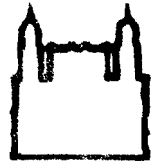




UFBA

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



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EFEITOS DA SALIVA DE LUTZOMYIA  
INTERMEDIA SOBRE MONÓCITOS HUMANOS**

**MARIA JOSÉ MENEZES**

**Salvador - Bahia - Brasil**

**2007**



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

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**EFEITOS DA SALIVA DE *LUTZOMYIA INTERMEDIA*  
SOBRE MONÓCITOS HUMANOS**

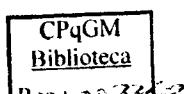
**MARIA JOSÉ MENEZES**

**Orientadora: Camila Indiani de Oliveira**

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

**Salvador-Bahia-Brasil**

**2007**



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

Menezes, Maria José  
M543e Efeitos da saliva de *lutzomyia intermedia* sobre monócitos humanos [manuscrito]  
/ Maria José Menezes. - 2007.  
64 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas  
Gonçalo Moniz, 2007.

Orientador: Profa. Dra. Camila Indiani de Oliveira, Laboratório de Imunoregulação  
Patologia.

1. Leishmania Braziliensis. 2. Saliva. 3. Monócitos. 4. Leishmaniose Americana.  
I.Título.

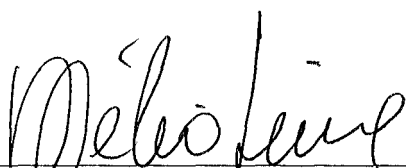
CDU 616.993.161:616-008.843.1

“EFEITOS DA SALIVA DE LUTZOMYIA INTERMÉDIA SOBRE MONÓCITOS HUMANOS”

MARIA JOSÉ MENEZES


FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA




---

Dr. Célio Geraldo Freire de Lima  
Professor Adjunto  
UFRJ



---

Dr. Washington Luis dos Santos  
Pesquisador Titular  
CPqGM-FIOCRUZ



---

Dra. Camila Indiani de Oliveira  
Pesquisadora Titular  
CPqGM-FIOCRUZ

À minha amada avó Francisca, à minha querida mãe Maria do Carmo e irmãs Sara, Lene e Luciana.

## **AGRADECIMENTOS**

Durante a minha pós-graduação, tive a oportunidade de conviver com muitas pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Gostaria de agradecê-las pelo estímulo intelectual, apoio, amizade e excelente convivência.

Dra. Camila Indiani de Oliveira

Dra. Aldina Barrai

Dr. Manoel Barral-Netto

Dr. Cláudia Brodskyn

Dirceu Joaquim Costa

Dr. Jorge Clarêncio

Colegas do LIP e LIM1

Colegas do Insetário do LIP, especialmente ao Dr. José Carlos Miranda, Joíza Monti Brizon e Edvaldo Passos.

Aos secretários do LIM1/LIP: Camilla Mota, Elze Leite e Jackson Lemos

Aos doadores anônimos e aos funcionários dos setores de produção e expedição da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia – HEMOBA.

Aos colegas e professores do Curso de Pós-graduação.

Aos funcionários do Setor de Coordenação de Ensino-PGPAT.

À bibliotecária Ana Fiscina e as funcionárias da Biblioteca do CPqGM.

Aos demais funcionários e colaboradores do CPqGM.

Às agências financiadoras CNPq e FAPESB.

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	LEISHMANIOSE	13
1.2	LEISHMANIA	14
1.3	A REPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE	15
1.3	A SALIVA DOS FLEBOTOMÍNEOS	18
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVO GERAL	23
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	DESENHO EXPERIMENTAL	23
4.1	EFEITO DA SALIVA DE <i>L. INTERMEDIA</i> SOBRE MONÓCITOS HUMANOS ESTIMULADOS COM LPS	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	26
5.2	PARASITAS	26
5.3	OBTENÇÃO DE SONICADO DE GLÂNDULA SALIVAR (SGS) DE <i>LUTZOMYIA INTERMEDIA</i> E <i>LUTZOMYIA LONGIPALPIS</i>	26
5.4	OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO (CMSP) POR GRADIENTE DE FICOLL	27
5.5	PURIFICAÇÃO DE MONÓCITOS HUMANO POR GRADIENTE DE PERCOLL	27
5.6	PURIFICAÇÃO DE MONÓCITOS HUMANOS POR SELEÇÃO POSITIVA EM ESFERAS MAGNÉTICAS	28
5.7	ESTIMULAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MONÓCITOS HUMANOS COM LPS E SGS DE <i>L. INTERMEDIA</i>	28
5.8	INFECÇÃO DE MONÓCITOS HUMANOS COM <i>L. BRAZILIENSIS</i>	29
5.9	CARGA PARASITÁRIA	29
5.10	EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DA SUPERFÍCIE	29
5.11	DOSAGEM DE CITOCINAS	30
5.12	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA	30
5.13	PCR EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS	31
	Tabela 1: Seqüências dos <i>primers</i> utilizados nos ensaios de PCR em Tempo Real	31
5.14	CÁLCULO DE EFICIÊNCIA DOS PRIMERS E DETERMINAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA	32
5.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
6	RESULTADOS	33
6.1	PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LPS PARA ESTIMULAÇÃO DE MONÓCITOS HUMANOS.	33

6.3 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS EM MONÓCITOS HUMANOS PRÉ-TRATADOS COM SGS DE <i>L. INTERMEDIA</i> E ESTIMULADOS COM LPS.	38
6.5 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE EM MONÓCITOS HUMANOS PREVIAMENTE TRATADOS COM SGS DE <i>L. INTERMEDIA</i> , ESTIMULADOS COM LPS E INFECTADOS COM <i>L. BRAZILIENSIS</i> .	43
6.6 AVALIAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO E CARGA PARASITARIA POR <i>L. BRAZILIENSIS</i> EM MONÓCITOS HUMANOS PRÉ-TRATADOS COM SGS DE <i>L. INTERMEDIA</i> .	45
6.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL EM MONÓCITOS PRÉ-SENSIBILIZADOS COM SGS DE <i>L. INTERMEDIA</i> E DE <i>L. LONGIPALPIS</i> .	46
6.8.1. Validação das Reações de PCR em Tempo Real.	46
6.8.2. Padronização da quantidade de SGS de <i>L. intermedia</i> e tempo de cultura nas reações de PCR em Tempo Real para quantificação de quimiocinas.	50
6.8.3 - Expressão de quimiocinas em monócitos humanos pré-tratados com SGS de <i>L. intermedia</i> e <i>L. longipalpis</i> em reação de PCR em Tempo Real.	52
7 DISCUSSÃO	53
8 CONCLUSÕES	57
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58



## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina de soro bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
Ct	Limiar de detecção ( <i>cycle threshold</i> )
ELISA	Ensaio imunoenzimático ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
HE	Hematoxilina–Eosina
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12p40	Interleucina 12
LPS	Lipopolissacarídeo
MIF	Média de Intensidade de Fluorescência
MACS	1 X PBS / BSA 0,5% / EDTA 2mM
NO	Óxido Nítrico
PAB	1 X PBS, 1% BSA e 0,05 %azida sódica
PBS	Tampão de salina Fosfatada (pH 7.4) ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>polimerase chain reaction</i> )
PE	Ficoeritrina
QR	Ensaio de Quantificação Relativa por Reação de PCR em Tempo Real
RHT	Reação de Hipersensibilidade Tardia
SBF	Soro Bovino Fetal
SGS	Sonicado de Glândula Salivar
SLA	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TGF- $\beta$	Fator Transformador de Crescimento Beta

# LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Produção de TNF- $\alpha$  em monócitos humanos estimulados com LPS....33
- Figura 2** - Produção de IL-10 e IL-6 em monócitos humanos estimulados com SGS de *L. intermedia* ..... 35
- Figura 3** - Produção de TNF- $\alpha$  e IL-12p40 em monócitos humanos pré-tratados com SGS de *L. intermedia*..... 37
- Figura 4** – Média da intensidade de fluorescência das moléculas CD86, CD80 e HLA-DR em monócitos humanos pré-tratados com SGS de *L. intermedia*..... 39
- Figura 5** - Produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  em monócitos humanos estimulados com SGS de *L. intermedia* e infectados com *L. braziliensis*..... 410
- Figura 6** - Produção de IL-6 e IL-8 em monócitos humanos estimulados com SGS de *L. intermedia* e infectados com *L. braziliensis*..... 42
- Figura 7** - Média da intensidade de fluorescência de CD86 e HLA-DR na Superfície de monócitos humanos pré-tratados com SGS de *L. intermedia*, estimulados com LPS e infectados com *L. braziliensi*..... 44
- Figura 8** – Carga parasitária de monócitos humanos pré-sensibilizados com SGS de *L. intermedia*, estimulados com LPS e infectados com *Leishmania braziliensis*..... 45

<b>Figura 9</b> - Plots de amplificação (A) e curvas de dissociação (B) das reações de PCR em Tempo Real utilizando os <i>primers</i> 18S, GAPDH, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ e Rantes.....	47
<b>Figura 10</b> - Plots de amplificação das reações de PCR em Tempo Real para determinar a diluição ideal de cDNA a ser utilizada com os <i>primers</i> 18S, GAPDH, IL-8, MCP-1, MIP1- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ e Rantes.....	48
<b>Figura 11:</b> Curvas-padrão das amplificações das reações de PCR em Tempo Real para determinar a eficiência dos <i>primers</i> 18S, GAPDH, IL-8, MCP-1, MIP1- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ e Rantes.....	49
<b>Figura 12:</b> Padronização da quantidade de SGS de <i>L. intermedia</i> para sensibilização de monócitos humanos para determinar a expressão de IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 e Rantes.....	51
<b>Figura 13:</b> Expressão das quimiocinas IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , Rantes e MCP-1 em monócitos humanos estimulados com SGS de <i>L. intermedia</i> e <i>L. longipalpis</i> .....	52

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Seqüências dos <i>primers</i> utilizados nos ensaios de PCR em tempo real.....	31
---	----

## RESUMO

EFEITOS DA SALIVA DE *LUTZOMYIA INTERMEDIA* SOBRE MONÓCITOS HUMANOS. **MARIA JOSÉ MENEZES.** A saliva dos flebotomíneos contém moléculas farmacológicas potentes e complexas que, quando inoculadas na pele do vertebrado, são capazes de modular os sistemas hemostático, inflamatório e imune do hospedeiro. No presente estudo, nós avaliamos os efeitos do conteúdo da glândula salivar de *Lutzomyia intermedia*, o vetor natural da *Leishmania braziliensis*, na produção de citocinas e na expressão de moléculas de superfície em monócitos estimulados com LPS, infectados ou não por *L. braziliensis*. Avaliamos também a carga parasitária em células infectadas e expressão de quimiocinas em monócitos pré-sensibilizados com a saliva de *L. intermedia* e com a saliva de *L. longipalpis*. Monócitos selecionados de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de doadores saudáveis foram pré-sensibilizados com SGS de *L. intermedia*, estimulados com LPS e, em seguida, infectados ou não com *L. braziliensis*. A produção de citocinas foi avaliada por ELISA em sobrenadante de cultura; expressão de moléculas de superfície foi determinada por citometria de fluxo e a expressão de quimiocinas foi analisada por PCR em Tempo Real em ensaios de Quantificação Relativa (QR). Monócitos humanos pré-tratados com SGS de *L. intermedia* mostraram uma redução significativa na produção de IL-10 e um aumento significativo na expressão de CD86. A infecção com *L. braziliensis* aumentou significativamente a produção de TNF- $\alpha$ , porém não alterou a expressão de CD86, nem a taxa de infecção em monócitos pré-sensibilizados com SGS. A expressão de IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e Rantes aumentou após estímulo de monócitos humanos com SGS de *L. intermedia* e *L. longipalpis*. Nossos dados indicam que a saliva de *L. intermedia* é capaz de modificar a produção de citocinas, a expressão de moléculas de superfície e a expressão de quimiocinas em monócitos humanos e estas alterações podem afetar a evolução da leishmaniose em infecções naturais.

**PALAVRAS CHAVE** *Leishmania braziliensis*, saliva, monócitos, Leishmaniose Tegumentar Americana

## ABSTRACT

### EFFECTS OF *LUTZOMYIA INTERMEDIA* SALIVA ON HUMAN MONOCYTES.

**MARIA JOSÉ MENEZES.** Sand fly saliva contains potent and complex pharmacologic molecules which, when inoculated in the skin of vertebrate, are able to modulate the hemostatic, inflammatory and immune host's systems. In the present study, we evaluated the effects of salivary gland contents of *Lutzomyia intermedia*, the natural vector of *Leishmania braziliensis*, in the production of cytokines and expression of surface molecules in LPS-stimulated human monocytes, infected or not by *L. braziliensis*, parasite load in infected cells and chemokine expression in human monocytes pre-sensitized with *L. intermedia*. Monocytes were selected from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors and pre-sensitized with SGS of *L. intermedia*, stimulated with LPS and infected or not with *L. braziliensis*. For chemokine expression, human monocytes were pre-sensitized with *L. intermedia* or *L. longipalpis* SGS. Cytokine production was evaluated by ELISA in culture supernatant; surface molecules expression was determined by flow cytometry and chemokine expression was analyzed by Real Time PCR in Relative Quantification (RQ) assays. LPS-stimulated human monocytes pre-treated with *L. intermedia* SGS showed a significant decrease in IL-10 production and a significant increase in CD86 expression, neither infection rate. Infection with *L. braziliensis* significantly increased TNF- $\alpha$  but do not altered surface molecule expression. Expression of IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  and Rantes increased after both *L. intermedia* and *L. longipalpis* SGS stimulation of human monocytes. Our data indicate that *L. intermedia* saliva is able to change cytokine production, surface molecule expression and chemokine expression in human monocytes and these alterations could affect the outcome of *Leishmaniasis* in natural infections.

[KEYWORDS] *Leishmania braziliensis*, saliva, monocyte, American Tegumentary Leishmaniasis.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 LEISHMANIOSE

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que representam importante problema de saúde pública mundial por afetarem dois milhões de pessoas em países da África, sul da Europa, Oriente Médio, Américas Central e do Sul e na Índia. Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de serem infectadas pelo parasito e a estimativa é de que 12 milhões estejam infectadas em todo o mundo; a doença causa 57.000 mortes anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

A leishmaniose apresenta duas formas clínicas principais: a Leishmaniose Visceral e a Leishmaniose Tegumentar. O Brasil é considerado um país endêmico, tanto para a Leishmaniose Visceral Americana (LVA), quanto para a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), apresentando as mais elevadas incidências de casos nas Américas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA), também conhecida como Calazar, é uma doença sistêmica e grave, que acomete o sistema reticuloendotelial, envolvendo baço, fígado medula óssea e linfonodos e a letalidade pode atingir cerca de 10%, quando não devidamente tratada (BITTENCOURT, 1995). A LVA comportava-se como uma endemia focal e rural até meados da década de 1980, mas nas últimas décadas ocorreu expansão da doença para regiões peri-urbanas e periferias de alguns centros urbanos e epidemias urbanas foram observadas em várias cidades, acometendo grupos de indivíduos jovens e ocasionado elevado número de óbitos. A LVA está distribuída em 17 dos 27 estados, com maior incidência no Nordeste com 92% do total de casos, seguido pela região Sudeste (4%), a região Norte (3%) e região Centro-Oeste (1%). No Brasil, o principal agente etiológico da LVA é a *Leishmania chagasi* e o vetor implicado na transmissão é a *Lutzomyia longipalpis* (Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2005).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença que acomete pele e mucosas, apresenta várias formas clínicas e possui elevada morbidade, podendo acarretar deformidades e seqüelas. A doença manifesta-se, na maioria das vezes, por meio de uma úlcera única, indolor, de bordas elevadas e com fundo necrótico, porém, cerca de 3% dos pacientes afetados evoluem para a forma mucosa da doença, caracterizada por destruição do septo cartilaginoso nasal, podendo comprometer palato, faringe, laringe e cordas vocais. Além destas duas formas clínicas mais comuns, a LTA pode apresentar também as formas difusa e disseminada (BITTENCOURT, 1995). Na LTA, também ocorreu expansão geográfica a partir de 1985 e hoje há relatos de transmissão da doença em todas as regiões do país e no período de 1985 a 2005, verificou-se uma média anual de 28.568 casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. No ano de 2004, dos 5510 municípios brasileiros, 2.000 relataram casos de LTA e a região Norte apresentou maior número de casos, seguida das regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul. No Brasil, o principal agente etiológico da LTA é a *Leishmania braziliensis* e o vetor associado com a sua transmissão é a *Lutzomyia intermedia* (BRASIL, 2007).

## 1.2 LEISHMANIA

Os protozoários do gênero *Leishmania* são organismos digenéticos, pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. O hospedeiro vertebrado adquire a infecção por *Leishmania*, por meio da picada de fêmeas infectadas, de insetos flebotomíneos, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (Velho Mundo), que, ao realizarem o repasto sangüíneo, regurgitam o conteúdo da glândula salivar na derme do hospedeiro, juntamente com formas promastigotas metacíclicas. Os parasitas se desenvolvem no sistema fagocitossomal dos macrófagos, onde sofrem transformações morfológicas e evoluem para as formas amastigotas, que se reproduzem por divisões binárias simples até a destruição da célula hospedeira, sendo então liberados no meio extracelular e são novamente fagocitados, mantendo assim a progressão da doença. Quando o flebotomíneo pica um hospedeiro vertebrado infectado, aspira células e componentes da matriz



extracelular, dentre os quais se encontram as formas amastigotas, que estão livres no sangue ou no interior de macrófagos. Os amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, as formas flageladas do parasita, no intestino médio do inseto e aí se multiplicam e evoluem para promastigotas metacíclicas, as formas infectantes do parasita. Estes parasitas migram para as regiões anteriores do trato digestório do vetor e são inoculados no hospedeiro vertebrado quando o vetor faz outro repasto sangüíneo re-iniciando o ciclo no hospedeiro vertebrado (BATES, 1994).

### 1.3 A REPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE

A *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório no hospedeiro vertebrado e a resposta imune é mediada predominantemente por células (SCOTT *et al.*, 1988). Neste contexto, as células apresentadoras de antígenos (APC) como macrófagos e células dendríticas, apresentam os antígenos do parasita, via moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II (MHC II), para as células T CD4+ *naïve* e estas se diferenciam em células efectoras T *helper* 1 (Th1) ou T *helper* 2 (Th2), de acordo com as citocinas às quais os linfócitos são submetidos (MOSMANN *et al.*, 1986). A ativação da célula T necessita da interação de um segundo sinal, envolvendo receptores co-estimulatórios presentes nas células T (CD28 e ICOS) e seus respectivos ligantes (B7-1, B7-2 e ICOSL), expressos na superfície das APCs e resulta na transcrição de citocinas e na proliferação celular (BHATIA *et al.*, 2006).

Os modelos experimentais murinos de resistência e susceptibilidade à leishmaniose cutânea foram desenvolvidos a partir do padrão de ativação de clones de células T CD4+ e a observação da polarização das respostas T *helper* 1 (Th1) X T *helper* 2 (Th2) em linhagens de animais infectados com *Leishmania major* (REINER & LOCKSLEY, 1995). As células T *helper* 1 (Th1) estão associadas à produção das citocinas IL-12, IL-2, IL-18, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que induzem a ativação de macrófagos infectados e morte de parasitas intracelulares (MOSMANN *et al.*, 1986). Este padrão de resposta é observado em camundongos das linhagens C57BL/6, C57BL/10, B10.D2, C3H, A/J, DBA/1, AKR, CBA, NZB e STS/A que

apresentaram resistência à doença ou cura espontânea das lesões. A imunidade protetora contra a infecção por *Leishmania* é dependente da produção da citocina IL-12, cujas principais células produtoras são APCs, principalmente macrófagos e células dendríticas. A expressão de IL-12 é feita através da interação da molécula CD40L, expressa na superfície de células T ativadas, com CD40, presente na superfície das APCs, que por sua vez, induz a produção de IFN- $\gamma$  por células T, acentuando a atividade leishmanicida dos macrófagos. Os macrófagos são células hospedeiras da *Leishmania* e sua ativação, através da produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico (NO) é o principal mecanismo para a eliminação do parasita (revisado em AWASTHI *et al.*, 2004). A neutralização de IL-12 em camundongos infectados com *L. major* ou *L. donovani* causou a exacerbação da doença nos animais, enquanto o tratamento de camundongos BALB/c com IL-12 recombinante levou à cura das lesões (HEINZEL *et al.*, 1995; ENGWERDE *et al.*, 1998). Camundongos de linhagens resistentes à infecção por *L. major*, cujo gene que codifica o IFN- $\gamma$  ou o seu receptor foram interrompidos, tornaram-se incapazes de controlar a infecção. A produção de TNF- $\alpha$  é crítica no controle da leishmaniose, pois atua de forma sinérgica com o IFN- $\gamma$  na indução da expressão de iNOS pelos macrófagos. A neutralização transitória da produção de TNF- $\alpha$ , através de anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , provocou a exacerbação da infecção por *L. major* em camundongos CBA e C3H, embora não tenha causado alterações em animais BALB/c. Outra citocina pró-inflamatória importante no controle da *Leishmania* é a IL-18, que age em combinação com a IL-12, induzindo a produção de IFN- $\gamma$  em macrófagos murinos. As citocinas IL-2, IL-4 e IL-7 também atuam com IFN- $\gamma$  na ativação de macrófagos e controle da infecção por *L. major* (revisado em AWASTHI *et al.*, 2004).

As linhagens murinas BALB/c e SWR/J, susceptíveis à infecção por *L. major*, apresentam predomínio de resposta tipo Th2, caracterizada pela secreção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, que leva à ativação de células B e produção de anticorpos. Estas citocinas desativam macrófagos, possibilitando a sobrevivência dos parasitas e progressão da doença (HONDOWICZ & SCOTT, 1999). Em camundongos BALB/c infectados por *L. major*, a síntese inicial de IL-4 leva ao padrão de susceptibilidade, através da redução da produção de IL-12, IFN- $\gamma$ , diminuição da expressão do receptor de IL-12 e da produção de NO pelos macrófagos (SCOTT *et al.*, 1988; SCOTT *et al.*, 1989; LIEW *et al.*, 1990; HEINZEL *et al.*, 1995).

Camundongos BALB/C tratados com anticorpos monoclonais anti-IL-4 ou linhagens BALB/c deficientes de IL-4 foram capazes de resolver a infecção por *Leishmania* (revisado em SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Embora IL-10 tenha sido inicialmente correlacionada com a resposta Th2 na leishmaniose murina, dados recentes têm apontado esta citocina como imunomoduladora na infecção por parasitas como filariose, esquistosomose, toxoplasmose e leishmaniose (BELKAID *et al.*, 2006). Em camundongos C57BL/6 infectados por *L. major*, apesar da cicatrização das lesões, foi possível recuperar *L. major* viáveis no baço, medula óssea, linfonodos e fígado. A *Leishmania* é capaz de induzir a produção de IL-10 por células T CD25+ reguladoras, mostrando que a persistência do parasita pode ser importante na manutenção da resposta de memória, pois camundongos C57BL/6 deficiente em IL-10 e infectados com baixas doses de parasitas eliminaram todos os parasitas, porém não apresentaram imunidade protetora quando re-infectados (BELKAID *et al.*, 2001).

No homem, a LTA apresenta amplo espectro de formas clínicas e a resposta imune desempenha um papel importante na patogênese, onde o controle da doença parece estar relacionado, principalmente, com uma resposta pró-inflamatória modulada (BOTTREL *et al.*, 2001). Estudos realizados com moradores de áreas endêmicas para Leshmaniose Cutânea (LC) mostraram que a produção adequada de IFN- $\gamma$  é essencial para o controle da doença (AKUFFO *et al.*, 1997; WEINSTOCK *et al.*, 1997), enquanto indivíduos que não são capazes de produzir IFN- $\gamma$  têm maior chance de desenvolver leishmaniose (CARVALHO *et al.*, 1994). Ensaios de *in vitro priming* com CMSP de doadores normais, co-cultivadas com *L. major*, o IFN- $\gamma$  foi a principal citocina produzida neste sistema, que teve sua produção regulada por IL-10 e IL-12 (ROGERS & TITUS, 2004). Em estudo com indivíduos residentes em área endêmica para LC com Teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM) positivo, porém sem manifestação clínica da doença (assintomáticos), apresentaram níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  inferiores aos observados em pacientes com LC e produção de IL-5 superior. Estes dados indicam que a produção modulada de citocinas é capaz de proteger o hospedeiro contra a doença (FOLLADOR *et al.*, 2002).

CMSP de pacientes com LC e Leshmaniose Cutânea Mucosa (LCM), estimuladas com SLA, produzem altas concentrações de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , com controle da parasitemia, porém os baixos níveis de IL-5 e IL-10 não conseguem

controlar a ação exacerbada das citocinas pró-inflamatórias, levando ao desenvolvimento das lesões. Estes pacientes apresentam IDRMM positivo. A resposta imune na LCM caracteriza o pólo hiperérgico da doença (BACELLAR *et al.*, 2002). Ensaio realizado com CMSP de pacientes com leishmaniose disseminada, estimuladas de SLA, mostraram que estes pacientes também produzem IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , porém em níveis inferiores aos observados em pacientes com LC, embora a produção de IL-5 e IL-10 seja similar entre as duas formas da doença (LEOPOLDO *et al.*, 2006). Nestes pacientes a IDRMM pode ser positiva ou negativa (CARVALHO *et al.*, 1994). Já CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea difusa (LCD), quando estimuladas com SLA, produzem altas concentrações de IL-10 e não se observa produção de IFN- $\gamma$ ; há grande quantidade de transcritos das citocinas IL-2, IL-4 e IL-10 e ausência de RNAm de IFN- $\gamma$ , fato que favorece a disseminação do parasita. A IDRMM destes pacientes é negativa. Este padrão de resposta caracteriza o pólo anérgico da leishmaniose cutânea. (BOMFIM *et al.*, 1996). A leishmaniose visceral também apresenta um padrão de resposta imune bem definido. CMSP destes pacientes, quando estimuladas *in vitro* com SLA, geralmente não proliferam, não produzem IFN- $\gamma$  e IL-12 e apresentam baixa produção de IL-2, IL-1 e TNF- $\alpha$  e o teste intradérmico é negativo. Este tipo de resposta também representa o pólo anérgico, semelhante aos pacientes com LCD (CARVALHO *et al.*, 1985; BARRAL-NETTO *et al.*, 1991; Ho *et al.*, 1992). A adição de IFN- $\gamma$ , associada a IL-2 ou de anticorpo monoclonal anti-IL-10 em culturas de CMSP destes pacientes, restaurou a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- $\gamma$  (CARVALHO *et al.*, 1994).

Estes resultados reforçam o papel das citocinas na resposta imune na leishmaniose humana. Na progressão da doença observamos produção polarizada de citocinas pró ou anti-inflamatórias, enquanto pacientes com cura espontânea ou indivíduos assintomáticos a produção de citocinas é balanceada.

O papel das células T CD8<sup>+</sup> na infecção por *Leishmania* ainda não está bem definido, embora se especule que estas células sejam auxiliares das células T CD4<sup>+</sup> na geração da memória imonológica contra *Leishmania* (AWASTHI *et al.*, 2004).

### 1.3 A SALIVA DOS FLEBOTOMÍNEOS

Os artrópodes hematófagos, para obterem sucesso em seu repasto sangüíneo, necessitam driblar três sistemas eficientes do hospedeiro vertebrado: hemostático, inflamatório e imunológico. Artrópodes que possuíam componentes em suas salivas capazes de antagonizar ou retardar a ação destes sistemas foram selecionados ao longo do processo evolutivo. Análises bioquímicas, moleculares e funcionais realizadas com produtos de glândulas salivares de insetos hematófagos mostraram que todos eles possuem, pelo menos, um componente vasodilatador, um com ação anti-agregação plaquetária e uma molécula anti-coagulante, embora exista grande diversidade molecular entre diferentes espécies de insetos. Além disso, foram descritas também moléculas com ação moduladora nas respostas inflamatória e imunológica do hospedeiro vertebrado (RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003). Assim, as principais moléculas descritas na saliva dos flebotomíneos são: i) Apirase: hidroliza ADP e ATP a AMP e ortofosfato e tem ação anti-agregação plaquetária e antiinflamatória; descrita em *L. longipalpis* (CHARLAB *et al.*, 1999) e *P. papatasi* (VALENZUELA *et al.*, 2001); ii) Adenosina Desaminase: enzima que hidrolisa a adenosina em inosina; possui efeitos antiinflamatórios, descrita em *L. longipalpis* (CHARLAB *et al.*, 1999); iii) Adenosina e o 5'-AMP: possuem ação vasodilatadora, anti-agregação plaquetária e imunomodulatória, encontradas em glândulas salivares de *P. papatasi* (RIBEIRO *et al.*, 1999) e de *P. argentipes* (RIBEIRO & MODI, 2001); iv) Maxadilan, um peptídeo de 6.5 kDa, é o vasodilatador mais potente conhecido, possui ação imunomoduladora e foi descrito apenas em *L. longipalpis* (LERNER *et al.*, 1991).

A inflamação é a resposta que segue ao processo de hemostasia e os animais vertebrados utilizam o processo inflamatório para conter e neutralizar o agente causador de uma lesão tecidual, recrutando células da circulação e acumulando líquido intersticial no local da lesão. O recrutamento das células para o sítio de infecção é feito através da produção de quimiocinas e outros mediadores inflamatórios produzidos pelas células locais (COTRAN *et al.*, 2003). Ensaio *in vitro* mostraram que o SGS de *P. dubosqi* é capaz de aumentar a quimiotaxia de monócitos de camundongos BALB/c, infectados ou não com *L. major* (Anjili *et al.*, 1995) e a modulação na quimiotaxia decorrente da exposição ao SGS de *L.*

*longipalpis* e *P. papatasi* também foi observada em macrófagos de camundongos BALB/c e C3H/HeN infectados com *L. infantum*. Macrófagos cultivados com SGS de *P. papatasi* apresentaram maior taxa de infecção e aumento no número de amastigotas por célula (Zer *et al.*, 2001). Camundongos BALB/c expostos à picada de *L. longipalpis* não infectadas na derme da orelha desenvolveram, após 48 horas, um infiltrado inflamatório intenso e difuso, caracterizado por neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (SILVA *et al.*, 2005), enquanto estudo no modelo do bolsão inflamatório em camundongos C57BL/6 e BALB/c, mostrou que produtos da saliva de *L. longipalpis* foram capazes de induzir um significativo influxo de macrófagos nos camundongos C57BL/6, associado ao aumento da expressão de MCP-1 (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Estes resultados mostram que a saliva dos flebotomíneos contém produtos capazes de modular o recrutamento de macrófagos, podendo auxiliar no estabelecimento do parasita.

Produtos da glândula salivar dos flebotomíneos podem alterar o curso da infecção por *Leishmania spp.* Titus & Ribeiro (1988), foram os primeiros a demonstrar os efeitos de produtos da saliva dos flebotomíneos no curso da infecção por *Leishmania*. Ao estudar camundongos das linhagens CBA/Ca e BALB/c, resistentes e susceptíveis à infecção por *Leishmania major*, respectivamente, os autores observaram que o sonicado de glândula salivar (SGS) de *L. longipalpis*, quando injetado juntamente com formas promastigotas da *Leishmania*, produzia lesões substancialmente maiores e aumentavam o número de parasitas no local das lesões, quando comparados com animais inoculados apenas com a *Leishmania* (TITUS & RIBEIRO, 1988). Mais tarde, Theodos *et al.*, (1991) observaram que o SGS de *L. longipalpis*, quando inoculado juntamente com *L. major* ou *L. amazonensis* também produzia lesões significativamente maiores em linhagens de camundongos resistentes ou susceptíveis à infecção (THEODOS *et al.*, 1991). Curiosamente, a exacerbação das lesões causadas por infecção por *L. major* foi verificada de forma mais pronunciada nos animais C57BL/6 e CBA/Ca, que possuem *background* de resistência. Lima & Titus (1996), ao avaliarem os efeitos do SGS de *L. longipalpis* em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, observaram o mesmo efeito de exacerbação das lesões, embora a evolução das mesmas tenha variado de acordo com a quantidade de parasitas injetada nos animais (LIMA & TITUS, 1996). O mesmo efeito foi observado com

SGS de *L. whitmani* em infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* (BEZERRA & TEIXEIRA, 2001).

Trabalhos posteriores mostraram uma correlação entre os efeitos de exacerbação da infecção com a produção de pró-inflamatórias e inibição de citocinas anti-inflamatórias. A injeção de SGS de *P. papatasi* em camundongos CBA e CaH-T6J aumentou a expressão de IL-4, enquanto o inóculo de *L. major* juntamente com SGS de *P. papatasi*, inibiu a produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e iNOS e aumentou a produção de IL-4, levando ao aumento na carga parasitária e do número de parasitas nos locais das lesões (MBOW *et al.*, 1998). Belkaid *et al.*, (1998) e Norsworthy *et al.* (2004), associaram a exacerbação das lesões com a produção das citocinas IL-4 e IL-10, respectivamente (BELKAID *et al.*, 1998, NORSWORTHY *et al.*, 2004).

O caráter protetor de componentes da saliva dos flebotomíneos foi inicialmente demonstrado por Belkaid *et al.* (1998), ao injetar SGS de *P. papatasi* na derme da orelha de camundongos BALB/c e C57BL/6 e, posteriormente, desafiarem com *L. major*, juntamente com SGS do flebotomíneo. Os animais previamente sensibilizados com SGS desenvolveram lesões significativamente menores e com menor número de parasitas no sítio da infecção, frente ao desafio com parasitas. Este efeito foi associado ao aumento da produção de IFN- $\gamma$  e redução de IL-4 (BELKAID *et al.*, 1998). Camundongos pré-expostos à picada de *P. papatasi* não infectados foram protegidos quando desafiados com *L. major* (KAMHAWI *et al.*, 2000). A pré-imunização de camundongos CBA com o peptídeo maxadilan, também foi capaz de apresentar efeito protetor frente à infecção por *Leishmania* (MORRIS *et al.*, 2001). Camundongos CBA vacinados com maxadilan e desafiados com *L. major* associada ao SGS de *L. longipalpis* apresentaram lesões quatro vezes menores em relação aos animais que não foram vacinados, além de reduzir 13.000 vezes o número de parasitas nas lesões (MORRIS *et al.*, 2001). Ensaios de cultura de macrófagos de camundongos BALB/c, estimulados com LPS e incubados com maxadilan, apresentaram aumento na produção de prostagladina E (PGE<sub>2</sub>), IL-6 e IL-10 e redução de TNF- $\alpha$  (SOARES *et al.*, 1998). Estes dados indicam que, o tratamento com produtos da saliva de flebotomíneos são capazes de desenvolver papel protetor frente ao desafio por *Leishmania* em modelo murino.

Dados obtidos em área endêmica para LVA apontam para um perfil protetor da saliva de *L. longipalpis* na leishmaniose humana. Estudo realizado por nosso

grupo em amostras de crianças residentes em área endêmica para Leishmaniose Visceral Americana no Brasil, mostrou que indivíduos expostos à infecção por *Leishmania* reconhecem antígenos da saliva do vetor e estes antígenos têm ação protetora contra o desenvolvimento da leishmaniose (BARRAL *et al.*, 2000). Outro estudo, também realizado por nossa equipe, em área endêmica para LVA, reforçam a hipótese de uma resposta protetora dos produtos da saliva de *L. longipalpis* ao mostrar que indivíduos com resposta tipo RTH anti-*Leishmania* apresentam aumento dos títulos dos anticorpos IgG, IgG1, IgE anti-saliva de *L. longipalpis*, sugerindo que a picada de *L. longipalpis* produz uma resposta mista Th1 e Th2 capazes de estabelecer uma resposta anti-*L. chagasi* (GOMES *et al.*, 2002).

Em função dos achados sobre a ação de produtos da saliva dos flebotomíneos na infecção experimental por *Leishmania*, tornou-se importante pesquisar os efeitos destes produtos em APCs humanas. CMSP humanas, pré-tratadas com SGS de *P. papatasi* e estimuladas com *L. major* produziram baixas concentrações de IFN- $\gamma$  e elevada produção de IL-6 (ROGERS & TITUS, 2003). Monócitos humanos estimulados com LPS, quando previamente sensibilizados com SGS de *L. longipalpis*, apresentaram aumento na produção de IL-6, IL-12p40 e IL-8 e queda na produção de TNF- $\alpha$  e IL-10, com tendência de redução na expressão de CD80 e de aumento na expressão de CD86 e HLA-DR. A estimulação com SGS de *L. longipalpis* durante a maturação de células dendríticas inibiu a expressão de moléculas co-estimulatórias e levou à diminuição da maturação de células dendríticas, quando esta foi induzida por CD40L (COSTA *et al.*, 2004). Monócitos humanos tratados com maxadilan, quando estimulados com LPS ou com *L. major*, apresentaram maior produção de IL-6 e menor produção de TNF- $\alpha$ , enquanto CMSP humanas, estimuladas com *L. major* e tratadas com maxadilan, produziram menos IFN- $\gamma$  e IL-12p40 (ROGERS & TITUS, 2003). Estes resultados indicam que os produtos da saliva dos flebotomíneos podem favorecer o estabelecimento do parasita, ao modular negativamente a produção de citocinas ativadoras de macrófagos e diminuir a apresentação dos antígenos do parasita ao sistema imune.

O conjunto destes resultados reforça o caráter imunomodulador dos produtos da saliva dos flebotomíneos no sistema imune do hospedeiro vertebrado e a capacidade de alterar o curso da infecção por *Leishmania*.



## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos realizados sobre a ação dos produtos da saliva de flebotomíneos em células do sistema imune, mostraram que estes produtos modulam a expressão de citocinas, quimiocinas e alteram a expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos. Uma vez que a LTA causada por *L. braziliensis* é uma das mais importantes e negligenciadas endemias no Brasil, conhecer os efeitos dos produtos da saliva de *L. intermedia* em monócitos humanos, infectados ou não com *L. braziliensis*, poderá ajudar na compreensão dos eventos iniciais da infecção, permitindo a elaboração de estratégias que possam direcionar uma resposta imune eficaz contra a *Leishmania*.

## 3 OBJETIVO GERAL

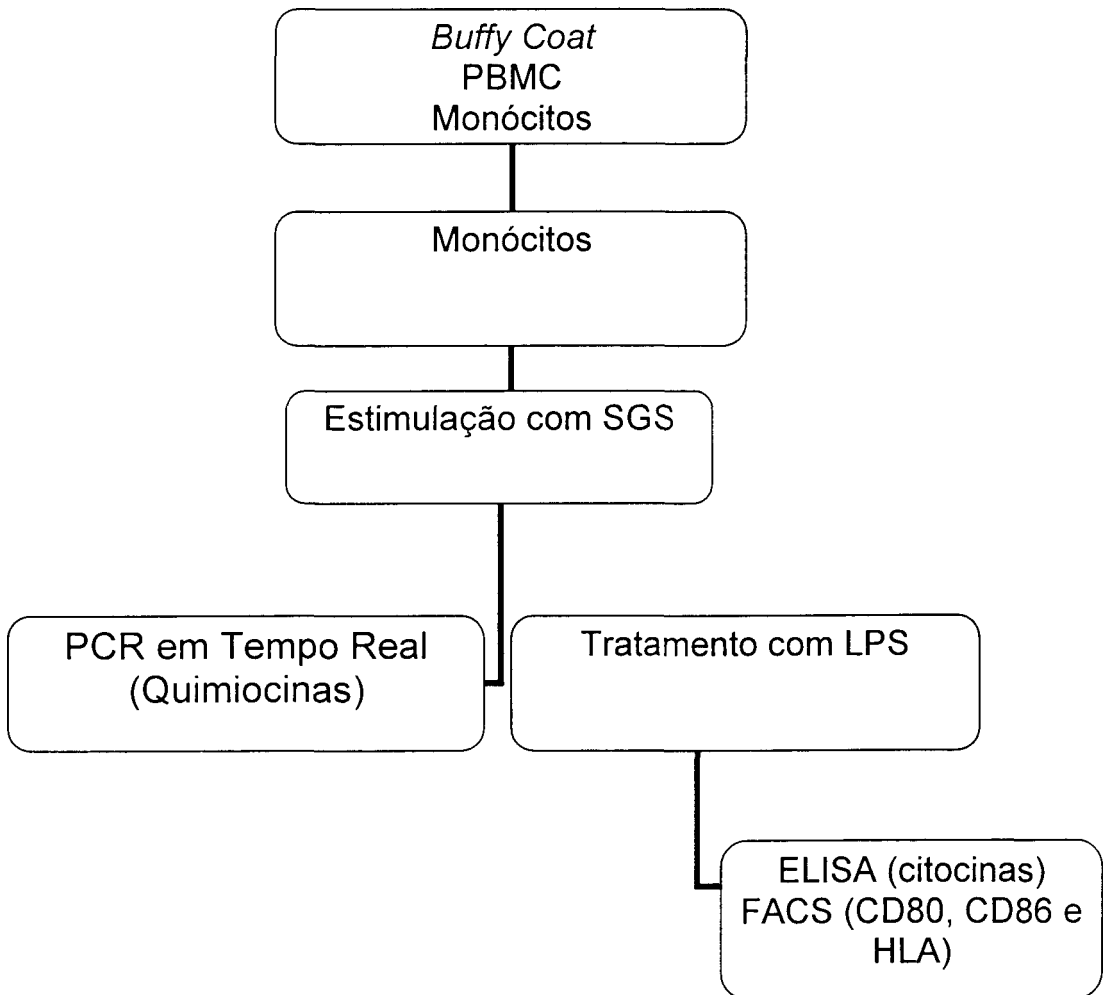
Determinar o efeito de produtos da saliva de *Lutzomyia intermedia* em monócitos humanos de doadores saudáveis, infectados ou não com *L. braziliensis*, na produção de mediadores da resposta imune.

### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

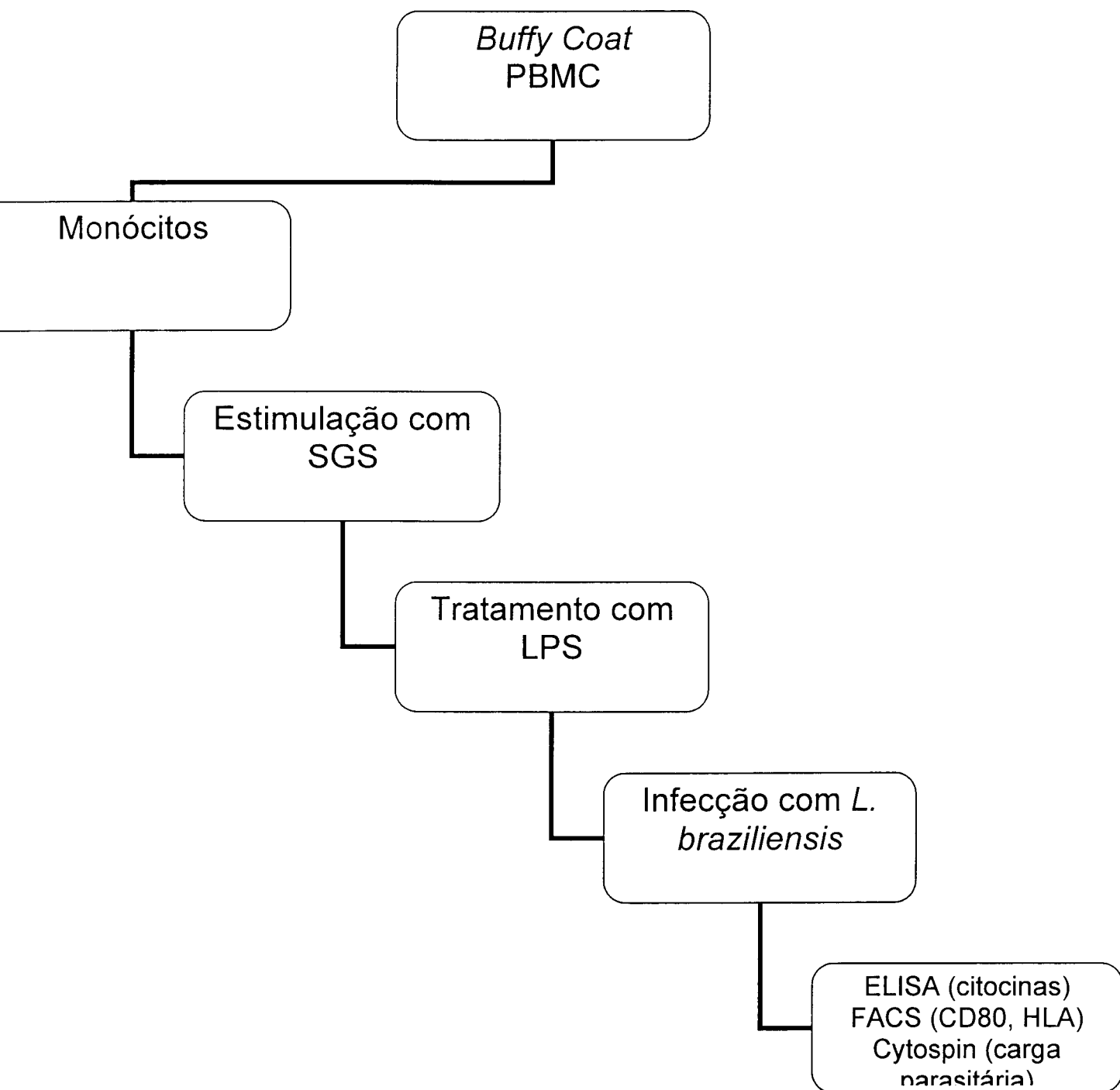
- Determinar os efeitos de SGS de *L. intermedia* sobre monócitos humanos estimulados com LPS com relação à expressão de CD80, CD86 e HLA-DR e a produção de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL12p40.
- Determinar os efeitos de SGS de *L. intermedia* sobre monócitos humanos estimulados com LPS e infectados com *L. braziliensis* quanto à expressão de CD86 e HLA-DR, produção de IL-10, TNF- $\alpha$  e IL12p40 e quanto à carga parasitária.
- Determinar a expressão das quimiocinas IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 e Rantes em monócitos pré-tratados com SGS de *L. intermedia* e *L. longipalpis*.

## 4 DESENHO EXPERIMENTAL

### 4.1 EFEITO DA SALIVA DE *L. INTERMEDIA* SOBRE MONÓCITOS HUMANOS ESTIMULADOS COM LPS



4.2 EFEITO DA *L. BRAZILIENSIS* SOBRE MONÓCITOS HUMANOS  
ESTIMULADOS COM LPS E SGS DE *L. INTERMEDIA*.



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, parecer 100/2006, CAAE 0012.0.225.000-06.

### 5.2 PARASITAS

A cepa de *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) utilizada neste estudo foi obtida de um paciente com LT e sua caracterização foi feita por PCR (CASTILHO *et al.*, 2003) e anticorpos monoclonais (MCMAHON-PRATT *et al.*, 1982). As formas promastigotas foram mantidas em meio de cultura Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 20 mM Hepes (todos da Invitrogen).

### 5.3 OBTENÇÃO DE SONICADO DE GLÂNDULA SALIVAR (SGS) DE *LUTZOMYIA INTERMEDIA* E *LUTZOMYIA LONGIPALPIS*

Fêmeas de *L. intermedia*, provenientes de coleta em Corte de Pedra (BA) e de *L. longipalpis*, obtidas do insetário do Laboratório de Imunoparasitologia do CPqGM, com idade entre cinco a sete dias, foram dissecadas em solução fisiológica e armazenadas em lotes de 10 pares/10µL a -70°C. No momento do uso, as glândulas foram descongeladas e sonicadas a uma frequência de 40 Hz com três seqüências de 20 pulsos, em equipamento Branson Sonifier 450 (Danbury). Em seguida, o sonicado de glândula salivar foi centrifugado à velocidade de 10.509 x g por 4 minutos a 4°C e o sobrenadante (SGS) foi coletado e suplementado com meio de cultura RPMI completo.

#### 5.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO (CMSP) POR GRADIENTE DE FICOLL

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram purificadas a partir de concentrado de leucócitos (*Buffy Coat*), obtidos de bolsas de sangue de voluntários sadios do Banco de Sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), os quais foram negativos sorologicamente para doenças infecto-parasitárias (Chagas, Sífilis, Hepatites B e C, AIDS, HTLV I/II). As CMSP foram separadas por passagem em gradiente de Ficoll-Hipaque - 1077, (densidade: 1,077 g/mL Sigma). O sangue foi diluído em solução fisiológica estéril na proporção 1:2 e adicionado sobre a solução de Ficoll, utilizando-se 3mL de Ficoll para cada 10mL de sangue diluído. O material foi submetido a centrifugação a 239 x g durante 30 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, a fração correspondente às CMSP foi coletada, ressuspensa em solução salina e lavada três vezes a 239 x g durante 10 minutos a 4°C. Ao final das lavagens, as células foram ressuspensas em solução fisiológica e a viabilidade das mesmas foi determinada por coloração com Azul da Trypan.

#### 5.5 PURIFICAÇÃO DE MONÓCITOS HUMANO POR GRADIENTE DE PERCOLL

CMSP obtidas por gradiente de Ficoll foram ajustadas na concentração de  $70$  a  $100 \times 10^6$  e ressuspensas em 2mL do gradiente de Percoll a 70%. Em seguida foram adicionadas, com auxílio de seringa, as demais diluições de Percoll, nas seguintes ordem e volume: 2 mL de Percoll 50%; 2 mL de Percoll 40% e 3 mL de Percoll 25%. O gradiente foi então centrifugado a 420 x g, durante 20 minutos em temperatura ambiente e as células entre os gradientes de 40% e 25% foram coletadas e lavadas três vezes em solução salina, durante 10 minutos, utilizando as velocidades de rotação entre 127 a 208 x g a 4°C. Após a última lavagem as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI completo [RPMI 1640 R-0883 (Sigma), suplementado com HEPES Buffer 11203, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (1%) e de Soro Bovino Fetal (10%) (Invitrogen)] Para determinar o grau de pureza da população celular, as mesmas foram marcadas com anti-CD14 humano (clone M5E2) conjugado à PE (BD Pharmingen) e analisadas por citometria de fluxo.

## 5.6 PURIFICAÇÃO DE MONÓCITOS HUMANOS POR SELEÇÃO POSITIVA EM ESFERAS MAGNÉTICAS

Monócitos foram purificados a partir de CMSP por meio de seleção positiva, utilizando-se esferas magnéticas recobertas com anti-CD14 (Miltenyi Biotec), de seguindo-se as instruções dos fornecedores. Brevemente, CMSP ( $1 \times 10^8$  células/mL), obtidas por gradiente de Ficoll, foram ressuspendidas em 800  $\mu$ L de tampão MACS (PBS/BSA 0,5%/EDTA 2Mm), marcadas com 100  $\mu$ L de *Microbeads* anti-CD14 e incubadas por 30 minutos em temperatura entre 6 a 12°C. Em seguida, foram adicionados 2mL de tampão MACS e as células foram centrifugadas a 239 x g durante 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o *pellet* celular foi ressuspendido em 500  $\mu$ L de tampão MACS e aplicado em um coluna magnética MiniMACS MS<sup>+</sup>Separation Columns (Miltenyi Biotec). A coluna foi lavada três vezes com 500  $\mu$ L de tampão MACS (coleta da fração negativa) e os monócitos foram eluídos com 1mL de tampão MACS. A fração coletada foi lavada três vezes em solução fisiológica (239 x g, durante 10 minutos a 4°C) e o *pellet* celular, ressuspendido em meio de cultura RPMI completo. Para determinar o grau de pureza da população celular, as mesmas foram marcadas com anti-CD14 humano e analisadas por citometria de fluxo, como descrito acima.

## 5.7 ESTIMULAÇÃO *IN VITRO* DE MONÓCITOS HUMANOS COM LPS E SGS DE *L. INTERMEDIA*

Monócitos humanos foram ressuspendidos em meio de cultura RPMI completo na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL, distribuídos em tubos de cultura de 2mL de polipropileno e incubados em estufa a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade, por 12h, na presença de SGS *L. intermedia* (equivalente a 2 pares/mL de cultura). Em seguida, as células foram estimuladas com 20 pg/mL de LPS de *Escherichia coli*, sorotipo 0111:B4 (Sigma) por 24 ou 48h, para determinação da produção de citocinas e para a determinação da expressão de moléculas co-estimulatórias.

## 5.8 INFECÇÃO DE MONÓCITOS HUMANOS COM *L. BRAZILIENSIS*

Monócitos humanos ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram cultivados na presença ou ausência de SGS de *L. intermedia* (equivalente a 2 pares/mL) em tubos de cultura de polipropileno e foram estimulados com 20pg/mL de LPS por quatro horas. Em seguida, os monócitos foram infectados com *Leishmania braziliensis*, na proporção de 5 parasitas por monócito (5:1) durante quatro horas. Após este período, os monócitos foram lavados duas vezes para remoção de parasitas livres, ressuspensos em meio RPMI completo e cultivados em estufa a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade por 24 e 48h horas.

## 5.9 CARGA PARASITÁRIA

Para determinar a taxa de infecção, os monócitos humanos foram sensibilizados com SGS de *L. intermedia* (12h), estimulados com LPS (4h) e infectados com *L. braziliensis* (4h). As células foram mantidas em cultura por 24 e 48h e, em seguida, processadas em centrífuga de Cytospin a 400rpm por 5 minutos, coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) e analisadas ao microscópio óptico. A carga parasitária foi determinada por contagem, em objetiva de imersão, do número de monócitos infectados em cem células. A taxa de infecção foi determinada a partir do número de amastigotas por macrófago infectado, dividido pelo total de macrófagos x 100. Foram contados, no mínimo, 200 macrófagos por lâmina. As contagens foram repetidas por outro examinador independente.

## 5.10 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DA SUPERFÍCIE

Para determinar a expressão de CD80, CD86 e HLA-DR, os monócitos humanos foram sensibilizados com SGS de *L. intermedia* (12h), estimulados com LPS (4h) e infectados com *L. braziliensis* (4h). As células foram cultivadas por mais 48h e, em seguida, foram ajustadas para concentração de  $2 \times 10^5$  por marcação, centrifugadas e ressuspensas em tampão PAB [PBS, BSA (1%) e azida sódica (0,05 %)]. As células foram bloqueadas com 10% de soro bovino fetal por 30 minutos em gelo. Em seguida as células foram marcadas com Anti-CD80 (clone L307.4), Anti-CD86 (clone 2331), anti-HLA-DR (clone G46-6) conjugado a PE

(todos da BD Pharmingen). As células foram adquiridas no equipamento FACSort (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany), com cerca de cinco mil a 10 mil eventos celulares adquiridos por amostra. Após aquisição os resultados foram analisados, utilizando-se o programa Cell Quest (Becton-Dickinson).

### 5.11 DOSAGEM DE CITOCINAS

As concentrações das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12p40 foram determinadas pelo método imunoenzimático (ELISA) em sobrenadantes de cultura de monócitos após 24 horas de incubação para TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL12p40 e 48 horas para IL-10, utilizando-se kits comerciais para TNF- $\alpha$  e IL-10 (BD PHARMINGEN) e R&D para IL-12p40 e IL-6 (R&D Systems), seguindo os protocolos dos fabricantes. Recombinantes humanos foram utilizados para gerar as curvas “padrão”. As reações foram preparadas em placas MaxiSorp (Nunc-Immuno Plate) e as densidades ópticas foram determinadas em espectrofotômetro marca Soft Max Pro 3.0 (Molecular Devices Corporation) no comprimento de onda de 450nm e convertidas em pg/mL, interpolando-se com os valores das curvas-padrão.

### 5.12 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA

Para realizar as reações de PCR em Tempo Real, monócitos humanos ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram incubados com SGS de *L. intermedia*, SGS de *L. longipalpis* (equivamente a 1 par/mL) ou LPS (100ng/mL) durante três horas e foram, em seguida, coletados para extração do RNA total. Para tal, as células foram ressuspendidas em Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen) e o RNA total foi obtido a partir da precipitação em clorofórmio, de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e armazenadas em freezer -70°C até o momento de uso. Para a síntese de cDNA, utilizamos o kit SuperScript III (Invitrogen), 1 $\mu$ g de RNA total e 200ng de *Random Primer* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram efetuadas no termociclador modelo Mastercycler Gradient (Eppendorf). Após a síntese, o cDNA foi armazenado a -20C até a sua utilização.



### 5.13 PCR EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS

As reações de PCR em Tempo Real foram preparadas em mix com volume final de 35  $\mu$ L, contendo 1X do reagente fluoróforo SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), iniciadores *forward* e *reverse* (Tabela 1) e 5  $\mu$ L de cDNA diluído 1:10. As reações foram realizadas em triplicatas, em placas de 96 poços (96 *well optical reaction plate*, Applied Biosystems), e os controles negativos foram preparados excluindo-se cDNA das reações. As corridas foram realizadas em equipamento *7500 Real Time PCR System*, programa *7500 System SDS Software*, opção "*Relative Quantification*", obedecendo as seguintes condições: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60° C. Após corrida, foi realizada a dissociação da reação no programa "*Dissociation*", no mesmo equipamento.

Tabela 1: Seqüências dos *primers* utilizados nos ensaios de PCR em Tempo Real

Gene	Seqüências 5'-3'	Nº Acesso Genebank	Tm (°C)	Tamanho Produto (Pb)
IL-8/ CXCL-8	fw: GTGCAGTTTTGCCAAGGAGT rev: CTCTGCACCCAGTTTTCTT	NM000584.2	83	69
MCP-1 / CCL-2	fw:ATCACTACTCCTCACCACCATCAC rev: TTGGGTTTGCTTGTCCAGGT	NM001001437	85	148
MIP-1 $\alpha$ / CCL-3	fw: TCTCTGCAACCAGGTCCTCTCT rev:TAGACCTGGGGCAGATCCAA	XM001123374	85	81
MIP-1 $\beta$ / CCL-3	fw: CAGCGCTCTCAGCACCAA rev: TTCCTCGCGGTGTAAGAAAAG	NM_002984	85	67
RANTES	fw: GCATCTGCCTCCCATATTC rev: CAGTGGGCGGGCAATG	NM_002985	84	65
GAPDH	fw: CACATGGCCTCCAAGGAGTAA rev: GAGGGTCTCTCTTCTCCTTGT	XR_015759	84	75
18S rRNA	fw: GGCGTCCCCAACTTCTTA rev: GGCATCACAGACCTGTTATTG	NT011295.10	83	76

#### 5.14 CÁLCULO DE EFICIÊNCIA DOS PRIMERS E DETERMINAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA

Para calcular a eficiência dos *primers*, utilizamos a fórmula descrita por Pfaffl (2001):  $E = [5^{(-1/slope)}] - 1$ , onde E corresponde à eficiência da reação e *slope* é o valor de angulação da curva. Para o cálculo do *slope* utilizamos o desvio-padrão das diferenças entre os Cts das diluições (1/10 menos 1/50, 1/50 menos 1/250 e 1/250 menos 1/1250). Os valores obtidos foram utilizados para calcular o valor de angulação da curva e eficiência dos *primers*. Para avaliar a expressão gênica das citocinas nos ensaios de Quantificação Relativa, utilizamos a fórmula:  $QR = 2^{-\Delta \Delta Ct}$ , onde  $\Delta Ct = Ct$  do gene alvo –  $Ct$  do gene de referência, e  $\Delta \Delta Ct$  é o valor do  $\Delta Ct$  da amostra subtraído do valor do  $\Delta Ct$  do gene controle (PFAFFL, 2001).

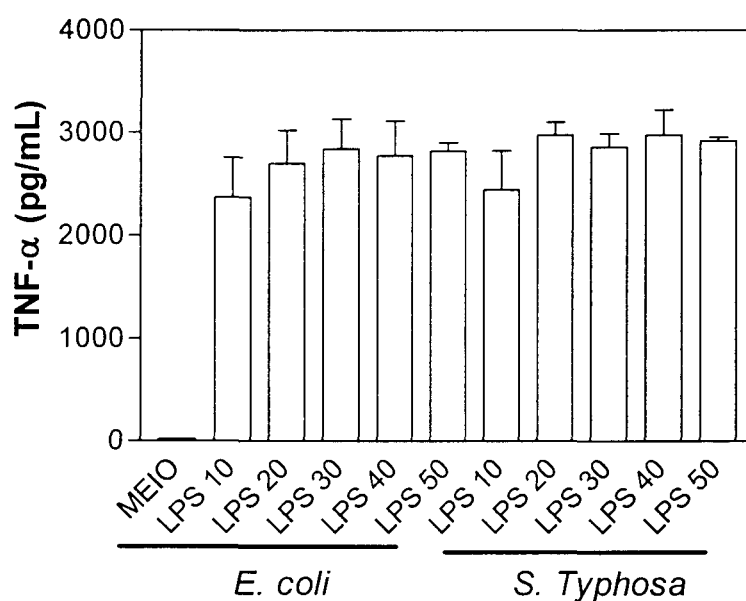
#### 5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados quanto às diferenças estatísticas utilizando diferentes testes a depender dos dados obtidos. Para múltiplas comparações foi utilizado Kruskal-Wallis e para comparações entre dois grupos foi realizado Teste t de *Student* com intervalo de confiança de 95% sendo os valores considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LPS PARA ESTIMULAÇÃO DE MONÓCITOS HUMANOS.

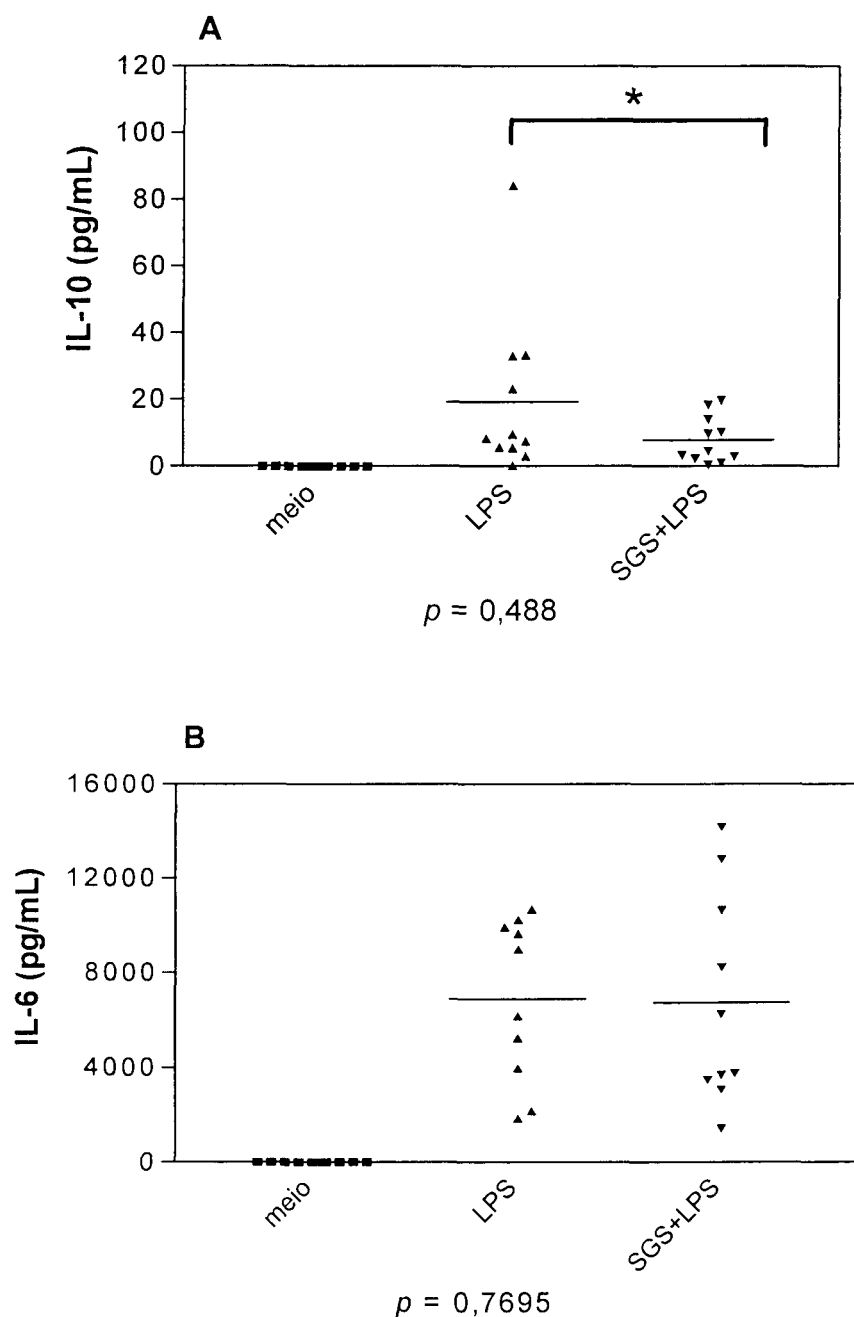
Estudo realizado em nosso laboratório por Costa *et al.* (2004) mostrou que em ensaios com monócitos humanos pré-tratados com SGS de *L. longipalpis*, as células precisaram ser estimuladas com concentrações sub-ótimas de LPS para que fosse possível avaliar diferenças em relação à produção de citocinas e moléculas de superfície. Iniciamos então nossos experimentos com a padronização da concentração de LPS a ser utilizada nos ensaios com SGS de *L. intermedia*. Realizamos uma curva dose-resposta com diferentes concentrações de LPS para estimular monócitos humanos, utilizando como parâmetro de estimulação a produção de TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes de cultura. Como mostrado na Figura 1, as concentrações de TNF- $\alpha$  produzidas foram semelhantes quando comparamos LPS de *E. coli* e *S. typhosa*. Decidimos adotar a concentração de 20pg/mL de LPS de *E. coli* como ideal para a estimulação de monócitos.



**Figura 1** - Produção de TNF- $\alpha$  em monócitos humanos estimulados com LPS. Monócitos humanos ( $1 \times 10^6$ ) foram estimulados por 12h com LPS de *E. coli* ou *S. Typhosa*, nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50pg/mL. Os sobrenadantes foram coletados e a produção de TNF- $\alpha$  foi determinada por ELISA. Os dados apresentados representam as médias e os desvios-padrão de três experimentos independentes.

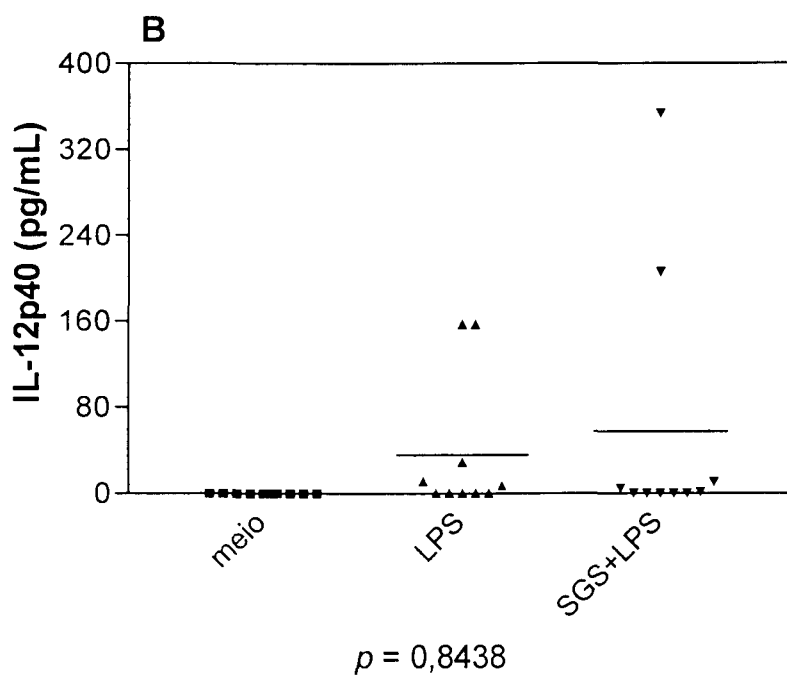
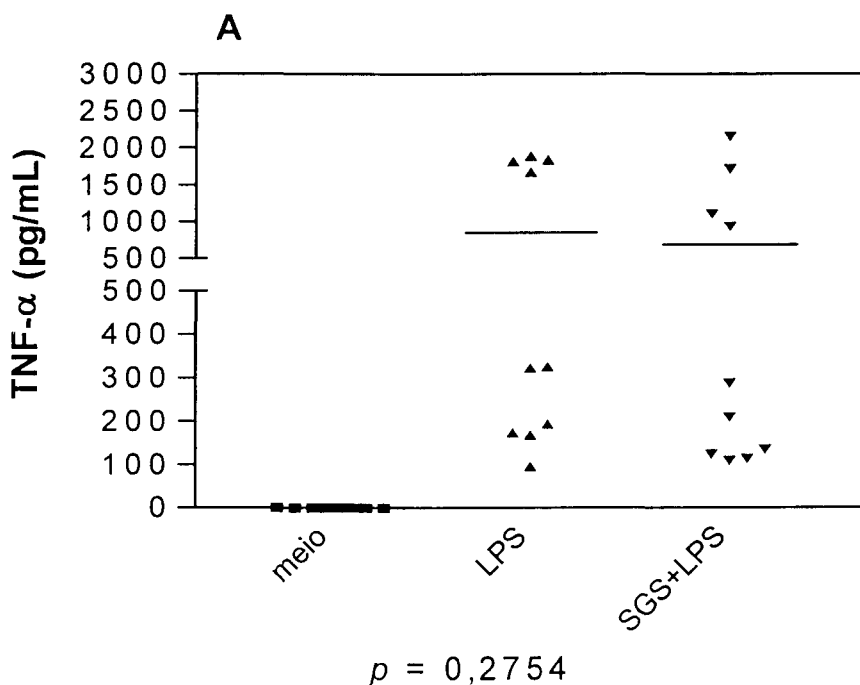
## 6.2 PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM SOBRENADANTES DE MONÓCITOS HUMANOS PRÉ-TRATADOS COM SGS DE *L. INTERMEDIA*.

Em seguida, partimos para a avaliação do efeito do SGS de *L. intermedia* sobre monócitos humanos. Para isso, os monócitos humanos foram pré-tratados com SGS de *L. intermedia* (equivalente a 2 pares/mL) por 12h e, em seguida, estimulados com LPS por 4h. Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 e 48 horas e a produção de IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12p40 foram determinadas por ELISA. Como mostrado na Fig. 2, a pré-sensibilização de monócitos humanos com SGS de *L. intermedia*, seguida da estimulação com LPS, levou a uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na produção de IL-10 (Fig. 2A), quando comparado com monócitos que não receberam o pré-estímulo. A produção de IL-6 (Fig. 2B) não apresentou alteração entre monócitos pré-estimulados com SGS e monócitos controle.



**Figura 2** - Produção de IL-10 e IL-6 em monócitos humanos estimulados com SGS de *L. intermedia*. Monócitos humanos foram pré-tratados com SGS de *L. intermedia* e estimulados com LPS. Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e a presença de IL-10 (A) e de IL-6 (B) foram determinadas por ELISA. Os dados representam os valores obtidos com 10 doadores (A) e 15 doadores (B).

Dando prosseguimento à avaliação da produção de citocinas em monócitos humanos pré-tratados com SGS *L. intermedia*, determinamos a concentração de TNF- $\alpha$  e IL-12p40 nos sobrenadantes de cultura destas células. Como mostrado na Figura 3, a pré-sensibilização com SGS de *L. intermedia*, seguida da estimulação com LPS, não produziu alterações significativas na produção de TNF- $\alpha$  (Fig.3A) e IL-12p40 (Fig. 3B). É interessante notar que quanto à produção de TNF- $\alpha$ , observamos que os doadores agruparam-se em duas categorias de produtores de TNF- $\alpha$ : baixos produtores, com valores máximos inferiores a 400pg/mL e altos produtores, com valores acima de 900pg/mL.

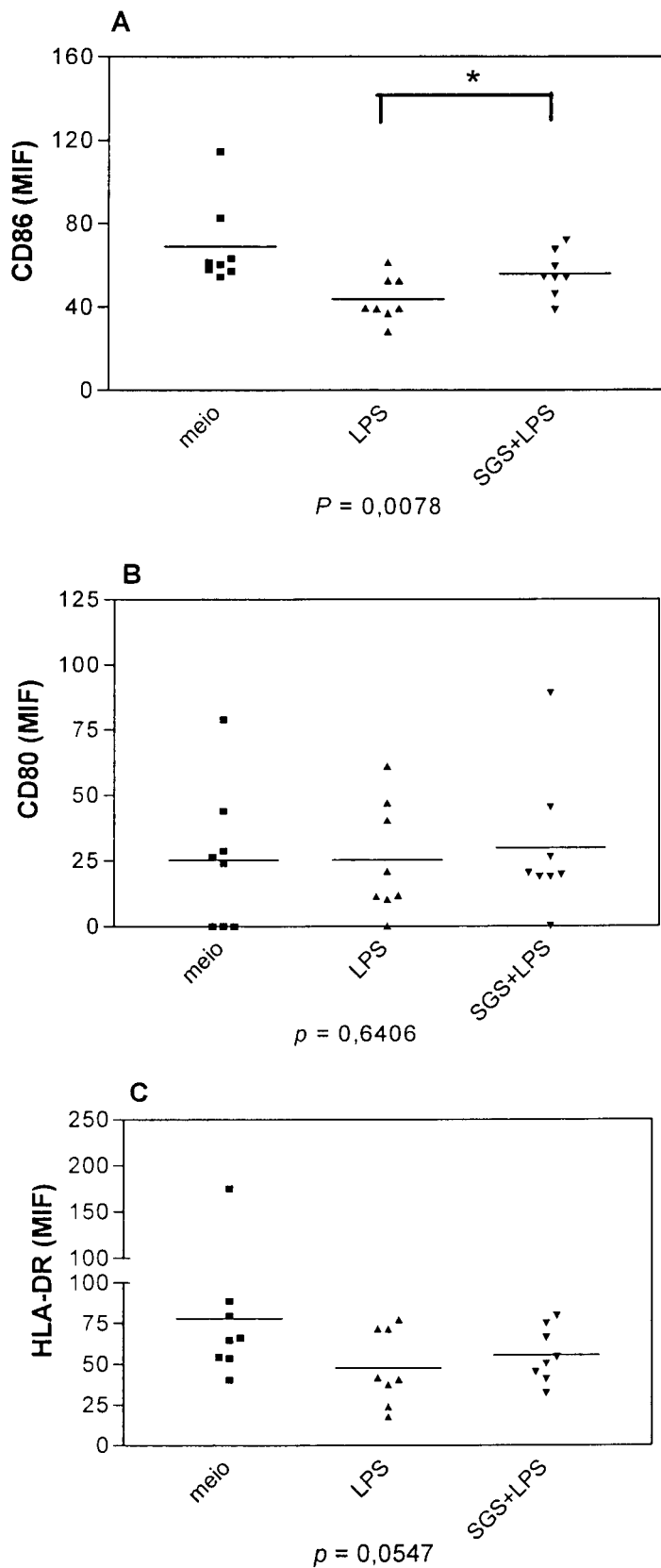


**Figura 3** - Produção de TNF- $\alpha$  e IL-12p40 em monócitos humanos pré-tratados com SGS de *L. intermedia*. Monócitos humanos foram sensibilizados com SGS de *L. intermedia* e estimulados com LPS (20pg/mL). Após 24 horas de cultura, os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de TNF- $\alpha$  (A) e de IL-12p40 (B) foram determinadas por ELISA. Os dados representam os valores obtidos com 10 doadores.

### 6.3 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS EM MONÓCITOS HUMANOS PRÉ-TRATADOS COM SGS DE *L. INTERMEDIA* E ESTIMULADOS COM LPS.

Em seguida, verificamos se os produtos da saliva de *L. intermedia* seriam capazes de alterar a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e da molécula do MHC classe II, HLA-DR, em monócitos humanos pré-tratados com SGS. Para isso, os monócitos foram incubados com SGS de *L. intermedia*, e, em seguida, foram estimulados com LPS e mantidos em cultura por 48 horas. As células foram então recuperadas, marcadas com os respectivos anticorpos e analisadas por FACS e a expressão das moléculas foi determinada pela média de intensidade da fluorescência emitida (MIF). Como mostrado na Figura 4, células pré-tratadas com SGS de *L. intermedia* apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão de CD86 (Fig. 4A), enquanto que expressão de CD80 (Fig. 4B) não apresentou alterações. Observamos também uma tendência de aumento na expressão de HLA-DR (Fig. 4C), embora sem significância estatística.

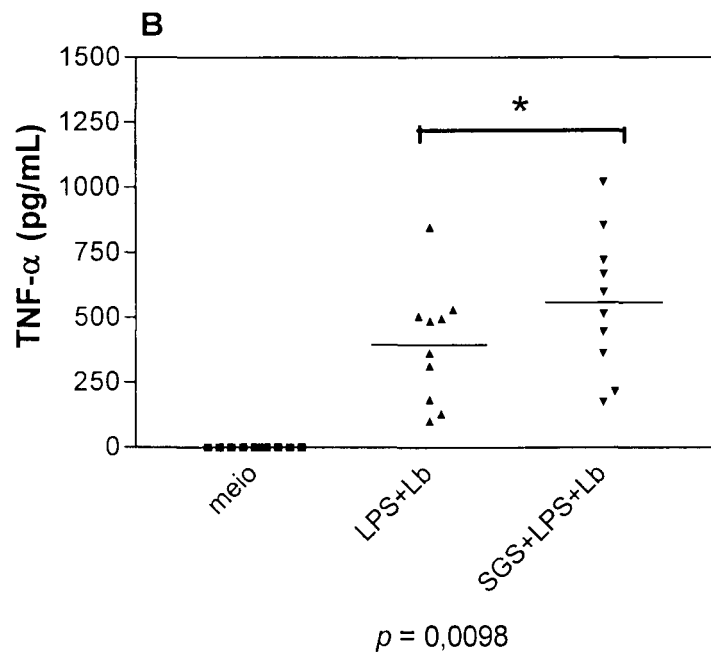
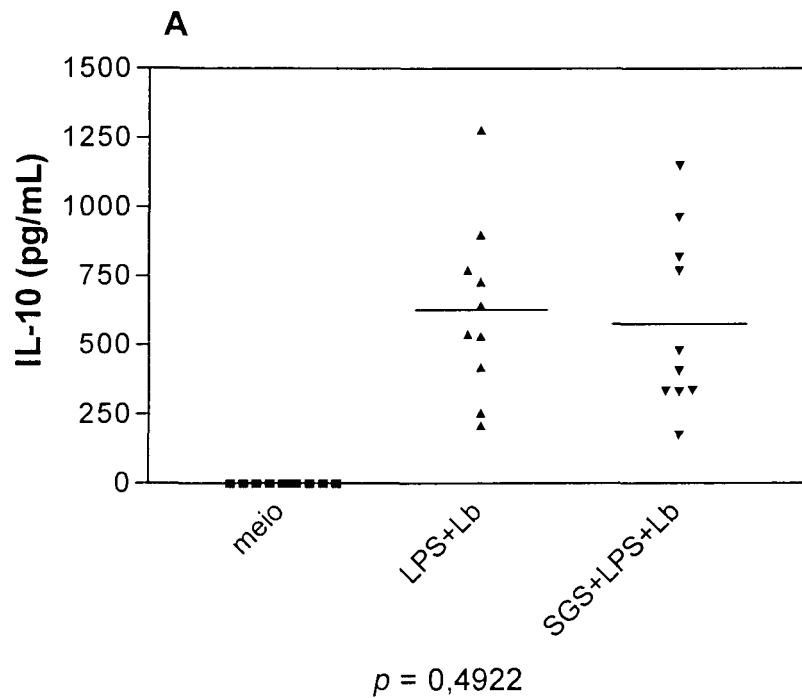




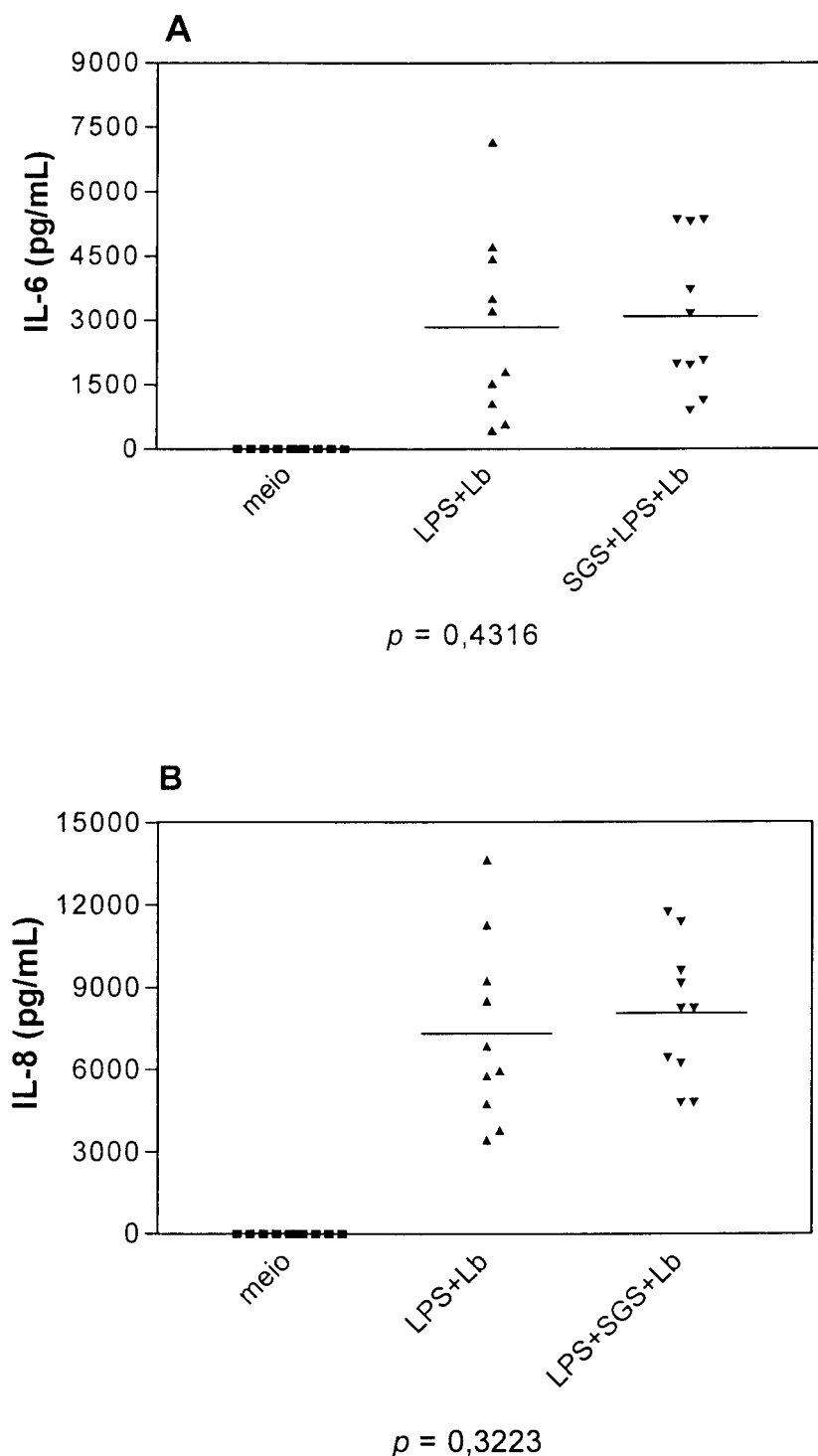
**Figura 4** – Média da intensidade de fluorescência das moléculas CD86, CD80 e HLA-DR em monócitos humanos pré-tratados com SGS de *L. intermedia*. Monócitos humanos foram pré-tratados com SGS de *L. intermedia* e estimulados com LPS (20pg/mL). As células foram recuperadas após 48 horas, marcadas com os respectivos anticorpos e a expressão das moléculas CD86 (A), CD80 (B) e HLA-DR (C) foi determinada por FACS. Os dados representam os valores obtidos com 8 doadores.

#### 6.4 PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE MONÓCITOS HUMANOS PREVIAMENTE TRATADOS COM SGS DE *L. INTERMEDIA*, ESTIMULADOS COM LPS E INFECTADOS COM *L. BRAZILIENSIS*.

Nosso próximo passo foi verificar se o tratamento prévio com SGS de *L. intermedia* seria capaz de produzir alterações na produção de citocinas de monócitos humanos quando estes eram infectados com *L. braziliensis*. Para isto, os monócitos foram sensibilizados com SGS de *L. intermedia*, estimulados com LPS e infectados com *L. braziliensis*. Os sobrenadantes de cultura foram coletados e a produção de IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 foram determinadas por ELISA. Como mostrado nas Figura 5 (IL-10 e TNF- $\alpha$ ) e Figura 6 (IL-6 e IL-8), não houve alteração na produção de IL-10 (Fig. 5A) e IL-6 e IL-8 (Figuras 6A e 6B, respectivamente) em monócitos pré-tratados com SGS e infectados com *L. braziliensis*, quando comparados com células não tratadas. Por outro lado, observamos aumento na produção de TNF- $\alpha$  (Fig. 5B) em monócitos estimulados com SGS e infectados com *L. braziliensis* ( $p=0,0098$ ). Por último, não observamos alteração na produção de IL-12p40 (dados não mostrados).



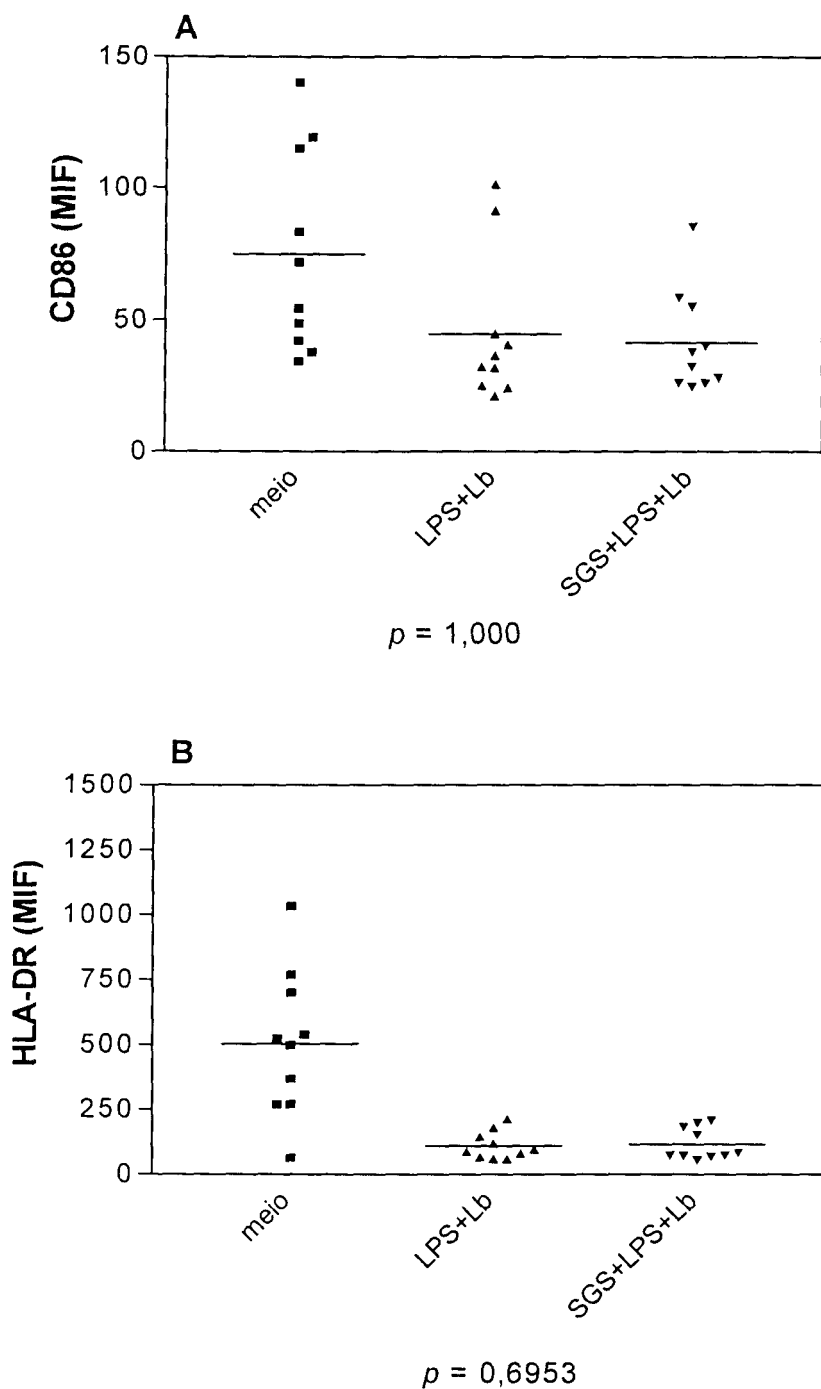
**Figura 5** - Produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  em monócitos humanos estimulados com SGS de *L. intermedia* e infectados com *L. braziliensis*. As células ( $1 \times 10^6$ ) foram pré-tratadas com SGS de *L. intermedia*, estimuladas com LPS (20pg/mL) e infectadas com *L. braziliensis* (5:1). Após 24 horas de cultura, os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de IL-10 (A) e TNF- $\alpha$  (B) foram determinadas por ELISA. Os dados representam os valores obtidos com 10 doadores.



**Figura 6** - Produção de IL-6 e IL-8 em monócitos humanos estimulados com SGS de *L. intermedia* e infectados com *L. braziliensis*. As células ( $1 \times 10^6$ ) foram pré-tratadas com SGS de *L. intermedia*, estimuladas com LPS (20pg/mL) e infectadas com *L. braziliensis* (5:1). Após 24 horas de cultura, os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de IL-6 (A) e IL-8 (B) foram determinadas por ELISA. Os dados representam os valores obtidos com 10 doadores.

## 6.5 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE EM MONÓCITOS HUMANOS PREVIAMENTE TRATADOS COM SGS DE *L. INTERMEDIA*, ESTIMULADOS COM LPS E INFECTADOS COM *L. BRAZILIENSIS*.

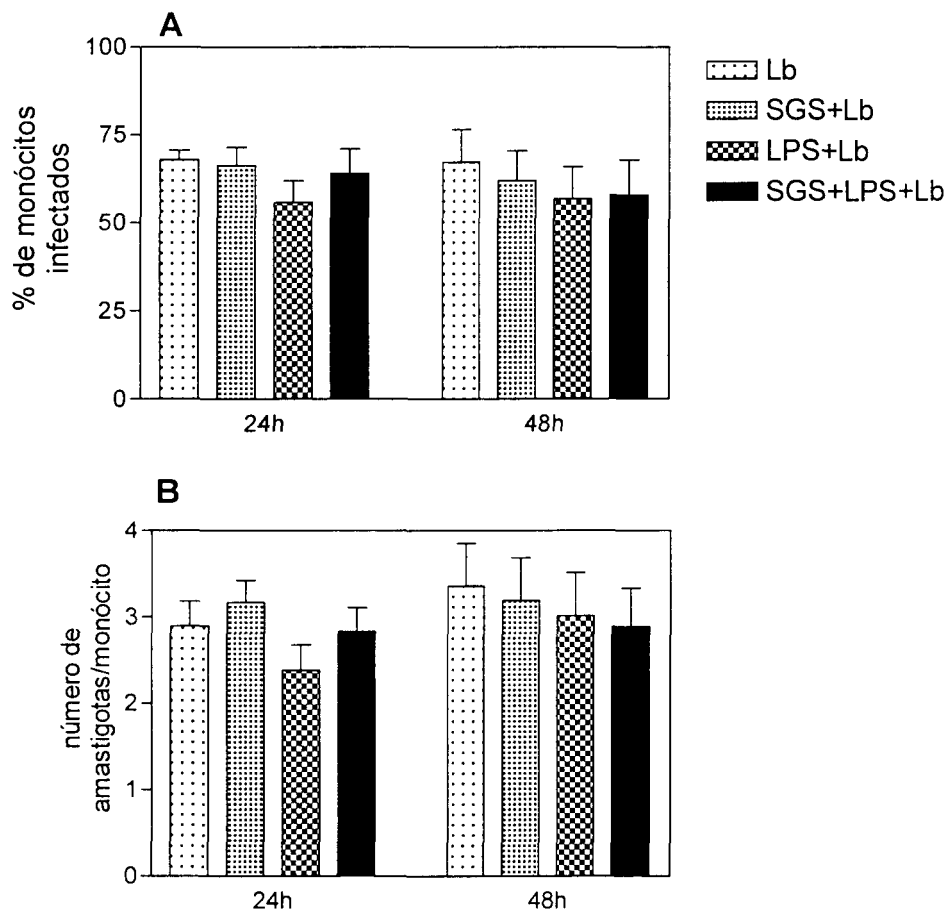
Dando continuidade às análises do efeito do conteúdo salivar de *L. intermedia* em monócitos humanos, avaliamos se o tratamento prévio de monócitos humanos com SGS seguido da infecção por *L. braziliensis* poderia alterar a expressão de moléculas de superfície. Para isso, monócitos humanos foram incubados com SGS de *L. intermedia*, estimulados com LPS e infectados com *L. braziliensis*. As células foram recuperadas após 48 horas de cultura, marcadas com os respectivos anticorpos e analisadas por citometria de fluxo. A expressão das moléculas CD86 e HLA-DR foram determinadas pela média de intensidade da fluorescência emitida (MIF). Ao avaliarmos estas moléculas não observamos alteração na expressão de CD86 (Fig. 7A) e de HLA-DR (Fig. 7B) quando os monócitos infectados com *Leishmania* foram previamente submetidos ao contato com produtos da saliva de *L. intermedia*.



**Figura 7** - Média da intensidade de fluorescência de CD86 e HLA-DR na superfície de monócitos humanos pré-tratados com SGS de *L. intermedia*, estimulados com LPS e infectados com *L. braziliensis*. Monócitos humanos ( $1 \times 10^6$ ) foram pré-tratados com SGS de *L. intermedia* (equivalente a 2 pares/mL), estimulados com LPS (20pg/mL) e infectadas com *L. braziliensis* (5:1). As células foram recuperadas após 48 horas, marcadas com os respectivos anticorpos e a expressão das moléculas foi determinada por FACS. Os dados representam os valores obtidos com 10 doadores.

## 6.6 AVALIAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO E CARGA PARASITÁRIA POR *L. BRAZILIENSIS* EM MONÓCITOS HUMANOS PRÉ-TRATADOS COM SGS DE *L. INTERMEDIA*.

Para verificar se o pré-tratamento com a saliva de *L. intermedia* produzia alteração na carga parasitária e na taxa de infecção, monócitos humanos foram pré-tratados com SGS de *L. intermedia*, estimulados com LPS infectados com *L. braziliensis*. A porcentagem de monócitos infectados (Fig. 8A) e o número de amastigotas (Fig. 8B) por célula infectada foram determinados após 24 e 48 horas de infecção. Como mostrado na Figura 7, não observamos alterações na taxa de infecção e na carga parasitária com o pré-tratamento com saliva.



**Figura 8** – Carga parasitária de monócitos humanos pré-sensibilizados com SGS de *L. intermedia*, estimulados com LPS e infectados com *Leishmania braziliensis*. Os monócitos humanos foram Monócitos humanos ( $1 \times 10^6$ ) foram pré-tratados com SGS de *L. intermedia* (equivalente a 2 pares/mL), estimulados com LPS (20pg/mL) e infectadas com *L. braziliensis* (5:1). A taxa de infecção (A) e o número de amastigotas por células (B) foram determinadas por coloração em HE e microscopia ótica. Os dados representam as médias e o desvio-padrão dos valores obtidos com 8 doadores.

## 6.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL EM MONÓCITOS PRÉ-SENSIBILIZADOS COM SGS DE *L. INTERMEDIA* E DE *L. LONGIPALPIS*.

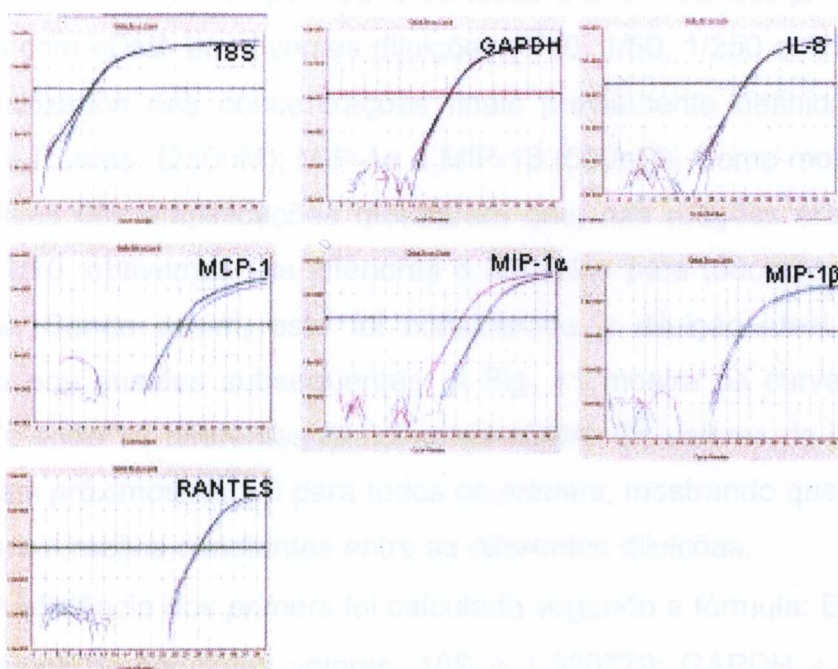
Nossos resultados mostraram que os produtos da saliva de *L. intermedia* produzem alterações na produção de citocinas e na expressão de moléculas de superfície de monócitos humanos. O recrutamento de fagócitos para o sítio de infecção depende da expressão de fatores quimiotáticos, produzidos por células que estão no local da infecção nos momentos iniciais, dentre as quais se encontram os monócitos. Surgiu então o interesse em saber se os produtos da saliva de *L. intermedia* poderiam estimular a expressão de quimiocinas nesta linhagem de células. Utilizamos para este estudo a técnica de PCR em Tempo Real em ensaios de Quantificação Relativa (QR), por se tratar de uma metodologia que apresenta grande sensibilidade.

### 6.8.1. Validação das Reações de PCR em Tempo Real.

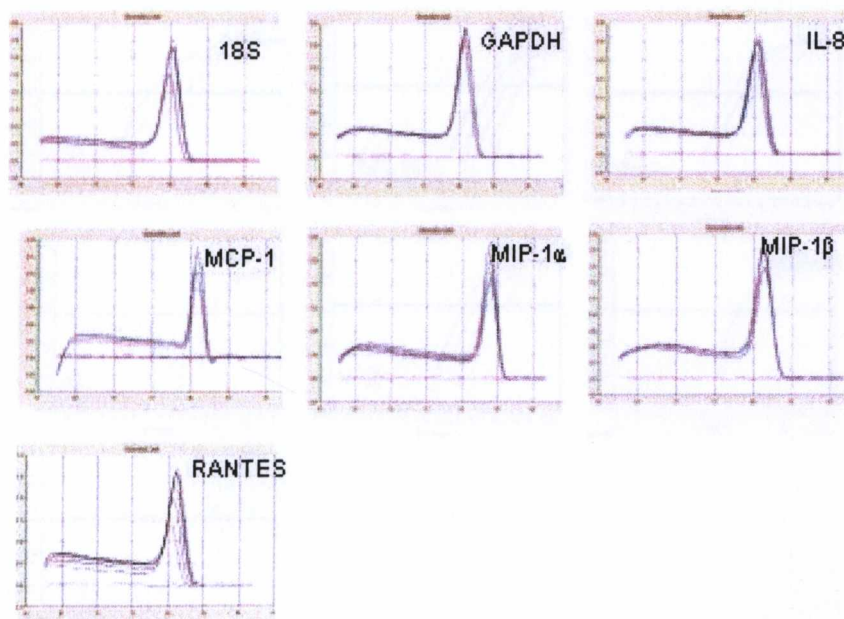
Os ensaios de QR necessitam de uma série de controles para sua validação. Além disso, em leituras de PCR em Tempo Real é imprescindível que as reações tenham alta eficiência de amplificação. Inicialmente, determinamos a diluição ideal de *primers* e de cDNA a serem utilizados nas reações e, em paralelo, calculamos a eficiência dos *primers*. Para o cálculo da diluição dos *primers*, realizamos as reações com concentrações finais de *primers* de 125, 250 e 500 nM, utilizando, como molde, o cDNA obtido de monócitos estimulados com 1 µg de LPS/mL, diluído 1/10. Em uma situação ideal, o limiar de amplificação inicial (Ct) da reação deve variar 15 a 25 ciclos e o par de *primer* que apresentar um Ct valores inferiores ou superiores não poderá ser utilizados nos ensaios. Como mostrado na Fig. 9A, todos os pares de *primers* testados apresentaram limiares de amplificações (Cts) entre 15 a 25 ciclos. Assim, determinamos como concentração de uso dos *primers* seriam: GAPDH , IL-8 MCP-1 e Rantes (250nM); MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  (500nM). Na Fig. 9B são mostrados os perfis das curvas de dissociação das reações, que apresentaram apenas um pico, mostrando que as reações geraram apenas um produto de PCR em todas as diluições testadas, demonstrando a especificidade das reações.



A



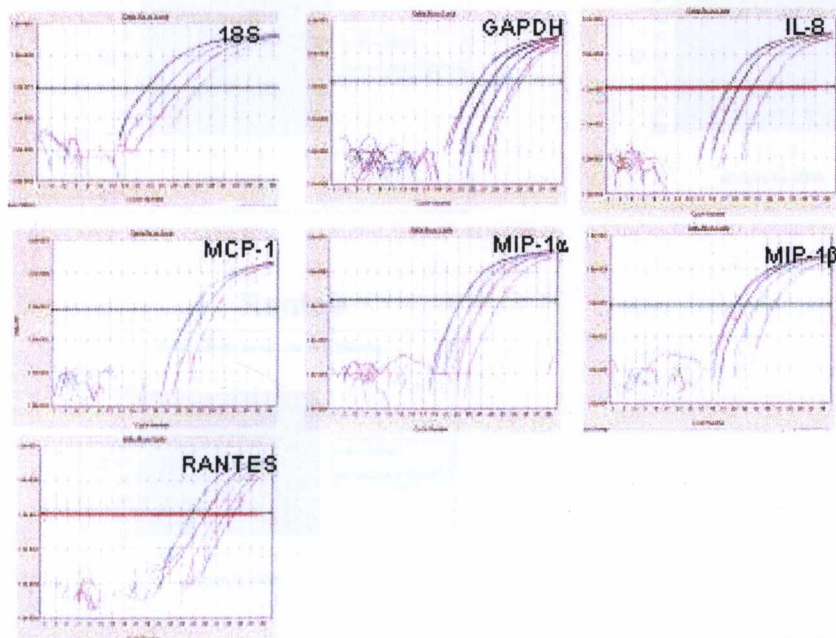
B



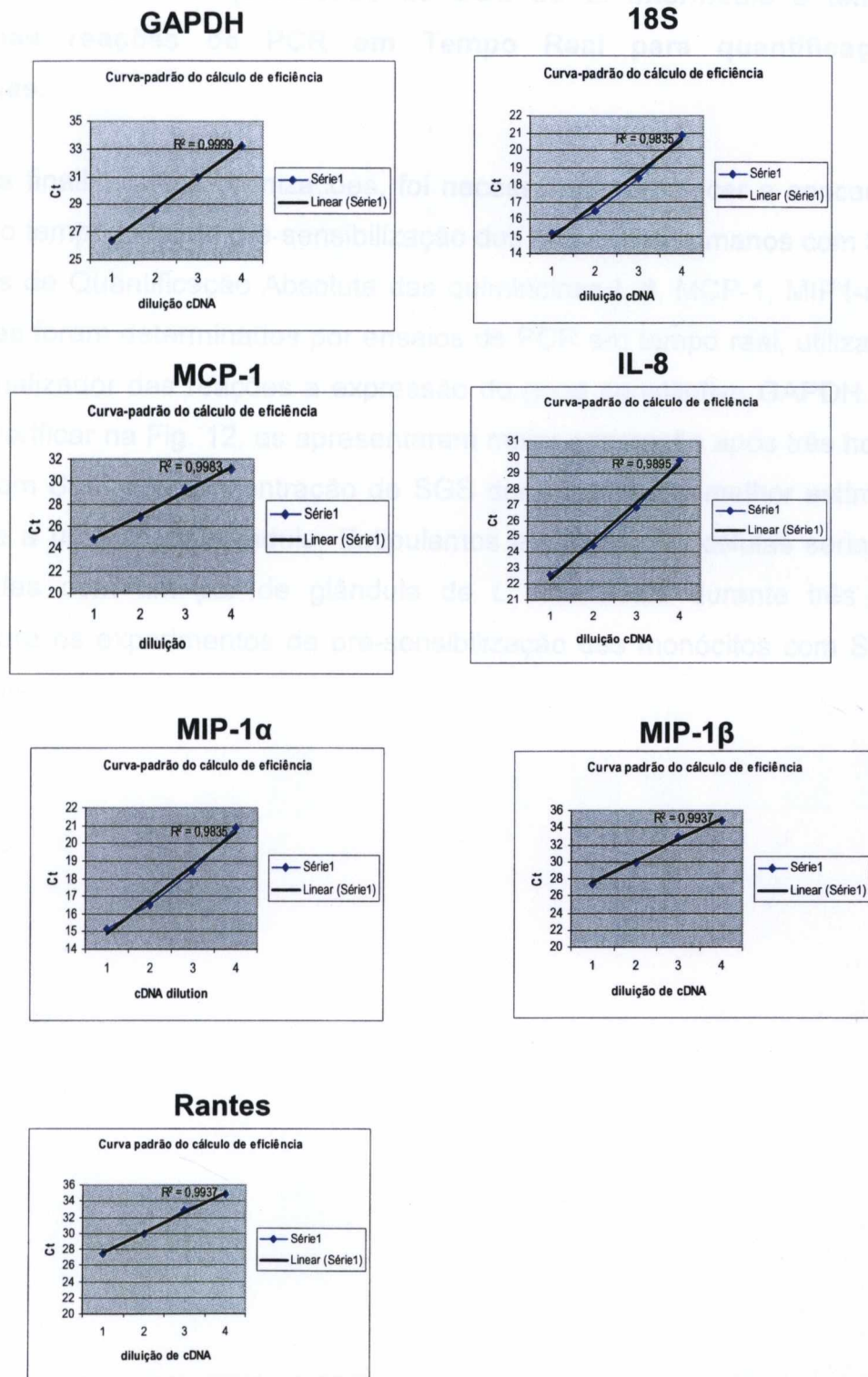
**Figura 9-** Plots de amplificação (A) e curvas de dissociação (B) das reações de PCR em Tempo Real utilizando os *primers* 18S, GAPDH, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e Rantes. Monócitos humanos ( $1 \times 10^6$ ) foram estimulados com  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS por 3 horas. Em seguida, as células foram coletadas, o RNA total foi extraído e utilizado para a síntese de cDNA. As reações de PCR em Tempo Real foram preparadas utilizando os *primers* nas concentrações finais de 125nM, 250nM e 500nM e cDNA diluído 1/10.

Com o propósito de estabelecer a diluição ideal de cDNA a ser utilizada nas reações de PCR em Tempo Real e de testar a eficiência dos *primers*, preparamos reações com cDNA em diversas diluições (1/10, 1/50, 1/250 e 1/1250). Os *primers* foram utilizados nas concentrações finais previamente definidas: GAPDH, IL-8, MCP-1 e Rantes (250nM); MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  (500nM). Como mostrado na Fig. 10, as análises das amplificações mostraram que, nas reações em que o cDNA foi diluído 1/10, obtivemos Cts inferiores a 30 ciclos para todos os pares de *primers* testados. Sendo assim, esta foi considerada a diluição ideal de cDNA a ser utilizada nos ensaios subseqüentes. A Fig. 11 mostra as curvas-padrão obtidas com cTs entre as diferentes diluições de cDNA. Os valores da inclinação da reta ( $R^2$ ) foram próximos de 1.0 para todos os *primers*, mostrando que as amplificações mantiveram razões constantes entre as diferentes diluições.

A eficiência dos *primers* foi calculada segundo a fórmula:  $E = [5^{(-1/\text{slope})}] - 1$  e obtivemos os seguintes valores: 18S = 1,320779; GAPDH = 1,031965; IL-8 = 0,947998; MCP-1 = 1,14913; MIP1- $\alpha$  = 0,97189; MIP-1 $\beta$  = 1,03112 e Rantes = 0,920287.



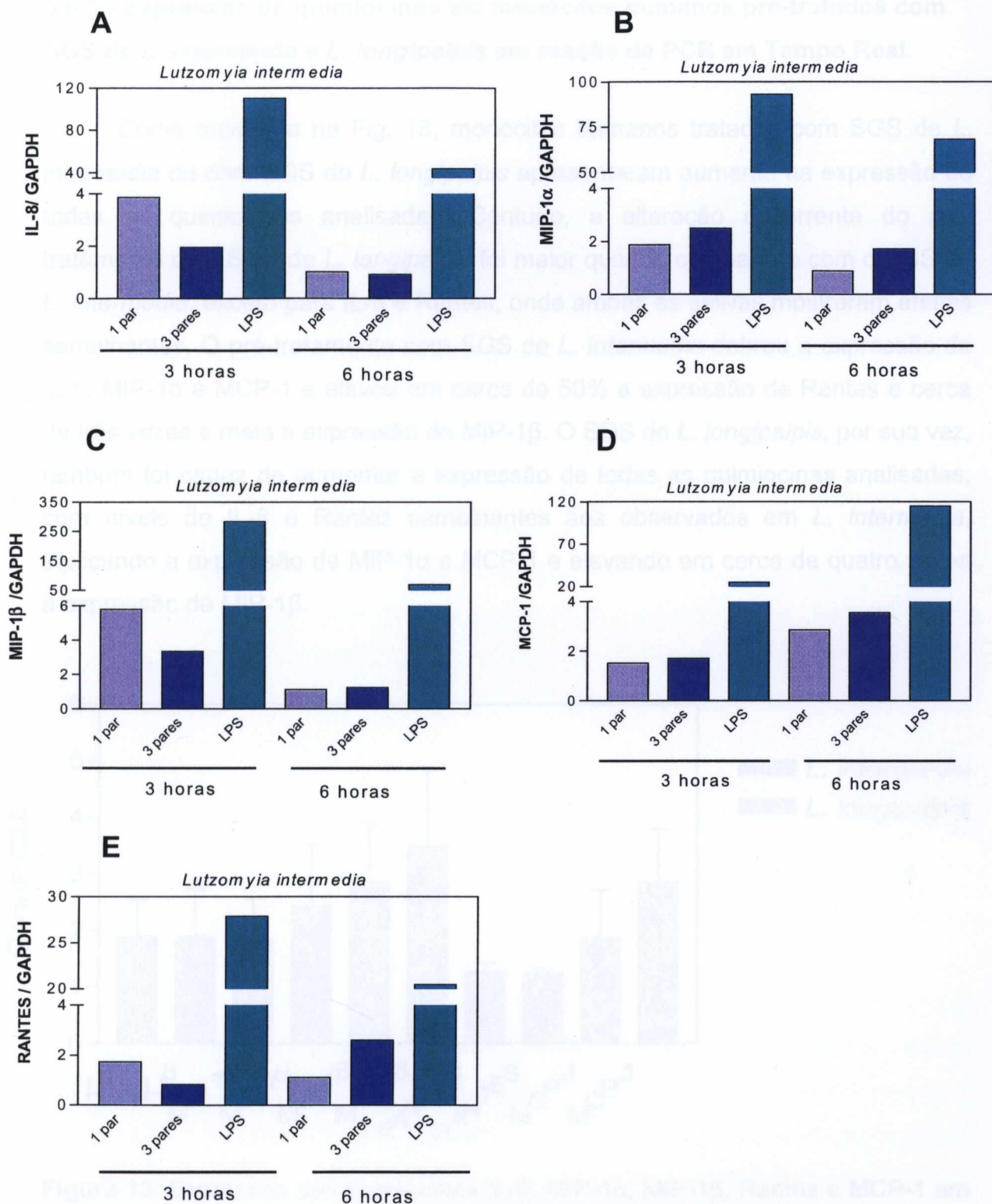
**Figura 10:** Plots de amplificação das reações de PCR em Tempo Real para determinar a diluição ideal de cDNA a ser utilizada com os *primers* 18S, GAPDH, IL-8, MCP-1, MIP1- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e Rantes e para o cálculo de eficiência dos *primers*. Monócitos humanos ( $1 \times 10^6$ ) foram estimulados com  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS e o RNA total foi extraído e utilizado para a síntese de cDNA. As reações foram preparadas utilizando cDNA nas diluições 1/10, 1/50, 1/250 e 1/1250 e os *primers*, nas concentrações previamente estabelecidas.



**Figura 11:** Curvas-padrão das amplificações de PCR em Tempo Real para determinar a eficiência dos *primers* 18S, GAPDH, IL-8, MCP-1, MIP1- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e Rantes, utilizando cDNA nas diluições 1/10, 1/50, 1/250 e 1/1250. Monócitos humanos ( $1 \times 10^6$ ) foram estimulados com LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) e, após incubação, as células foram coletadas, o RNA total extraído e utilizado para a síntese de cDNA. O os cTs das reações foram utilizados para calcular a angulação da reta.

### **6.8.2. Padronização da quantidade de SGS de *L. intermedia* e tempo de cultura nas reações de PCR em Tempo Real para quantificação de quimiocinas.**

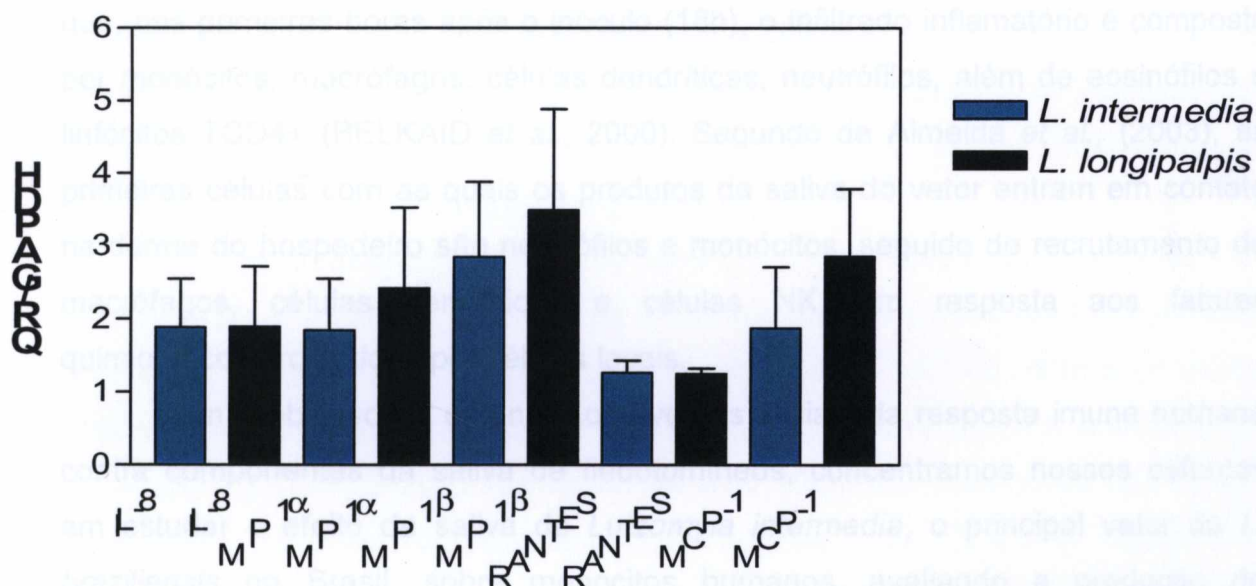
Para finalizar as padronizações, foi necessário estabelecer a concentração de SGS e o tempo ideal de pré-sensibilização dos monócitos humanos com SGS. Os ensaios de Quantificação Absoluta das quimiocinas L-8, MCP-1, MIP1- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e Rantes foram determinados por ensaios de PCR em tempo real, utilizando-se como normalizador das reações a expressão do gene constitutivo GAPDH. Como podemos verificar na Fig. 12, as apresentaram maior expressão após três horas de estímulo com SGS e a concentração de SGS que apresentou melhor estímulo foi equivalente a um par de glândula. Estipulamos então que as células seriam pré-sensibilizadas com um par de glândula de *L. intermedia* durante três horas, inclusive para os experimentos de pré-sensibilização dos monócitos com SGS de *L. longipalpis*.



**Figura 12:** Expressão de IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 e Rantes em monócitos humanos estimulados com SGS de *L. intermedia*. Monócitos humanos foram pré-tratados com SGS de *L. intermedia* (equivalente a 1 e 3 pares/mL) ou com LPS (1 $\mu$ g/mL) durante 3 e 6 horas. Após estes intervalos, os monócitos foram recuperados, o RNA total foi extraído e o cDNA foi sintetizado. As reações de PCR em Tempo Real foram preparadas em ensaios de QR, utilizando como normalizador das reações o gene constitutivo GAPDH.

### 6.8.3 - Expressão de quimiocinas em monócitos humanos pré-tratados com SGS de *L. intermedia* e *L. longipalpis* em reação de PCR em Tempo Real.

Como mostrado na Fig. 13, monócitos humanos tratados com SGS de *L. intermedia* ou com SGS de *L. longipalpis* apresentaram aumento na expressão de todas as quimiocinas analisadas. Contudo, a alteração decorrente do pré-tratamento com SGS de *L. longipalpis* foi maior quando comparado com o SGS de *L. intermedia*, exceto para IL-8 e Rantes, onde ambas as salivas mostraram efeitos semelhantes. O pré-tratamento com SGS de *L. intermedia* dobrou a expressão de IL-8, MIP-1 $\alpha$  e MCP-1 e elevou em cerca de 50% a expressão de Rantes e cerca de três vezes e meia a expressão de MIP-1 $\beta$ . O SGS de *L. longipalpis*, por sua vez, também foi capaz de aumentar a expressão de todas as quimiocinas analisadas, com níveis de IL-8 e Rantes semelhantes aos observados em *L. intermedia*, triplicando a expressão de MIP-1 $\alpha$  e MCP-1 e elevando em cerca de quatro vezes a expressão de MIP-1 $\beta$ .



**Figura 13:** Expressão das quimiocinas IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , Rantes e MCP-1 em monócitos humanos estimulados com SGS de *L. intermedia* e *L. longipalpis*. Os monócitos foram tratados com SGS de *L. intermedia* e *L. longipalpis* (equivalente a 1 par/mL) durante 3 horas. Os monócitos foram recuperados, o RNA total foi extraído para a obtenção do cDNA. As reações de PCR em Tempo Real foram preparadas em ensaios de QR, utilizando como normalizador o gene constitutivo GAPDH. Os dados representam a média e o desvio-padrão de 4 doadores.

## 7 DISCUSSÃO

As fêmeas dos flebotomíneos, ao realizarem a alimentação sangüínea, regurgitam o conteúdo de suas glândulas salivares na derme do hospedeiro, ao mesmo tempo em que ingerem o sangue. A picada do inseto resulta na dilaceração de vasos sangüíneos, capilares e tecidos e os componentes destes vasos e capilares são extravasados para os tecidos, produzindo um lago sangüíneo no local da picada. O micro-ambiente formado pela presença de produtos da saliva do vetor e elementos do sistema imune do hospedeiro, leva à formação de uma resposta inflamatória, um dos principais fatores relacionados com o desfecho da infecção (KAYE *et al.*, 1987). Uma vez que a saliva é injetada com a *Leishmania* no momento da infecção, tornou-se interessante estudar se os componentes da saliva dos flebotomíneos são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro. Assim, estudos em camundongos injetados com SGS de *P. papatasi* mostraram que, nas primeiras horas após o inóculo (18h), o infiltrado inflamatório é composto por monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, além de eosinófilos e linfócitos TCD4+ (BELKAID *et al.*, 2000). Segundo de Almeida *et al.*, (2003), as primeiras células com as quais os produtos da saliva do vetor entram em contato na derme do hospedeiro são neutrófilos e monócitos, seguido do recrutamento de macrófagos, células dendríticas e células NK, em resposta aos fatores quimiotáticos produzidos por células locais.

Com o objetivo de entender os eventos iniciais da resposta imune humana contra componentes da saliva de flebotomíneos, concentramos nossos esforços em estudar o efeito da saliva de flebotomíneos, concentramos nossos esforços em estudar o efeito da saliva de *Lutzomyia intermedia*, o principal vetor da *L. braziliensis* no Brasil, sobre monócitos humanos, avaliando a produção de citocinas, a expressão de moléculas de superfície e a expressão de quimiocinas. Em um segundo momento, avaliamos também o efeito da infecção *L. braziliensis* em monócitos humanos previamente expostos ao SGS de *Lutzomyia intermedia*.

Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento de monócitos humanos com SGS de *L. intermedia* inibiu significativamente a produção de IL-10. A ação de IL-10 tem efeito inibitório sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e na produção de NO, diminuindo a expressão de moléculas MHC

classe II, moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, limitando e finalizando a resposta inflamatória (revisado em MOORE *et al.*, 2001). Camundongos BALB/c co-injetados com *L. amazonensis* e SGS de *L. longipalpis* apresentam alta porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IL-10 e baixa frequência de células produtoras de IL-4 e IFN- $\gamma$ , o que pode explicar a evolução da doença nestes animais (NORSWORTHY *et al.* 2004). Em pacientes infectados com *L. braziliensis*, uma pequena porcentagem desenvolve lesões de mucosa que estão associadas com uma potente resposta celular, caracterizada por elevada expressão de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e baixos níveis de IL-10 (CARVALHO *et al.*, 1985). TNF- $\alpha$  é considerada crítica para a resolução da infecção por *Leishmania major*, pois em camundongos TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup> a infecção é fatal (WILHELM *et al.*, 2001). O SGS de *P. papatasi* não alterou a produção de TNF- $\alpha$  em monócitos humanos (ROGERS & TITUS, 2003), contudo, o SGS de *L. longipalpis* foi capaz de reduzir a produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 nesta população celular (COSTA *et al.*, 2004). Uma vez que não conseguimos detectar diferenças significativas na produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12 quando os monócitos foram pré-sensibilizados com SGS de *L. intermedia*, podemos apenas especular que houve modulação da resposta imune do hospedeiro por meio da inibição da produção de IL-10. É importante ressaltar que nossos resultados demonstraram grande dispersão o que, de fato, é esperado em se tratando de um estudo com populações humanas.

Em nosso estudo, abordamos também a expressão de moléculas co-estimulatórias e de MHC classe II na superfície de monócitos pré-tratados com SGS de *L. intermedia*. A indução da expressão de B7-1(CD80) ocorre de forma lenta e estável por longo período de tempo (4 a 5 dias) e favorece a diferenciação de células Th1, enquanto a expressão de B7-2 (CD86) é constitutiva das APCs, rapidamente regulada positivamente na interação com CD28 e favorece a diferenciação de células Th2, levando ao aumento da produção de IL-4 (BHATIA *et al.*, 2006). O bloqueio de CD80, CD86 ou de ambas as moléculas em cultura de macrófagos infectados com *L. major* inibiu a produção de IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-12 (BRODSKYN *et al.*, 2001), enquanto o bloqueio da interação CD28-B7 regulou negativamente a secreção de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  em CMSP de pacientes com LC (Favali *et al.*, 2005). A diminuição da expressão de moléculas co-estimulatórias e de MHC classe II diminui a ativação de células efetoras e pode alterar a expressão



de citocinas importantes para o controle da leishmaniose. A presença de SGS de *L. longipalpis* durante a geração de DC diminuiu a expressão de CD80, CD86 e HLA-DR, indicando um aspecto favorável para a proliferação do parasita, uma vez que retarda o desenvolvimento da resposta adaptativa (COSTA *et al.*, 2004). Nosso estudo mostrou alteração na expressão de moléculas co-estimulatórias em monócitos estimulados com LPS e pré-tratados com SGS de *L. intermedia* em relação às células não-tratadas. Houve elevação da expressão de CD86 e uma tendência de aumento na expressão de HLA-DR. Estes dados, aliados à diminuição na produção de IL-10, novamente, nos permitem especular que a saliva de *L. intermedia* estaria favorecendo o desenvolvimento de uma resposta imune a qual poderá ser mais eficaz na eliminação da *Leishmania*.

Já nos monócitos pré-tratados com SGS de *L. intermedia* e infectados com *L. braziliensis*, observamos um aumento na produção de TNF- $\alpha$ , o que pode indicar que uma exposição prévia à saliva de *L. intermedia* pode favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune contra a *Leishmania*. No entanto, quando avaliamos a carga parasitária, em termos do número de monócitos infectados e do número de amastigotas por monócitos, não observamos diferenças significativas com relação ao pré-tratamento com saliva. Não houve significância também quanto à produção de IL-10, IL-8 e IL-6 nestas condições, assim como também não foi observado diferenças na expressão de CD86 e HLA-DR.

A partir da constatação de que produtos da saliva de *L. intermedia* foram capazes de modular a produção de citocinas e de moléculas co-estimulatórias em monócitos humanos, achamos importante avaliar também a influência dos produtos da saliva de *L. intermedia* sobre a expressão de quimiocinas, que são moléculas que atuam no recrutamento de células para o sítio inflamatório. Para esta abordagem, utilizamos a técnica de PCR em Tempo Real, em ensaios de Quantificação Relativa e optamos por incluir a saliva de *L. longipalpis*, o vetor da *L. chagasi* no Brasil, como controle, uma vez que estudo desenvolvido em nosso laboratório mostrou que o SGS *L. longipalpis* aumentava a expressão de MCP-1 em linhagem de macrófagos murinos (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Nossos resultados mostraram que, tanto a saliva de *L. intermedia*, quanto a saliva de *L. longipalpis*, foram capazes de modular a expressão de quimiocinas em monócitos humanos, sendo o efeito mais proeminente observado na expressão de MIP-1 $\beta$ . Outro fato interessante foi notar que a modulação na expressão apresentou magnitudes

diferentes quando comparamos os resultados das duas espécies de flebotomíneos. Este efeito foi particularmente relevante em relação a MIP-1 $\beta$  e MCP-1. É importante destacar que *L. longipalpis* possui em seu conteúdo salivar o peptídeo maxadilan, que tem um forte efeito imunomodulador. Em região endêmica para LVA, a presença de uma resposta humoral anti-saliva de *L. longipalpis* foi correlacionada com uma resposta imune celular (DTH positivo) anti-*Leishmania* (Barral *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2002).

A produção de IL-8 no sítio de inflamação é responsável pelo recrutamento de neutrófilos, enquanto MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  recrutam macrófagos e Rantes recruta eosinófilos. As quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e Rantes foram associadas com a resposta imune do tipo Th1 (SCHRUM *et al.*, 1996). Na leishmaniose os neutrófilos fagocitam e destroem os parasitas (AGA *et al.*, 2002), mas, segundo Van Zandbergen *et al.* (2004), os neutrófilos funcionariam também como vetores da *Leishmania* para infectar macrófagos via fagocitose de corpos apoptóticos. Em camundongos BALB/c a interação de neutrófilos mortos com macrófagos infectados com *L. major* exacerbou a infecção, mas levou à morte de parasitas em animais C57BL/6 (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004), mostrando que o papel dos neutrófilos na leishmaniose murina depende do *background* genético. MIP-1 $\alpha$  e MCP-1 estão relacionados com a presença de infiltrado de linfócitos e macrófagos nas lesões na LC e MIP-1 $\alpha$  é responsável pela ativação de macrófagos em lesões de pacientes com LC e controla o crescimento e a multiplicação de *L. donovani* em macrófagos humanos, através da produção de óxido nítrico (RITTER *et al.*, 1996; BHATTACHARYYA *et al.*, 2002). Dasgupta *et al.* (2003) mostraram que MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e Rantes, bem como seus receptores CCR1 e CCR5 são positivamente regulados quando macrófagos humanos são infectados com *L. donovani*, num possível mecanismo para atrair macrófagos que serão infectados. Teixeira *et al.* (2005) verificaram que o SGS de *L. longipalpis* produziu um pico de recrutamento de monócitos 12 horas após a inoculação em camundongos BALB/c, com aumento da expressão de MCP-1, enquanto a inoculação de SGS de *L. longipalpis* com *Leishmania chagasi* nestes animais provocou o aumento no recrutamento de neutrófilos e macrófagos, o que pode facilitar a instalação do parasita, confirmado por PCR em tempo real. Uma vez que efeito semelhante foi detectado com a saliva de *L. intermedia*, será interessante investigar se, neste caso, também ocorre maior recrutamento de monócitos, por exemplo.

## 8 CONCLUSÕES

O SGS de *Lutzomyia intermedia* modula a produção de IL-10 e TNF- $\alpha$ , a expressão de CD86 e a expressão gênica de IL-8, MIP- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 e Rantes em monócitos humanos, mas não altera a carga parasitária em monócitos infectados por *Leishmania braziliensis*.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGA, E.; KATSCHINSKI, D.M.; VAN ZANDBERGEN, G.; LAUFS, H.; HANSEN, B.; MULLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v.169, p. 898-905, 2002.
- AKUFFO, H.; MAASHO, K.; BLOSTEDT, M.; HOJEBERG, B.; BRITTON, S.; BAKHIET, M. *Leishmania aethiopica* derived from diffuse leishmaniasis patients preferentially induce mRNA for interleukin-10 while those from localized leishmaniasis patients induce interferon-gamma. **J. Infect. Dis.**, v.175, p. 737-741, 1997.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunol. Lett.**, v.99, p. 17-23, 2005.
- ANJILI, C.O.; MBATI, P.A.; MWANGI, R.W.; GITHURE, J.I.; OLOBO, J.O.; ROBERT, L.L.; KOECH, D.K. The chemotactic effect of *Phlebotomus dubscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. **Acta Trop.**, v.60, p. 97-100, 1995.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res.**, v.119, p. 238-258, 2004.
- BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; CARVALHO, E.M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect. Immun.**, v.70, p. 6734-6740, 2002.
- BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A.; COSTA, J.; VINHAS, V.; ROWTON, E.D.; VALENZUELA, J.G.; CHARLAB, R.; BARRAL-NETTO, M.; RIBEIRO, J.M. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.62, p. 740-745, 2000.
- BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; SANTOS, S.B.; CARVALHO, E.M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; REED, S.G.; JOHNSON JUNIOR, W.D. Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v.147, p. 281-284, 1991.
- BATES, P.A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, v.79, p. 215-218, 1994.
- BELKAID, Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN-TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D.L. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **J. Exp. Med.**, v.188, p. 1941-1953, 1998.

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

BELKAID, Y.; SUN, C.M.; BOULADOUX, N. Parasites and immunoregulatory T cells. **Curr. Op. Immunol.**, v. 18, p. 406-412, 2006.

BEZERRA, H.S.; TEIXEIRA, M.J. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.96, p. 349-351, 2001.

BHATIA, S.; EDIDIN, M.; ALMO, S.C.; NATHENSON, S.G. B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. **Immunol. Lett.**, v.104, p. 70-75, 2006.

BHATTACHARYYA, S.; GHOSH, S.; DASGUPTA, B.; MAZUMDER, D.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. **J. Infect. Dis.**, v.185, p. 1704-1708, 2002.

BITTENCOURT, A.L.B.-N., M. *Leishmaniasis in Tropical Pathology*. Springer. Berlim: Verlag, 1995.

BOMFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, v.84, p. 188-194, 1996.

BOTTREL, R.L.; DUTRA, W.O.; MARTINS, F.A.; GONTIJO, B.; CARVALHO, E.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; ALMEIDA, R.P.; MAYRINK, W.; LOCKSLEY, R.; GOLLOB, K.J. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v.69, p. 3232-3239, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2007.

BRODSKYN, C.I.; DEKREY, G.K.; TITUS, R.G. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. **Infect. Immun.**, v.69, p. 665-672, 2001.

CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R.L.; REED, S.G. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v.152, p. 5949-5956, 1994.

CARVALHO, E.M.; JOHNSON, W.D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P.D.; COSTA, J.L.; REED, S.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J. Immunol.**, v.135, p. 4144-4148, 1985.

- CASTILHO, T.M.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **J. Clin. Microbiol.** pp. 540-546, 2003.
- COSTA, D.J.; FAVALI, C.; CLARENCIO, J.; AFONSO, L.; CONCEICAO, V.; MIRANDA, J.C.; TITUS, R.G.; VALENZUELA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.I. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. **Infect. Immun.**, v.72, p. 1298-1305, 2004.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins - Patologia Estrutural e Funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1996.
- DASGUPTA, B.; ROYCHOUDHURY, K.; GANGULY, S.; AKBAR, M.A.; DAS, P.; ROY, S. Infection of human mononuclear phagocytes and macrophage-like THP1 cells with *Leishmania donovani* results in modulation of expression of a subset of chemokines and a chemokine receptor. **Scand. J. Immunol.**, v.57, p. 366-374, 2003.
- DE ALMEIDA, M.C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.98, p. 861-870, 2003.
- ENGWERDA, C.R.; MURPHY, M.L.; COTTERELL, S.E.; SMELT, S.C.; KAYE, P.M. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. **Eur. J. Immunol.**, v.28, p. 669-680, 1998.
- FAVALI, C.; COSTA, D.; AFONSO, L.; CONCEICAO, V.; ROSATO, A.; OLIVEIRA, F.; COSTA, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.I. Role of costimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. **Microbes Infect.**, v.7, p. 86-92, 2005.
- FOLLADOR, I.; ARAÚJO, C.; BACELLAR, O.; ARAÚJO, C. B.; CARVALHO, L. P.; ALMEIDA, R. P.; CARVALHO, E. M. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 54-58, 2002.
- GOMES, R.B.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C.I.; COSTA, J.; MIRANDA, J.C.; CALDAS, A.; VALENZUELA, J.G.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. **J. Infect. Dis.**, v.186, p. 1530-1534, 2002.
- HEINZEL, F.P.; AHMED, F.; HUJER, A.M.; RERKO, R.M. Immunoregulation of murine leishmaniasis by interleukin-12. **Res. Immunol.**, v.146, p. 575-581, 1995.

HO, J.L.; BADARO, R.; SCHWARTZ, A.; DINARELLO, C.A.; GELFAND, J.A.; SOBEL, J.; BARRAL, A.; NETTO, M.B.; CARVALHO, E.M.; REED, S.G. Diminished in vitro production of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  during acute visceral leishmaniasis and recovery after therapy. **J. Infect. Dis.**, v.165, p. 1094-1102, 1992.

HONDOWICZ, B.; SCOTT, P. Influence of host and parasite factors on the innate immune response and Th2 stability following infection with *Leishmania major*. **Microbes Infect.**, v.1, p. 65-71, 1999.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, v.290, p. 1351-1354, 2000.

KARP, C.L.; EL-SAFI, S.H.; WYNN, T.A.; SATTI, M.M.; KORDOFANI, A.M.; HASHIM, F.A.; HAG-ALI, M.; NEVA, F.A.; NUTMAN, T.B.; SACKS, D.L. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon- $\gamma$ . **J. Clin. Invest.**, v.91, p. 1644-1648, 1993.

KAYE, P.M.; ROBERTS, M.B.; BLACKWELL, J.M. On immunobiology of experimental leishmaniasis. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.**, v.138, p. 907, 1987.

LEOPOLDO, P.T.; MACHADO, P.R.; ALMEIDA, R.P.; SCHRIEFER, A.; GIUDICE, A.; DE JESUS, A.R.; HO, J.L.; GUIMARAES, L.H.; BACELLAR, O.; CAVALHO, E.M. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. **B.M.C. Infect. Dis.**, v.6, p. 75, 2006.

LERNER, E.A.; RIBEIRO, J.M.; NELSON, R.J.; LERNER, M.R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 11234-11236, 1991.

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

LIMA, H.C.; TITUS, R.G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v.64, p. 5442-5445, 1996.

MBOW, M.L.; BLEYENBERG, J.A.; HALL, L.R.; TITUS, R.G. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v.161, p. 5571-5577, 1998.

MCMAHON-PRATT, D.; BENNETT, E.; DAVID, J.R. Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. **J. Immunol.**, v.129, p. 926-927, 1982.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v.19, p. 683-765, 2001.

MORRIS, R.V.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; LANZARO, G.C.; TITUS, R.G. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. **J. Immunol.**, v.167, p. 5226-5230, 2001.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v.136, p. 2348-2357, 1986.

NORSWORTHY, N.B.; SUN, J.; ELNAIEM, D.; LANZARO, G.; SOONG, L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infect. Immun.**, v.72, p. 1240-1247, 2004.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v.29, p. e45, 2001.

REINER, S. L.; LOCKSLEY R.M. The Regulation of immunity to *Leishmania major*. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 151-77, 1995.

RIBEIRO, J.M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, v.32, p. 463-478, 1987.

RIBEIRO, J.M.; FRANCISCHETTI, I.M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu. Rev. Entomol.**, v.48, p. 73-88, 2003.

RITTER, U.; MOLL, H.; LASKAY, T.; BROCKER, E.; VELAZCO, O.; BECKER, I.; GILLITZER, R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v.173, p. 699-709, 1996.

ROGERS, K.A.; TITUS, R.G. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite Immunol.**, v.25, p. 127-134, 2003.

ROGERS, K.A.; TITUS, R.G. The human cytokine response to *Leishmania major* early after exposure to the parasite in vitro. **J. Parasitol.**, v.90, p. 557-563, 2004.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat. Immunol.**, v.3, p. 1041-1047, 2002.

SCHRUM, S.; PROBST, P.; FLEISCHER, B.; ZIPFEL, P.F. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. **J. Immunol.**, v.157, p. 3598-3604, 1996.



- SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R.L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J. Exp. Med.**, v.168, p. 1675-1684, 1988.
- SCOTT, P.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.W.; COFFMAN, R.L.; SHER, A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunol. Rev.**, v.112, p. 161-182, 1989.
- SILVA, F.; GOMES, R.; PRATES, D.; MIRANDA, J.; ANDRADE, B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in Balb/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** V. 72, p. 94-98.
- TEIXEIRA, C.R.; TEIXEIRA, M.J.; GOMES, R.B.; SANTOS, C.S.; ANDRADE, B.B.; RAFFAELE-NETTO, I.; SILVA, J.S.; GUGLIELMOTTI, A.; MIRANDA, J.C.; BARRAL, A.; BRODSKY, C.; BARRAL-NETTO, M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **J. Immunol.**, v.175, p. 8346-8353, 2005.
- TEIXEIRA, M.J.; TEIXEIRA, C.R.; ANDRADE, B.B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v.22, p. 32-40, 2006.
- THEODOS, C.M.; RIBEIRO, J.M.; TITUS, R.G. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. **Infect. Immun.**, v.59, p. 1592-1598, 1991.
- TITUS, R.G.; DEKREY, G.K.; MORRIS, R.V.; SOARES, M.B. Interleukin-6 deficiency influences cytokine expression in susceptible BALB mice infected with *Leishmania major* but does not alter the outcome of disease. **Infect. Immun.**, v.69, p. 5189-5192, 2001.
- TITUS, R.G.; BISHOP, J.V.; MEJIA, J.S. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. **Parasite Immunol.**, v.28, p. 131-141.
- TITUS, R.G.; RIBEIRO, J.M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, v.239, p. 1306-1308, 1988.
- VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J. Immunol.**, v.173, p. 6521-6525, 2004.
- WEINSTOCK, C.; KNOBLOCH, J.; SCHULTHEIS, W.; NORTHOFF, H. Impaired production of cytokines in a case of human leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v.25, p. 1334-1339, 1997.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Disponível em [http://www.who.int/leishmaniasis/disease\\_epidemiology](http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology). Acesso em 05 jan 2007.

ZER, R.; YAROSLAVSKI, I.; ROSEN, L.; WARBURG, A. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p. 810-814, 2001.