

Laercio Shikô Toma

**Resposta imune na infecção murina
por *Leishmania (L.) amazonensis* na
ausência da molécula co-estimulatória CD28
ou das citocinas IL-12 e IFN- γ**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

São Paulo

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Laercio Shikô Toma

**Resposta imune na infecção murina por
Leishmania (L.) amazonensis na ausência da
molécula co-estimulatória CD28 ou das
citocinas IL-12 e IFN- γ**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Glória Maria Collet de Araújo Lima

São Paulo

2006

A Deus por proporcionar mais um momento sensacional em minha vida.

Aos meus pais pelo amor e dedicação em todos os momentos.

À minha irmã por todo carinho e incentivo.

À minha esposa pelo incentivo, dedicação e compreensão em mais uma caminhada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra Glória Maria Collet de Araújo Lima, que sempre me incentivou e me apoio em todas as etapas de minha vida acadêmica e pessoal. Obrigado por a senhora ser dura quando estava quase desistindo de algo que poderia me arrepender mais adiante, obrigado pelo carinho, amizade que somente pessoas que querem o nosso bem pode nos dar.

À Dra Ises de Almeida Abrahamsohn, outra pessoa que sem dúvida alguma não poderia de deixar de agradecer, pelo apoio incondicional ao meu desenvolvimento acadêmico, científico e pessoal. Obrigado pelo carinho e dedicação dispensados à mim desde a Iniciação científica; sem a senhora não seria possível ter realizado este trabalho.

Aos professores Dr. Maria Regina D'Império Lima, Luiz Vicente Rizzo e a Silvia Reni Bortolin Uliana pelas críticas e sugestões no exame de Qualificação.

À minha querida amiga Tânia, por todo apoio, companheirismo, carinho e dedicação desde o primeiro momento que nos conhecemos. Não há palavras que expresse uma verdadeira amizade.

À amiga Lia, por sempre poder contar com o seu apoio sincero e amigo neste 10 anos de convivência.

À amiga Natalie, pela amizade e apoio .

À Valéria pela amizade, dedicação e apoio em todos os momentos.

Ao Marcelo, Marcos e Adriana que deixaram momentos inesquecíveis...

À Jotelma pela ajuda nos momentos mais críticos desta dissertação

Aos amigos Marilu, Ricardo, Laura, Sandriana, Ulisses, Ademir, Áurea e tantos outros que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta dissertação, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Nós estudamos a infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* na pata de camundongos C57BL/6 geneticamente desprovidos de CD28 (CD28 KO), IL-12 (IL-12 KO) ou IFN- γ (IFN- γ KO) em comparação com camundongos C57BL/6 (controle tipo selvagem).

Os animais CD28 KO apresentaram maior resistência e os animais IL-12 KO ou IFN- γ KO apresentaram maior suscetibilidade à infecção em comparação aos controles. Os camundongos CD28 KO consistentemente apresentaram lesões menores e menor número de parasitos na pata ou linfonodos drenantes poplíteos (LNDP) do que os camundongos controles, para inóculos de 10^6 ou 10^5 formas promastigotas de fase estacionária de cultura. Maior resistência, com lesões menores e menor carga de parasitos na pata de animais CD28 KO foram observadas também quando 10^3 formas promastigotas metacíclicas purificadas foram usadas para infecção dos animais.

Nos grupos de camundongos IL-12 KO e IFN- γ KO, a inoculação de diferentes doses de promastigotas de fase estacionária resultou em lesões mais graves e cargas parasitárias significativamente maiores nas patas e nos LNDP em comparação aos camundongos C57BL/6 WT. Quanto à produção de citocinas, nós observamos que a produção de IL-12 e de IFN- γ foi similar nos sobrenadantes de culturas obtidas de camundongos CD28 KO e camundongos WT. Não detectamos em nenhum momento IL-4. Embora, em baixas concentrações, IL-10 foi consistentemente detectada nos sobrenadantes de cultura de células dos LNDP das diferentes linhagens de camundongos, com diferentes inóculos, na fase crônica da infecção por *L. (L.) amazonensis*.

Nós concluímos que a inexistência de co-estimulação via moléculas de CD28 determinou maior resistência frente à infecção por *L. (L.) amazonensis*.

ABSTRACT

We studied the outcome and the immune response to *Leishmania amazonensis* infection in C57BL/6 mice genetically deprived of CD28 (CD28 KO), IL-12 (IL-12 KO) or IFN- γ (IFN- γ KO).

CD28 KO mice were more resistant while IL-12 KO and IFN- γ KO mice were more susceptible to infection in comparison to wild type (WT) mice. Smaller lesions and reduced parasite numbers in the paw and in the popliteal draining lymph nodes were observed in CD28 KO mice infected with 10^6 or 10^5 stationary-phase promastigotes in comparison to WT controls. Infection of the former with 10^3 purified metacyclic forms also resulted in smaller lesions and reduced parasite load in the paw as compared to similarly infected WT mice.

In contrast, IL-12 KO e IFN- γ KO mice developed more intense footpad swelling and heavier parasite loads in the paw and popliteal draining lymph nodes. Cytokines were quantified in cultures of draining LN cells: IL-4 could not be detected in any circumstance; IL-12 and IFN- γ levels were similar between CD28 KO and WT mice; IL-10 levels were low, however, constantly detected at the chronic infected mice.

We conclude that the lack of costimulation of the immune response via CD28 molecules determined increased resistance to *L. (L.) amazonensis* infection in C57BL/6 resistant mice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Infecção de camundongos C57BL/6 WT, CD28 KO, IL-12 KO e IFN- γ KO com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura: aumento de tamanho da pata após infecção. 51
- Figura 2.** Determinação do número de *L. (L.) amazonensis* nos linfonodos poplíteo e inguinal drenantes da lesão em camundongos C57BL/6 WT, IL-12 KO, IFN- γ e CD28 KO inoculados com formas promastigotas obtidas de fase estacionária de cultura. 53
- Figura 3.** Quantificação dos parasitos nas patas de camundongos C57BL/6 WT, IL-12 KO e CD28 KO inoculadas com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura. 55
- Figura 4.** Infecção de camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO inoculados com promastigotas metacíclicas ou promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis*: aumento de tamanho da pata após infecção. 59
- Figura 5.** Quantificação do número de parasitos nos linfonodos poplíteos drenantes de camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO infectados com 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura ou 10^3 promastigotas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis*. 61
- Figura 6.** Quantificação do número de parasitos de *L. (L.) amazonensis* na pata de camundongos CD28 KO e C57BL/6 WT infectados com 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura ou 10^3 formas metacíclicas. 63
- Figura 7.** Quantificação do número de células em linfonodos poplíteos drenantes de camundongos CD28 KO e C57BL/6 WT injetados com PBS (controles) ou infectados com 10^5 promastigotas de fase estacionária ou 10^3 formas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis*. 67
- Figura 8.** Infecção de camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO inoculados com promastigotas metacíclicas ou promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis*: aumento de tamanho da pata após infecção. Repetição de experimentos pós-tratamento das colônias de camundongos. 69
- Figura 9.** Infecção de culturas de células aderentes de peritônio de camundongos C57BL/6 CD28 KO e WT por formas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis*. 72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Produção de citocinas por células dos linfonodos poplíteos drenantes de camundongos C57BL/6 WT, CD28 KO, IFN- γ KO e IL-12 KO infectados com 10^6 formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultivo. 57
- Tabela 2.** Produção de citocinas por células de linfonodos poplíteos drenantes de camundongos CD28 KO e WT infectados com 10^3 metacíclicas ou 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis*. 65
- Tabela 3.** Produção de citocinas por células de linfonodos drenantes de camundongos CD28 KO e C57BL/6 WT infectados com 10^3 promastigotas metacíclicas ou 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis* no período pós contaminação por *Proteus sp.* 70
- Tabela 4.** Produção de óxido nítrico (NO) por células aderentes de culturas infectadas *in vitro* com 10^3 promastigotas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis* no período pós contaminação por *Proteus sp.* 74

ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
Células NK	Células “Natural Killer”
CD28 KO	Camundongos geneticamente deficientes em CD28
DC	Células dendríticas
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
IFN- γ KO	Camundongos geneticamente deficientes em IFN- γ
IL-12 KO	Camundongos geneticamente deficientes em IL-12
LAD	Leishmaniose anérgica difusa
<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LDA	Ensaio de diluição limitante
<i>L. (L.) major</i>	<i>Leishmania (Leishmania) major</i>
LN	Linfonodo
LND	Linfonodo drenante
LNDP	Linfonodo drenante poplíteo
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>
MRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
SBF	Soro Fetal Bovino
WT (wild-type)	Camundongo controle do tipo selvagem

SUMÁRIO

	Pag.
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Leishmaniose: histórico	20
1.2 Leishmaniose: o parasita e modo de transmissão	22
1.3 Leishmaniose: doença	24
1.4 Modelo animal: hospedeiro resistente ou suscetível	26
1.5 Leishmaniose: resposta inata e imune, interações e produtos	30
1.6 Leishmaniose: molécula co-estimulatória CD28	34
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAIS E METODOS	
3.1 Animais	40
3.2 Parasitos	41
3.3 Produção do anticorpos monoclonais 3A1	42
3.4 Obtenção de formas metacíclicas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	42
3.5 Infecção	43
3.6 Quantificação de parasitos nos linfonodos e patas	43
3.7 Cultura de células obtidas de linfonodos drenantes	44
3.8 Obtenção de macrófagos peritoneais	45
3.9 Cultura de macrófagos e infecção	45
3.10 Contagem dos macrófagos e dos parasitos internalizados	46
3.11 Produção de óxido nítrico (NO)	46
3.12 Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de células	47
3.13 Análise estatística	48
4. RESULTADOS	
4.1 Evolução da infecção após a inoculação em camundongos C57BL/6 WT, IL-12 KO, IFN- γ KO e CD28 KO com formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> de fase estacionária de cultura	50
4.2 Quantificação do número de parasitos em Linfonodos drenantes do sítio de infecção de <i>L. (L.) amazonensis</i> em camundongos C57BL/6 WT, IL-12 KO, IFN- γ KO, CD28 KO com formas promastigotas obtidas de fase estacionária de cultura	52
4.3 Quantificação dos parasitos nas patas de camundongos C57BL/6 WT, IL-12 KO, e CD28 KO inoculadas com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> de fase estacionária de	

cultura	54
4.4 Produção de citocinas IL-4, IL-12, IFN- γ e IL-10 por células obtidas de linfonodos drenantes da pata de camundongos C57BL/6 WT, CD28 KO e IL-12 KO infectados com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> de fase estacionária de cultura.....	56
4.5 Evolução da infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i> após inoculação de formas metacíclicas ou promastigotas de fase estacionária de cultura em camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO	58
4.6 Quantificação dos parasitos em linfonodos drenantes de camundongos CD28 KO e C57BL/6 WT infectados com promastigotas metacíclicas ou promastigotas de fase estacionária de cultura de <i>L. (L.) amazonensis</i>	60
4.7 Quantificação dos parasitos no sítio de inoculação de camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO infectados com promastigotas metacíclicas ou promastigotas de fase estacionária de cultura de <i>L. (L.) amazonensis</i>	62
4.8 Dosagem de citocinas em sobrenadantes de culturas de células de linfonodo de poplíteos de camundongos CD28 KO e C57BL/6 WT infectados com 10^3 promastigotas metacíclicas ou 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura de <i>amazonensis</i>	64
4.9 Celularidade dos linfonodos drenantes poplíteos de camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO infectados com formas promastigotas de fase estacionária ou formas metacíclicas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	66
4.10 Influência da qualidade sanitária dos animais de experimentação na reprodutibilidade dos experimentos de infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i> (formas metacíclicas ou promastigotas de fase estacionária de cultura) em camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO. Repetição de experimentos pós-tratamento das colônias de camundongos.....	68
4.11 Avaliação da infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i> em células aderentes de peritônio de camundongos C57BL/6 WT ou CD28 KO.....	71
4.12 Produção de óxido nítrico (NO) em culturas de células aderentes de peritônio de camundongos C57BL/6 CD28 KO e WT infectadas com formas metacíclicas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	73
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÕES	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose: histórico

Os registros mais antigos encontrados sobre uma doença que provocava lesões cutâneas, conhecida como “doença dos narizes” e que hoje sabemos se tratar da leishmaniose, são datados do primeiro século depois de Cristo. De fato, doentes com lesões da cartilagem nasal foram retratados pelos ceramistas pré-colombianos do Peru e do Equador. Mais tarde relatos de cronistas espanhóis, entre eles Pedro Pizarro em 1533, escreveram sobre o “mal do nariz” que dizimou os povos situados nos vales quentes do Peru. Em outros países já se conhecia a enfermidade, mas como não havia ainda sido descoberto o agente etiológico da doença, em cada região ocorria denominação diferente, como botão d’Aleppo (na Síria) conhecido desde o século XVIII, botão de Biskra (Biskra, Irã) relatado em 1844 e o Kala-azar (calazar), descrito principalmente na Índia (Altamirano-Enciso, Marzochi *et al.*, 2003).

A primeira descrição do parasita da Leishmaniose foi feita por Cunningham, na Índia, em 1885 que isolou e descreveu as formas amastigotas de pacientes (Pessoa, 1958; Albuquerque, 1995).

Entretanto somente em 1898 o pesquisador russo Peter Fokitsch Borovsky, conseguiu demonstrar que o agente causador do botão d’Aleppo ou botão do Oriente era um protozoário, publicando a primeira descrição clara sobre o parasita. A sua publicação somente foi conhecida mundialmente após a Segunda Guerra Mundial. Devido a este fato, a descoberta do parasita é creditada a James Homer Wright, que obteve amostras retiradas das úlceras de uma criança armênia, e deu, em 1903, o nome ao parasito de *Welcozoma tropicum*. Mais tarde o parasito foi classificado como sendo do gênero *Leishmania*, conhecido atualmente como *Leishmania tropica*. Ainda em 1903, William Leishman e Charles Donovan,

independentemente, descreveram o parasito; Leishman reconheceu a semelhança do parasito com o agente etiológico da tripanossomíase e identificou-o como responsável etiológico do Calazar, enquanto Donovan descreveu o parasita como sendo um esporozoário. Foi então que o médico inglês Ronald Ross (descobridor da etiologia da Malária e de seu mecanismo de infecção), demonstrou que os organismos não eram esporozoários e estabeleceu um novo gênero, *Leishmania*, agente causal das leishmanioses prestando homenagem a Leishman, já que a identificação do parasito como protozoário decorreu de seus estudos.

No Brasil, em 1885, houve um foco endêmico de leishmaniose, quando Moreira e Cerqueira diagnosticaram lesões cutâneas idênticas ao botão do oriente. Em 1909, Carini e Paranhos, no sul do Brasil e Adolfo Lindenberg no estado de São Paulo, descreveram os primeiros casos de leishmaniose cutânea (LC) nas Américas. No ano de 1911, Gaspar de Oliveira Viana, trabalhando no Instituto Oswaldo Cruz, fez a correlação das lesões com a presença do protozoário do gênero *Leishmania*, dando-lhe o nome de *Leishmania braziliensis*.

Até o ano de 1921, suspeitava-se que os insetos *Phlebotomus* eram os vetores da doença; em 1922, durante uma epidemia que ocorreu no estado do Rio de Janeiro, Henrique Aragão comprovou que realmente eram esses os insetos responsáveis pela transmissão da Leishmaniose tegumentar americana (LTA).

A incidência das várias formas de leishmaniose atingiu níveis tão elevados que a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1993, considerou-a como a segunda doença em importância para a saúde pública, entre as doenças causadas por protozoários. (Organização Mundial da Saúde, 1998).

1.2 Leishmaniose: o parasita e modo de transmissão

A leishmaniose é causada por um protozoário do sub-filo Kinetoplasta, classe *Trypanosomatidea*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. O gênero *Leishmania* é composto por mais de vinte espécies que são epidemiologicamente diversas e complexas.

Todas as espécies de *Leishmania* exibem um ciclo de vida heteroxênico semelhante. No inseto vetor e em meio de cultura líquido axênico os parasitos encontram-se na forma promastigota com um flagelo anterior. Já no hospedeiro vertebrado, os parasitos são encontrados no interior de vacúolos (fagossomos) de macrófagos e monócitos de vários órgãos, apresentando-se como formas ovais, com um flagelo muito curto, sem motilidade, sendo chamadas de formas amastigotas. A multiplicação dessas formas ocorre por divisão binária simples (Bryceson, 1996).

A transmissão dos parasitos para os vertebrados ocorre por meio da picada de insetos de diferentes espécies dos gêneros *Phlebotomus* (no velho mundo) e *Lutzomyia* (nas Américas).

O inseto tem como característica viver em locais próximo ao solo, com pouca luz, úmidos. Sua alimentação é baseada em carboidratos que são retirados da vegetação; a fêmea para completar seu ciclo gonotrófico necessita de sangue e é ao picar um mamífero que pode infectar-se ou infectar outro hospedeiro com o parasito (Killick-Kendrick e Molyneux, 1981).

No momento do repasto sanguíneo em um animal ou homem infectado o inseto se infecta. A epiderme e capilares dérmicos do hospedeiro são rompidos na picada e o inseto suga juntamente com o sangue as células parasitadas. No intestino médio do flebotomíneo, estas células se rompem liberando as formas

amastigotas que se diferenciam em formas promastigotas procíclicas que não são infectantes. Nesse ambiente, os parasitos se dividem rapidamente, sofrem o processo de diferenciação conhecido como metaciclogênese e se transformam em formas promastigotas metacíclicas infectantes. Durante a metaciclogênese, as leishmanias sofrem alterações estruturais e bioquímicas na sua superfície celular, tais como aumento da protease de superfície gp63 e alteração na estrutura do LPG (lipofosfoglicano) que perde a adesividade à parede intestinal do inseto; ocorrem também alterações de motilidade e tamanho. Os parasitos migram então do intestino anterior para o esôfago e para a probóscida do inseto, ficam suspensos na saliva e estão prontos para serem inoculados no hospedeiro vertebrado (Killick-Kendrick, Molyneux *et al.*, 1974; Sacks, Hieny *et al.*, 1985; Da Silva e Sacks, 1987; Mauel, 1996). Estima-se que na natureza, 10 a 1000 formas promastigotas metacíclicas são suficientes para desencadear uma lesão (Warburg e Schlein, 1986).

As espécies de *Leishmania* foram divididas em três grupos segundo o seu desenvolvimento no inseto vetor:

Hipopiloro – no íleo e nas áreas retais do vetor (Afonso, Scharon *et al.*, 1994)

Peripiloro – no íleo anterior e no estômago e na faringe do vetor;

Suprapiloro – no estômago e na faringe do vetor.

As espécies que infectam os seres humanos estão principalmente classificadas no grupo do suprapiloro e poucas no grupo peripiloro. Baseados nesta divisão, Lainson e Shaw, em 1987, classificaram as leishmanias em dois subgêneros: *Leishmania* (suprapiloro) e *Viannia* (peripiloro) (Lainson, 1987).

1.3 Leishmaniose: doença

Cerca de 12 milhões de pessoas são afetadas com a doença em 88 países de todos os continentes, com exceção da Austrália. Trezentos e cinquenta milhões de pessoas estão expostas ao risco da infecção, com uma incidência anual de 2 milhões de casos novos (OMS, 1998), sendo a sua notificação compulsória em apenas 30 países.

As leishmanioses apresentam extensa variedade de manifestações clínicas, que vão desde formas menos graves, como uma única lesão cutânea de cura espontânea (leishmaniose cutânea localizada), até formas mais graves, como lesões destrutivas da mucosa ou formas viscerais (leishmaniose visceral), que podem ser resistentes à terapêutica convencional, podendo levar à morte (Dickerhoff, Muller *et al.*, 1990; Desjeux, 1996).

A classificação utilizada na atualidade segue o modelo taxonômico proposto por Lainson & Shaw (Lainson, 1987), que dividem as leishmanias nos subgêneros *Viannia* (V.) e *Leishmania* (L.). Especialistas distinguem cerca de 18 espécies de *Leishmania* em função do tipo de lesão que causam e de algumas características imunológicas e moleculares.

Apesar de serem todas inoculadas na pele, espécies distintas de *Leishmania* têm preferências por órgãos diferentes e causam lesões de tamanho e evolução variados, com ou sem metástases e que podem inclusive resolver-se espontaneamente. Entretanto, as infecções podem não induzir imunidade permanente, sendo esta freqüentemente apenas temporária e às vezes inexistente. Esse conjunto de fatores, aliados à variada capacidade de resposta imune e tecidual

dos pacientes são responsáveis pelas diversas formas clínicas das leishmanioses (Ashford, Desjeux *et al.*, 1992).

Nas lesões mais simples como as do "botão do oriente", causado no velho mundo pela *L. (L.) tropica*, a ulceração cutânea é pequena, cura espontaneamente e confere imunidade permanente. Outras duas formas de lesões cutâneas mais agressivas e mutilantes são causadas pela *L. (L.) major* no Oriente Médio e *L. (L.) aethiopica* na Etiópia (Evans, 1993).

No novo mundo, já foram descritos vários tipos de ulcerações cutâneas causadas por leishmanias que recebiam designações regionais: uta, espúndia, pian bois, úlcera de Bauru. As formas tegumentares no Brasil são determinadas por seis espécies: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lansoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (L.) amazonensis*; a forma cutâneo-mucosa, pela *L. (V.) braziliensis* e eventualmente pela *L. (V.) guyanensis*.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é caracterizada pelo surgimento de lesões na pele (geralmente úlceras profundas) únicas ou múltiplas, principalmente nas áreas expostas do corpo. A leishmaniose mucocutânea atinge áreas como nariz, lábios, bochechas, palato mole e faringe e em alguns casos a traquéia. A conseqüência mais alarmante desse tipo de leishmaniose é o desfiguramento do indivíduo (Marzochi e Marzochi, 1994).

Existe ainda, na Amazônia, uma forma rara e extremamente grave de leishmaniose denominada leishmaniose anérgica difusa (LAD). A LAD caracteriza-se pela disseminação generalizada do parasito pela pele, evoluindo para a formação de nódulos e placas com caráter altamente deformante associada à incapacidade de desenvolver resposta imunológica eficiente contra o parasito. Esta "imunodeficiência seletiva" está aparentemente limitada à resposta dos linfócitos T do tipo Th1

específica para antígenos de *Leishmania*. Em conseqüência não ocorre estimulação dos macrófagos adequada para eliminar os parasitos intracelulares. Esta forma clínica está associada à infecção por *L. (L.) amazonensis*. É de difícil tratamento e freqüentemente letal (Gontijo e De Carvalho Mde, 2003).

Outra forma grave da infecção é a forma visceral (LV), também presente no Velho Mundo, em toda a Ásia, incluindo a China e particularmente na Índia. Manifesta-se por febre pouco elevada, mas, diária e constante, marcado emagrecimento com grande aumento do baço e fígado. A LV é particularmente grave em crianças; se não tratada, quase sempre evolui para a morte. No Brasil, a LV é causada pela *L. (L.) chagasi* e no Velho Mundo, pela *L. (L.) donovani* (Lainson, Shaw *et al.*, 1987; Dickerhoff, Muller *et al.*, 1990).

1.4 Modelo animal: hospedeiro resistente ou suscetível

Os modelos animais de doenças infecciosas, embora muitas vezes não reproduzindo todos os aspectos da doença humana são importantes para a compreensão da biologia do parasitismo, patologia e desenvolvimento de novos fármacos. Camundongos e hamsters são mais comumente usados para a caracterização da doença e da resposta imune do hospedeiro frente ao parasita. Embora as leishmanioses viscerais e cutâneas possam assim ser estudadas, existem limitações como, por exemplo, a inexistência de modelo animal para se estudar a leishmaniose pós-calazar. As diferentes espécies de *Leishmania* causam doenças clinicamente distintas e a severidade da doença causada por um determinado parasita pode variar entre os indivíduos.

A maior parte dos estudos, até hoje, se baseia na classificação de hospedeiros suscetíveis e resistentes. Esta classificação é uma extensão do modelo de infecção por *L. (L.) major* em linhagens de camundongos isogênicos, entre as quais os camundongos da linhagem C57BL/6 são uniformemente resistentes e os camundongos BALB/c comparativamente muito mais suscetíveis (Howard, Hale *et al.*, 1980).

Os estudos dos mecanismos de resposta imune realizados em camundongos, caracterizaram dois padrões de respostas distintas baseadas no perfil de citocinas sintetizadas por linfócitos T: Th1 e Th2 (Th do inglês, T helper) (Mosmann, Cherwinski *et al.*, 1986; Mosmann e Sad, 1996; Mosmann, Cherwinski *et al.*, 2005).

Os camundongos BALB/c são extremamente suscetíveis à infecção por *L. (L.) major* desenvolvem uma lesão cutânea progressiva no sítio de inoculação e a infecção se visceraliza, levando o animal à morte. Nesta linhagem, a suscetibilidade à infecção por *L. major* está relacionada ao desenvolvimento de resposta do tipo Th2 e de escassa resposta do tipo Th1. Por outro lado, os camundongos C57BL/6, resistentes à infecção, desenvolvem uma lesão que se auto-resolve com o tempo e a resistência está relacionada à uma eficiente e dominante resposta do tipo Th1 (Heinzel, Sadick *et al.*, 1989; Scott, 1989). Desse modo, no modelo murino de infecção causada por *L. (L.) major*, a resistência do hospedeiro à infecção está associada à ativação seletiva e diferenciação de linfócitos TCD4⁺ em células efetoras Th1, que secretam citocinas tais como interleucina 2 (IL-2), IFN- γ e TNF- α . Por outro lado, a suscetibilidade à infecção está associada à ativação seletiva e diferenciação de linfócitos TCD4⁺ em células efetoras Th2, que secretam principalmente citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-6 (Liew e O'donnell, 1993; Herwaldt, 1999; Jankovic, Sher *et al.*, 2001). Além disso, foi visto que a resistência à

L. (L.) major é dependente de produção inicial eficaz de IL-12 por células dendríticas e ou macrófagos e esta citocina induz a produção de IFN- γ e o meio ambiente propício à geração de células Th1 (Scharton-Kersten, Afonso *et al.*, 1995).

A resistência e suscetibilidade de camundongos C57BL/6 e BALB/c, respectivamente, não depende somente do tipo de resposta imune vinculada aos linfócitos TCD4⁺ Th1 e Th2, mas, também do fundo genético destes animais. Estudos utilizando linhagens recombinantes de camundongos mostraram que a resistência ou a suscetibilidade era ditada pelo haplótipo do animal (Roberts, Baldwin *et al.*, 1997). Estudos, que questionaram se outros genes poderiam estar envolvidos na suscetibilidade e na resistência à infecção por *L. (L.) major* mostram que loci nos cromossomos 6, 7, 10, 11, 15, e 16 estão associados com a resistência. Portanto, os estudos evidenciaram a natureza multigênica da regulação do fenótipo de resistência ou suscetibilidade da qual participam de maneira importante mas não exclusiva as citocinas (Beebe, Mauze *et al.*, 1997).

Resumindo, o espectro de manifestações e severidade da doença reflete a interação entre o genoma do hospedeiro e o do parasita, e a patologia é o resultado da combinação de interações moleculares entre os dois (Handman, Elso *et al.*, 2005).

De uma maneira geral, o padrão de resposta do hospedeiro mediado por diferentes populações de linfócitos T parece depender de uma série de fatores que envolvem: os diferentes antígenos do parasito, as células apresentadoras desses antígenos e as moléculas liberadas, principalmente no início da infecção, por células da resposta imune inata (Reiner e Locksley, 1995). Neste sentido, tem sido demonstrado que o padrão Th1 de resposta e a conseqüente resposta protetora depende, dentre outros fatores, de uma rápida produção de IFN- γ por células NK,

ativadas por IL-12 e IL-2. A presença de fatores inibitórios, tais como IL-4, IL-10 e TGF- β previne a ativação destas células, levando a uma resposta do tipo Th1 menos efetiva (Scott, 2003).

Outros pesquisadores, entretanto, trabalhando com várias linhagens isogênicas de camundongos mostraram que IL-4 está relacionada à progressão da infecção por *L. (L.) major*, mas a produção de IFN- γ não é prognóstico de resistência (Alexander e Bryson, 2005). Recentemente, Chatelain e colaboradores mostraram que camundongos resistentes e suscetíveis depletados de IL-4 e IFN- γ desenvolvem uma forte resposta Th1; ainda assim, o controle da infecção tardia nos camundongos suscetíveis não ocorre, enquanto que os camundongos resistentes mantêm sob controle a infecção por *L. (L.) major* (Chatelain, Mauze *et al.*, 1999).

No caso da infecção murina por *L. (L.) amazonensis*, Afonso e Scott, em 1993, trabalhando com camundongos C57BL/10 mostraram que estes camundongos eram resistentes à infecção por *L. (L.) major* e eram suscetíveis à infecção por *L. (L.) amazonensis*. (Afonso e Scott, 1993). Os autores mostraram também, que as células de linfonodos de C57BL/10 infectados com *L. (L.) major* produziam grandes quantidades de IFN- γ , enquanto as células de linfonodos dos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* produziam pouco ou nenhum IFN- γ . A citocina IL-4 só foi detectada em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, produção esta restrita às primeiras semanas de infecção. Assim, concluíram que a suscetibilidade destes animais à *L. (L.) amazonensis* era, principalmente, devida a uma ausência de resposta do tipo Th1 do que à presença de uma resposta do tipo Th2 (Afonso e Scott, 1993) . Outros estudos relacionaram a suscetibilidade à infecção por *L. (L.) amazonensis* à presença de TGF- β (Barral-Netto, Barral *et al.*, 1992)

Conclui-se, portanto, que os parâmetros que determinam resistência ou suscetibilidade na infecção por *L. (L.) amazonensis* podem ser menos evidentes do que os observados nas infecções por *L. (L.) major*. Ainda, o número de estudos existentes sobre a infecção por *L. (L.) amazonensis* são bastante escassos.

1.5 Leishmaniose: resposta inata e imune, interações e produtos

Aceita-se amplamente que resistência de camundongos à infecção por *L. (L.) major* depende da produção inicial de IL-12 que induz a produção de IFN- γ e a geração de células T CD4⁺ do tipo Th1, (Heinzel, Rerko *et al.*, 1993; Heinzel, Schoenhaut *et al.*, 1993; Sypek, Chung *et al.*, 1993).

A IL-12 é uma citocina heterodimérica composta por duas subunidades p35 e p40 que se associam para formar a molécula p70 que é a forma biológica ativa da IL-12; é produzida principalmente por células dendríticas, monócitos, macrófagos e neutrófilos. O receptor da IL-12 é constituído por duas cadeias: a cadeia β 1 (IL-12R β 1) e a cadeia β 2 (IL12R β 2), que ativa a via Janus quinase de transdução de sinal (JAK-STAT - sinal transdutor e ativador de transcrição). A cadeia p40 da IL-12 é geralmente produzida cerca de 10 a 100 vezes mais que a cadeia p70. Por esse motivo, é mais fácil detectar essa subunidade no sobrenadante das culturas das células (Trinchieri e Gerosa, 1996; Trinchieri, 1998).

Camundongos de linhagens originalmente resistentes mas, geneticamente deficientes em IL-12 (p40) ou (p35) não conseguem controlar a lesão desencadeada por *L. (L.) major*. Aqueles geneticamente deficientes de IL-12 (p40) produzem quantidades muito menores de IFN- γ , do que os camundongos com os genes intactos (tipo selvagem) (Magram, Sfarra *et al.*, 1996; Mattner, Magram *et al.*, 1996).

Trabalhos mais recentes têm indicado que a IL-12 não é importante apenas no início da infecção por *Leishmania*, mas a manutenção da produção de IL-12 em animais infectados é decisiva para o controle da doença (Stobie, Gurunathan *et al.*, 2000; Park, Hondowicz *et al.*, 2002). Outras citocinas podem atuar sinergicamente com a IL-12 na geração da resposta Th1. Dentre elas a IL-18, a IL-1, a IL-15 e a IL-2 podem ter efeitos decisivos já que, na presença destas citocinas, baixos níveis de IL-12 são capazes de induzir uma produção muito maior de IFN- γ que na ausência delas (Carson, Ross *et al.*, 1995; Seder, 1996; Robinson, Shibuya *et al.*, 1997). Desse modo, na leishmaniose murina, a IL-12 é essencial ao desenvolvimento da resposta imune para controlar a infecção, principalmente se associada a outras citocinas que agem sinergicamente.

Recentemente foi descoberto que a subunidade p40 da IL-12 se associa também a uma outra molécula, a p19, formando uma nova citocina heterodimérica chamada IL-23 (Oppmann, Lesley *et al.*, 2000). A IL-23 se liga ao receptor formado pela IL-12R β 1 e a por uma nova cadeia denominada receptor da IL-23 (IL-23R) (Parham, Chirica *et al.*, 2002). É menos eficiente que a IL-12 na indução da produção de IFN- γ e na diferenciação de células Th1, mas é particularmente eficiente na indução da proliferação de células T murinas de memória (50). Na infecção por *L. (L.) major*, a IL-23 não é suficiente para a indução precoce de células Th1, pois mesmo o camundongo geneticamente deficiente da subunidade p35 (p35 $^{-/-}$), portanto com IL-23 intacta, ainda se mantém suscetível à infecção (Mattner, Magram *et al.*, 1996; Park, Hondowicz *et al.*, 2002).

A suscetibilidade à infecção por *L. (L.) major* em camundongos BALB/c, entretanto, é resultante da incapacidade desses animais em responder a atividade da IL-12 com uma adequada produção de IFN- γ (Guler, Gorham *et al.*, 1996;

Nishikomori, Gurunathan *et al.*, 2001). A dificuldade desses animais em gerar linfócitos Th1 induzidos pela IL-12, não está relacionada à incapacidade dos linfócitos T virgens em responder a IL-12 mas, na inibição da geração de células Th1 na presença de antígenos do parasito (Guler, Gorham *et al.*, 1996; Launois, Maillard *et al.*, 1997). Foi visto que a inibição da diferenciação dos linfócitos T em células Th1 era causada pela presença de grande quantidade de IL-4 nos linfonodos de BALB/c infectados nas primeiras horas após a inoculação de *L. (L.) major*. A produção inicial dessa citocina resultava da ativação de uma população de células T, cujo receptor (TCR) era constituído pela cadeia β de porção variável tipo 4 e da cadeia α de porção variável do tipo 8 (células $V\beta 4 V\alpha 8 TCD4^+$) em resposta a uma proteína imunodominante de *Leishmania* homóloga do receptor da proteína quinase-C, denominada LACK (54). A produção precoce de IL-4 por linfócitos T $CD4^+$ foi considerada como o fator inibidor da geração da resposta Th1, pois reduzia a expressão da cadeia IL-12R $\beta 2$, tornando o linfócito T $CD4^+$ parasito-específico pouco responsivo a IL-12 (Himmelrich, Parra-Lopez *et al.*, 1998). Outros estudos mostraram que a expressão da cadeia IL-12R $\beta 2$ nos linfócitos T $CD4^+$ não é o fator determinante na diferenciação dessas células para Th1 e que os linfócitos T $CD4^+$ uma vez diferenciados em células Th2, não poderiam se converter em células Th1, via sinalização por IL-12. Mostraram também que, a IL-12 não era capaz de inibir a diferenciação dos linfócitos T $CD4^+$ em células Th2 induzidas pela IL-4, quando essa última citocina estava presente em grande quantidade durante o período inicial de estimulação (priming), mesmo na presença de IL-12 (Heath, Showe *et al.*, 2000; Nishikomori, Ehrhardt *et al.*, 2000).

Nishikomori e colaboradores em 2001 (Nishikomori, Gurunathan *et al.*, 2001) mostraram que camundongos BALB/c expressando IL-12R $\beta 2$ transgênico

apresentavam uma forte resposta do tipo Th2 à infecção por *L. (L.) major*, idêntico ao camundongo BALB/c selvagem. Demonstraram que o efeito da IL-4 na indução da resposta Th2 não dependia da capacidade desta citocina de inibir a expressão da cadeia IL-12R β 2. A resposta Th2 / IL-4 dominante tanto nos animais transgênicos como nos tipo selvagem estava relacionada com a produção contínua de IL-4 e não com a expressão da cadeia IL-12R β 2.

Várias são as tentativas de explicar as ações efetoras relativas de IL-4 e IL-12 que levam à estimulação preferencial de Th1 ou Th2. Estudos utilizando camundongos BALB/c inoculados com *L. (L.) major* mostraram que a IL-4 presente durante a ativação inicial das células dendríticas fazia com que essas células produzissem IL-12 e promovessem o desenvolvimento de linfócitos Th1. Já quando a IL-4 estava presente mais tardiamente, durante o período de estimulação (priming) dos linfócitos T, essa citocina induzia a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ em células Th2 (Biedermann, Zimmermann *et al.*, 2001). Uma vez que as respostas imunes desenvolvem-se pela ativação sucessiva de células dendríticas e posteriormente de linfócitos T, os efeitos contrastantes da IL-4 no desenvolvimento dessas células levam à respostas imunes que podem se manifestar por fenótipos funcionais opostos.

É consenso geral, no entanto, que a IL-12 produzida por células apresentadoras de antígeno (APC), entre elas, monócitos (D'andrea, Rengaraju *et al.*, 1992) e células dendríticas (Macatonia, Hosken *et al.*, 1995), possivelmente com a colaboração de citocinas como IL-1 α , IL-18, IL-23 e IL-27, coordena a diferenciação e proliferação de linfócitos T CD4⁺ Th1, responsáveis pela resposta protetora à infecção por *L. (L.) major* (Sacks e Noben-Trauth, 2002; Alexander e Bryson, 2005).

1.6 Leishmaniose: molécula co-estimulatória CD28

A ativação dos linfócitos T requer dois sinais distintos: o primeiro pela ligação do complexo TCR/CD3 no contexto de CD4 ou CD8 e um segundo sinal pela ligação de moléculas denominadas coestimulatórias.

A molécula coestimulatória CD28, denominada primeiramente de Tp44, é uma glicoproteína da superfamília das imunoglobulinas e está presente na membrana da maioria das células T maduras (Aruffo e Seed, 1987; Linsley e Ledbetter, 1993). A interação com seus ligantes nas APCs [B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86)], desencadeia uma série de sinais intracelulares que culminam na diminuição do limiar de ativação do linfócito T, além da transcrição de genes responsáveis pela síntese de citocinas, tais como a IL-2 e enzimas anti-apoptóticas (Bcl-xl) favorecendo a sobrevivência e expansão da população ativada. (Viola e Lanzavecchia, 1996; Sharpe e Freeman, 2002). Por outro lado, a ausência de co-estimulação resulta na anergia de células T que é um dos mecanismos de geração de tolerância periférica (Green, Noel *et al.*, 1995; Sharpe, 1995; Macian, Im *et al.*, 2004).

A interação entre CD28/B7 na regulação da atividade dos linfócitos T estudada em camundongos geneticamente deficientes (knock-out-KO) de CD28 (CD28^{-/-}) (Green, Noel *et al.*, 1995), mostrou deficiência quanto a resposta proliferativa induzida por ativadores policlonais como aloantígenos, concanavalina A e anticorpos anti-CD3 (Shahinian, Pfeffer *et al.*, 1993). Não obstante, há vários relatos mostrando que os linfócitos T podem ser ativados independentemente da interação entre CD28/B7 (Johnson e Jenkins, 1994; Behar, Porcelli *et al.*, 1995; Lenschow, Ho *et al.*, 1995; Keane-Myers, Gause *et al.*, 1997).

Estudos utilizando linfócitos T murinos com TCR transgênico sugeriram que a capacidade das células de memória de responder ao antígeno é menos dependente da coestimulação CD28/B7 que os linfócitos T virgens (Croft, Bradley *et al.*, 1994) e que o papel da sinalização mediada por B7 é prover coestimulação para a produção de IL-2, em lugar de IFN- γ (Schweitzer e Sharpe, 1998)

Gause e colaboradores estudaram os mecanismos de diferenciação de linfócitos T em células T efetoras do tipo Th2 e o envolvimento das moléculas CD28 na diferenciação das células Th2 produtoras de IL-4. Eles mostraram que a diferenciação dos linfócitos T *in vivo* em células T produtoras de citocinas durante uma resposta do tipo Th2, podia ou não envolver as moléculas CD28, dependendo do antígeno utilizado (Gause, Chen *et al.*, 1997).

O efeito do bloqueio das moléculas B7 no desenvolvimento de Th1 ou Th2 durante a infecção por *L. major* foi, inicialmente, examinado utilizando-se CTLA-4 Ig. Esta é uma proteína de fusão da CTLA-4 que pode se ligar tanto a B7-1 como a B7-2 e impede a sua ligação com CD28. O tratamento de camundongos resistentes (C57BL/6) com CTLA-4Ig não alterou o desenvolvimento da infecção. Por outro lado, o tratamento de camundongos suscetíveis (BALB/c) com uma única dose de CTLA-4Ig, no momento da infecção, promoveu resistência nestes animais. A resistência foi associada ao decréscimo dos níveis de mRNA para IL-4 em linfonodos drenantes da infecção. Estes resultados sugeriram que B7, presumivelmente através da interação com CD28, era requerida para o desenvolvimento da resposta Th2, mas não Th1, durante a infecção por *L. major* (Corry, Reiner *et al.*, 1994). Brown e colaboradores (Brown, Titus *et al.*, 1996) mostraram que o bloqueio de B7-2, mas não de B7-1, afetava o curso da infecção por *L. major* em camundongos suscetíveis (BALB/c); ocorria redução tanto da carga parasitária e como da produção de citocinas Th2 na

quarta semana de infecção. Em camundongos resistentes (C57BL/6) o tratamento com anticorpos monoclonais anti-B7-2, diminuiu a carga parasitária mas não alterou a produção de citocinas. Em 1999, Elloso e Scott (Elloso e Scott, 1999) utilizando camundongos suscetíveis (BALB/c) normais ou deficientes em CD28, tratados ou não com CTLA-4Ig, concluíram que a co-estimulação mediada por B7 é requerida para o desenvolvimento da resposta imune inicial à infecção por *L. major* tanto em camundongos resistentes como suscetíveis. Estes mesmos autores observaram ainda que a co-estimulação envolvendo B7-1 e B7-2 pode resultar na produção de citocinas tanto Th1 como Th2, discordando da indução preferencial de um só tipo de resposta. Brown e colaboradores mostraram que camundongos BALB/c e C57Bl/6, normais ou deficientes em CD28, não apresentavam alterações no curso da infecção por *L. major*, nem diferenças significativas na produção de citocinas, assim sugeriram que a interação CD28-B7 não era essencial para o desenvolvimento das respostas Th1 e Th2 (Brown, Green *et al.*, 1996).

Compton e Farrell, em 2002, mostraram que a co-estimulação via CD28 combinada com variação do número de parasitos no inóculo determinada a resposta à infecção por *L. major* em camundongos suscetíveis BALB/c. Camundongos BALB/c deficientes em CD28 controlaram a infecção induzida com inóculo baixo enquanto camundongos BALB/c normais desenvolveram lesões progressivas. A resistência observada nos camundongos BALB/c deficientes em CD28 foi relacionada com a resposta do tipo Th1; altos níveis de mRNA para IFN- γ e baixos níveis de mRNA para IL-4 e IL-10; com redução da carga parasitária nos linfonodos drenantes da infecção (Compton e Farrell, 2002).

Chang e colaboradores, em 2000, utilizando camundongos deficientes em CD28, mostraram que a interação CD28/B7 era requerida para a produção de IL-2

assim como IL-12 e que estas duas citocinas juntas eram críticas na indução da subunidade $\beta 2$ do receptor para IL-12 (IL-12R) (Chang, Segal *et al.*, 2000). Elloso e Scott, 2001, discutem a participação das moléculas CD28 na indução preferencial da expressão dos receptores para IL-12 (IL-12 $\beta 1$ e IL-12 $\beta 2$). Analisando a expressão destes receptores em linfócitos T de camundongos CD28 KO, eles observaram que os linfócitos T CD4⁺ e não os linfócitos T CD8⁺ exibiam defeito na expressão do IL-12 $\beta 1$ o que está associado com a diminuição da ligação da IL-12, assim como a produção de IFN- γ dependente da IL-12 (Elloso e Scott, 2001).

Não consta na literatura nenhum estudo investigando a participação de moléculas CD28 na regulação das respostas imunes nas infecções por *L. (L.) amazonensis*.

Considerando que a suscetibilidade à infecção por *L. (L.) amazonensis* parece não estar relacionada à expansão e produção de IL-4 por Th2 como observado na infecção por *L. major* torna-se interessante verificar o efeito da eliminação de ativação via CD28 sobre a resistência e resposta de citocinas nesta infecção. Os resultados podem ajudar a esclarecer os mecanismos atuantes na resistência à infecção por esta espécie de *Leishmania*. Da mesma maneira, verificar o curso da infecção na ausência de IL-12 ou IFN- γ , pode esclarecer a influência destas citocinas na resistência e/ ou se a ausência pode ser compensada por outras citocinas ou mecanismos efetores.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO E ABORDAGEM EXPERIMENTAL GERAL

Verificar a participação da molécula CD28 e das citocinas IL-12 e IFN- γ na resistência à infecção por *Leishmania amazonensis*.

Como abordagem experimental foram avaliados a evolução da lesão no sítio de inoculação e o parasitismo em camundongos C57BL/6 CD28 KO, C57BL/6 IL-12 KO e C57BL/6 IFN- γ KO em comparação aos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem. A produção de citocinas por linfócitos obtidos do linfonodo poplíteo drenante da lesão foi também avaliada nos mesmos grupos de animais. Ainda, os mesmos parâmetros foram comparados em camundongos C57BL/6 CD28 KO e C57BL/6 do tipo selvagem infectados com formas promastigotas de fase estacionária de cultura ou com formas metacíclicas purificadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos das linhagens C57BL/6 resistentes; C57BL/6 IL-12 KO (Mattner, Magram *et al.*, 1996); C57BL/6 IFN- γ KO (Dalton, Pitts-Meek *et al.*, 1993); C57BL/6 CD28 KO (Shahinian, Pfeffer *et al.*, 1993), fêmeas e machos, com idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram obtidos e mantidos no Biotério de criação e experimentação do Departamento de Imunologia/ICB-IV/ USP. Todos os experimentos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em experimentação animal do ICB/USP.

3.2 Parasitos

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa Josefa (gentilmente cedida pela Dra. Elvira Saraiva do Instituto de Microbiologia da UFRJ), foram cultivadas a 25°C em meio Grace's Insect Cell Culture Medium (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (SFB) (v/v) (Gibco-BRL, Argentina), 100 U/ml penicilina e 100 μ g/ml estreptomicina (Grace's completo). Gentamicina (1 μ g/ml) – foi adicionada ao meio nos ensaios para quantificação do número de parasitos presentes nos tecidos extraídos de camundongos. Os parasitos foram periodicamente re-isolados de lesões de coxim plantar de camundongos BALB/c infectados de modo a manter a virulência do parasito.

3.3 Produção dos anticorpos monoclonais 3A1

O hibridoma produtor do anticorpo monoclonal 3A1 anti-promastigotas procíclicas de *L. (L.) amazonensis*, (gentilmente cedido pela Dra. Elvira Saraiva), foi cultivado em meio RPMI 1640, suplementado com 5% de SFB v/v, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Os sobrenadantes obtidos foram centrifugados a 600 g por 10 min a 4°C para a remoção dos debris celulares e estocados a -20°C com 0,01% de azida (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA) até serem purificados. A purificação foi feita por passagem em coluna de afinidade de proteína G (Protein G Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) acoplada em HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência, Amersham Pharmacia Biotech), o eluente contendo os anticorpos purificados foram dialisados (membrana Spectra/Por, Spectrum Laboratories Inc., USA) em PBS pH 7,2 durante 18 horas a 4°C sob agitação. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry (Lowry, Rosebrough *et al.*, 1951).

3.4 Obtenção de formas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis* de cultura

As formas promastigotas de fase estacionária de cultura foram lavadas em solução salina de pH 7,2 tamponada com fosfato de sódio 0,01M (PBS) por centrifugação 1200g/10min/10°C e incubadas em placas de 96 poços de fundo chato (Nunc) a 25°C por 20 min. com o anticorpo monoclonal 3A1 diluído em PBS na concentração de 50 ng/2X10⁷ células. Logo após a incubação, as formas procíclicas aglutinadas pelos anticorpos eram separadas das formas metacíclicas livres, por

centrifugação (150g/6min/10°C). As formas metacíclicas obtidas no sobrenadante eram, então, lavadas PBS para retirada dos anticorpos livres.

3.5 Infecção

Os camundongos foram infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura ou com promastigotas metacíclicas. A suspensão dos parasitos foi lavada por centrifugação a 3000 rpm/10min/10°C, três vezes em PBS e em cada camundongo foram injetados 30µl de uma suspensão contendo 10^6 ou 10^5 promastigotas obtidas de fase estacionária de cultura ou 10^3 promastigotas metacíclicas purificadas, em um dos coxins plantares posteriores. A evolução da infecção foi acompanhada semanalmente, medindo-se a espessura da pata com o auxílio de um paquímetro de precisão 0,01 mm (Manostat). Os resultados foram expressos pela média aritmética das diferenças de espessura entre as patas posteriores, inoculada e não inoculada \pm erro padrão (SE) de cada grupo.

3.6 Quantificação de parasitos nos linfonodos e patas

A avaliação do parasitismo dos camundongos ao final do experimento foi feita pela quantificação do número de parasitos encontrados na lesão (pata) e nos linfonodos poplíteos drenantes (LND) da pata que recebeu o inóculo dos parasitos. O método foi o de análise por diluição limitante (LDA) [modificado por Lima e colaboradores, 1998 (Lima, Bleyenber *et al.*, 1997)]. Diluições seriadas de suspensões celulares do linfonodo drenante da infecção ou de tecido obtido da pata

total (removida próxima a articulação entre a perna e a pata) foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato (Nunc), 200 µl/poço em meio Grace's completo, fechadas hermeticamente com parafilme e incubadas a 25°C em estufa BOD. A detecção do aparecimento de promastigotas móveis (poços positivos) foi feita através de avaliações periódicas em microscópio invertido. A leitura final foi feita no 14º dia, quando os poços positivos e negativos de cada diluição foram contados.

Os dados foram analisados usando-se o programa ELIDA desenvolvido por Taswell (Taswell, 1986). Com esse programa foi possível estimarmos a frequência de parasitos, calculada pela equação de Poisson através do método estatístico do χ^2 . A frequência de parasitos de uma amostra é considerada estatisticamente diferente da frequência de outra quando os intervalos de confiança (a 95%) não se superpõem.

3.7 Cultura de células obtidas de linfonodos drenantes

Em tempos determinados ao longo da infecção os linfonodos drenantes da pata inoculada (LNDP) eram removidos e processados e dissociados em homogeneizadores de vidro (Ten Broeck). A suspensão celular resultante era em seguida centrifugada (200g, 10 min., 10°C) e ressuspendida, após contagem, para a concentração de 10^7 células/ml em meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado com 2% SFB, 0,05µM 2-mercaptoetanol, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina (Iscove's completo). A viabilidade das células era avaliada por exclusão do corante azul de Trypan. As células foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato (Falcon) (2×10^6 células em 200 µl/poço) ou em placas de 24 poços (10^7 células em

1ml/poço), na ausência ou presença do parasito vivo (PV) como estímulo secundário antigênico (10^6 /ml promastigotas obtidas de fase estacionária de cultura), a 37°C em estufa úmida a 5% de CO₂ durante 24, 48 e 72 horas.

3.8 Obtenção de macrófagos peritoneais

Camundongos foram injetados pela via intraperitoneal com 3ml de solução estéril de hidrolisado de amido a 2 % diluído em PBS. Três dias depois foram sacrificados e as células peritoneais foram recolhidas por lavagem do peritônio com 5 ml de PBS gelado injetado com seringa.

3.9 Cultura de macrófagos e infecção

As suspensões de células contendo macrófagos peritoneais foram lavadas 3 vezes por centrifugação (300g/5 min/10°C) e ressuspensas para a concentração de 1×10^6 células/ml em Iscove's completo e distribuídas em placa de 24 poços de fundo chato contendo lamínulas de vidro esterilizadas na chama. As células foram incubadas por 4 horas para aderência em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após este período, as células não aderidas foram retiradas por lavagem com PBS estéril e as placas incubadas por um período adicional de 24 horas em Iscove's completo. Em seguida, *L. (L.) amazonensis* na forma metacíclica, na proporção de 2:1 (em relação às células originalmente plaqueadas), foram adicionadas às culturas. A placa foi novamente incubada a 37°C por 5 horas. Em seguida, as placas foram lavadas para remoção dos parasitos que não foram internalizados e 1 ml de Iscove's completo foi adicionado aos poços (0 hora). Os sobrenadantes foram colhidos 24, 48, 72 e 96

horas para dosagem de óxido nítrico. As lamínulas retiradas às 0, 24, 48, 72 e 96 horas foram coradas pelo kit Instant-Prov da Newprov à base de hematoxilina e eosina para quantificação dos macrófagos infectados e da carga de parasitos intracelulares.

3.10 Contagem dos macrófagos e dos parasitos internalizados

A contagem dos macrófagos e dos parasitos no interior de vacúolos parasitóforos, foi realizada por microscopia óptica usando objetiva de 40 X. As imagens foram capturados com auxilio de uma câmara acoplada a um computador. Posteriormente a contagem de células foi feita manualmente em computador usando-se o programa ADOBE photoshop. Os resultados são apresentados como número e percentagem de macrófagos infectados. Para refletir a carga parasitária por célula infectada foi calculada a razão entre todos parasitos intracelulares e o número de macrófagos infectados em cada preparação.

3.11 Produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi indiretamente avaliada medindo-se a concentração de nitrito acumulado nos sobrenadantes de culturas, utilizando-se o reagente de Griess (Stuehr e Nathan, 1989). Este foi preparado com N-(1-Naftil) Etilenodiamino dihidrocloridato a 0.1% em água destilada adicionando-se, no momento do uso, igual volume de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico 2,5% preparado em água bidestilada. As placas foram lidas em espectrofotômetro com filtro de absorbância a 540 nm, após 10 minutos no escuro para desenvolvimento da reação. Os resultados

foram calculados pela comparação com a curva padrão realizada com nitrito de sódio diluído em RPMI, em concentrações variando de 100 a 1 μM . A sensibilidade de detecção mínima do teste foi de 1,563 μM .

3.12 Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de células

A detecção de citocinas foi feita utilizando a técnica de ELISA - sanduíche de captura, empregando anticorpos monoclonais de rato específicos para a detecção da citocina IL-4, IL-12, IFN- γ e IL-10 de camundongo. Todos os anticorpos e os padrões recombinantes foram gentilmente cedidos pela Dra. Ises de Almeida Abrahamsohn, exceto o IL-10 obtidos da Biosciences Pharmingen (Becton Dickinson Co). As placas flexíveis de 96 poços e de fundo chato (Costar 2595, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com o primeiro anticorpo diluído em solução Na_2HPO_4 0,1M pH 9,0. Os anticorpos e concentrações foram: anti-IL-4 (11B11, a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), anti-IL-12 p40 (C17.8, a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), IFN- γ (XMG1.2, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ou IL-10 (JES5-16E3 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A incubação foi feita por 18 horas a 4°C. Após esse período a placa foi lavada com PBS/ 0,05% Tween 20 e bloqueada com PBS/ 1% BSA por 2 horas, temperatura ambiente (TA). A seguir, a placa foi novamente lavada e foram adicionados o padrão recombinante (IL-4, IL-12, IFN- γ ou IL-10) diluídos em Iscove's + 2% SBF ou diluições das amostras (sobrenadantes de cultura de linfonodos drenantes). A placa foi incubada em câmara úmida a 4°C durante a noite. Após este período de incubação, a placa foi lavada com PBS e o segundo anticorpo anti-IL-4 biotinilado (BVD624G2, a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), anti-IL-12 p40 biotinilado (C15.6, a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), anti-IFN- γ biotinilado (AN18 a 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ou anti-IL-10 biotinilado (JES5-2A5 a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) diluídos em PBS 1% BSA foi adicionado. A placa foi, então, incubada por 2 hora, TA.

Em seguida, a placa foi lavada com PBS e o conjugado enzimático (estreptoavidina marcada com peroxidase, Southern Biotechnology Associates, Inc., AL. USA) foi adicionado e a placa deixada por 1 hor, TA. Após mais um ciclo de lavagem foi adicionada a solução contendo o substrato, H₂O₂ a 30% e o agente cromógeno ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, Southern Biotechnology Associates, Inc., AL. USA) dissolvidos em tampão citrato pH 4,0. A reação foi interrompida com a solução “stop” (50 ml dimetilformamida +20 g dodecil sulfato de sódio + 50 ml H₂O) e a leitura realizada em um leitor de ELISA (Versa Max microplate reader, Molecular Devices) a 405 nm. A sensibilidade mínima do teste foi de 0,31 ng /ml para IL-4, 0,125 para IL-12, 0,031 ng/ml ou 0,25 U/ml para IL-10 e 0,313 ng/ml para IFN- γ .

3.13 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo método estatístico de análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas, executado no programa INSTAT 2, os valores de $p < 0,05$ foram considerados para estabelecer diferenças como estatisticamente significativas.

4 RESULTADOS

4.1 Evolução da infecção após a inoculação em camundongos C57BL/6 WT, IL-12 KO, IFN- γ KO e CD28 KO com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura

A avaliação da participação das moléculas CD28 e das citocinas IL-12 e IFN- γ , na resistência à infecção por *L. (L.) amazonensis*, foi feita em camundongos geneticamente desprovidos destas moléculas, infectados com duas diferentes doses de promastigotas de fase estacionária de cultura (exceto para o grupo de camundongos IFN- γ KO, inoculados somente com 10^6 promastigotas). Os camundongos foram inoculados com 10^6 (Fig 1A) ou 10^5 (Fig 1B) parasitos, no coxim plantar posterior. O desenvolvimento das lesões foi acompanhado pela medição da lesão da pata (local do inóculo), em vários tempos após o inóculo.

Nossos resultados mostraram que os camundongos IL-12 KO e IFN- γ KO são muito mais suscetíveis do que camundongos do tipo selvagem (*Wild-type*, WT) à infecção com 10^6 (ou também com 10^5 , no caso de animais IL-12 KO) *L. (L.) amazonensis* de fase estacionária de cultura (Fig 1A e 1B). Estes resultados confirmam a importância da IL-12 e do IFN- γ no controle da infecção por *L. (L.) amazonensis* com alto inóculo de promastigotas de fase estacionária de cultura.

Os camundongos CD28 KO, se inoculados com 10^6 parasitos, não diferiram quanto à evolução da lesão dos camundongos WT inoculados com a mesma dose (Fig 1A). Entretanto, se inoculados com 10^5 parasitos, aqueles animais, a partir da nona semana de infecção, mantiveram a mesma espessura de pata enquanto os camundongos WT tiveram aumento progressivo até a 23ª semana de infecção (Fig. 1 B). Portanto, a infecção realizada com 10^5 promastigotas permitiu observar que

camundongos CD28 KO apresentaram melhor controle da lesão no sítio de inóculo em relação aos camundongos WT, sugerindo que a presença da molécula CD28 aumenta a suscetibilidade à infecção por *L. (L.) amazonensis*.

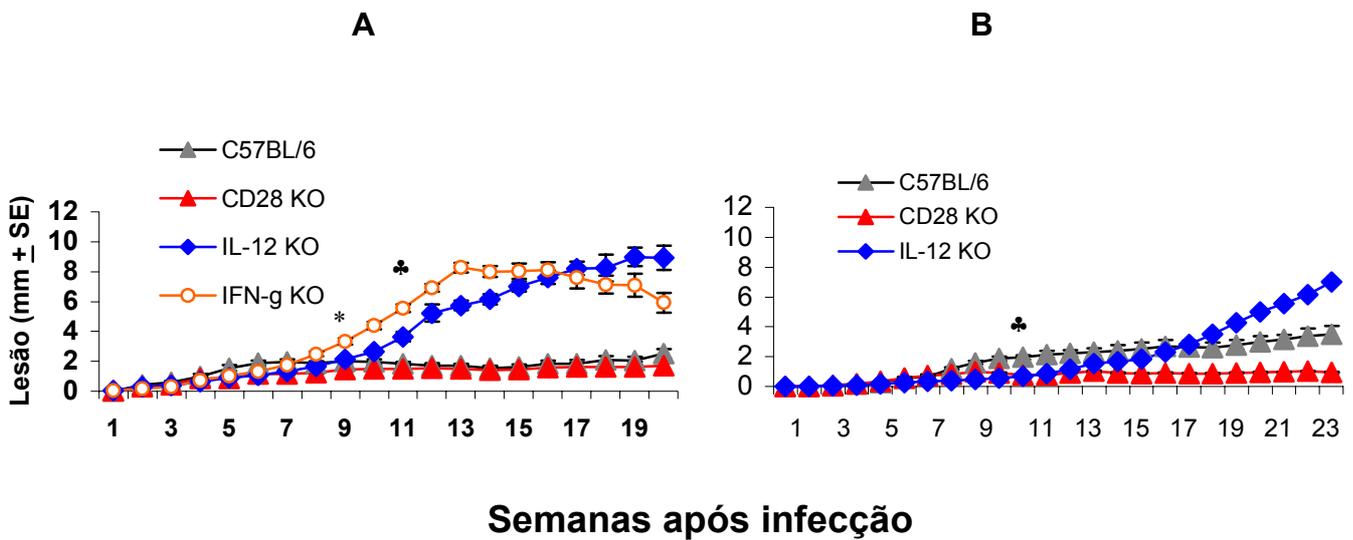


Figura 1: Infecção de camundongos C57BL/6 WT, CD28 KO, IL-12 KO e IFN- γ KO com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura: aumento de tamanho da pata após infecção. Os camundongos foram inoculados com 10^6 (A) ou 10^5 (B) parasitos no coxim plantar posterior. Os resultados foram expressos pela média aritmética \pm erro padrão (SE) das diferenças de espessura das patas infectadas e não infectadas (2-3 experimentos independentes). Grupos de 9-20 camundongos foram inoculados com 10^6 parasitos e grupos de 8-13 camundongos foram inoculados com 10^5 parasitos.

* diferenças significativas C57BL/6 WT vs IFN- γ à partir 8^a semana

♣ diferenças significativas C57BL/6 WT vs IL-12 KO e CD28 KO à partir 10^a semana

4.2 Quantificação do número de parasitos em linfonodos drenantes do sítio de infecção de *L. (L.) amazonensis* em camundongos C57BL/6WT, IL-12 KO, IFN- γ KO, CD28 KO inoculados com formas promastigotas obtidas de fase estacionária de cultura

Como espessura da pata pode não se correlacionar diretamente com a carga parasitária local foi feita a quantificação do número de parasitos nos linfonodos drenantes da pata inoculada (LND) nos diversos grupos de animais, inoculados como no item 4.1.

Os resultados apresentados na figura 2 mostram, não haver diferença significativa no número de parasitos presentes nos LN poplíteos dos animais inoculados com 10^6 ou 10^5 parasitos; nos LN inguinais a diferença foi vista apenas nos animais CD 28 KO.

A carga parasitária nos LN poplíteos e inguinais de animais IL-12 KO e IFN- γ KO é muito maior do que a verificada nos LND dos animais WT, correlacionando-se com as lesões de maior tamanho desenvolvidas no sítio de inoculação.

A comparação da carga de parasitos entre os camundongos CD28 KO e WT permitiu observar, tanto para o inóculo de 10^6 como 10^5 significativamente menos parasitos, nos LN poplíteos dos camundongos CD28 KO do que em animais WT. Cabe reforçar que esta diferença apareceu apesar de não ter havido diferença significativa na espessura da pata entre estes grupos após o inóculo de 10^6 parasitos, como mostrado na Fig. 1A. Nos linfonodos inguinais, as diferenças não foram significativas entre os dois grupos para ambas as doses de inóculo. A disseminação para os LN inguinais ocorreu nos dois grupos de animais CD28 KO e WT, para as duas doses de inóculo e, mesmo no tempo de análise longo de 35

semanas para o inóculo de 10^5 , não houve diferença na carga de parasitos nos LN inguinais. Animais IL-12 KO e IFN- γ KO apresentaram muito mais parasitos do que animais WT, tanto nas quantificações de LN poplíteos como nas realizadas nos LN inguinais, para as duas doses de inóculo.

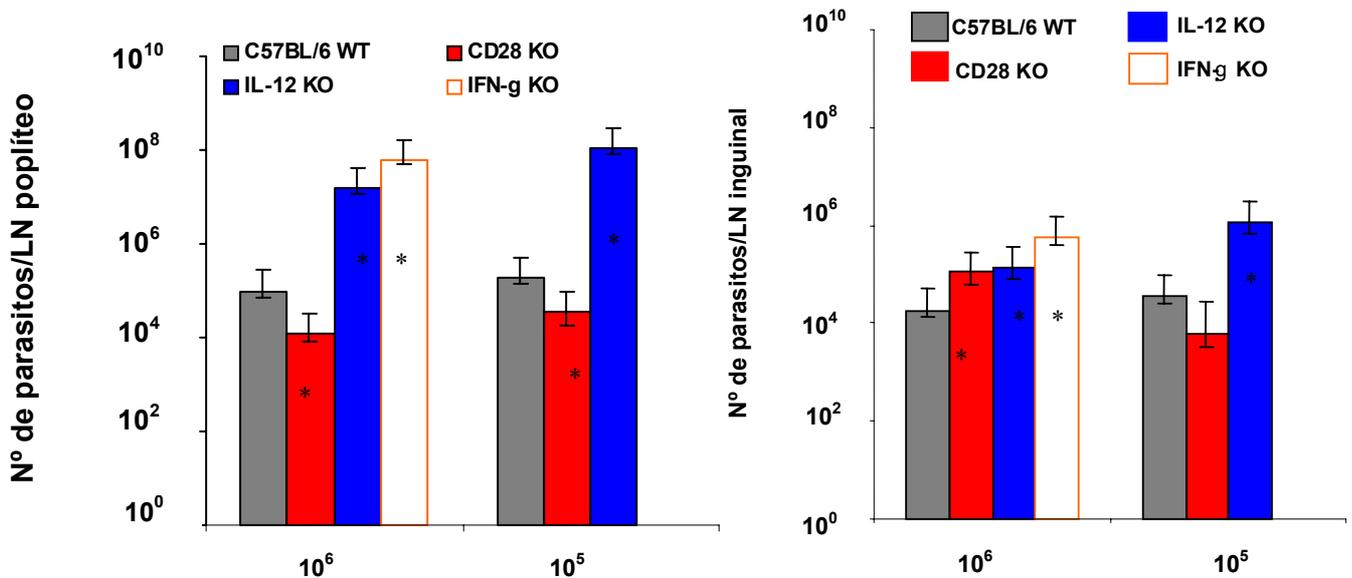


Figura 2: Determinação do número de *L. (L.) amazonensis* nos linfonodos poplíteo e inguinal drenantes da lesão em camundongos C57BL/6 WT, IL-12 KO, IFN- γ e CD28 KO inoculados com formas promastigotas obtidas de fase estacionária de cultura. O número de parasitos no linfonodo poplíteo foi determinado técnica de diluição limitante, 20 semanas após a infecção para o inóculo de 10^6 e 35 semanas para o inóculo de 10^5 . Os resultados estão expressos pela média e pelo intervalo de confiança a 95%, de 2 a 3 camundongos por grupo. A freqüência de parasitas de um grupo é considerada estatisticamente diferente da freqüência de parasitas do outro grupo quando os intervalos de confiança não se sobrepõem.

* diferença significativa em relação ao grupo controle WT.

4.3 Quantificação dos parasitos nas patas de camundongos C57BL/6WT, IL-12 KO e CD28 KO inoculadas com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura.

No intuito de verificarmos, se poderíamos relacionar diretamente o tamanho da lesão com o número de parasitos encontrados na própria pata, quantificamos os parasitos das patas dos camundongos dos diferentes grupos inoculados com 10^5 parasitos na 35^a semana após a infecção.

Os resultados, expressos na figura 3, mostram que o tamanho das patas dos diferentes grupos experimentais, apresentou correlação direta com a quantidade de parasitos presentes nas mesmas. Nossos resultados mostram diferenças significativas no número de parasitos no sítio da lesão entre os três grupos de animais testados. Camundongos CD28 KO têm menos e camundongos IL-12 KO têm mais parasitos quando comparados aos camundongos WT.

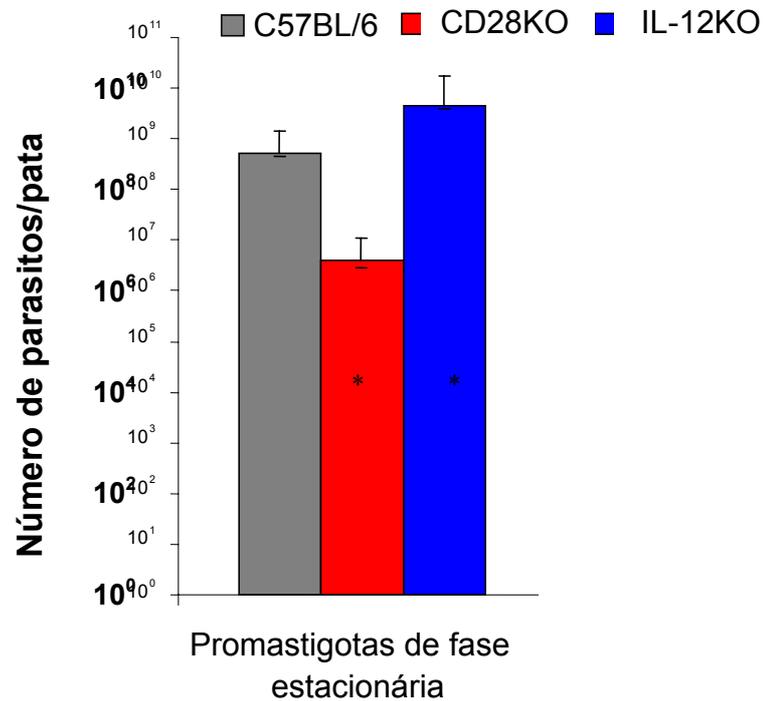


Figura 3: Quantificação dos parasitos nas patas de camundongos C57BL/6 WT, IL-12 KO e de CD28 KO inoculadas com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura. O número de parasitos foi determinado pela técnica de diluição limitante na 35^a semana após a infecção para o inóculo de 10^5 . Os resultados foram expressos pela média e pelo intervalo de confiança 95% de 2 a 3 camundongos por grupo. A freqüência de parasitas de um grupo é considerada estatisticamente diferente da freqüência de parasitas do outro grupo quando os intervalos de confiança não se sobrepõem.

* diferença significativa em comparação ao grupo C57BL/6 WT.

4.4 Produção de citocinas IL-4, IL-12, IFN- γ e IL-10 por células obtidas de linfonodos drenantes da pata de camundongos C57BL/6 WT, CD28 KO e IL-12 KO infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura.

Avaliamos a produção de citocinas por células de linfonodos drenantes da pata dos camundongos infectados com 10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura na 20^a semana após infecção.

Os resultados, expressos na tabela 1, mostram não haver produção detectável de IL-4 nos sobrenadantes de cultura de células de LNDR oriundos das quatro linhagens de camundongos analisadas. A produção de IL-12 foi similar entre os sobrenadantes de células obtidas de linfonodos poplíteos das linhagens de camundongos WT, IFN- γ KO e CD28 KO. Quanto à produção de IFN- γ , observamos que não houve diferença na concentração de IFN- γ entre os sobrenadantes das culturas de linfonodos poplíteos de camundongos WT e CD28 KO.

Observamos uma concentração significativamente menor de IL-10 nos sobrenadantes das culturas reestimuladas *in vitro* de células de LNDR de camundongos CD28 KO, em comparação à cultura de células de LNDR de camundongos WT.

Tabela 1: Produção de citocinas por células dos linfonodos poplíteos drenantes de camundongos C57BL/6 WT, CD28 KO, IFN- γ KO e IL-12 KO infectados com 10^6 formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultivo.

Estímulo com parasitos ‡	IL-4 (ng/ml)		IL-12 p40(ng/ml)		IFN- γ (ng/ml)		IL-10 (U/ml)	
	-	+	-	+	-	+	-	+
C57BL/6 WT	<0,3	<0,3	0,8 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3	3,4 \pm 0,5	9,1 \pm 4,0	<0,25	1,0 \pm 0,3
CD28 KO	<0,3	<0,3	1,1 \pm 0,4	1,4 \pm 0,6	4,1 \pm 1,0	15,4 \pm 7,2	<0,25	0,3 \pm 0,1
IL-12 KO	<0,3	<0,3	NR	NR	NR	NR	0,3 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1
IFN-γ KO	<0,3	<0,3	3,5 \pm 0,8	1,6 \pm 0,4	NR	NR	0,4 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1

‡ Suspensões celulares, na concentração de 10^7 /ml, obtidas dos linfonodos poplíteos drenantes dos animais na 20ª semana após-infecção foram cultivadas com 10^6 promastigotas vivos de fase estacionária, como estímulo antigênico secundário. Os sobrenadantes foram colhidos em tempos diferentes após incubação; para a dosagem de IL-4 (24 horas), IL-12 p40 (48 horas), IFN- γ e IL-10 (72 horas). Os resultados representam a média aritmética \pm SD (desvio padrão) de 5-7 animais de 3-4 experimentos independentes. NR : não realizado

* diferença significativa na produção de IL-10 entre C57BL/6 WT e CD28 KO

4.5 Evolução da infecção por *L. (L.) amazonensis* após inoculação de formas metacíclicas ou de formas promastigotas de fase estacionária de cultura em camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO.

Nós observamos nos experimentos anteriores que os camundongos CD28 KO apresentavam lesões muito pequenas quando inoculados com 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura, no coxim plantar posterior. Resolvemos verificar se formas metacíclicas do parasito (formas infectantes exclusivamente) poderiam determinar lesões mais severas. Utilizamos para isso a dose de 10^3 formas metacíclicas e comparamos com a dose menor de 10^5 promastigotas de fase estacionária. Todos os camundongos foram inoculados no coxim plantar posterior. O desenvolvimento das lesões foi acompanhado pela medição da lesão da pata (local do inóculo), em vários tempos após o inóculo. Verificamos que a lesão no sítio de inóculo evoluiu de maneira semelhante nos animais WT inoculados com 10^3 metacíclicas (Fig. 4A) ou com 10^5 promastigotas de fase estacionária (Fig.4B) e que em ambas as situações experimentais os camundongos CD28 KO desenvolviam lesões menores e não progressivas em comparação aos respectivos controles WT. Este experimento confirmou os experimentos anteriores e mostra que a falta da expressão da molécula CD28 resulta em melhor controle da lesão induzida pela infecção por *L. (L.) amazonensis*, seja esta causada exclusivamente por formas metacíclicas infectantes ou pela população mista encontrada na fase estacionária de cultivo, composta de formas procíclicas não infectantes e de formas metacíclicas infectantes.

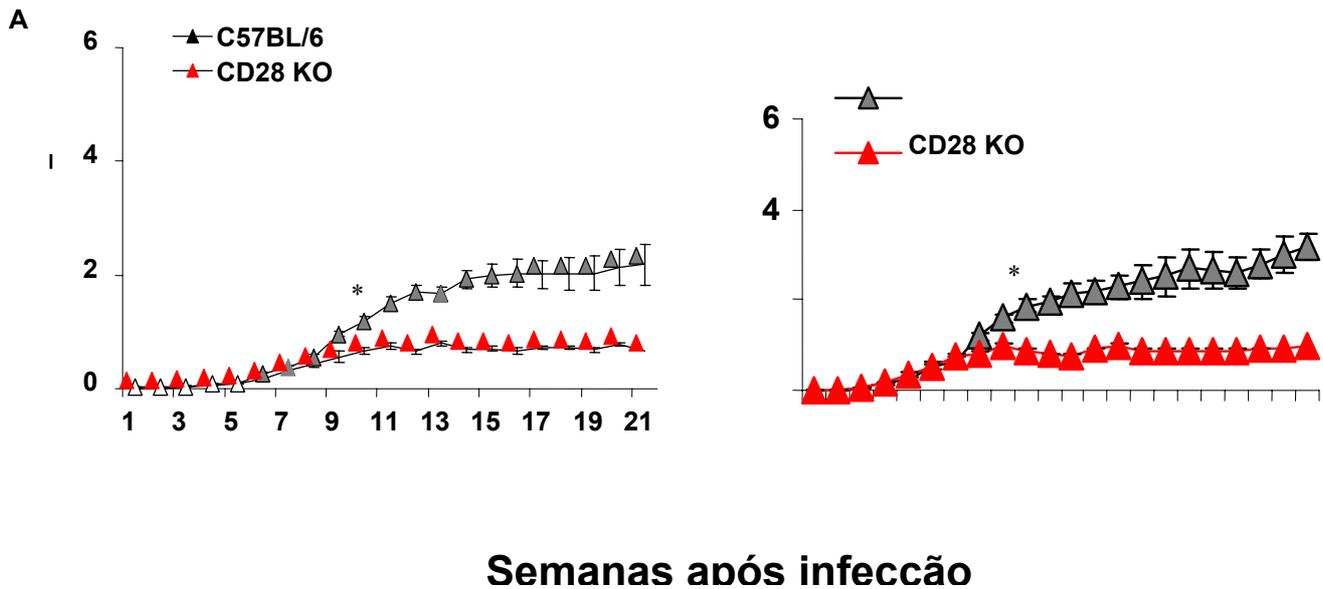


FIGURA 4: Infecção de camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO inoculados com promastigotas metacíclicas ou promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis*: aumento de tamanho da pata após infecção. Os camundongos foram inoculados com 10³ promastigotas metacíclicas (A) ou 10⁵ promastigotas de fase estacionária de cultura no coxim plantar posterior. Os resultados foram expressos pela média aritmética \pm erro padrão (SE – 10 camundongos/grupo) das diferenças de espessura entre a pata infectada e não infectada (2 experimentos independentes).

* C57BL/6 WT vs. CD28 KO: diferenças significativas à partir da 10^a semana.

4.6 Quantificação dos parasitos em linfonodos drenantes de camundongos CD28 KO e C57Bl/6 WT infectados com promastigotas metacíclicas ou promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis*

Nossos resultados anteriores mostraram que o número de parasitos presentes nos linfonodos poplíteos de camundongos CD28 KO infectados com 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura, era menor do que em camundongos WT correlacionando-se com a o tamanho menor das lesões desenvolvidas pelos CD28 KO (Fig 1 e 2). A quantificação dos parasitos nos linfonodos poplíteos foi feita também nos grupos de camundongos infectados com 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura ou com 10^3 promastigotas metacíclicas purificadas.

Os resultados, apresentados na figura 5, mostram não haver diferença significativa no número de parasitos encontrados nos linfonodos poplíteos de camundongos CD28 KO e WT na 21^a semana após a infecção com 10^3 promastigotas metacíclicas. Entretanto os resultados da Fig. 4 mostram que, neste tempo de infecção, o tamanho da pata inoculada é significativamente menor nos camundongos CD28 KO. Portanto, para este tempo mais precoce de infecção não houve correlação entre tamanho de lesão e o parasitismo no principal linfonodo drenante.

Os camundongos CD28 KO que foram inoculados com 10^5 formas promastigotas de fase estacionária de cultura e que foram sacrificados na 35^a semana para comparação do parasitismo, apresentaram número significativamente menor de parasitos no LN poplíteo do que os camundongos do grupo controle WT.

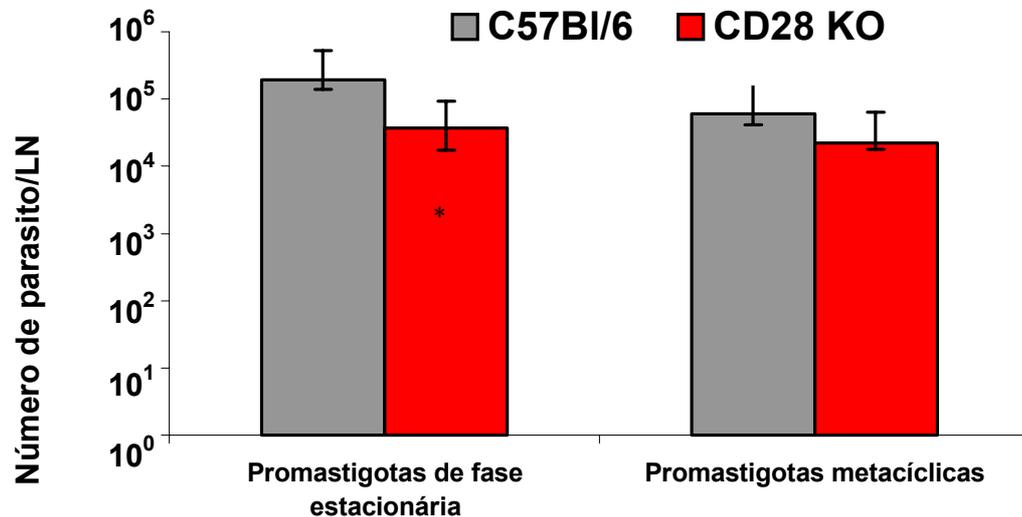


Figura 5: Quantificação do número de parasitos nos linfonodos poplíteos drenantes de camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO infectados com 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura ou 10^3 promastigotas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis*. O número de parasitos foi determinado por LDA na 21^a semana após infecção nos camundongos inoculados com 10^3 promastigotas metacíclicas e na 35^a semana após infecção nos camundongos inoculados com 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura. Os resultados foram expressos pela média e pelo intervalo de confiança 95% de 3 camundongos por grupo. A freqüência de parasitas de um grupo é considerada estatisticamente diferente da freqüência do outro grupo quando os intervalos não se sobrepõem.

* C57BL/6 WT vs CD28 KO

4.7 Quantificação dos parasitos no sítio de inoculação de camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO infectados com promastigotas metacíclicas ou promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis*

A análise anterior da quantificação de parasitos feita no LN poplíteo drenante, não mostrou na 21^a semana após infecção, correlação entre o pequeno tamanho da lesão desenvolvida por CD28 KO inoculados com 10^3 promastigotas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis* e o número de parasitos encontrados no linfonodo drenante, em comparação com os valores obtidos para animais WT inoculados e analisados de maneira similar.

Assim, resolvemos repetir as quantificações nestes grupos de animais infectados e ampliar a análise, quantificando o número de parasitos também no sítio da infecção. Para tanto, inoculamos, no coxim plantar dos camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO, 10^3 promastigotas metacíclicas ou 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis*. A quantificação dos parasitos foi realizada no sítio do inóculo (pata) após 21^a semana de infecção (10^3 promastigotas metacíclicas) ou na 35^a semana de infecção (10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura).

Os resultados mostrados na Fig. 6 mostram que o parasitismo por *L. (L.) amazonensis* no sítio do inóculo é significativamente menor em camundongos CD28 KO tanto para o grupo inoculado com 10^3 promastigotas metacíclicas (21^a semana de infecção) como para o grupo inoculado com 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura (35^a semana de infecção). Portanto, o parasitismo medido no sítio de inóculo refletiu as diferenças observadas no tamanho da lesão entre os dois grupos. Estes dados confirmaram que os camundongos CD28 KO são mais

resistentes à infecção quando comparados ao grupo WT, independentemente do tipo de inóculo.

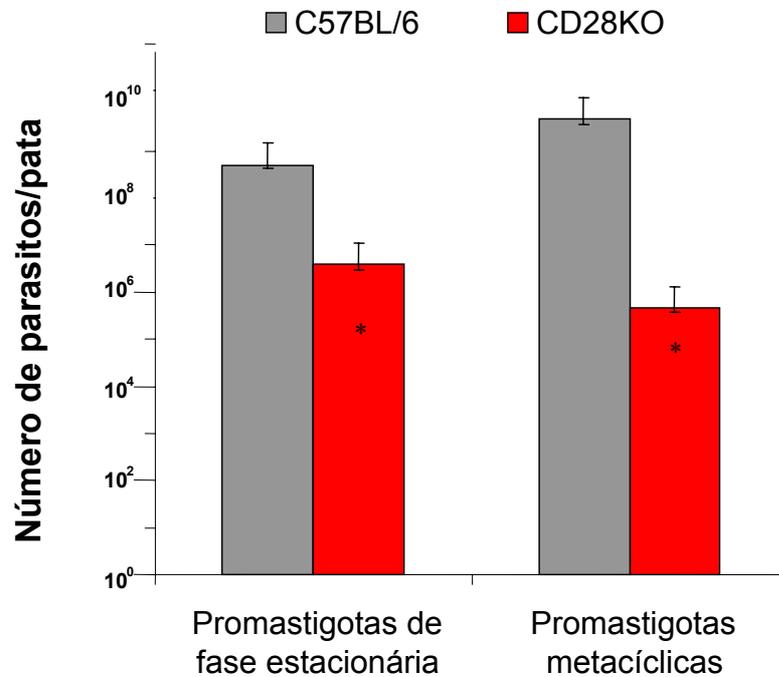


Figura 6: Quantificação do número de parasitos de *L. (L.) amazonensis* na pata de camundongos CD28 KO e C57BL/6 WT infectados com 10⁵ promastigotas de fase estacionária de cultura ou 10³ formas metacíclicas. O número de parasitos foi determinado por LDA na 35^a semana após a infecção para o inóculo de 10⁵ de formas promastigotas de fase estacionária e na 21^a semana para o inóculo de 10³ formas metacíclicas. Os resultados foram expressos pela média e pelo intervalo de confiança 95% de 2 a 3 camundongos por grupo. A freqüência de parasitas de um grupo é considerada estatisticamente diferente da freqüência do outro grupo quando os intervalos não se sobrepõem.

* C57BL/6 WT vs CD28 KO.

4.8 Dosagem de citocinas nos sobrenadantes de culturas de células de linfonodo drenantes poplíteos de camundongos CD28 KO e C57BL/6 WT infectados com 10^3 promastigotas metacíclicas ou 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis*.

A produção de citocinas nos sobrenadantes de cultura de células de LNDP dos camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO, inoculados com 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura ou 10^3 promastigotas metacíclicas na pata, foi dosada na 21^a semana após a infecção. Os dados expressos na tabela 2 mostram que IL-4 não foi detectada nos sobrenadantes de cultura de células de LNDP dos camundongos dos diferentes grupos. Não houve diferenças significativas entre CD28 KO e WT nos níveis de IL-12 e IFN- γ medidos nos sobrenadantes das culturas, obtidas de camundongos infectados com formas metacíclicas ou infectados com 10^5 formas promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis*.

Tabela 2: Produção de citocinas por células de linfonodos poplíteos drenantes de camundongos CD28 KO e C57BL/6 WT infectados com 10^3 metacíclicas ou 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis*.

Estímulo com parasitos ‡	IL-4 (ng/ml)		IL-12 p40 (ng/ml)		IFN- γ (ng/ml)	
	-	+	-	+	-	+
C57BI/6 WT meta	<0,3	<0,3	3,5 \pm 1,7	2,3 \pm 1,1	1,6 \pm 0,4	3,4 \pm 1,3
CD28 KO meta	<0,3	<0,3	2,0 \pm 1,1	3,4 \pm 1,6	1,6 \pm 0,3	5,3 \pm 2,5
C57BI/6 WT pro⁵	<0,3	<0,3	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	<0,3	1,4 \pm 0,2
CD28 KO pro⁵	<0,3	<0,3	0,5 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	<0,3	0,69 \pm 0,3

‡ Suspensões celulares, na concentração de 10^7 /ml, obtidas dos linfonodos poplíteos drenantes dos animais na 21ª semana após-infecção foram cultivadas com 10^6 promastigotas vivos de fase estacionária, como estímulo antigênico secundário. Os sobrenadantes foram colhidos em tempos diferentes após incubação; para a dosagem de IL-4 (24 horas), IL-12 p40 (48 horas), IFN- γ e IL-10 (72 horas). Os resultados representam a média aritmética \pm SD (desvio padrão) de 4 animais de 2 experimentos independentes.

4.9 Celularidade dos linfonodos drenantes poplíteos de camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO infectados com formas promastigotas de fase estacionária ou formas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis*.

A estimulação das células de linfonodos por antígenos leva a proliferação local, além de fixar células migrantes e como consequência aumento no número de células no órgão.

Para verificar se a infecção com as diferentes formas do parasito acarretaria diferenças na celularidade dos LNDP, realizamos, na 21^a semana pós-infecção, a contagem das células obtidas de linfonodos de camundongos CD28 KO e WT injetados com PBS (controles) e de linfonodos de camundongos CD28 KO e WT, tanto nos grupos inoculados com 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura como naqueles inoculados com 10^3 formas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis*.

Nossos resultados apresentados na figura 7 mostram que o número de células foi semelhante (média de 1×10^6 células /linfonodo) entre os LNDP de camundongos injetados com PBS (controles). A infecção por parasitos de *L. (L.) amazonensis* de fase estacionária de cultura, induz um aumento maior no número de células nos LNDP do que a infecção com promastigotas metacíclicas. Camundongos CD28 KO infectados com formas de fase estacionária de cultura tinham menor celularidade nos LNDP do que camundongos WT identicamente infectados. Essa diferença não foi observada entre os respectivos grupos infectados com promastigotas metacíclicas.

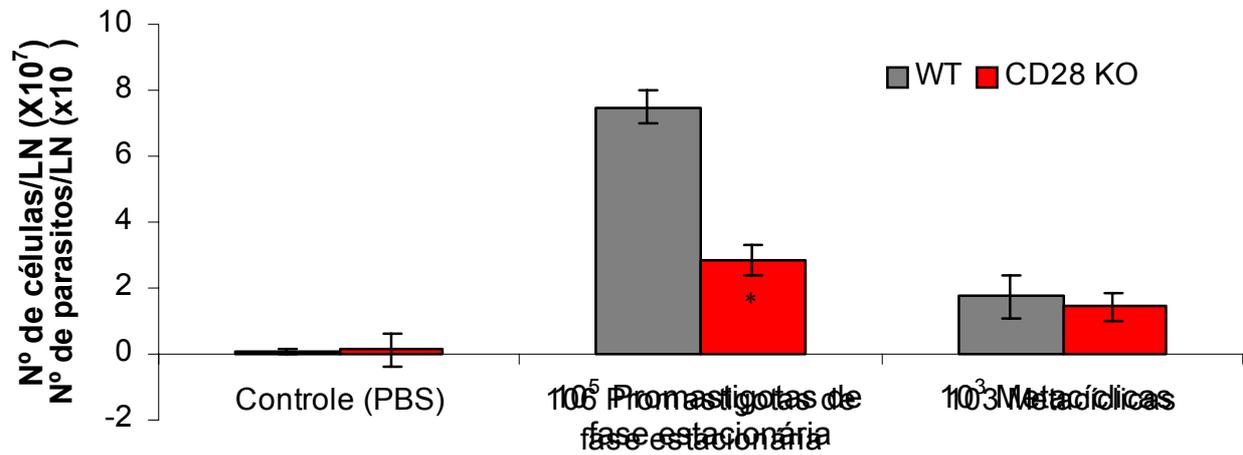


Figura 7: Quantificação do número de células em linfonodos poplíteos drenantes de camundongos CD28 KO e C57BL/6 WT injetados com PBS (controles) ou infectados com 10^5 promastigotas de fase estacionária ou 10^3 formas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis*. O número de células foi obtido por contagem em câmara de Neubauer na 21ª semana após infecção. Os resultados foram expressos pela média aritmética \pm SD de 2 a 3 camundongos por grupo * $p < 0,05$.

4.10 Influência da qualidade sanitária dos animais de experimentação na reprodutibilidade dos experimentos de infecção por *L. (L.) amazonensis* (formas metacíclicas ou promastigotas de fase estacionária de cultura) em camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO. Repetição de experimentos pós-tratamento das colônias de camundongos.

Durante o período em que as colônias do biotério de experimentação estiveram contaminadas com *Proteus sp*, foram realizados vários experimentos que resultaram em dados diferentes e extremamente variáveis entre os experimentos e entre os indivíduos de um mesmo grupo e dos resultados que até aqui mostramos e que tinham sido obtidos anteriormente à contaminação. Estes dados não são aqui mostrados, mas apenas citados de modo a enfatizar a influência da qualidade sanitária dos animais nos resultados experimentais.

Após o período de tratamento dos camundongos com antibiótico, conseguimos obter padrão e cinética semelhantes de desenvolvimento de lesão, tanto para os camundongos inoculados com 10^3 formas metacíclicas (figura 8A) como os inoculados com 10^5 formas promastigotas de fase estacionária de cultura (figura 8B). Também foram feitas dosagens de citocinas na 18ª semana de infecção nestes grupos de camundongos e que estão apresentadas na Tabela 3.

Na tabela 3 observa-se que infecção de camundongos WT com 10^3 promastigotas metacíclicas ou com 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura induz semelhante perfil de produção de IL-10, IL-12 ou IFN- γ , com significativo aumento na concentração de IFN- γ nas culturas de células de LNBP estimuladas *in vitro*. A produção de IL-12, IFN- γ e IL-10 não diferiu entre camundongos C57BL/6 CD28 KO e C57BL/6 infectados.

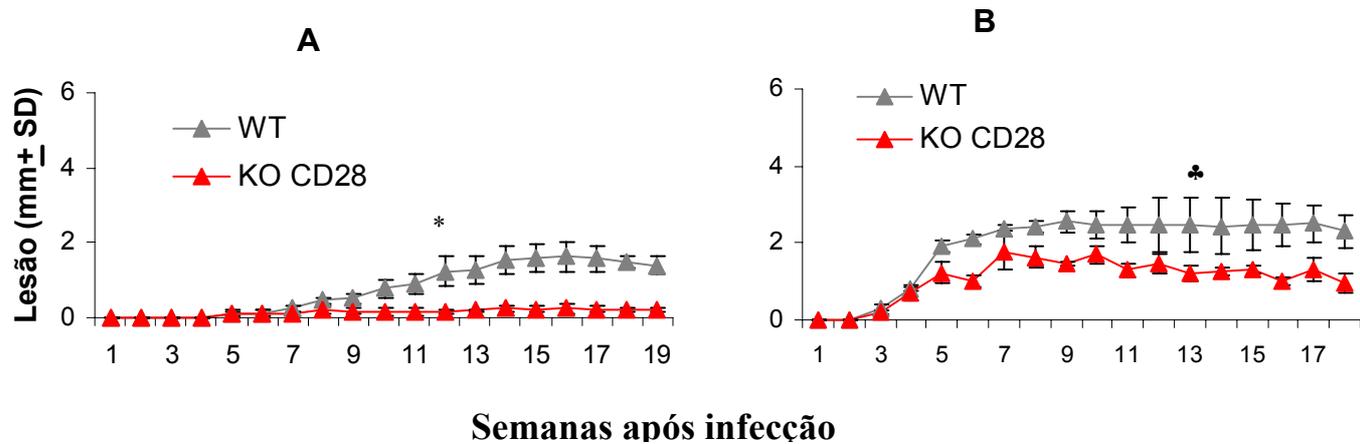


Figura 8: Infecção de camundongos C57Bl/6 WT e CD28 KO inoculados com promastigotas metacíclicas ou promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis*: aumento de tamanho da pata após infecção. Repetição de experimentos pós-tratamento das colônias de camundongos. Os camundongos foram inoculados com 10^3 promastigotas metacíclicas (A) ou 10^5 (B) promastigotas de fase estacionária de cultura, no coxim plantar posterior. Os resultados foram expressos pela média aritmética \pm desvio padrão (SD - 5 camundongos/grupo) das diferenças de espessura das patas infectadas e não infectadas (2 experimentos independentes).

* C57BL/6 WT vs. CD28 KO: diferenças significativas a partir da 11^a semana.

♣ C57BL/6 WT vs. CD28 KO: diferenças significativas a partir da 13^a semana.

Tabela 3: Produção de citocinas por células de linfonodos drenantes de camundongos CD28 KO e C57BL/6 WT infectados com 10^3 promastigotas metacíclicas ou 10^5 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) amazonensis* no período pós contaminação por *Proteus sp*

Estímulo com parasitos ‡	IL-10 (ng/ml)		IL-12 p40 (ng/ml)		IFN- γ (ng/ml)	
	-	+	-	+	-	+
C57BL/6 WT meta	<0,03	2,9 \pm 0,6	1,0 \pm 0,5	0,8 \pm 0,2	1,8 \pm 0,3	22,6 \pm 6,7
CD28 KO meta	0,2 \pm 0,1	0,8 \pm 0,6	2,9 \pm 0,3	1,9 \pm 0,5	2,6 \pm 0,2	19,2 \pm 8,3
C57BL/6 WT pro⁵	<0,03	0,4 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	2,0 \pm 0,4	24 \pm 2,7 [*]
CD28 KO pro⁵	<0,03	<0,03	1 \pm 0,16	<0,5	2,4 \pm 1,9	2,0 \pm 1,1

‡ **Suspensões celulares, na concentração de 10^7 /ml, obtidas dos linfonodos poplíteos drenantes dos animais na 18^a semana após-infecção** foram cultivadas com 10^6 promastigotas vivos de fase estacionária, como estímulo antigênico secundário. Os sobrenadantes foram colhidos em tempos diferentes após incubação; para a dosagem de IL-12 p40 (48 horas), IL-10 e IFN- γ (72 horas). Os resultados representam a média aritmética \pm SD (desvio padrão) de 5 animais.

* C57BL/6 WT pro⁵ X CD28 KO pro⁵

4.11 Avaliação da infecção por *L. (L.) amazonensis* em células aderentes de peritônio de camundongos C57BL/6 WT ou CD28 KO

A infecção dos camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD28 KO por *L. (L.) amazonensis* mostrou que os camundongos CD28 KO apresentaram lesões menores e menor quantidade de parasitos no sítio do inóculo do que os camundongos WT.

Uma possibilidade aventada era de que a internalização dos parasitos pelas células hospedeiras (macrófagos) fosse diferente nos camundongos desprovidos do gene codificador de CD28. Para verificar, células peritoneais de camundongos não infectados foram infectadas *in vitro* e os índices de infecção determinados.

Os resultados estão apresentados na figura 9. No final do período de incubação (96 horas) verificamos similaridade entre as diferentes culturas. Neste experimento único realizado, não se observam diferenças óbvias entre células provenientes de CD28 KO e de WT, tanto na percentagem de infecção de macrófagos como na taxa de internalização inicial, avaliada após 24 h, nem no parasitismo nos tempos mais longos (96 horas) pós-infecção da cultura.

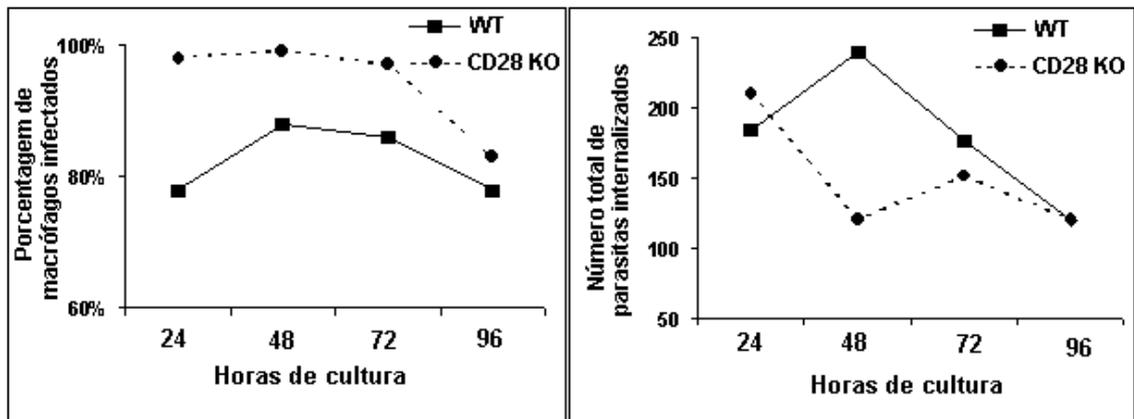


Fig. 9 Infecção de culturas de células aderentes de peritônio de camundongos C57Bl/6 CD28 KO e C57Bl/6 WT por formas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis*. Culturas de células aderentes obtidas da cavidade peritoneal estimulada por amido foram infectadas com formas promastigotas metacíclicas na proporção de 0,5 parasito por célula. As lamínulas foram retiradas 24, 48, 72 e 96 horas e coradas para contagem dos macrófagos infectados e dos parasitas internalizados. Os resultados são apresentados como percentagem de células infectadas e número total de parasitas internalizados pelas células infectadas (médias de duplicatas).

4.12 Produção de óxido nítrico (NO) em culturas de células aderentes de peritônio de camundongos C57BL/6 CD28 KO e WT infectadas com formas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis*

No intuito de relacionar o melhor controle do parasitismo com a produção de NO, nós dosamos nos diferentes tempos a concentração de nitrito nos sobrenadantes das culturas.

Os resultados apresentados na tabela 4 mostram que, nas culturas de células peritoneais obtidas de camundongos C57BL/6 CD28 KO ou WT infectadas *in vitro* com promastigotas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis*, havia concentrações apenas moderadas de nitrito no sobrenadante e que não diferiram entre si.

Tabela 4: Produção de óxido nítrico (NO) por células aderentes de culturas infectadas *in vitro* com 10^3 promastigotas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis* no período pós contaminação por *Proteus sp*

	Nitrito (μM)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
C57BL/6 WT	5,2 \pm 1,4	2,2 \pm 0,5	2,7 \pm 0,3	7,7 \pm 0,6
C57BL/6 CD28 KO	4,8 \pm 0,95	<1,56	2,3 \pm 0,3	3,5 \pm 1,1

A concentração de nitrito acumulado nos sobrenadantes de culturas de células aderentes da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD28 KO infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis* foi medida utilizando-se o reagente de Griess. A sensibilidade mínima do teste foi de 1,563 μM . Médias e SE de 3 animais .

5 DISCUSSÃO

O estudo da infecção experimental com *Leishmania*, em linhagens de camundongos isogênicos, não só vem contribuindo para a compreensão da relação protozoário-hospedeiro como também para o conhecimento de mecanismos básicos da resposta imune. Muito se aprendeu sobre as interações entre os linfócitos T específicos e as células apresentadoras de antígenos, sobre o papel de citocinas, diferenciação das subpopulações de linfócitos T e os requisitos de coestimulação para ativação de linfócitos virgens ou efetores.

Numerosas manipulações incluem: a injeção de citocinas e de anticorpos neutralizantes de citocinas, expressão de citocinas transgênicas e, mais recentemente, supressão de genes de citocinas ou seus receptores (*gene knockout*).

Os experimentos com animais KO (*Knockout*) desenvolvidos em nosso projeto mostraram que estávamos frente a dois tipos de evolução da infecção por *L.(L.) amazonensis*: agravamento pela falta da produção das citocinas IL-12 e IFN- γ , e aumento de resistência pela falta de moléculas de superfície celular CD28 ambos ocorrendo em camundongos C57Bl/6, normalmente resistentes à infecção por *Leishmania*.

A compreensão precisa dos mecanismos que permitem às várias espécies de *Leishmania* de infetar e sobreviver em um hospedeiro imunologicamente competente ainda representa um desafio para muitos pesquisadores.

A primeira demonstração direta da relevância da balança Th1/Th2 no desenvolvimento da infecção por *Leishmania in vivo*, surgiu com os estudos do modelo de infecção murina por *L. (L.) major*, onde o desequilíbrio para a resposta do tipo Th2 leva a doença e a resposta do tipo Th1 orquestrada pela IL-12 que leva a produção de IFN- γ e proteção (Sadick, Heinzel *et al.*, 1990; Chatelain, Varkila *et al.*, 1992).

Camundongos BALB/c deficientes em IL-4 são resistentes à infecção por *L. (L.) major* (Kopf, Brombacher *et al.*, 1996) e camundongos transgênicos de fundo genético resistente com expressão constitutiva de IL-4, são suscetíveis (Leal, Moss *et al.*, 1993; Erb, Blank *et al.*, 1996).

Enquanto em infecções por *L. (L.) major*, fenótipos extremos de resistência e suscetibilidade são identificados facilmente (Behin, Mauel *et al.*, 1979; Handman, Ceredig *et al.*, 1979), nas infecções por *L. (L.) amazonensis* grande parte das linhagens são suscetíveis, e as ditas “resistentes” apresentam lesões pequenas crônicas onde os parasitos podem ser encontrados mas que nunca são eliminados totalmente (Grimaldi, Moriearty *et al.*, 1980; Barral, Petersen *et al.*, 1983; Andrade, Reed *et al.*, 1984).

Em 1993 foi descrito que a suscetibilidade à *L. (L.) amazonensis* era, principalmente, devida à ausência de resposta Th1 do que à presença de uma resposta Th2 (Afonso e Scott, 1993). Entretanto, outros autores mostraram que a infecção por *L. (L.) amazonensis* induz uma resposta mista de Th1/Th2 (Lima, Puel *et al.*, 1998; Ji, Sun *et al.*, 2002).

Nós não detectamos, em nenhum momento, na infecção crônica por *L. (L.) amazonensis* nos camundongos C57BL/6 WT ou KO, a presença de IL-4. De fato, a ausência de IL-4 parece não contribuir para o desenvolvimento da infecção por *L. (L.) amazonensis* nos camundongos “resistentes” (Jones, Buxbaum *et al.*, 2000).

Os camundongos IFN- γ KO e IL-12 KO apresentaram evolução sem controle do parasitismo com lesão progressivamente maior quando inoculados com duas doses diferentes de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* de fase estacionária de cultura, diferentemente dos camundongos C57BL/6 WT e CD28 KO que

apresentaram lesões pequenas e estáveis. Não foram observadas diferenças na produção de IL-12 entre os camundongos WT, IFN- γ KO e CD28 KO. A maior suscetibilidade de camundongos IFN- γ KO e IL-12 KO não pode ser atribuída a maiores níveis de IL-4 ou IL-10 visto que a produção destas citocinas não apresentou aumento significativo nos camundongos KO em relação aos camundongos WT. Logo, parece ser a própria deficiência de IL-12 e IFN- γ , a responsável pela grande suscetibilidade observada nos animais IL-12 KO e IFN- γ KO à infecção por promastigotas de *L. (L.) amazonensis* de fase estacionária de cultura. Aguilar e colaboradores demonstraram que, camundongos C57BL/6 deficientes em IL12p40 ou tratados com anticorpos neutralizantes anti-IL12p40 e infectados com 10^7 promastigotas de *L. mexicana* de fase estacionária de cultura, desenvolviam doença extremamente grave que levava à morte dos animais. Verificaram ainda que, estes animais não produziam IFN- γ mas produziam IL-4, IL-10 e IL-18. Eles mostraram também, um aumento progressivo de células expressando IL-12p40 (nos animais tratados com Ac anti-IL-12p40), IFN- γ , NOS2 e CD40L na pata (local do inóculo) e no linfonodo drenante de camundongos C57BL/6 WT, até 24 semanas após infecção. Concluíram que IL-12 endógena é necessária para o controle da doença na fase crônica da infecção por *L. mexicana* (Aguilar Torrentera, Laman *et al.*, 2002).

Nós detectamos concentrações semelhantes de IL-10 nos sobrenadantes de cultura de células de LNDP dos camundongos C57BL/6 WT, IFN- γ KO e IL-12 KO na infecção crônica (20^a semana) induzida por 10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* de fase estacionária de cultura. Também os níveis de IL-12p40 dosados em sobrenadante de cultivo foram similares entre os grupos de camundongos C57BL/6 WT e IFN- γ KO. Embora, nossos resultados em relação à

produção de citocinas não sejam conclusivos, os experimentos com os camundongos IL-12 KO e IFN- γ KO mostram que a ação da IL-12 e do IFN- γ é importante na resistência e que sua ausência leva à extrema suscetibilidade à infecção por *L. (L.) amazonensis*.

O papel de citocinas envolvidas na suscetibilidade/resistência à infecção por *L. (L.) amazonensis*, continua sendo foco de interesse dado que existem relatos de diferenças importantes na ação de citocinas na leishmaniose quando são analisadas espécies diferentes da clássica *L. (L.) major*. Foi visto que na fase inicial da infecção, camundongos C57BL/6 deficientes em IL-10 apresentavam um aumento da resposta do tipo Th1, porém, este aumento não se correlacionava à cura da infecção induzida por 5×10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* de fase estacionária de cultura (Jones, Ackermann *et al.*, 2002).

Outros pesquisadores mostraram que, embora os linfócitos T CD4⁺ ativados sejam os responsáveis pela patologia nas infecções murinas por *L. (L.) amazonensis*, camundongos suscetíveis não desenvolvem uma resposta imune do tipo Th2 polarizada, sugerindo um mecanismo diferente para a suscetibilidade a esta doença (Silva, Bertho *et al.*, 1994; Soong, Chang *et al.*, 1997).

A incapacidade para montar uma resposta do tipo Th1 eficaz, independente da inibição pela resposta imune do tipo Th2 induzida por IL-4, foi associada com a inaptidão de produzir (Rodriguez-Sosa, Monteforte *et al.*, 2001) ou responder a IL-12 pela inibição da expressão da molécula IL-12R β 2 do receptor (Jones, Buxbaum *et al.*, 2000). Existem evidências, levando em conta o modelo utilizado, que as leishmanias consideradas parte do complexo mexicana, como no caso da *L. (L.) amazonensis*, subvertem a resposta imune lançando mão desta mesma estratégia (Jones, Buxbaum *et al.*, 2000; Rodriguez-Sosa, Monteforte *et al.*, 2001; Aguilar

Torrentera, Laman *et al.*, 2002). Também é bem documentado que o parasito pode inibir a produção de IL-12 por macrófagos (Weinheber, Wolfram *et al.*, 1998) e a produção de IL-12 por células dendríticas (Bennett, Misslitz *et al.*, 2001; Qi, Popov *et al.*, 2001); e promover as condições para as células dendríticas produzirem níveis altos de IL-4 (Qi, Popov *et al.*, 2001). Paradoxalmente, um estudo recente com *L. (L.) mexicana* (Buxbaum, Uzonna *et al.*, 2002), usando camundongos IL-12^{-/-}, sugere que apesar da resistência à infecção depender de STAT4 (fator de transcrição requerido para a sinalização via IL-12), da resposta do tipo 1, e da síntese de IFN- γ e iNOS, ela é independente de IL-12.

Em camundongos suscetíveis, Compton e Farrell (Compton e Farrell, 2002), utilizando camundongos BALB/c CD28 KO, mostraram que na falta das interações CD28-B7, os camundongos BALB/c resolvem a infecção por *L. (L.) major* e desenvolvem uma resposta do tipo Th1. Observaram também que a resistência dos camundongos BALB/c CD28 KO à infecção por *L. (L.) major* era dependente da produção de IFN- γ .

Quanto ao papel da molécula CD28 na resistência ou não dos camundongos C57BL/6, nossos dados indicam que sua ausência leva a um melhor controle da infecção e da lesão induzida pela infecção por *L. (L.) amazonensis*. Nós verificamos que a ausência desta interação não prejudica a produção de IL-12 e nem a de IFN- γ .

Soong e colaboradores em 1997 (Soong, Chang *et al.*, 1997), mostraram que a ativação excessiva de células TCD4⁺ levava ao agravamento das infecções por *L. (L.) amazonensis*. Uma das nossas hipóteses para explicar o melhor controle da infecção nos camundongos CD28 KO é que, a ausência de estímulo pela molécula CD28, levaria à menor ativação do compartimento TCD4⁺ e conseqüentemente do melhor controle da infecção por *L. (L.) amazonensis*, como observado em nossos

experimentos. A menor quantidade de células observada em LNDP de camundongos CD28 KO (figura 7) pode corroborar esta hipótese.

Acuto e Michel descreveram, em revisão recente (Acuto e Michel, 2003) que, camundongos deficientes em CD28 têm sua resposta imune reduzida contra patógenos. A falta de coestimulação do sistema imune por CD28 resulta na redução de proliferação de linfócitos T *in vitro* e *in vivo*, em inibição severa na formação do centro germinativo e na troca isotópica das imunoglobulinas, reduz a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ e também a síntese de citocinas do tipo Th2. A sinalização via CD28 aumenta a síntese de citocinas, como por exemplo, IL-12, IFN- γ , IL-4; quimiocinas, como por exemplo, MIP1(*macrophage inflammatory protein 1*; CC-chemokine ligand 3, CCL3); receptores para citocinas e quimioquinas, como por exemplo, receptor para IL-2 (IL-2R), IL-12R e CXCR5 (*CXC-chemokine receptor 5*); e receptores como CD40 ligante (CD40L), CTL-A4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), molécula coestimulatória induzível (ICOS), OX40 e 4-1BB, que têm seus ligantes nas APCs. Estes eventos asseguram a transmissão do estímulo para uma segunda onda de sinais (horas ou dias depois da interação inicial do linfócito T com as APCs) nos órgãos linfóides secundários e/ou após migração para os tecidos. Estas outras interações são cruciais para a manutenção das funções dos linfócitos T efetores e para o estabelecimento da memória de longa duração. A molécula CD28 é expressa pela maioria dos linfócitos T murinos ativados. Seus receptores nas APC (como as células dendríticas- DC, macrófagos e linfócitos B), são as moléculas CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) que só são expressas após a estimulação das APC (as DC não ativadas expressam pouca CD86 e nenhuma CD80). Uma vez deflagrada a resposta imune inicial, a expressão de CTL-A4 que tem afinidade muito maior pelos mesmos

ligantes, CD80 e CD86, sinaliza as vias de regulação negativas como mecanismo para evitar hiperativação.

Recentemente, foi sugerido que a molécula ICOS era a molécula chave, reguladora das respostas imunes do tipo Th1 e Th2 na infecção por *L. (L.) mexicana* (Greenwald, 2002) e do controle desta infecção. Os autores observaram que camundongos suscetíveis 129S4/SvJae deficientes em ICOS infectados no dorso com 5×10^6 amastigotas de *L. (L.) mexicana* desenvolveram lesões cutâneas menos acentuadas que os camundongos WT, embora até doze semanas de infecção as lesões fossem similares nos dois grupos de animais. Eles observaram, também, produção reduzida de citocinas do tipo Th1 e Th2 e defeito na troca isotípica para IgG1 e IgG2 e nenhuma IgE específica contra o parasita.

Em nossos experimentos, nós observamos que nem a dose, nem o tipo de forma predominante no inóculo modificaram o fenótipo de maior resistência à infecção por *L. (L.) amazonensis* na ausência de CD28 nos camundongos com fundo genético resistente (C57BL/6). Nossos resultados mostraram, ainda, que a falta de co-estimulação via moléculas de CD28 leva à reduzida carga parasitária, menor estimulação traduzida por menor aumento de células nos LNTP dos animais infectados observada, principalmente, com inóculos altos contendo procíclicos não infectantes.

Assim, podemos concluir que a coestimulação via CD28 favorece o fenótipo de maior suscetibilidade à infecção por *L. (L.) amazonensis*. As razões para isto, por enquanto, são especulativas e se baseiam na menor ativação dos linfócitos T e menor celularidade devida à menor síntese de quimiocinas e atração de células alvo imaturas (*safe target*), hóspedes preferenciais da *Leishmania*.

Resultados mais recentes publicados, em 2005, mostraram que nas primeiras três semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*, no local do inóculo e nos linfonodos drenantes, existe um grande número de linfócitos T CD4⁺CD25⁺CD86⁺, como também níveis altos de transcritos de FoxP3, TGF-beta1, e IL-10RI, indicando acumulação local de linfócitos Treg (Ji, Masterson *et al.*, 2005). Estes estudos mostraram ainda, que os linfócitos T CD4⁺CD25⁺ produzindo IL-10, derivados da lesão, eram capazes de suprimir a proliferação e a produção de IL-2 e IFN- γ por linfócitos T CD4⁺CD25⁻ efetores *in vitro*. Seria interessante verificar a frequência de células Treg nos animais CD 28 KO.

Este estudo abre uma discussão sobre o papel de linfócitos Treg contendo as respostas imunes deletérias durante à infecção por *Leishmania* e enfatiza o equilíbrio entre os linfócitos efetores Treg e Th1 no desenvolvimento da leishmaniose induzida por *L. (L.) amazonensis*.

Ainda é possível que na ausência de CD28, células TCD8 com atividade citotóxica assumam um papel maior no controle da infecção. Experimentos preliminares de quantificação de células TCD8 ativadas não revelaram diferenças entre camundongos CD28 KO e WT.

Os mecanismos usados pela *Leishmania* na forma promastigota para transpor as barreiras da resposta inata e infetar os macrófagos, principal célula hospedeira, são numerosos. Os promastigotas metacíclicos sobrevivem em ambiente inóspito, o fagolisossoma acidificado, diferenciam-se em amastigotas e se multiplicam. Uma vez na forma amastigota, a *Leishmania* torna-se resistente aos mecanismos parasiticidas da célula hospedeira que, por sua vez é também, a célula efetora responsável pela sua destruição.

Após a interação com os linfócitos T efetores específicos e submetidos à ação de citocinas pró-inflamatórias, especialmente, o IFN- γ , os macrófagos são ativados e passam a expressar óxido nítrico sintase (iNOS) e gerar grandes quantidades de óxido nítrico (NO), um poderoso agente microbicida. A produção de NO e metabólitos reativos do oxigênio como o superóxido, resulta na destruição intracelular da *Leishmania*.

Nós não achamos diferenças entre animais CD28 KO e seus respectivos controles WT nas percentagens de macrófagos peritoneais parasitados e também na quantidade de nitrito acumulada no meio de cultivo (indicativa da produção de NO). Embora preliminares, estes experimentos sugerem que diferenças na internalização dos parasitos pela célula hospedeira ou grandes diferenças de produção de NO não são as causas da maior resistência dos CD28 KO.

Entretanto, estes experimentos foram preliminares e identificar os mecanismos que levam à maior resistência à leishmaniose nos animais CD28 KO, poderá indicar estratégias alternativas para o tratamento desta infecção, em situações de ineficácia da medicação. Por exemplo, o bloqueio da interação CD28/CD80/CD86 pela molécula de fusão CTLA4-Ig pode reduzir os níveis de ativação de linfócitos T e facilitar o controle do parasitismo.

6 CONCLUSÕES

Nós concluímos que a inexistência de co-estimulação via moléculas de CD28 determinou maior resistência frente à infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos “resistentes” C57Bl/6.

Conclusões específicas:

- Quanto aos nossos modelos utilizando camundongos deficientes em citocinas IL-12 e IFN- γ que estão relacionados com o desenvolvimento da resposta T CD4⁺ Th1, confirmamos com a infecção provocada pela *L. (L.) amazonensis* a importância destas citocinas na indução de resposta protetora do hospedeiro.
- Nossos resultados mostraram que a falta de co-estimulação via moléculas de CD28 leva a maior resistência à infecção por *L. (L.) amazonensis*, revelada pela menor frequência de parasitos e por lesões menores e estáveis nos camundongos C57BL/6 CD28 KO quando comparado às lesões nos camundongos WT.
- desenvolvimento controlado da infecção por *L. (L.) amazonensis* na ausência da co-estimulação via moléculas CD28 nos camundongos com fundo genético resistente (C57BL/6), não foi alterado nem pela dose do inóculo nem pela forma do parasita utilizado.
- Todos os grupos experimentais apresentaram uma resposta imune do tipo Th1, revelada pela presença de IL-12 e IFN- γ , e deficiência de resposta imune do tipo Th2, revelada pela ausência de IL-4, porém com presença de IL-10.
- A falta de co-estimulação via moléculas de CD28 levou a uma menor estimulação dos linfonodos drenantes, traduzida pelo menor aumento de células nos LNDR dos animais CD28 KO infectados por *L. (L.) amazonensis*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuto, O. e Michel, F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v.3, n.12, Dec, p.939-51. 2003.

Afonso, L. C. *et al.* The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Science**, v.263, n.5144, Jan 14, p.235-7. 1994.

Afonso, L. C. e Scott, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, v.61, n.7, Jul, p.2952-9. 1993.

Aguilar Torrentera, F. *et al.* Endogenous interleukin-12 is critical for controlling the late but not the early stage of *Leishmania mexicana* infection in C57BL/6 mice. **Infect. Immun.**, v.70, n.9, Sep, p.5075-80. 2002.

Albuquerque, M., Maciel, L.R. Resenha histórica da leishmaniose (do início do século a década de 1930). Rio de Janeiro: **Boletim eletrônico da História da Saúde da Medicina**: 60 p. 1995.

Alexander, J. e Bryson, K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunol. Lett.**, v.99, n.1, Jun 15, p.17-23. 2005.

Altamirano-Enciso, A. J. *et al.* [On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source]. **Hist. Ciências Saúde Manguinhos**, v.10, n.3, Sep-Dec, p.852-82. 2003.

Andrade, Z. A. *et al.* Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, v.114, n.1, Jan, p.137-48. 1984.

Aruffo, A. e Seed, B. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.84, n.23, Dec, p.8573-7. 1987.

Ashford, R. W. *et al.* Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v.8, n.3, Mar, p.104-5. 1992.

Barral, A. *et al.* Late metastatic Leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.32, n.2, Mar, p.277-85. 1983.

Barral-Netto, M. *et al.* Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v.257, n.5069, Jul 24, p.545-8. 1992.

Beebe, A. M. *et al.* Serial backcross mapping of multiple loci associated with resistance to *Leishmania major* in mice. **Immunity**, v.6, n.5, May, p.551-7. 1997.

Behar, S. M. *et al.* A pathway of costimulation that prevents anergy in CD28- T cells: B7-independent costimulation of CD1-restricted T cells. **J. Exp. Med**, v.182, n.6, Dec 1, p.2007-18. 1995.

Behin, R. *et al.* Leishmania tropica: pathogenicity and in vitro macrophage function in strains of inbred mice. **Exp. Parasitol.**, v.48, n.1, Aug, p.81-91. 1979.

***De acordo com:**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2002.

- Bennett, C. L. *et al.* Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. **Eur. J. Immunol.**, v.31, n.3, Mar, p.876-83. 2001.
- Biedermann, T. *et al.* IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. **Nat. Immunol.**, v.2, n.11, Nov, p.1054-60. 2001.
- Brown, D. R. *et al.* Limited role of CD28-mediated signals in T helper subset differentiation. **J. Exp. Med.**, v.184, n.3, Sep 1, p.803-10. 1996.
- Brown, J. A. *et al.* Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by down-regulating the Th2 response. **J. Infect. Dis.**, v.174, n.6, Dec, p.1303-8. 1996.
- Bryceson, A. Leishmaniasis. In: C. G (Ed.). **Manson's Tropical Diseases**. London: Saunders, 1996. Leishmaniasis, p.1213-46
- Buxbaum, L. U. *et al.* Control of New World cutaneous leishmaniasis is IL-12 independent but STAT4 dependent. **Eur. J. Immunol.**, v.32, n.11, Nov, p.3206-15. 2002.
- Carson, W. E. *et al.* Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. **J. Clin. Invest.**, v.96, n.6, Dec, p.2578-82. 1995.
- Chang, J. T. *et al.* Role of costimulation in the induction of the IL-12/IL-12 receptor pathway and the development of autoimmunity. **J. Immunol.**, v.164, n.1, Jan 1, p.100-6. 2000.
- Chatelain, R. *et al.* *Leishmania major* infection in interleukin-4 and interferon-gamma depleted mice. **Parasite Immunol.**, v.21, n.8, Aug, p.423-31. 1999.
- Chatelain, R. *et al.* IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. **J. Immunol.**, v.148, n.4, Feb 15, p.1182-7. 1992.
- Compton, H. L. e Farrell, J. P. CD28 costimulation and parasite dose combine to influence the susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v.168, n.3, Feb 1, p.1302-8. 2002.
- Corry, D. B. *et al.* Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. **J. Immunol.**, v.153, n.9, Nov 1, p.4142-8. 1994.
- Croft, M.; *et al.* Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. **J. Immunol.**, v.152, n.6, Mar 15, p.2675-85. 1994.
- Da Silva, R. e Sacks, D. L.. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. **Infect. Immun.**, v.55, n.11, Nov, p.2802-6. 1987.
- Dalton, D. K. *et al.* Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. **Science**, v.259, n.5102, Mar 19, p.1739-42. 1993.

D'andrea, A. *et al.* Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. **J. Exp. Med.**, v.176, n.5, Nov 1, p.1387-98. 1992.

Desjeux, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v.14, n.5, Sep-Oct, p.417-23. 1996.

Dickerhoff, R. *et al.* [Visceral leishmaniasis. Personal observation and review of epidemiology, clinical aspects and therapy]. **Klin. Padiatr.**, v.202, n.5, Sep-Oct, p.347-51. 1990.

Elloso, M. M. e Scott, P. Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v.162, n.11, Jun 1, p.6708-15. 1999.

Elloso, M.M. e Scott, P. Differential requirement of CD28 for IL-12 receptor expression and function in CD4(+) and CD8(+) T cells. **Eur. J. Immunol.**, v.31, n.2, Feb, p.384-95. 2001.

Erb, K. J. *et al.* Susceptibility to *Leishmania major* in IL-4 transgenic mice is not correlated with the lack of a Th1 immune response. **Immunol. Cell Biol.**, v.74, n.3, Jun, p.239-44. 1996.

Evans, T. G. Leishmaniasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v.7, n.3, Sep, p.527-46. 1993.

Gause, W. C. *et al.* CD28 dependence of T cell differentiation to IL-4 production varies with the particular type 2 immune response. **J. Immunol.**, v.158, n.9, May 1, p.4082-7. 1997.

Gontijo, B. e De Carvalho Mde, L.. [American cutaneous leishmaniasis]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, n.1, Jan-Feb, p.71-80. 2003.

Green, J. M. *et al.* T cell costimulation through the CD28 receptor. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, v.107, n.1, Apr, p.41-6. 1995.

Grimaldi, G., Jr. *et al.* *Leishmania mexicana*: immunology and histopathology in C3H mice. **Exp. Parasitol.**, v.50, n.1, Aug, p.45-56. 1980.

Guler, M. L. *et al.* Genetic susceptibility to *Leishmania*: IL-12 responsiveness in TH1 cell development. **Science**, v.271, n.5251, Feb 16, p.984-7. 1996.

Handman, E. *et al.* Murine cutaneous leishmaniasis: disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, v.57, n.1, Feb, p.9-29. 1979.

Handman, E. *et al.* Genes and susceptibility to leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v.59, p.1-75. 2005.

Heath, V. L. *et al.* Cutting edge: ectopic expression of the IL-12 receptor-beta 2 in developing and committed Th2 cells does not affect the production of IL-4 or induce the production of IFN-gamma. **J. Immunol.**, v.164, n.6, Mar 15, p.2861-5. 2000.

Heinzel, F. P. *et al.* IL-2 is necessary for the progression of leishmaniasis in susceptible murine hosts. **J. Immunol.**, v.150, n.9, May 1, p.3924-31. 1993.

Heinzel, F. P. *et al.* Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.**, v.169, n.1, Jan 1, p.59-72. 1989.

Heinzel, F. P. *et al.* Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, v.177, n.5, May 1, p.1505-9. 1993.

Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v.354, n.9185, Oct 2, p.1191-9. 1999.

Himmelrich, H. *et al.* The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor beta 2-chain expression on CD4+ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. **J. Immunol.**, v.161, n.11, Dec 1, p.6156-63. 1998.

Howard, J. G. *et al.* Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunol.**, v.2, n.4, Winter, p.303-14. 1980.

Jankovic, D. *et al.* Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. **Curr. Opin. Immunol.**, v.13, n.4, Aug, p.403-9. 2001.

Ji, J. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, v.174, n.11, Jun 1, p.7147-53. 2005.

Ji, J. *et al.* Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.66, n.4, Apr, p.338-45. 2002.

Johnson, J. G. e Jenkins, M. K.. Monocytes provide a novel costimulatory signal to T cells that is not mediated by the CD28/B7 interaction. **J. Immunol.**, v.152, n.2, Jan 15, p.429-37. 1994.

Jones, D. E. *et al.* Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. **Infect. Immun.**, v.70, n.4, Apr, p.2151-8. 2002.

Jones, D. E. *et al.* IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, v.165, n.1, Jul 1, p.364-72. 2000.

Keane-Myers, A. *et al.* B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways are required for the development of T helper cell 2-mediated allergic airway responses to inhaled antigens. **J. Immunol.**, v.158, n.5, Mar 1, p.2042-9. 1997.

Killick-Kendrick, R. e Molyneux, D. H.. Transmission of leishmaniasis by the bite of phlebotomine sandflies: possible mechanisms. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.75, n.1, p.152-4. 1981.

Killick-Kendrick, R. *et al.* *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v.187, n.1089, Nov 19, p.409-19. 1974.

- Kopf, M. *et al.* IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, v.184, n.3, Sep 1, p.1127-36. 1996.
- Lainson, R. *et al.* Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.81, n.4, p.702-3. 1987.
- Lainson, R. e Shaw, J.J. Evolution classification and geographical distribution. In: W. E. Petters e R. Killick-Kendrick (Ed.). **Leishmaniasis in biology and medicine**: London Academic Press, 1987. Evolution classification and geographical distribution, p.1-120
- Launois, P. *et al.* IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. **Immunity**, v.6, n.5, May, p.541-9. 1997.
- Leal, L. M. *et al.* Interleukin-4 transgenic mice of resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection. **Eur. J. Immunol.**, v.23, n.2, Feb, p.566-9. 1993.
- Lenschow, D. J. *et al.* Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. **J. Exp. Med.**, v.181, n.3, Mar 1, p.1145-55. 1995.
- Liew, F. Y. e O'donnell, C. A.. Immunology of leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v.32, p.161-259. 1993.
- Lima, G. M. C. A. *et al.* Susceptibility and resistance to *Leishmania amazonensis* in H-2q syngeneic high and low antibody responder mice (Biozzi mice). **Scand. J. Immunol.**, v.48, n.2, Aug, p.144-51. 1998.
- Lima, H. C. *et al.* A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. **Parasitol. Today**, v.13, n.2, Feb, p.80-2. 1997.
- Linsley, P. S. e Ledbetter, J. A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annu. Rev. Immunol.**, v.11, p.191-212. 1993.
- Lowry, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, n.1, Nov, p.265-75. 1951.
- Macatonia, S. E. *et al.* Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. **J. Immunol.**, v.154, n.10, May 15, p.5071-9. 1995.
- Macian, F. *et al.* T-cell anergy. **Curr. Opin. Immunol.**, v.16, n.2, Apr, p.209-16. 2004.
- Magram, J. *et al.* IL-12-deficient mice are defective but not devoid of type 1 cytokine responses. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.795, Oct 31, p.60-70. 1996.
- Marzochi, M. C. e Marzochi, K. B. Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil: emerging anthrozoosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Pública**, v.10 Suppl 2, p.359-75. 1994.

Mattner, F. *et al.* Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. **Eur. J. Immunol.**, v.26, n.7, Jul, p.1553-9. 1996.

Mauel, J. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. **Adv. Parasitol.**, v.38, p.1-51. 1996.

Mosmann, T. R. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v.136, n.7, Apr 1, p.2348-57. 1986.

Mosmann, T. R. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. **J. Immunol.**, v.175, n.1, Jul 1, p.5-14. 2005.

Mosmann, T. R. e Sad, S.. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, v.17, n.3, Mar, p.138-46. 1996.

Nishikomori, R.; Ehrhardt, R. O.; *et al.* T helper type 2 cell differentiation occurs in the presence of interleukin 12 receptor beta2 chain expression and signaling. **J. Exp. Med.**, v.191, n.5, Mar 6, p.847-58. 2000.

Nishikomori, R. *et al.* BALB/c mice bearing a transgenic IL-12 receptor beta 2 gene exhibit a nonhealing phenotype to *Leishmania major* infection despite intact IL-12 signaling. **J. Immunol.**, v.166, n.11, Jun 1, p.6776-83. 2001.

Oppmann, B. *et al.* Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v.13, n.5, Nov, p.715-25. 2000.

Organização Mundial da Saúde. Disponível em:

<<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>>. Acesso em 20 dez. 2004 1998.

Parham, C. *et al.* A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. **J. Immunol.**, v.168, n.11, Jun 1, p.5699-708. 2002.

Park, A. Y. *et al.* The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v.168, n.11, Jun 1, p.5771-7. 2002.

Pessoa, S. B. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.5ª edição. 1958

Qi, H. *et al.* *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. **J. Immunol.**, v.167, n.8, Oct 15, p.4534-42. 2001.

Reiner, S. L. e Locksley, R. M.. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annu Rev Immunol**, v.13, p.151-77. 1995.

Roberts, L. J. *et al.* Resistance to *Leishmania major* is linked to the H2 region on chromosome 17 and to chromosome 9. **J. Exp. Med.**, v.185, n.9, May 5, p.1705-10. 1997.

Robinson, D. *et al.* IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. **Immunity**, v.7, n.4, Oct, p.571-81. 1997.

Rodriguez-Sosa, M.; Monteforte, G. M.; *et al.* Susceptibility to *Leishmania mexicana* infection is due to the inability to produce IL-12 rather than lack of IL-12 responsiveness. **Immunol. Cell Biol.**, v.79, n.4, Aug, p.320-2. 2001.

Sacks, D. e Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.**, v.2, n.11, Nov, p.845-58. 2002.

Sacks, D. L. *et al.* Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. **J. Immunol.**, v.135, n.1, Jul, p.564-9. 1985.

Sadick, M. D. *et al.* Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. **J. Exp. Med.**, v.171, n.1, Jan 1, p.115-27. 1990.

Scharton-Kersten, T. *et al.* IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **J. Immunol.**, v.154, n.10, May 15, p.5320-30. 1995.

Schweitzer, A. N. e Sharpe, A. H.. Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. **J. Immunol.**, v.161, n.6, Sep 15, p.2762-71. 1998.

Scott, P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, v.68, n.3, Apr, p.369-72. 1989.

Scott, P. Development and regulation of cell-mediated immunity in experimental leishmaniasis. **Immunol. Res.**, v.27, n.2-3, p.489-98. 2003.

Seder, R. A. High-dose IL-2 and IL-15 enhance the in vitro priming of naive CD4+ T cells for IFN-gamma but have differential effects on priming for IL-4. **J. Immunol.**, v.156, n.7, Apr 1, p.2413-22. 1996.

Shahinian, A. *et al.* Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. **Science**, v.261, n.5121, Jul 30, p.609-12. 1993.

Sharpe, A. H. Analysis of lymphocyte costimulation in vivo using transgenic and 'knockout' mice. **Curr. Opin. Immunol.**, v.7, n.3, Jun, p.389-95. 1995.

Sharpe, A. H. e Freeman, G. J.. The B7-CD28 superfamily. **Nat. Rev. Immunol.**, v.2, n.2, Feb, p.116-26. 2002.

Silva, E. M. *et al.* Effect of in vivo depletion of CD4+ T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*. **Acta Trop.**, v.56, n.1, Feb, p.111-20. 1994.

Soong, L. *et al.* Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, v.158, n.11, Jun 1, p.5374-83. 1997.

Stobie, L. *et al.* The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.97, n.15, Jul 18, p.8427-32. 2000.

Stuehr, D. J. e Nathan, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J. Exp. Med.**, v.169, n.5, May 1, p.1543-55. 1989.

Sypek, J. P. *et al.* Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **J. Exp. Med.**, v.177, n.6, Jun 1, p.1797-802. 1993.

Taswell, C. Limiting dilution assay for the separation, characterization, and quantitation of biologically active particles and their clonal progeny: statistical methods for LDAs used by ELIDA. In: PRETLOW, T.G.; PRETLOW, T.P. (Eds.). **Cell separation: selected methods and applications**, v.ed. New York: Academic Press, p.109-145. 1986.

Trinchieri, G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. **Adv. Immunol.**, v.70, p.83-243. 1998.

Trinchieri, G. e Gerosa, F. Immunoregulation by interleukin-12. **J. Leukoc. Biol.**, v.59, n.4, Apr, p.505-11. 1996.

Viola, A. e Lanzavecchia, A.. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. **Science**, v.273, n.5271, Jul 5, p.104-6. 1996.

Warburg, A. e Schlein, Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.35, n.5, Sep, p.926-30. 1986.

Weinheber, N. *et al.* Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. **Eur. J. Immunol.**, v.28, n.8, Aug, p.2467-77. 1998.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)