLLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Early gene expression of NK-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, **67**:3155-59, 1999.
- WELLS, T. N. C.; POWER, C. A.; PROUDFOOT, A. E. I. Definition, function and pathophysiological significance of chemokine receptors. **TIPS**, **19**: 376-80, 1998.
- YU, X.; ANTONIADES, H. N.; GRAVES, D. T. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human inflamed gingival tissues. **Infect. Immun.**, **61**: 4622-8, 1993.