

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**RESPOSTA IMUNE CELULAR APÓS À INFECÇÃO POR
Leishmania chagasi EM CAMUNDONGOS BALB/c
IMUNOSSUPRIMIDOS**

JULIANA GIANTOMASSI MACHADO

**Botucatu-SP
Maio - 2008**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESPOSTA IMUNE CELULAR APÓS À INFECÇÃO POR *Leishmania*
chagasi EM CAMUNDONGOS BALB/c IMUNOSSUPRIMIDOS**

JULIANA GIAN TOMASSI MACHADO

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni
Co-Orientadora: Prof^a. Dra Simone Baldini
Lucheis

Botucatu-SP
Maio – 2008

COMISSÃO EXAMINADORA

Titulares

Prof. Titular Helio Langoni

Presidente e Orientador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP

Prof^a. Titular Lisiane Almeida Martins

Faculdade de Medicina Veterinária – UNIPAR – Umuarama- PR

Prof^a Adjunta Cárís Maroni Nunes

Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária – UNESP-
Araçatuba - SP

Prof^a Adjunta Jussara Marcondes Machado

Faculdade de Medicina de Botucatu

Dr^a Luciane Alarcão Dias-Melicio

Instituto de Biociências – UNESP- Botucatu-SP

Data: 16 de maio de 2008

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família que tanto amo, especialmente aos meus pais, José e Marlene que sempre estavam ao meu lado em todas as etapas da minha vida, me apoiando e incentivando.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças para buscar a perfeição e lutar por meus ideais, mesmo nos momentos em que pensava em desistir.

À minha família, que não dispensando esforços e carinho, tornou possível a realização de todos os meus sonhos.

Ao Prof. Helio Langoni pela orientação, amizade e ensinamentos.

À família do Prof. Helio que sempre acolheu seus orientados e residentes

Aos integrantes do Núcleo de Pesquisa em Zoonozes (NUPEZO) pelo apoio durante a realização da fase experimental

A Prof^a. Jussara Marcondes Machado pelo apoio no delineamento do projeto

A equipe do Instituto Biociências (IB) da UNESP – Botucatu, em especial à Luciane Dias Melício, Sofia Zorzella, Juliana Cavalheiro, Prof^a Alexandrina Sartori, Prof. Silvio Oliveira e Prof^a Angela Soares.

A Samanta Borborema (USP) que cedeu a cepa de *L. chagasi* para utilização na inoculação experimental

As profissionais do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, Marjorie Golim e Léia, que sempre estavam à disposição para realização dos experimentos que utilizaram citometria de fluxo

Ao Carlinhos e Roberto, responsáveis pela criação e manutenção dos camundongos e hamsters nos infectórios do Departamento de Doenças Tropicais e Higiene Veterinária e Saúde Pública.

A Prof^a. Simone Lucheis pelo apoio e carinho

A Prof^a Jane Megid por ter cedido as estantes ventiladas para a manutenção dos camundongos

Ao Juliano (Sorovar), a Fer Gaio e a Vivian Krause pelo companheirismo e profissionalismo, pois a ajuda de cada um foi imprescindível para a realização deste projeto.

Ao Aristeu, amigo e guru que sempre me ajudou durante o doutorado, inclusive na estatística

Aos meus amigos, Luciana Camargo, Acacia Elias (Fuinha), Janaína Biotto (Cruz), Vitória Souza, Dani Bastos, Marcela Ribeiro (Ber) e Gustavo Lara que sempre estavam ao meu lado me apoiando ou me fazendo rir e que vão estar comigo para onde eu for, pois amo muito cada um de vocês.

Aos meus amigos Felipe Guimarães (Filão), Vanessa Salgado, Murilo (Mega), Ieda Blanco, Vivi Chirinea, Guta Derussi, Melissa Hartman e Pedro Pinczowski (Pânico), pessoas maravilhosas que fazem parte da minha história de Botucatu.

Ao Zé Oreia, gato mais lindo do mundo

Aos meus amigos da pós - graduação Marcella Troncarelli, Rodrigo Silva, Fábio Hiroto, Ana Paula Corrêa, Nair Lira, Deolinda Carneiro, Audrey Braga, Patrícia Faccioli, Luciano Eloy, Simone Mangia, Roberto Bolsanelo, Amanda Siqueira e Tati Salerno que sempre me incentivaram e aconselharam durante o doutorado.

Aos amigos que fiz em todos os lugares por onde passei, aqueles que raramente encontro, mas levo sempre comigo.

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública e da Pós – Graduação, pela paciência e apoio.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo incentivo à pesquisa. (Bolsa de Doutorado – Processo 2004/14153-4 e Auxílio Pesquisa – Processo 2004/14762-0)

A todos, os meus sinceros agradecimentos
Muito obrigada.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Peso (g) dos camundongos Balb/c na véspera da imunossupressão realizada com dexametasona (6,65mg/Kg/dia IP durante 22 dias) e dos momentos de eutanásia (-1,2,6,13 e 20) segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com <i>L. chagasi</i> no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com <i>L. chagasi</i> no momento 0) representado pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.	50
TABELA 2. Peso (mg) dos baços dos camundongos Balb/c nos momentos de eutanásia (0, 3, 7, 14 e 21) segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com <i>L. chagasi</i> no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com <i>L. chagasi</i> no momento 0) representado pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.	52
TABELA 3. Porcentagem de CD8 no sangue de animais normais (grupos I e III) e imunossuprimidos (grupos II e IV) no momento 0 representada pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.	53
TABELA 4. Porcentagem de CD4 no sangue de animais normais (grupos I e III) e imunossuprimidos (grupos II e IV) no momento 0 representada pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.	53
TABELA 5. Relação % CD4 / % CD8 no sangue de animais normais (grupos I e III) e imunossuprimidos (grupos II e IV) no momento 0 representada pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.	53
TABELA 6. Níveis de IFN- γ , IL-10, IL-2 e IL-4 (pg/mL) em culturas de células esplênicas dos camundongos Balb/c não estimuladas, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com <i>L. chagasi</i> no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com <i>L. chagasi</i> no momento 0) e os momentos de eutanásia 3, 7, 14 e 21, representados pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.	56

TABELA 7. Níveis de IFN- γ , IL-10, IL-2 e IL-4 (pg/mL) em culturas de células esplênicas dos camundongos Balb/c estimuladas com conA, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia 3, 7, 14 e 21, representados pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008. 60

TABELA 8. Níveis de IFN- γ , IL-10, IL-2 e IL-4 (pg/mL) em culturas de células esplênicas dos camundongos Balb/c estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia 3, 7, 14 e 21, representados pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008. 64

TABELA 9. Carga parasitária de animais infectados com *Leishmania chagasi*, segundo os grupos (III - infectado no momento 0 e IV - imunossuprimido até o momento 0 e infectado no momento 0), órgão (baço e fígado) e momentos da eutanásia (3, 7, 14 e 21) representada pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008. 73

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Peso (g) dos camundongos Balb/c na véspera da imunossupressão (V.I.) realizada com dexametasona (6,65 mg/Kg/dia IP durante 22 dias) e dos momentos de eutanásia (-1, 2, 6, 13, 20) segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0). Botucatu-SP, 2008. 51
- FIGURA 2.** Peso (mg) dos baços dos camundongos Balb/c nos momentos de eutanásia (0, 3, 7, 14 e 21) segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0). Botucatu-SP, 2008. 52
- FIGURA 3.** Porcentagens de CD4 e CD8 no sangue de animais normais (grupos I e III) e imunossuprimidos (II e IV) no momento 0. Botucatu-SP, 2008. 54
- FIGURA 4.** Relação % CD4 / % CD8 no sangue de animais normais(grupos I e III) e imunossuprimidos (grupos II e IV) no momento 0. Botucatu-SP, 2008. 54
- FIGURA 5.** Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c sem estímulo, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 57
- FIGURA 6.** Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c sem estímulo, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 57

FIGURA 7. Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c sem estímulo, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 58

FIGURA 8. Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com conA, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 61

FIGURA 9. Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com conA, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 61

FIGURA 10. Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com conA, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 62

FIGURA 11. Produção de IL-4 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com conA, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 62

FIGURA 12. Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 65

FIGURA 13. Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 65

FIGURA 14. Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 66

FIGURA 15. Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c do grupo I (normal), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 66

FIGURA 16. Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c do grupo I (normal), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008 67

FIGURA 17. Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c do grupo I (normal), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008 67

FIGURA 18. Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c do grupo II (imunossuprimido até o momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 68

- FIGURA 19.** Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c do grupo II (imunossuprimido até o momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 68
- FIGURA 20.** Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c do grupo II (imunossuprimido até o momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 69
- FIGURA 21.** Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c e carga parasitária do grupo III (infectado com *L. chagasi* no momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 69
- FIGURA 22.** Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c e carga parasitária do grupo III (infectado com *L. chagasi* no momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008 70
- FIGURA 23.** Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c e carga parasitária do grupo III (infectado com *L. chagasi* no momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 70
- FIGURA 24.** Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c e carga parasitária do grupo IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008. 71

- FIGURA 25.** Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c e carga parasitária do grupo IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008 71
- FIGURA 26.** Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c e carga parasitária do grupo IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008 72
- FIGURA 27.** Cinética da carga parasitária de *Leishmania chagasi* em baço e fígado de camundongos experimentalmente infectados, segundo o grupo experimental (Grupo III - infectado no momento 0 e IV - imunossuprimido até o momento 0 e infectado no momento 0). Botucatu-SP, 2008. 73

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BALB/cIL-10^{-/-}	Balb/c sem gene da IL-10
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CO₂	Dióxido de Carbono
ConA	Concanavalina A
DXM	Dexametasona
FITC	do original em inglês “Fluorescein Isothiocyanate”
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
HA	Hidrocortisona
HIV	Do original em inglês “Human Immunodeficiency Virus”
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgG2a	Imunoglobulina G2a
IL	Interleucina
IL-10R	Receptor da IL-10
iNOS	Enzima que Regula a Produção de Óxido Nítrico
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
NO	Do inglês “Nitric Oxid”
NOS-2	Gene que Regula a Produção de Óxido Nítrico
p.i.	Pós-Inoculação
PCR	do original em inglês “Polymerase Chain Reaction”

PTX	Pentoxifilina
RNA_m	RNA mensageiro
RPM	Rotação por Minuto
SMF	Sistema Mononuclear Fagocítico
TGF-β	do original em inglês “ Transforming Growth Fator beta”
T_H1	T helper 1
T_H2	T helper 2
TNF-α	do original em inglês “Tumor Necrosis Factor alfa”
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Saúde Pública: Leishmaniose e Hospedeiro Imunossuprimido	23
2.2 Resposta Imune	24
2.3 Imunopatologia da Leishmaniose Visceral	25
2.4 Modelos experimentais na Leishmaniose	30
2.4.1 Infecção na Leishmaniose Visceral	31
2.4.2 Citocinas e Carga Parasitária na Leishmaniose Visceral	33
2.5 Corticosteróide	37
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Animais utilizados	44
4.2 Parasito	44
4.3 Grupos de animais	44
4.3.1 Imunossupressão	45
4.3.2 Infecção experimental	45
4.4 Citometria de fluxo	46
4.5 Determinação da carga parasitária	47
4.6 Dosagem das citocinas	47
4.6.1 Obtenção de sobrenadante de cultura de células esplênicas	47
4.6.2 Determinação de citocinas pelo método de ELISA	48
4.6.3 Análise estatística	48

5. RESULTADOS	50
5.1 Peso dos camundongos	50
5.2 Peso dos baços	51
5.3 Porcentagem de células CD4 e CD8 no sangue dos camundongos	53
5.4 Produção de citocinas em culturas de células esplênicas sem estímulo, estimuladas com ConA e estimuladas com antígeno sonificado de <i>L. chagasi</i>	55
5.5 Carga parasitária no baço e no fígado	72
6.DISSCUSSÃO	75
7.CONCLUSÕES	84
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

RESUMO

A Leishmaniose Visceral é uma zoonose relevante que mais recentemente tem afetado pacientes imunossuprimidos, e tornou-se um sério problema para a saúde pública. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a imunopatologia da infecção com *Leishmania chagasi* em camundongos BALB/c imunossuprimidos com dexametasona até o momento da infecção. Foram realizadas culturas de células esplênicas sem estímulo e com estímulo (Ag de *L. chagasi* e ConA) para dosagem das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, e determinação das cargas parasitárias do baço e do fígado. Os grupos imunossuprimidos apresentaram os pesos dos baços e porcentagem de CD4 estatisticamente inferiores aos grupos normais no momento da infecção e nos outros momentos de estudo revelaram a produção tanto de citocinas do tipo T_H1 (IFN- γ e IL-2) quanto do tipo T_H2 (IL-10). Os grupos infectados se comportaram de maneira semelhante, produzindo citocinas tipo T_H1 e T_H2, independentemente da imunossupressão. As cargas parasitárias do baço e do fígado destes grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa em nenhum dos momentos. Sugere-se que a imunossupressão realizada com a dexametasona não interferiu na infecção com *L. chagasi*, provavelmente pelo seu efeito reversível.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral; imunossupressão; imunopatologia; camundongos; interleucinas

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis is a relevant zoonosis infecting immunosuppressed patients, becoming a serious problem to public health in the last years. The objective of this study was to evaluate the immunopathology of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice immunosuppressed with dexamethasone until the day of infection. Spleen cells with and without specific stimulus (Ag of *L. chagasi* and ConA) were cultured for cytokine quantification (IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10) and spleen and liver parasite loads were determined. Immunosuppressed groups showed statistically lower spleen weight and CD4 percentage than normal groups on the day of infection and on the other days of the study, showing the production of T_H1 (IFN- γ and IL-2) and T_H2 (IL-10). cytokines. The other infected groups presented the same results, producing T_H1 and T_H2 cytokines, no matter if they were immunosuppressed and infected. Spleen and liver parasite loads in these groups did not show statistical differences. It was concluded that immunosuppression using dexamethasone did not interfere in *L. chagasi* infection, probably due its reversible effect.

Keywords: Visceral leishmaniasis; immunosuppression; immunopathology; mice; interleukins

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses têm como agentes etiológicos, protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. O gênero *Leishmania* pode ter sido originário na América do Sul, mas sofreu modificações após sua migração para a Ásia. São doenças graves e de ampla distribuição geográfica, com uma incidência crescente de dois milhões de casos por ano, em que 350 milhões de indivíduos estão sob risco de infecção em 88 países (LUKES et al., 2007). Noventa por cento dos casos de leishmaniose visceral ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudan e Brasil (MURRAY et al., 2005).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar, uma das suas formas de apresentação, é uma zoonose de ampla distribuição, tanto no Velho Mundo como nas Américas. A enfermidade é causada por um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). No complexo *Leishmania donovani*, atualmente são reconhecidas três espécies envolvidas na etiologia da doença: *Leishmania (Leishmania) donovani* (ROSS, 1903) e *Leishmania (Leishmania) infantum* (NICOLLE, 1908) no Velho Mundo e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (LAINSON e SHAW, 1987) no Novo Mundo, inclusive no Brasil.

Alguns pesquisadores acreditam que a *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* são a mesma espécie, em função de suas semelhanças nas características bioquímicas e moleculares (MAURÍCIO et al., 2000). Entretanto, outros autores, baseados nas diferenças ecológicas e epidemiológicas, acreditam na hipótese de que a *L. (L.) chagasi* seja realmente uma espécie indígena e autóctone do Continente Americano, pois observaram altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia (LAINSON et al., 1987), posicionamento este adotado para a definição do agente etiológico neste trabalho.

São parasitos heteroxenos, completando desta forma o seu ciclo de vida em dois hospedeiros: um vertebrado (canídeos, roedores ou humanos) e outro invertebrado (dípteros hematófagos) da família Phlebotomidae, pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, com várias espécies vetoras no Velho Mundo, e ao gênero *Lutzomyia*, com a espécie *Lutzomyia longipalpis*, no Novo Mundo. Recentemente, foi evidenciada a possibilidade de outras espécies de *Lutzomyia*, tais como a *Lutzomyia evansi* e *Lutzomyia cruzi*, agirem como vetores (TRAVI et al., 1996; GALATI et al., 1997).

São descritos dois ciclos no calazar: o ciclo silvestre, cujos reservatórios são as raposas, e o ciclo doméstico ou peridoméstico, em que o cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório. Tanto no homem quanto nos animais vertebrados, apresenta uma fase intracelular e outra extracelular. As formas amastigotas parasitam as células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente macrófagos. A intensa multiplicação do parasito leva a ruptura das células parasitadas, liberando novamente ao meio extracelular amastigotas livres, que podem ser novamente fagocitadas pelas células do SMF ou ingeridas pelo vetor durante seu repasto sanguíneo. Neste último caso, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas no tubo digestivo do vetor, com conseqüente bloqueio do seu proventrículo o que favorece a inoculação das formas infectantes pelo vetor. No novo hospedeiro, essas formas promastigotas são fagocitadas pelas células do SMF, perdem o flagelo, transformando-se em formas amastigotas (ALENCAR, et al., 1991).

No Brasil, a leishmaniose visceral americana (LVA) é doença de notificação compulsória, sendo disciplinada a investigação epidemiológica para definir as medidas de controle. O programa de controle coordenado pelo Ministério da Saúde tem como objetivo reduzir as taxas de letalidade, grau de morbidade e riscos de transmissão, mediante controle da população de reservatórios, do vetor e pelo diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos da doença (BRASIL, 2003).

Foi uma doença predominante das zonas rurais até o final da década de 1970, estando atualmente em franca expansão em áreas urbanas ou periurbanas. Sua importância em saúde pública se deve ao aumento do número de casos e à gravidade da doença. Estudos de casos humanos e caninos têm revelado a ocorrência da urbanização da leishmaniose visceral nas grandes cidades brasileiras do Nordeste e, mais recentemente, do Sudeste (BADARÓ, 1988; MARZOCHI et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2001). O primeiro relato de caso autóctone da ocorrência de leishmaniose visceral canina no Estado de São Paulo ocorreu em 1998, na cidade de Araçatuba (NEVES, 2004).

No estado de São Paulo, a doença era conhecida apenas pelos casos importados, porém, em 1999, foi confirmado o primeiro caso humano autóctone no município de Araçatuba. Até dezembro de 2003, mais de 300 casos humanos

foram confirmados na região Oeste do Estado de São Paulo, com 35 municípios classificados como de transmissão e, destes, 20 apresentam casos humanos autóctones (SECRETARIA, 2004). Nos anos de 2004, 2005 e 2006 foram registrados 130, 151 e 247 casos humanos, respectivamente (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2008).

A LVA, na atualidade, tem sido apontada como doença reemergente, caracterizando nítido processo de transição epidemiológica e apresentando incidência crescente nos últimos anos nas áreas onde ocorria tradicionalmente, assim como expansão geográfica para os estados mais ao sul do país. Esta incidência crescente e um franco processo de urbanização podem ser observados em cidades localizadas em regiões distintas, como o Nordeste e Sudeste. Cidades como: Boa Vista e Santarém (Região Norte); Terezina, São Luiz, Natal e Aracaju (Região Nordeste); Montes Claros e Belo Horizonte, Araçuaí, Sabará, Perdões e Rio de Janeiro (Região Sudeste) e Cuiabá (Região Centro-Oeste) que já vivenciaram ou vivenciam, recentemente, epidemias de LV humana e canina (ALVES e BEVILACQUA, 2004).

Os aspectos imunopatológicos na infecção pela *Leishmania chagasi* tanto no paciente normal como no imunocomprometido, devem ser melhor compreendidos. Desta forma, os trabalhos de inoculação experimental em animais controlados de linhagem específica para estes estudos, visando determinar o perfil de citocinas, podem contribuir para o esclarecimento de algumas dúvidas frente a uma doença que está se expandindo rapidamente no Brasil, especialmente no Estado de São Paulo que, desde 1999 até 2007 registrou 1.124 casos humanos da doença (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2008).

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SAÚDE PÚBLICA: LEISHMANIOSE E HOSPEDEIRO IMUNOSSUPRIMIDO

As manifestações clínicas das leishmanioses são variáveis e dependem da associação entre as características de virulência da espécie de leishmania infectante, e da resposta imunológica do hospedeiro. De acordo com Ferreira (2002), os protozoários estão entre os patógenos mais importantes que causam infecções em hospedeiros imunocomprometidos. Estes microrganismos infectam indivíduos com a imunidade celular comprometida, tais como paciente com transplante cardíaco, renal, neoplasias hematológicas, assim como aqueles que utilizam altas doses de corticosteróides e ainda nos casos de aids.

Os protozoários que mais freqüentemente causam doenças em pacientes imunocomprometidos são *Toxoplasma gondii*, *Trypanossoma cruzi*, diferentes espécies de leishmania, e o *Cryptosporidium parvum*. No caso da leishmania, a doença pode ser mucocutânea ou visceral (FERREIRA, 2002). Imunossupressão, tanto humoral quanto celular, pode ter diferentes conseqüências para o hospedeiro, dependendo da sua magnitude, favorecendo inclusive a ocorrência de outras doenças infecciosas com o aumento da taxa de infecção/doença, alterações nas manifestações clínicas da infecção ou exacerbação do curso da doença (YOUNG, 1981).

A aids produz a forma mais grave de imunossupressão conhecida, e mais de 100 microrganismos causadores de infecções oportunistas nestes pacientes têm sido identificados, sendo muitos deles protozoários intracelulares (FERREIRA, 2002). Estas infecções aceleram o curso da aids, pela capacidade de muitos microrganismos estimularem citocinas tipo T_H2 , como por exemplo a IL- 4 e IL- 10 (MORROW, et al., 1989, ACTOR et al., 1993, GILKS 1993).

Casos de co-infecção de HIV-Leishmania têm sido relatados em mais de 25 países, particularmente os localizados às margens do Mar Mediterrâneo, tais como Portugal, Espanha, França, Itália, Grécia e países da África do Norte, e, em menor extensão, na África Equatorial, Ásia e países da América do Sul (ALVAR 1994, DEDET et al., 1995, GRANDONI et al., 1996, BORGES et al., 1999). No Brasil, cerca de 80 casos de co-infecção de HIV-Leishmania foram documentados. A maioria deles refere-se à forma mucocutânea da doença, e poucos casos com a forma visceral (FERREIRA, 2002).

Tem sido demonstrado que a aids permite a disseminação do parasito para praticamente todos os órgãos e sistemas do corpo, enquanto, por outro lado, a leishmaniose acelera o curso da infecção do HIV pela diminuição do período de latência da infecção viral (FERREIRA, 2002) e da expectativa de vida dos pacientes em áreas onde ambas as doenças são endêmicas (ZHAO et al., 2004). Em pacientes co-infectados, no decorrer do primeiro episódio da doença visceral, a taxa de óbito é de cerca de 20% e após um ano, no qual a doença reincide uma ou mais vezes, essa taxa é de aproximadamente 70% (FERREIRA, 2002).

2.2 RESPOSTA IMUNE

Durante a infecção parasitária, o sistema imune controla tanto o número de parasitos presentes no organismo quanto à resistência a reinfecção, porém pode também induzir a uma patologia associada ao parasitismo. As células T desempenham um papel importante nestes eventos, tanto por mediar respostas celulares, quanto na regulação e produção de anticorpos. Os linfócitos T constituem-se de duas principais subpopulações: as células CD4 e CD8. Em resposta aos antígenos protéicos dos microrganismos, as células T CD4 auxiliares podem diferenciar-se em subpopulações de células efetoras que produzem distintos grupos de citocinas e, por isto, executam funções efetoras. As subpopulações melhor definidas das células T auxiliares são designadas T_H1 e T_H2 , sendo o IFN- γ e IL-2 as citocinas características das células T_H1 e a IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 as citocinas definidoras das células T_H2 . O IFN- γ secretado pelas células T_H1 promove diferenciação de T_H1 e inibe a proliferação das células T_H2 . Inversamente, a IL-4 produzida pelas células T_H2 , promove a diferenciação da T_H2 , e juntamente com a IL-10 inibe a ativação das T_H1 . A diferenciação para subpopulações de T_H1 e T_H2 depende dos principais fatores: as citocinas presentes no ambiente da estimulação, o tipo de célula apresentadora de antígeno (APC) e a natureza e quantidade de antígeno. A principal função das células T_H1 é a defesa mediada pelos fagócitos contra infecções, especialmente por microrganismos intracelulares, já a do T_H2 é nas reações imunes mediadas pela IgE e pelos eosinófilos/mastócitos (ABBAS et al., 2005).

A IL-10 era originalmente descrita como uma citocina produzida especificamente por células $CD4^+ T_H2$, mas estudos posteriores mostraram que esta citocina é secretada tanto por células T_H1 , quanto por T_H2 . Novos relatos têm mostrado que a produção de IL-10 por células efetoras T_H1 auxilia a limitar o dano colateral causado por uma inflamação exacerbada. Este controle, porém, pode também limitar a eficiência da resposta imune, resultando no fracasso em eliminar completamente o patógeno (TRINCHIERI, 2007).

2.3 IMUNOPATOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanias representam um grupo de parasitos intracelulares que infectam macrófagos e que têm desenvolvido mecanismos adaptativos únicos para assegurar sua sobrevivência em diversos ambientes devido ao seu ciclo de vida. Estes parasitos devem sobreviver tanto frente a condições adversas encontradas no sistema digestivo do vetor, quanto evitar a ação destrutiva do sistema imune do hospedeiro, enquanto permanecem na corrente sanguínea. Para invadir o macrófago, a leishmania utiliza uma variedade de receptores celulares mediadores da endocitose. Uma vez dentro do macrófago, o parasito é protegido da degradação do fagolisossoma por várias adaptações que inibem o mecanismo de defesa celular. Estas incluem a inibição da fusão fagossoma-endossoma, enzimas hidrolíticas, mecanismos de sinalização celular, produção de óxido nítrico e produção de citocinas, em que há redução da produção de IL-12, necessária para resposta T_H1 e indução da produção de IL-10, associada com a supressão da atividade leishmanicida do macrófago (CUNNINGHAM et al., 2002).

A resistência do hospedeiro à infecção é associada a uma ativação de células $CD4^+ T_H1$ específicas de leishmania, que produzem $IFN-\gamma$ que induz a destruição dos parasitos intracelulares pelos macrófagos. Os macrófagos desempenham um papel importante no curso da infecção servindo como células hospedeiras para o parasito, células apresentadoras de antígeno que modulam a resposta imune celular específica e, ainda, após a ativação, como células efetoras na eliminação do parasito intracelular (ABBAS et al., 2005).

Para as espécies de leishmania que causam tanto a leishmaniose cutânea quanto a visceral, a promoção da cura nos modelos experimentais requer resposta imune T_H1 . No entanto, durante a infecção murina progressiva,

com a visceralização do agente, a resposta T_H1 é suprimida pelo menos em parte por TGF- β e IL-10, com ausência de produção de citocinas T_H2 (WILSON et al., 2005). Entretanto, na infecção com a espécie cutânea *L. major*, a resposta T_H2 suprime as citocinas da resposta T_H1 e leva à progressão da doença murina (WILSON et al., 2005). Ao contrário do modelo de *L. major*, o conceito T_H1 / T_H2 não parece explicar a suscetibilidade e a resistência na infecção no modelo experimental de *L. infantum* (HONORE et al., 1998).

Murray et al. (1993), utilizando anticorpos monoclonais recombinantes anti-IL-2 e IL-2, mostraram o papel da IL-2 na atividade leishmanicida, aparentemente pela indução de IFN- γ , e formação de granuloma, com o envolvimento de células T $L3T4^+$ (CD4) e $Lyt2^+$ (CD8).

Experimentos que utilizam camundongos atímicos BALB/c (nu/nu), e experimentos de depleção de células em camundongos BALB/c (nu/+), utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4 ou anti-CD8, demonstraram a necessidade de ambas as células, TCD4 e TCD8, na proteção contra a infecção por *L. donovani* (STERN et al., 1988). Camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* demonstraram participações de diferentes populações de células no curso da infecção: as células $L3T4^+$ (CD4 $^+$) são importantes nas duas semanas iniciais, principalmente na formação de granulomas hepáticos. Mais tarde, no entanto, esta população de célula decresce e a quantidade de células $Lyt-2^+$ (CD8 $^+$) aumenta, o que está associado à destruição dos parasitos (McELRATH et al., 1988). As células CD8 estão envolvidas no controle da leishmaniose visceral, participando da resposta imune específica presente no fígado (GOMES-PEREIRA et al., 2004).

A diversidade na qualidade e quantidade da resposta imune do hospedeiro contra a infecção do patógeno é visível quando distintos órgãos são examinados, e os modelos experimentais de LV são as mais claras representações dessa diversidade. A infecção hepática é usualmente auto-limitante e a resposta imune hepática é um bom exemplo de resposta inflamatória granulomatosa dominada por células mononucleares que envolvem células de Kupffer, monócitos, células TCD4 e TCD8 (ENGWERDA et al., 2004). Múltiplas citocinas, incluindo IFN- γ , IL-12, IL-4 e níveis moderados de TNF produzido no granuloma hepático, contribuem para a proteção do hospedeiro no fígado (TUMANG et al., 1994).

O TNF é uma citocina pró inflamatória que coordena o desenvolvimento do complexo microarquitetônico do baço e de outros tecidos linfóides e é um mediador benéfico para a imunidade anti-leishmania no fígado (KAYE et al., 2004). Esta citocina induz a ativação do macrófago e formação de granuloma, duas atividades importantes no controle da infecção intracelular causada por *L. donovani*. Além disto, o TNF α é importante na indução inicial de resistência à *L. donovani* e resolução da infecção visceral experimental (TUMANG et al., 1994). Notavelmente, excesso de TNF no ambiente linfóide é um mediador do dano na arquitetura e disfunção imunológica associada a um estado inflamatório crônico (ENGWERDA et al., 2004).

De acordo com Kaye et al. (2004) a resistência hepática está correlacionada com a produção de reativo de oxigênio e reativo intermediário de nitrogênio. No estágio inicial da infecção, a produção de ambos tem um papel significativo na diminuição da multiplicação do parasito. Durante a fase mais tardia da infecção, quando a resistência hepática é evidenciada devido ao declínio do número de amastigotas, o gene que regula a síntese de óxido nítrico (NOS-2) mostra-se mais dominante e a produção de óxido nítrico (NO) é refletida principalmente pela ativação dos macrófagos dependentes de células T. O IFN- γ estimula macrófagos a produzirem iNOS, enzima que cataliza a formação de NO, uma molécula final efetora necessária para a morte do parasito intracelular (WILSON et al., 2005). Por outro lado, a produção de inibidores do gene NOS-2, IL-10 e TGF- β está correlacionada à redução da morte do parasito (MALLA e MAHAJAN, 2006).

De forma simultânea, a resolução da infecção hepática é acompanhada da perda do controle do crescimento de amastigotas no baço, onde a destruição patológica ocorre sem interrupção do hospedeiro (MALA e MAHAJAN, 2006). No entanto, os parasitos persistem no baço e na medula óssea por mecanismos que ainda não foram totalmente elucidados. A persistência dos parasitos é acompanhada pela falha na formação do granuloma e pela variedade de mudanças patológicas, incluindo esplenomegalia, alteração da microarquitetura do tecido linfóide e aumento da atividade hematopoiética (KAYE et al., 2004).

A ativação das células T_{H2} pelo protozoário resulta no aumento da sobrevivência do parasito e exacerbação das lesões em razão das ações

supressoras de suas citocinas nos macrófagos (ABBAS et al 2005). A interação da *Leishmania donovani* com os macrófagos resulta na antagonização do mecanismo de defesa do hospedeiro pela interferência na cascata de células do processo de sinalização celular dos macrófagos (BALARAMAN, et al., 2004).

Nos indivíduos com infecção aparentemente clínica, os tipos de respostas T_H1 e T_H2 não são bem definidos, ambas citocinas ativadoras (IFN- γ , e IL-12) e supressoras (IL-10, IL-3, IL-4 e TGF) são detectadas (MURRAY et al., 2005). Ansari et al. (2006) observaram níveis elevados de IFN- γ , IL-10 e IL-6 durante o calazar ativo, e mínimos de TNF- α , IL-2 e IL-4. Estes resultados demonstraram que a resposta tipo 1 não é deprimida durante o calazar ativo e sugere a possibilidade de prevalecer a não responsividade ao estímulo tipo 1. A exacerbação da doença associada à resposta imune T_H2 , envolvendo IL-4 e IL-10, não é realmente detectada na infecção visceral experimental (MURRAY et al., 1997). Gomes-Pereira et al. (2004) acreditam que o nível de IL-10 parece não ser suficiente para inibir a produção do IFN- γ nos leucócitos hepáticos e subsequente destruição dos parasitos induzida por IFN- γ .

A IL-10 suprime a inflamação durante a infecção crônica cutânea com *L. major* (TRINCHIERI, 2007), no entanto, esta citocina mostra ter um papel na suscetibilidade em modelos experimentais da leishmaniose visceral (GOTO E LINDOSO, 2004). Nos humanos, a severidade da LV está relacionada com os aumentos de IL-10 no soro, como também em lesões teciduais (GHALIB, et al., 1993).

No modelo com camundongos e *L. major*, a IL-4 se agrupou com as citocinas que não protegem por três razões: a indução e expansão de células T_H2 estavam claramente associadas com um resultado desfavorável da infecção; a neutralização de IL-4 por anticorpos ou receptor solúvel de IL-4 conferiu proteção e funções inibitórias de macrófagos expressas pela IL-4 se mostraram mais proeminentes do que seus efeitos estimulatórios (BOGNAN et al., 1996). Porém, na leishmaniose visceral, a IL-4 não está envolvida na suscetibilidade (GHALIB et al., 1993; GOTO e LONDOSO, 2004). Stager et al. (2003) afirmaram que a IL-4 tem um papel positivo na imunidade para *L.*

donovani, pois parece regular a deposição do colágeno nos granulomas induzidos por *L. donovani*.

Existe uma forte correlação da TGF- β com o curso da carga parasitária, no qual altos valores desta citocina coincidiam com picos de carga parasitária no baço e no fígado. Esta citocina tem um importante papel no favorecimento da multiplicação do parasito, provavelmente pela desativação da atividade leishmanicida do macrófago e inibição do desenvolvimento da resposta imune do tipo T_H1. Além disto, o TGF- β pode controlar a produção de outras citocinas, tendo um importante papel imunorregulatório na infecção experimental com *L. infantum* (GOMES-PEREIRA et al., 2004; ROLÃO et al., 2007). Gantt et al. (2003) afirmam que níveis de TGF- β são aumentados consideravelmente em camundongos infectados com *L. chagasi*, e também na medula de humanos com leishmaniose visceral aguda.

Uma das consequências imunopatológicas da leishmaniose visceral no homem é a supressão de resposta de células T, principalmente para o antígeno de leishmania (CARVALHO et al., 1981). Estudos sobre imunossupressão em hamsters infectados com *Leishmania chagasi* relatam que a ConA induz resposta linfoproliferativa (GOTO e LINDOSO, 2004), mas há ausência de resposta quando induzida por antígeno de leishmania (MOOKERJEE, et al., 2003; GOTO e LINDOSO, 2004). No entanto, Mookerjee et al. (2003) afirmam que pode haver dano na resposta linfoproliferativa para mitógenos, tais como ConA. De acordo com Rodrigues et al. (1998), o TGF- β produzido por células apresentadoras de antígeno de hamsters infectados com *L. donovani* implicaram na imunossupressão, visto que alto nível de TGF- β foi observado no sobrenadante de cultura de células quando a resposta linfoproliferativa induzida pela leishmania foi inibida.

2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS NA LEISHMANIOSE

De acordo com Requena et al. (2000), o hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) constitui um excelente modelo para análise da infecção experimental causada por cepas viscerotrópicas de leishmania, como a *L. infantum*. Entretanto, o uso deste modelo é limitado, principalmente pela pouca disponibilidade de reagentes para estudos imunológicos. Wilson et al. (2005) afirmam que, apesar da doença no hamster ser mais semelhante à leishmaniose visceral humana progressiva, do que é nos camundongos, este ainda não é um modelo adequado para a doença humana. No entanto, Rodrigues, et al. (1992) afirmam que este modelo desenvolve a doença similar à leishmaniose visceral humana progressiva, com hepatoesplenomegalia, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia.

O camundongo é utilizado nos modelos para estudo da *L. infantum* na América do Norte e tem uma vantagem sobre os outros modelos experimentais, como os de cães e hamsters, pois reagentes imunológicos para camundongos são facilmente acessíveis. Camundongos de linhagens puras estão disponíveis, facilmente obtidos e têm a vantagem de proporcionar homogeneidade genética comparada às raças propostas de cães de laboratório (ROSY PAL et al., 2005).

Modelos murinos têm sido estudados por mais de uma década, com o objetivo de se determinar quais são os fatores do parasito e do hospedeiro que contribuem para o desenvolvimento de suscetibilidade ou resistência durante a infecção com leishmania (LIEW, 1989; SCOTT, 1990). De acordo com Grandoni (2001), a infecção de camundongos com *Leishmania major* é o melhor modelo de imunorregulação que ocorre durante a resposta mediada por célula para patógenos intracelulares. O camundongo da linhagem BALB/c é suscetível a infecção por *L. major*, enquanto as linhagens CBA, C3H, ou C57BL/6 são resistentes. Na infecção com *L. donovani/chagasi/infantum*, a linhagem de camundongos BALB/c também é suscetível (WILSON et al., 2005). Enquanto muitas informações são disponíveis sobre a resposta imune em leishmaniose cutânea experimental, a natureza da imunidade na leishmaniose visceral, que é diferente em muitos aspectos, é pobremente compreendida (GOTO e LINDOSO, 2004).

Em geral, a resposta imune devido à infecção de linhagens de camundongos com espécies de leishmanias viscerotrópicas, tais como *L. donovani* e *L. infantum*, são similares às observadas pela *L. major* em modelos de camundongos. No entanto, camundongos BALB/c não parecem exibir uma suscetibilidade similarmente elevada a estes parasitos, já que a inoculação intravenosa de leishmania viscerotrópica resulta em infecção crônica com auto-cura (GRANDONI, 2001). Além disto, os fenótipos de citocinas liberadas pela leishmania viscerotrópica no modelo de camundongos não são tipicamente de resposta do tipo T_H2 (KAYE et al., 1991).

O modelo da leishmaniose visceral mais estudado utiliza a linhagem de camundongo BALB/c infectado com *L. (L.) donovani* ou *L. (L.) chagasi*. Apesar desta linhagem ser considerada suscetível, a infecção progride durante as duas primeiras até a quarta semana, e então é controlada pela resposta imune do hospedeiro (MURRAY et al., 1987).

A utilização de linhagens isogênicas em infecções experimentais reduz variações genéticas entre indivíduos do mesmo grupo experimental (ROLÃO et al., 2004). O resultado da infecção experimental depende da imunidade do hospedeiro, da virulência da cepa, do número de parasitos inoculados (TITUS e RIBEIRO, 1988) e da via de inoculação (ROLÃO et al., 2004).

2.4.1 INFECÇÃO NA LEISHMANIOSE VISCERAL

De acordo com Rolão et al. (2004), a inoculação intraperitoneal de *Leishmania infantum* em camundongos BALB/c resultou em alta homogeneidade da infecção, sugerindo assim que esta via deveria ser preferencialmente usada em infecções experimentais que se utilizam deste modelo, particularmente quando *pools* de amostras são requeridos, em estudos da imunidade celular. A inoculação intravesosa também produziu a infecção progressiva em camundongos, mas os autores observaram alta dispersão de valores na carga parasitária dos animais.

A inoculação de espécies de leishmanias viscerotrópicas via cutânea não desenvolve a forma visceral da doença (MELBY et al., 1998). Por outro lado, Ahmed et al. (2003) mostraram que a infecção intradérmica com 10⁷ parasitos permitiu a progressão da doença visceral, porém com evolução e subsequente resposta imune menores que na infecção intravenosa, com alta

dose infectante, como é amplamente utilizado em modelos murinos de LV. Rosypal et al. (2005) também afirmaram que a infecção pela via intravenosa é superior à via subcutânea em modelos murinos nas leishmanioses da América do Norte. A inoculação intravenosa é mais difícil de ser realizada em pequenos animais, como nos camundongos, podendo ocorrer perda de parte do inóculo em tecidos adjacentes. A maioria dos estudos com LV utiliza 10^7 parasitos por camundongo e a aplicação de doses diferentes pode dificultar a comparação dos resultados (ROLÃO et al., 2004).

Camundongos inoculados com número reduzido de parasitos produzem citocinas do tipo T_H1 (MATTNER et al., 1997), enquanto que camundongos inoculados com maior número produzem citocinas tipo T_H2 (MENON e BRETSCHER, 1996). Se os animais dos quais se obteve o *pool* dos órgãos são inoculados com número variável de parasitos, eles podem desenvolver respostas diferentes, e ambos os tipos de citocinas podem ser detectadas. Isto pode ser interpretado incorretamente como uma mistura de resposta imune do tipo T_H1 e T_H2 e, desta forma, a avaliação dos resultados obtidos pode não refletir exatamente a resposta individual de cada animal (ROLÃO, 2004).

De acordo com Mbatí (1995), a dose intraperitoneal de 10^8 promastigotas de *L. donovani* é recomendada para o estabelecimento da infecção experimental de LV, em camundongos. A dose de 10^6 resulta em carga parasitária variável e doses maiores, como 10^{11} , resultam na morte de camundongos BALB/c. Desta forma, devido à diferença dos parasitos e da linhagem dos animais, é recomendável que cada laboratório determine a sua dose infectante ótima individual, bem como a via de administração.

Riça-Capela et al. (2003) infectaram hamsters, sendo que um grupo foi com promastigotas de *Leishmania infantum* e outro com amastigotas e observaram que o período de incubação foi mais longo quando utilizaram promastigotas.

2.4.2 CITOCINAS E CARGA PARASITÁRIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Murray et al. (1987) observaram que durante as quatro primeiras semanas da infecção visceral progressiva com *L. donovani*, as células do baço de camundongos BALB/c falharam na resposta para o antígeno de leishmania na produção de linfocinas derivadas de células T ativadas (IL-2 ou IFN- γ). Quatro semanas após a infecção, entretanto, a secreção de IL-2 e IFN- γ induzida por antígeno surge e coincide com o início do controle da replicação e subsequente morte de mais de 80% da *L. donovani* intra-hepática, provavelmente devido à ativação dos macrófagos. Esta atividade imunossecradora se correlaciona com a resposta do tecido hepático, onde as células de Kupffer estão parasitadas. Esta resposta progrediu da fusão das células de Kupffer (primeira semana) mais a fusão de células mononucleares infiltradas (segunda semana) com a formação do granuloma bem organizado (da quarta a oitava semanas). Observaram também que o fracasso inicial na produção de IFN- γ induzida por antígeno mostrou-se ser relativamente específico, pois a produção de IFN- γ estimulada por ConA não somente permaneceu intacta, mas aumentou durante a infecção.

Miralles et al. (1994) examinaram tecido hepático infectado, pela expressão de genes de citocinas associadas com T_H1 (IFN- γ e IL-2) e células T_H 2 (IL-4 e IL-10), em camundongos infectados com amastigotas de *L. donovani*. Nas quatro primeiras semanas, a carga parasitária no fígado de camundongos (nu/+) aumentou, mas a seguir, com o desenvolvimento da resistência adquirida, declinou para níveis baixos. Detectaram, pelo *Northern blot*, a presença de mRNA IFN- γ no fígado. Por meio do RT-PCR qualitativo detectaram a presença de mRNA de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, sugerindo, assim, a indução de mRNA de citocinas relacionadas tanto com T_H1 como T_H2. Com a detecção de mRNA IFN- γ pelo do *Northern blot*, sugeriram que a infecção induziu, no fígado, uma resposta preferencialmente tipo T_H1. Afirmaram que, em camundongos capazes de controlar a infecção pela *L. donovani*, a resposta T_H2 é insuficiente para influenciar no resultado, ou mais provavelmente é camuflada pela resposta de células T_H1.

Melby et al. (1998) investigando a resposta imune na infecção cutânea ou visceral com *L. dononani* em modelo murino (BALB/c), observaram que

camundongos infectados via cutânea, não desenvolvem parasitismo visceral detectável, no entanto, a inoculação intravenosa resultou em hepatoesplenomegalia e aumento da carga parasitária visceral. As células do baço de camundongos com infecção cutânea localmente controlada revelaram uma forte resposta de proliferação parasito específica e IFN- γ , mas as células do baço na infecção sistêmica não responderam ao parasito. A expressão local de IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 e mRNA iNOS (NO sintase) foi determinada no baço, linfonodos e no ponto da inoculação cutânea. A infecção cutânea localmente controlada associou-se com a melhor resposta específica ao antígeno das células do baço e aumento marcante do nível de IFN- γ , IL-12 e mRNA iNOS nos linfonodos. O parasitismo esplênico progressivo associou-se com a resposta inicial de IL-4, e com aumento acentuado de IL-10.

Rousseau et al. (1998) relataram que a administração prolongada de dexametasona (DXM) induz uma reativação limitada da leishmaniose visceral murina, com um padrão não claro de citocinas T_H1 e T_H2 reduzindo a produção das citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4 e TNF- α em camundongos BALB/c infectados cronicamente. A capacidade das células do baço em produzirem citocinas *in vitro* parece depender do tempo decorrido após a última aplicação de DXM, sugerindo uma recuperação parcial das células do baço, sensíveis à DXM. Observaram também que a carga parasitária dos camundongos tratados com DXM na fase crônica da infecção com *L. infantum* aumentou apenas no baço, não havendo reativação da leishmania. Nos animais tratados com dexametasona fosfato de sódio por via subcutânea, três vezes por semana (2 mg/kg) a contagem de CD4, CD8 e CD3 mostrou números reduzidos a aproximadamente 80% no 31º dia de tratamento, em comparação com os não infectados e não tratados.

Honoré et al. (1998) monitoraram a infecção com diferentes cepas de *L. infantum*, mensurando a carga parasitária pela técnica de microtitulação no baço e no fígado de camundongos BALB/c e C57B1/6 nos dias 9, 22, 44 e 87 pós-infecção. Os autores relataram que perfis similares para as diferentes cepas foram observados nas duas linhagens de camundongos, sugerindo a predominância do papel da cepa de leishmania no processo de visceralização. Observaram que nas cepas classificadas como “visceralizantes” (persistência

de carga parasitária elevada no baço e no fígado), a infecção estabilizou-se com três semanas, com carga parasitária alta no baço e fígado. Depois do dia 22, a carga parasitária hepática estagnou ou houve redução, considerando-se que o número de parasitos continuou a aumentar no baço até pelo menos o dia 44 e permanecendo superior ao fígado até o dia 87, tanto no BALB/c quanto no C57B1/6. Nas cepas classificadas como “regulatórias” (carga parasitária declina depois do dia 22) após o estabelecimento da infecção, a carga parasitária declinou rapidamente no dia 22 tanto no baço quanto no fígado, com contagem baixa ou indetectável no dia 87. Até o dia 22, a carga parasitária do fígado para ambas as cepas foi maior que a do baço.

Gangneux et al. (1999) avaliaram o efeito da terapia imunossupressora no curso da infecção por *Leishmania infantum* no modelo murino por meio da imunofenotipagem das células do baço, carga parasitária dos tecidos e produção de citocinas (IL-4 e IFN- γ). Utilizaram promastigotas de *L. infantum*, isoladas de pacientes com aids, para infectar via intravenosa (dia 0) um grupo controle sem tratamento, e dois grupos de camundongos BALB/c, sendo que ambos foram tratados a partir do dia 10 até 40º dia, um grupo com acetado de hidrocortisona (HA) e o outro com dexametasona (DXM) e pentoxifilina (PTX). A carga parasitária do baço e fígado, imunofenotipagem e dosagem das citocinas foram realizadas no dia 65. Os autores observaram que com a administração do HA houve aumento da carga parasitária no baço em comparação ao grupo controle, mas ela não se alterou no fígado. Por outro lado, nos camundongos tratados com DXM+PTX, houve aumento significativo no baço e fígado, em relação ao grupo controle. Nos dois grupos, a porcentagem de células do baço CD4 e CD8 não revelou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. A análise da produção de citocinas após a terapia imunossupressora mostrou decréscimo na produção de IFN- γ no sobrenadante da cultura de células, em comparação ao controle. O nível de IL-4 não diferiu entre os três grupos. Verificaram ainda que o aumento da carga parasitária não estava associado com o imunofenotipo de células específicas do baço ou perfil de secreção de citocinas T_H1 e T_H2.

Melby et al. (2001), para entenderem melhor o mecanismo relacionado ao controle da infecção por *L. donovani*, estudaram a evolução e a resposta imune celular esplênica em modelo murino (Balb/c), que é o mais

representativo da infecção subclínica humana. Para tanto, analisaram a produção *in situ* de IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ e TGF- β por imunistoquímica. Observaram que, após a inoculação sistêmica de *L. donovani*, os parasitos se localizaram primariamente, em grande quantidade, nos macrófagos esplênicos da polpa vermelha. No início do curso da infecção, observaram que a produção de IL-10 na zona marginal e a produção de TGF- β por células da polpa vermelha foram mais intensas. Estas citocinas inibidoras de macrófagos podem contribuir para estabelecimento da infecção e a replicação inicial do parasito. No 28^o dia da infecção, quando a carga parasitária no baço e fígado começou a declinar, o número de células do baço produtoras de IL-10 iniciava o retorno para níveis basais, mas a produção de IFN- γ era alta e o número de células produtoras de IL-12 foi aumentando drasticamente. Além disto, as células T e células dendríticas migraram para o folículo linfóide e zona marginal da polpa vermelha, onde os parasitos estavam localizados. Estes achados sugerem que o controle da infecção está associado com a produção de IFN- γ e IL-12, e a migração de células T e dendríticas para o local do parasitismo crônico.

Murphy et al. (2001) examinaram o papel da IL-10 na resistência durante a infecção por *L. donovani*. O curso da infecção foi examinado em camundongos BALB/c e C57BL/6 que não apresentavam o gene da IL-10 e estes animais foram resistentes a infecção, de acordo com a carga parasitária do fígado que foi dez vezes menor que no grupo controle, após 14 dias de infecção. Uma maior resistência foi acompanhada pelo aumento da produção de IFN- γ e óxido nítrico nos camundongos BALB/cIL-10^{-/-}. A suscetibilidade nos camundongos BALB/cIL-10^{-/-} infectados foi maior após tratamento *in vivo* com anticorpos neutralizantes para IFN- γ ou IL-12. Estes estudos demonstram que inicialmente a IL-10 é um componente crítico na resposta imune que inibe a resistência para *L. donovani*. Além disso, sugere-se que a IL-10, uma citocina supressora de muitos efeitos microbicidas dos macrófagos, contribui para a patogênese da leishmaniose visceral.

Murray et al. (2003) observaram que tratamentos com anticorpos monoclonais anti-receptores para IL-10 (IL-10R) induziram morte dos parasitos intracelulares por macrófagos do fígado de camundongos normais infectados com *L. donovani*. O bloqueio do receptor de IL-10 mantido pela

proteína 40 da IL-12 aumentou consideravelmente o nível de IFN- γ no soro. Como propiciado pelo bloqueio da IL-10R, a IL-10 endógena, primariamente regula a morte da *L. donovani* na infecção, pela supressão da produção assim como da resposta de citocinas do tipo T_H1(IL-12 e IFN- γ).

Engwerd et al. (2004) pesquisaram a carga parasitária no fígado e no baço de camundongos infectados com amastigotas de *L. donovani*. No fígado, o aumento das amastigotas foi evidente nos primeiros momentos pós-inoculação (p.i.), mas foi controlado por volta do dia 28 p.i. com a resposta do tecido com granulomas maduros. No entanto, após a fase aguda, em que a replicação das amastigotas não é evidente, o baço mostra uma exagerada esplenomegalia, perda da microarquitetura e persistência da presença de amastigotas.

Rolão et al. (2007) caracterizaram o curso da infecção e resposta imunológica desenvolvida pela *L. infantum* em camundongos BALB/c infectados. A carga parasitária foi determinada por PCR em tempo real enquanto a produção de citocinas e imunoglobulinas foi avaliada pelo ELISA. O DNA da leishmania foi detectado no baço e no fígado logo no primeiro dia pós-inoculação e este parasitismo foi sustentado até o fim do experimento. A cinética das citocinas no baço e no fígado estava geralmente associada com a oscilação da carga parasitária, e foi uma particularidade evidenciada nas células não estimuladas. Não foi observado padrão distinto de produção de citocinas T_H1 e T_H2. Os camundongos infectados desenvolveram uma resposta imune mista, com produção concomitante de IFN- γ , IL-4 e IL-10, no baço e no fígado e ambos os tipos de IgG (IgG1 e IgG2a). Os resultados sugerem que, comparado com o fígado, o baço é mais suscetível à infecção com *L. infantum*.

2.5 CORTICOSTERÓIDE

Os corticóides são hormônios de natureza esteroideal produzidos na porção cortical das glândulas adrenais e constituem três famílias: os glicocorticóides, os mineralocorticóides e os andrógenos adrenais (SPINOSA et al 2002). O efeito anti-inflamatório e imunossupressor dos glicocorticóides ocorre devido às seguintes ações: interferem na circulação das células imunes, diminuindo o número de linfócitos periféricos, principalmente linfócitos T e

inibem o acúmulo de neutrófilos no local da inflamação; promovem apoptose das células linfóides; inibem a síntese de citocinas; modulam direta e indiretamente a função das células B; inibem a resposta dos monócitos ao fator de estimulação de colônias e sua diferenciação em macrófagos, também inibindo as suas funções fagocíticas e citotóxicas; inibem o movimento de células e fluídos a partir do compartimento intravascular e inibem a ação da histamina, a síntese das prostaglandinas e a ação dos ativadores do plasminogênio (FINAMOR et al. 2002).

Os glicocorticóides, conhecidos como hormônios do estresse, geralmente suprimem a resposta inflamatória, como também a imunidade específica (MOYNIHAN et al., 1998). O acetato de hidrocortisona e a dexametasona são drogas anti-inflamatórias imunossupressoras utilizadas em amplo espectro em doenças humanas e animais. Estas drogas utilizadas isoladamente ou em combinações, têm vários efeitos imunossupressores e podem alterar o curso da infecção do *Toxoplasma gondii* e da *Leishmania* spp (GANGNEUXS et al 1999), mas seu efeito no perfil T_H1 e T_H2 não é claro (ROUSSEAU et al 1998). A dexametasona inibe vários aspectos da imunidade citomediada, incluindo linfoproliferação induzida por mitógeno e antígeno assim como diminuição da produção de citocinas, incluindo IL-2 e IFN- γ (BAUS et al., 1996).

De acordo com Elenkov (2004) os glicocorticóides causam imunossupressão seletiva da imunidade celular T_H1 e uma mudança em direção à imunidade humoral mediada por T_H2 . Franchimont et al. (1998) investigando o efeito da DXM no perfil da secreção de citocinas em culturas de células totais do sangue de pacientes saudáveis observaram que a dexametasona inibiu a secreção de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ , no entanto, esta inibição foi mais evidente em citocinas do tipo 1 do que do tipo 2. Estes autores concluíram que os glicocorticóides podem induzir a mudança de secreção de citocinas do perfil T_H1 para o perfil T_H2 . Esta alteração no balanço da produção de citocinas do tipo T_H1 e T_H2 poderia ser esperada por ter consequências para finalizar as funções imunes efectoras, resultando em aumento da resposta imune humoral e ainda supressão da resposta imune mediada por células (MOYNIHAN et al., 1998).

Moynihan et al. (1998) usando um modelo experimental sem infecção sugeriu que o glicocorticóide poderia regular diferencialmente a produção de citocina T_H1 versus T_H2 . Observaram que a dexametasona suprimiu a produção de IL-2, IL-4 e IFN- γ . Krouwels et al. (1996) observaram que a produção de IFN- γ foi significativamente menos inibida que a produção de IL-4 e IL-5, favorecendo o perfil T_H1 . De acordo com Ramierz et al. (1996) glicocorticóides favorecem a produção de citocinas do tipo T_H2 . Daynes et al. (1989) mostraram que baixas concentrações de dexametasona são capazes de aumentar a produção de IL-4 por linfócitos.

Lebrec et al. (1994) avaliaram o efeito imunossupressor de várias drogas, utilizando protocolos padronizados desenvolvidos por embasamento imunotoxicológico. No estudo foram utilizadas drogas sem efeito imunossupressor (amoxicilina, cimetidina, etc) em um grupo controle e no outro grupo, drogas com efeitos imunossupressores, sendo que uma destas foi a dexametasona. Foram avaliadas a imunopatologia, a função imune e a resistência do hospedeiro para *Listeria monocytogenes* após 28 dias de aplicação destas em camundongos B6C3F1 (C57B1 X C3H/HeJ). A dexametasona foi diluída em 0,1% de solução de etanol e administrada por via oral nas doses de 0,02; 0,1; 0,5 mg/Kg/dia. Observaram que quase todos os parâmetros da imunidade citomediada foram afetados no caso do tratamento com dexametasona e que esta foi a droga imunossupressora mais potente em relação às modificações de parâmetros imunopatológicos. Os pesos dos baços foram de 94,4; 71,6 e 46,2 nas doses de 0,02; 0,1 e 0,5 mg/Kg/dia, respectivamente.

Kunicka et al. (1993) estudaram o efeito da administração intraperitoneal da dexametasona em camundongos BALB/c, na proliferação de linfócitos induzida por anti-CD3 e na produção de linfocinas. Os resultados apontaram secreção de linfocinas induzidas por doses ótimas de anti-CD3 *in vitro* foi diferencialmente afetada pelo tratamento *in vivo* com dexametasona. Os níveis de IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ foram decrescentes com o tratamento com a dose mais baixa de DXM (30mg/Kg), enquanto doses altas foram requeridas para inibir a produção de IL-2, IL-3 e TNF. Observaram que, embora a administração de uma única dose de DXM (30mg/Kg por 4 horas) resultasse

em uma significativa supressão da produção de linfocinas e da proliferação de células, que precede uma significativa perda de células, a DXM poderia ser usada como um modelo reversível de imunossupressão.

Miller et al. (2007) caracterizaram a imunossupressão e recuperação por dexametasona 21-fosfato com cloreto de tetraciclina fornecidos pela água, utilizando camundongos C57BL/6 para a produção de oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Estes autores concluíram que a imunossupressão por DXM em camundongos é um estado complexo associado com a depressão dos linfócitos CD4 e uma pronunciada elevação de neutrófilos maduros. A contagem de CD8 inicialmente apresentou um decréscimo, mas após a décima primeira dose de DXM, pode-se observar um aumento gradual destas células, mesmo na presença de dexametasona. A generalizada linfopenia e a intensa diminuição nos tamanhos do baço e timo encontradas, demonstram o efeito sistêmico da dexametasona.

Enquanto são disponíveis informações sobre a resposta imune na leishmaniose cutânea experimental, a natureza da imunidade na leishmaniose visceral, que é diferente em muitos aspectos, é pobremente compreendida (GOTO e LINDOSO, 2004). Com a atual relevância das complicações na leishmaniose visceral em hospedeiros imunossuprimidos, é de extrema importância conhecer o comportamento imunológico nesta situação para que se possa minimizar as conseqüências da infecção, seja pelos tratamentos quimioterápicos ou pela utilização de citocinas exógenas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar aspectos da imunopatologia ligados á infecção com a *L. chagasi* em camundongos BALB/c imunossuprimidos com dexametasona

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o efeito da imunossupressão por dexametasona no peso corpóreo e no baço dos camundongos
- 2) Avaliar o efeito da imunossupressão com dexametasona na porcentagem de células TCD4 e TCD8 no sangue de camundongos
- 3) Avaliar a produção de citocinas em grupos de camundongos BALB/c imunossuprimidos com dexametasona e infectados ou não com *L. chagasi*
- 4) Avaliar os efeitos da imunossupressão pela dexametasona na carga parasitária em baço e fígado de camundongos infectados com *L. chagasi*

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Trabalho aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da FMVZ-UNESP-Botucatu.

4.1 Animais utilizados

Foram utilizados 89 camundongos machos com cinco semanas de idade, da linhagem BALB/c, adquiridos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica –CEMIB – UNICAMP – Campinas/SP. Estes foram mantidos em caixas de polipropileno com ração comercial sob a forma de pellets e água *ad libitum*. Estas caixas ficaram em estante ventilada ALESCO modelo ALE 99002-001 com “no break” localizada em sala adequada com janelas e portas teladas com malha de nylon fina, no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP-Botucatu-SP.

4.2 Parasito

Foram utilizadas formas amastigotas de *Leishmania chagasi* cepa M6445, fornecida pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – Faculdade de Medicina da USP. A cepa foi mantida em hamster Sírio Dourado (*Mesocricetus auratus*), criados no Núcleo de Pesquisa em Zoonoses da FMVZ-UNESP-Botucatu/SP, com passagem da cepa realizada a cada dois meses.

4.3 Grupos de animais

- **GRUPO I:** 21 camundongos BALB/c normais
- **GRUPO II:** 23 camundongos BALB/c imunossuprimidos com dexametasona até momento 0
- **GRUPO III:** 22 camundongos infectados com *L. chagasi* no momento 0
- **GRUPO IV:** 23 camundongos imunossuprimidos (dexametasona) até o momento 0 e infectados com *L. chagasi* no momento 0

4.3.1 Imunossupressão

Os grupos II e IV foram imunossuprimidos com 6,65 mg/kg de dexametasona fostato de sódio¹ intraperitoneal uma vez ao dia durante 22 dias (BUFFET et al., 1995). Os grupos I e III foram inoculados com “água de injeção” pela mesma via e frequência determinadas no protocolo de imunossupressão. No momento 0 do experimento, a imunossupressão foi suspendida nos grupos II e IV e realizou-se a infecção dos grupos III e IV. Nos momentos 0, 3, 7, 14 e 21 foram sacrificados quatro animais de cada grupo, totalizando 16 animais por dia. Todos os animais foram pesados na véspera do início da imunossupressão e dos momentos de eutanásias. Durante a coleta dos materiais dos animais sacrificados os baços foram pesados. Durante o período da imunossupressão, morreram dois animais do grupo I, quatro do grupo II, um do grupo III e três do grupo IV.

4.3.2 Infecção experimental

O protocolo de infecção dos grupos III e IV foi realizado de acordo com Stauber (1958). Amastigotas de *L. chagasi* (cepa M6445) foram obtidas a partir do baço de hamster dourado infectado, por meio de centrifugação diferencial. A capela de fluxo laminar foi esterilizada, bem como todo o material utilizado: pinças, tesouras, lâminas, tubos Falcon, macerador de órgãos, etc. O hamster foi sacrificado ao redor de dois meses e meio após a infecção. A seguir foi mergulhado e lavado em um banho de álcool iodado e levado para a capela do fluxo. Com o auxílio de pinças e tesouras estéreis, o baço foi acessado pelo flanco dorsal esquerdo, retirado e acondicionado em uma placa de Petri estéril, previamente pesada. A placa foi pesada novamente, para proceder-se o cálculo do seu peso. Com um fragmento do baço, realizou-se “imprint” em lâmina que foi então corada pela técnica rápida descrita como Panótico. A seguir, o mesmo foi retirado da placa e acondicionado em tubo tipo Falcon com 5 mL de solução salina estéril, e mantido em um béquer com gelo até o final do procedimento. A contagem do número de formas amastigotas presentes foi realizada de acordo com a fórmula:

$$N^0 \text{ de amastigotas no baço} = n^0 \text{ amastigotas} / 100 \text{ cél. nucleadas} \times \text{peso do baço (mg)} \times 2 \times 10^5$$

¹ Decadron – Aché Laboratórios Farmacêuticos

O baço foi macerado em 5 mL de solução salina em macerador apropriado, até a obtenção de uma solução homogênea que foi transferida para um tubo Falcon de 15ml, centrifugada durante 10 minutos, a 400 RPM, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon de 15 mL, centrifugando-se por 10 minutos, a 2800 RPM, a 4°C. Desta vez, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” foi ressuspensão no volume necessário para a obtenção de 10^8 amastigotas/ml de acordo com cálculos a seguir:

N^0 de amastigotas no baço/volume que será diluído = n^0 amastigotas/mL.

A dose infectante utilizada foi de 10^7 amastigotas. Fixou-se o volume de 100µl, que é pertinente ao tamanho dos animais e à via proposta, que foi a intravenosa, no seio infra-orbitário. Os animais foram anestesiados com Ketamina² / Xilazina³, na dose 100mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente, por via intramuscular de acordo com Curl et al. (1983).

4.4. Citometria de Fluxo

No momento 0, antes da infecção, foi coletado sangue dos animais imunossuprimidos (II e IV) e normais (I e III) pelo seio infra-orbitário e as amostras foram processadas para a realização da citometria de fluxo com a finalidade de se avaliar a imunossupressão realizada previamente. Pipetou-se 100µL do sangue homogeneizado em tubo próprio para a leitura e então foram acrescentados o anticorpo CD4 anti-camundongo conjugado com FITC (Pharmigen® rat IgG2a, H129,19) e anticorpo CD8 anti-camundongo conjugado com PE (Pharmigen® rat IgG2a, 53-6.7) (Rousseau et al, 1998) para marcação das células CD4 e CD8. As amostras foram mantidas durante 30 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. Após este período, acrescentou-se o tampão de lise de hemácias (BD Biosciences®) e após 15 minutos as amostras foram processadas no aparelho BDFACS - Calibur, no Laboratório de Citometria de Fluxo localizado no Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/SP.

² Cetamin – Lab. Syntec do Brasil, Campinas/SP

³ Anasedan – Vetbrands Saúde Animal, Jacareí/SP.

4. 5. Determinação da carga parasitária

A carga parasitária foi quantificada pela técnica de microtitulação em cultura. Foram utilizados fragmentos de baço e fígado, pesados, e a seguir macerados com pistilo em cadinho com 4 mL de meio *drosophila* de Schneider, suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado e com penicilina/estreptomicina 10000UI/mL e 10mg/mL, respectivamente (Cultilab®). Sob condições estéreis, foram preparadas placas de microtitulação com 96 poços, sendo que em cada poço foram pipetados 225µL de meio de cultura, exceto na coluna número um, na qual foram pipetados 300µL da suspensão de células do baço e do fígado. Cada amostra foi processada em quadruplicata.

Na sequência foram adicionados 75 µL sobre os 225µL já existentes, diluindo o macerado em sucessivas passagens na base 4, variando de 4 a 1/4.194.304 . As placas foram incubadas por oito dias, em estufa bacteriológica a 28°C e a leitura foi realizada em microscópio invertido, com aumento de 200x. A escolha do intervalo de oito dias foi para a padronização do cronograma de leituras das placas, pois após 14 dias a qualidade nutricional do meio está bastante comprometida, e as promastigotas podem morrer, inviabilizando a leitura.

A presença de pelo menos um parasito no poço analisado determina a positividade, e, por conseguinte, o valor que foi utilizado para se calcular a média geométrica utilizada na fórmula para a quantificação da carga parasitária, de acordo com Buffet et al. (1995).

4. 6 Dosagem de citocinas

4.6.1 Obtenção de sobrenadante de cultura de células esplênicas.

Aproximadamente metade do baço dos camundongos foi retirado, colocado em placas de Petri estéreis de 20 x 100mm contendo 4mL de meio de cultura de células RPMI1640, e macerado com a ajuda de uma peneira de *nylon* e pistilo. O material foi recolhido e centrifugado em tubos tipo falcon de 15mL, durante 10 minutos, a 1500 RPM. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o botão celular desprendido e homogeneizado com 1mL de meio completo de RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina(10000UI/mL)/estreptomicina (10mg/mL) e enriquecido com L-Glutamina a 1%. A concentração final foi ajustada para 5x10⁶ células/mL, após

a contagem em câmara Neubauer com o líquido de Turk. A seguir, 900 µL dessa suspensão foram distribuídos em placas de microcultura de 48 poços com fundo chato. Essas células foram cultivadas com mais 100 µL de meio completo ou com 100 µL dos estímulos diluídos (10µg/mL de mitógeno Concanavalina-A e 10µg/mL de antígeno sonicado de *Leishmania chagasi*). Estas culturas foram incubadas em estufa com temperatura controlada a 37°C em tensão de 5% de CO₂, por 48 horas para, então, realizar a colheita do sobrenadante, que foi armazenado e congelado em frascos de criopreservação em freezer a -80°C para posterior dosagem das citocinas.

O estímulo específico com *L. chagasi* foi obtido a partir de cultura de promastigotas em meio Schneider. Esta cultura foi centrifugada a 3000 rpm, lavada três vezes com solução salina e ressuspendida em 10 mL de solução salina. Foi sonicada por 6 ciclos, a 4 ° C, 50% durante 30" no sonicador do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu-SP, e a dosagem da proteína foi realizada com o método de Lowry (1951) no Departamento de Bioquímica.

4.6.2 Determinação de citocinas pelo método de ELISA sanduíche

Os níveis de IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-10 dos camundongos foram detectados em sobrenadantes de culturas de células esplênicas com ou sem estímulo pelo método de ELISA, realizado acordo com a orientação do fabricante (R&D Systems®).

Para realização do ELISA sanduíche, a placa de 96 poços foi sensibilizada com o anticorpo de captura, em seguida, ela foi bloqueada para posteriormente adicionar a amostra que foi testada. Acrescentou-se o anticorpo de detecção, a enzima, o substrato e o ácido para parar a reação. A quantificação da citocina em questão foi realizada em um programa estatístico (Prism®) de acordo com a leitura da curva utilizada nas placas como controle.

4.6.3 Análise estatística

Foi utilizada a Análise de Variância para analisar as diferenças entre os grupos na dosagem das citocinas e peso dos camundongos; o teste t de Student para indicar diferenças na porcentagem de células CD4 e CD8 e da carga parasitária no baço e fígado; o teste de Tukey para indicar a diferença

nos pesos dos baços entre os grupos e a Análise de Variância Fatorial para demonstrar interação entre infecção e imunossupressão (TRIOLA, 2005).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os resultados apresentados são de um experimento, representativo de dois realizados.

5.1 Peso dos camundongos

Os animais de todos os grupos foram pesados na véspera da imunossupressão e nos momentos de eutanásia. De acordo com a Tabela 1, no início do experimento todos os grupos não apresentaram diferença significativa no peso inicial. No final da imunossupressão, momento -1, as médias dos pesos dos camundongos dos grupos II (imunossuprimidos até o momento 0) e IV (imunossuprimido até o momento 0 e infectado) foram significativamente menores que os grupos não imunossuprimidos (I e III). No momento 2, apenas o grupo II diferiu estatisticamente dos outros. Nos momentos 6 e 13, os grupos II e IV não foram diferentes estatisticamente entre si, mas significativamente inferiores ao grupo III (infectado). Na véspera do último dia de eutanásia (20) as médias dos pesos dos camundongos de todos os grupos não apresentaram diferença estatística. Na Figura 1 é possível observar que os grupos II e IV (imunossuprimidos até o momento 0) se comportaram de maneira semelhante e isto se repetiu com os grupos I e III (não imunossuprimidos).

TABELA 1. Peso (g) dos camundongos Balb/c na véspera da imunossupressão realizada com dexametasona (6,65mg/Kg/dia IP durante 22 dias) e dos momentos de eutanásia (-1,2,6,13 e 20) segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) representado pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.

Momento	I	II	III	IV
Véspera da imunossupressão	21,71 ^a \pm 0,26	21,52 ^a \pm 0,30	22,13 ^a \pm 0,16	22,20 ^a \pm 0,24
-1	24,58 ^b \pm 0,28	20,17 ^a \pm 0,28	25,35 ^b \pm 0,28	20,66 ^a \pm 0,25
2	24,29 ^b \pm 0,26	20,89 ^a \pm 0,28	25,21 ^b \pm 0,34	21,38 ^b \pm 0,36
6	24,69 ^{bc} \pm 0,24	23,22 ^a \pm 0,46	25,92 ^c \pm 0,44	23,36 ^{ab} \pm 0,33
13	25,75 ^{ab} \pm 0,46	24,34 ^a \pm 0,62	26,70 ^b \pm 0,52	24,39 ^a \pm 0,38
20	26,35 ^a \pm 0,76	25,70 ^a \pm 1,11	27,60 ^a \pm 1,03	26,33 ^a \pm 0,52

Estatística: Valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pela Análise de Variância, considerando $\alpha=0,05$.

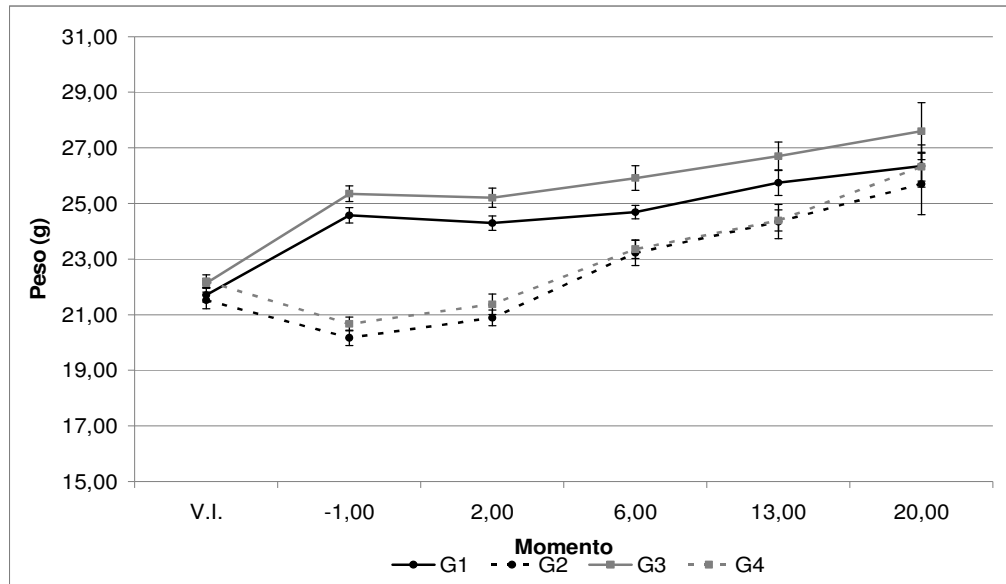


FIGURA 1. Peso (g) dos camundongos Balb/c na véspera da imunossupressão (V.I.) realizada com dexametasona (6,65 mg/Kg/dia IP durante 22 dias) e dos momentos de eutanásia (-1, 2, 6, 13, 20) segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0). Botucatu-SP, 2008.

5.2 Peso dos baços

Quanto ao peso dos baços, no momento 0, as médias dos grupos II e IV (imunossuprimidos até o momento 0) foram significativamente menores que as médias dos grupos I e III, que não foram imunossuprimidos (Tabela 2). No momento 3, o único grupo diferente estatisticamente foi o grupo III que foi infectado no momento 0. No momento 7, os grupos III (infectado) e IV (imunossuprimido infectado) não apresentaram diferença estatística, no entanto, o grupo II apresentou valor significativamente menor que os outros grupos. Nos momentos 14 e 21, os valores para o grupo II não apresentaram diferença estatística do I (normal), mas estes foram diferentes dos infectados (III e IV). Na Figura 2 é possível observar que os pesos dos baços dos grupos II e IV aumentaram, no entanto, os grupos infectados (III e IV) apresentaram pesos maiores.

TABELA 2. Peso (mg) dos baços dos camundongos Balb/c nos momentos de eutanásia (0, 3, 7, 14 e 21) segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) representado pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.

Momento	I	II	III	IV
0	119,00 ^b \pm 10,42	31,50 ^a \pm 4,87	110,25 ^b \pm 4,09	27,00 ^a \pm 1,22
3	101,75 ^a \pm 3,66	70,75 ^a \pm 4,77	187,00 ^b \pm 11,11	114,25 ^a \pm 18,22
7	113,33 ^b \pm 1,76	78,00 ^a \pm 2,42	165,75 ^c \pm 8,41	157,50 ^c \pm 8,97
14	111,75 ^a \pm 7,16	97,50 ^a \pm 8,67	187,00 ^b \pm 6,24	174,75 ^b \pm 4,91
21	128,75 ^a \pm 6,22	116,50 ^a \pm 2,02	199,25 ^b \pm 8,71	219,50 ^b \pm 26,60

Estatística: Para cada momento, médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey; a Análise de Variância Fatorial não demonstrou interação entre infecção e imunossupressão.

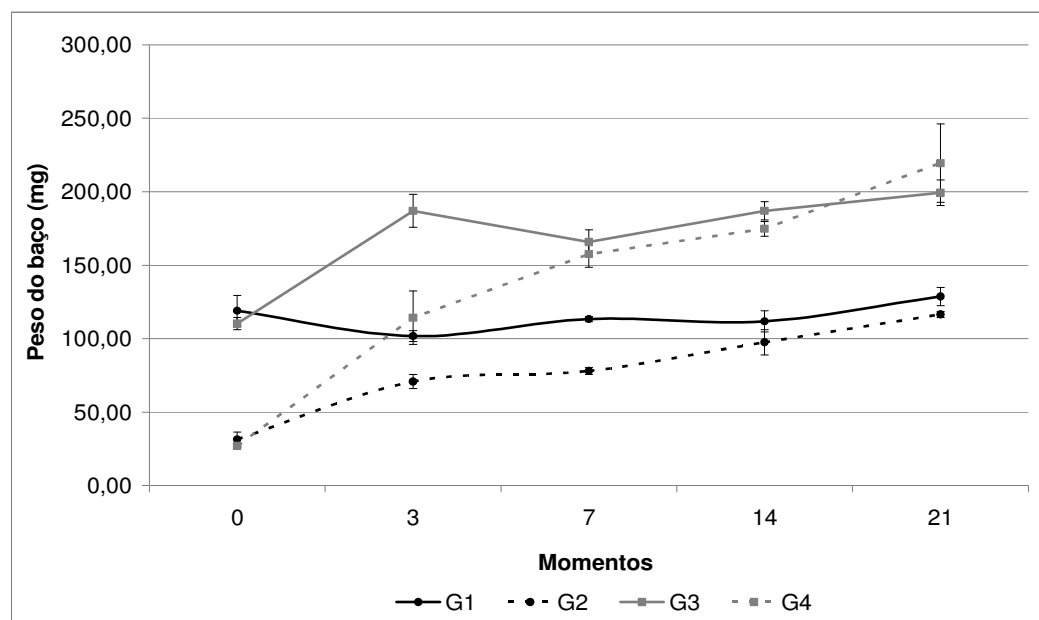


FIGURA 2. Peso (mg) dos baços dos camundongos Balb/c nos momentos de eutanásia (0, 3, 7, 14 e 21) segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0). Botucatu-SP, 2008.

5.3 Porcentagem de células CD4 e CD8 no sangue dos camundongos

Nas Tabelas 3 e 4 pode-se observar que no momento 0, as médias das porcentagens de células CD8 e CD4 no sangue dos animais imunossuprimidos apresentaram diferenças estatísticas e foram superiores e inferiores, respectivamente, quando comparadas com as médias dos animais normais (Figura 3). Na Tabela 5 é possível observar que a relação CD4/CD8 é significativamente menor no grupo imunossuprimido quando comparado com o grupo normal (Figura 4).

TABELA 3. Porcentagem de CD8 no sangue de animais normais (grupos I e III) e imunossuprimidos (grupos II e IV) no momento 0 representada pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.

Grupo	Média \pm erro-padrão da média
Normais	9,53 ^a \pm 0,45
Imunossuprimidos	15,10 ^b \pm 0,91
Estatística: médias seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste t de Student (t=4,7190; p=0,0002).	

TABELA 4. Porcentagem de CD4 no sangue de animais normais (grupos I e III) e imunossuprimidos (grupos II e IV) no momento 0 representada pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.

Grupo	Média \pm erro-padrão da média
Normais	33,05 ^b \pm 2,19
Imunossuprimidos	26,43 ^a \pm 1,51
Estatística: médias seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste t de Student (t=2,579; p=0,0189).	

TABELA 5. Relação % CD4 / % CD8 no sangue de animais normais (grupos I e III) e imunossuprimidos (grupos II e IV) no momento 0 representada pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.

Grupo	Média \pm erro-padrão da média
Normais	3,48 ^b \pm 0,20
Imunossuprimidos	1,79 ^a \pm 0,10
Estatística: médias seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste t de Student (t=8,367; p<0,0001).	

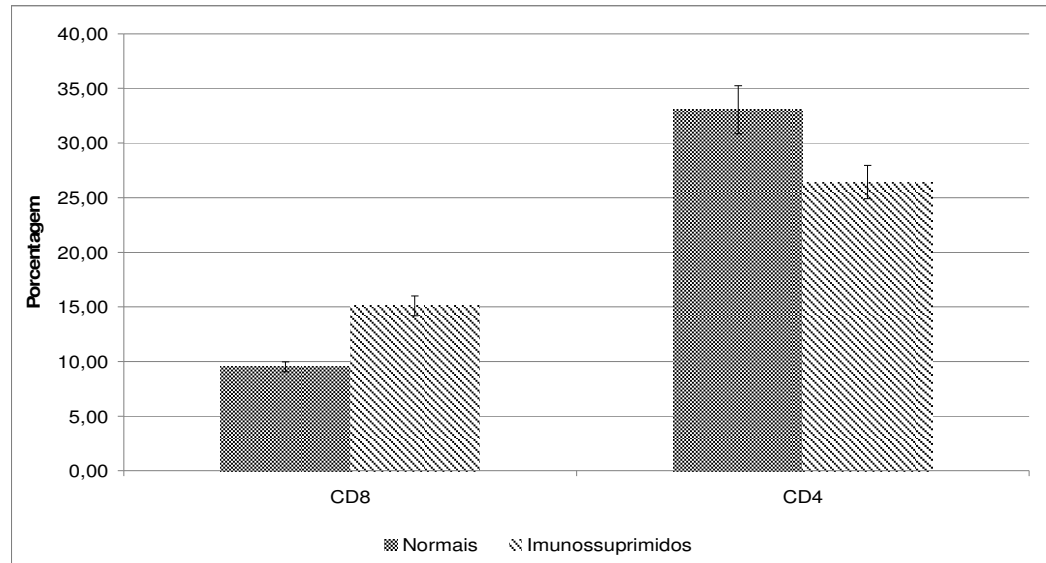


FIGURA 3. Percentagens de CD4 e CD8 no sangue de animais normais (grupos I e III) e imunossuprimidos (II e IV) no momento 0. Botucatu-SP, 2008.

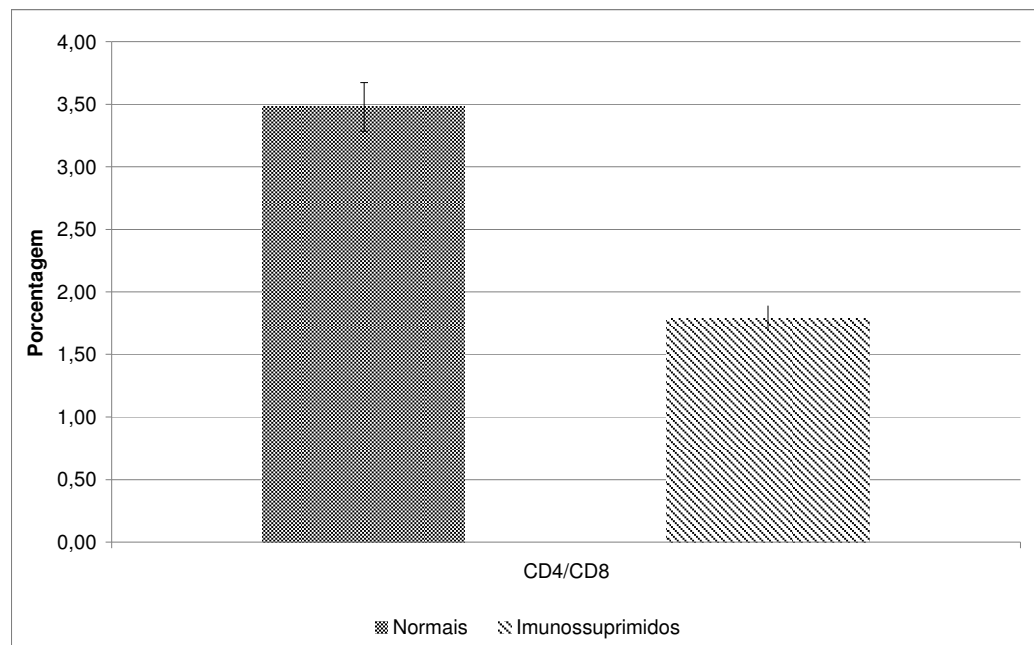


FIGURA 4. Relação % CD4 / % CD8 no sangue de animais normais (grupos I e III) e imunossuprimidos (grupos II e IV) no momento 0. Botucatu-SP, 2008.

5.4 Produção de citocinas em culturas de células esplênicas sem estímulo, estimuladas com ConA e com antígeno sonicado de *L. chagasi*

Na Tabela 6, é possível observar os valores das médias das citocinas produzidas em culturas de células esplênicas sem estímulo, em todos os grupos e momentos estudados. No momento 3, a produção de IFN- γ no grupo IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado) foi significativamente maior que no grupo I (normal) e grupo III (infectado no momento 0) e igual ao grupo II (imunossuprimido até o momento 0). A produção de IL-10 foi estatisticamente superior no grupo II e IV. No caso da IL-2, não se observou diferença estatística entre os grupos. No momento 7, as médias da produção de IFN- γ , IL-10 e IL-2 dos grupos II e IV foram estatisticamente maiores que dos grupos I e III, no entanto, no caso da IL-10 e IL-2, o grupo II foi estatisticamente superior ao IV. No momento 14, a produção de IFN- γ detectada nos grupos II e IV foi estatisticamente maior que nos grupos I e III, no entanto, eles foram diferentes estatisticamente entre si, sendo que o IV foi maior que o II. Para IL-10 não se observou diferença estatística entre os grupos e a IL-2 só foi detectada nos grupos II e IV, sem diferença estatística entre eles. No momento 21, a produção de IFN- γ no grupo IV foi estatisticamente superior aos outros grupos e na IL-10 o grupo IV foi estatisticamente superior apenas aos grupos II e III. A IL-2 não apresentou diferença estatística entre os grupos. A IL-4 não foi detectada em nenhum dos momentos e grupos estudados. Quando se analisou o mesmo grupo em diferentes momentos, observou-se que no grupo IV a produção de IFN- γ foi estatisticamente superior no momento 21 e a IL-10 nos momentos 3 e 7. Nos grupos I, II e III não foi possível realizar esta análise estatística, pois no momento 3 no grupo III e no momento 21 nos grupos I e II utilizaram-se somente 3 animais ao invés de 4, não sendo possível que se fizesse comparação.

Na Figura 5 é possível observar que os grupos II e IV (imunossuprimidos até o momento 0) produziram mais IFN- γ que os grupos I e III em todos os momentos, sendo que no momento 21, o grupo IV foi estatisticamente superior aos outros grupos (Tabela 6). Na Figura 6, até o momento 14, a produção de IL-10 nos grupos II e IV também foi superior aos grupos I e III, sendo que no momento 7, o grupo II mostrou um pico na detecção desta citocina, sendo

significativamente maior que o grupo IV. Este pico também foi observado no nível de IL-2 (Figura 7).

TABELA 6. Níveis de IFN- γ , IL-10, IL-2 e IL-4 (pg/mL) em culturas de células esplênicas dos camundongos Balb/c não estimuladas, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia 3, 7, 14 e 21, representados pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.

Momento	Citocina	Grupo			
		I	II	III	IV
3	IFN- γ	41,51 ^a \pm 17,65	117,08 ^{ab} \pm 16,84	50,51 ^a \pm 8,55	182,87 ^{bA} \pm 32,50
	IL-10	99,55 ^a \pm 7,47	321,95 ^b \pm 31,28	103,66 ^a \pm 7,68	404,81 ^{bB} \pm 30,76
	IL-2	0,00 ^a \pm 0,00	18,45 ^a \pm 10,03	0,00 ^a \pm 0,00	16,83 ^{aA} \pm 9,35
	IL-4	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
7	IFN- γ	39,51 ^a \pm 16,15	209,51 ^b \pm 25,65	64,89 ^a \pm 17,75	175,26 ^{bA} \pm 29,72
	IL-10	94,26 ^a \pm 9,86	568,03 ^b \pm 64,99	124,79 ^a \pm 11,91	375,86 ^{cB} \pm 29,39
	IL-2	4,20 ^a \pm 4,20	98,11 ^c \pm 7,87	1,07 ^a \pm 1,07	28,39 ^{bBA} \pm 6,52
	IL-4	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
14	IFN- γ	39,15 ^a \pm 16,76	150,25 ^b \pm 19,03	48,94 ^a \pm 16,93	201,90 ^{cA} \pm 33,49
	IL-10	91,15 ^a \pm 26,54	131,78 ^a \pm 10,03	57,40 ^a \pm 15,73	112,81 ^{aA} \pm 14,48
	IL-2	0,00 ^a \pm 0,00	33,44 ^b \pm 13,76	0,00 ^a \pm 0,00	23,75 ^{abBA} \pm 7,56
	IL-4	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
21	IFN- γ	38,67 ^a \pm 13,56	129,77 ^a \pm 7,73	97,51 ^a \pm 3,11	448,75 ^{bB} \pm 84,10
	IL-10	96,77 ^{ab} \pm 11,27	68,88 ^a \pm 2,63	78,87 ^a \pm 34,12	199,66 ^{bA} \pm 35,26
	IL-2	3,69 ^a \pm 3,69	14,71 ^a \pm 7,10	0,00 ^a \pm 0,00	42,21 ^{bB} \pm 4,03
	IL-4	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

Estatística: Valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pela Análise de Variância, considerando $\alpha=0,05$.

Valores de média seguidos de letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os momentos, para um mesmo grupo e citocina, pela Análise de Variância, considerando $\alpha=0,05$.

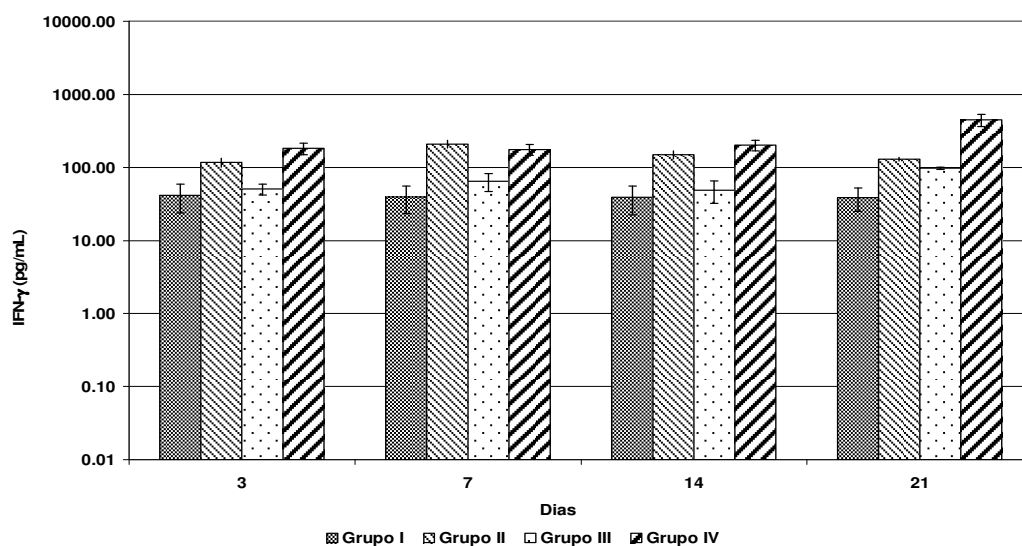


FIGURA 5. Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c sem estímulo, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

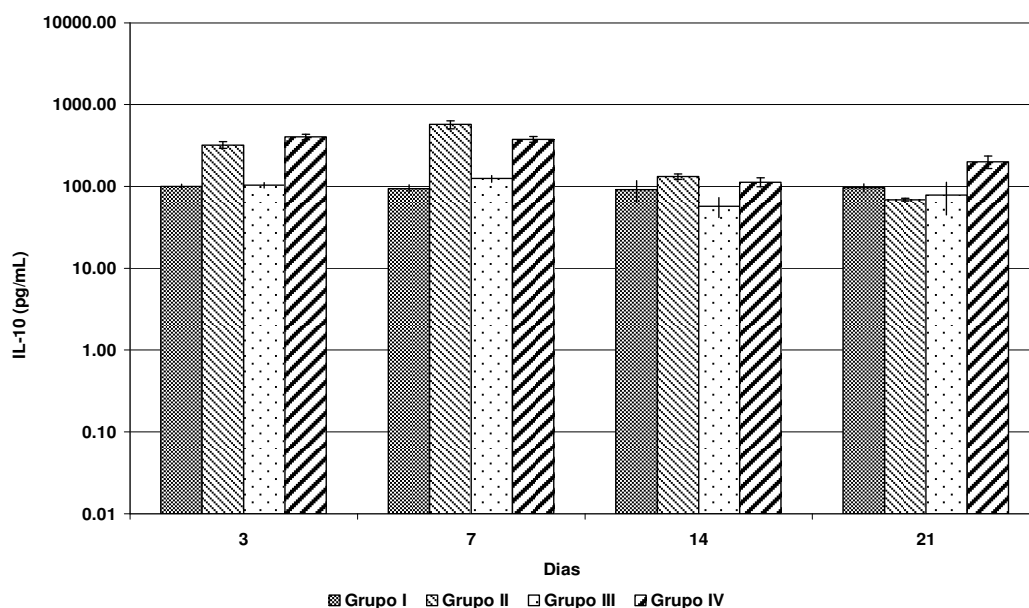


FIGURA 6. Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c sem estímulo, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

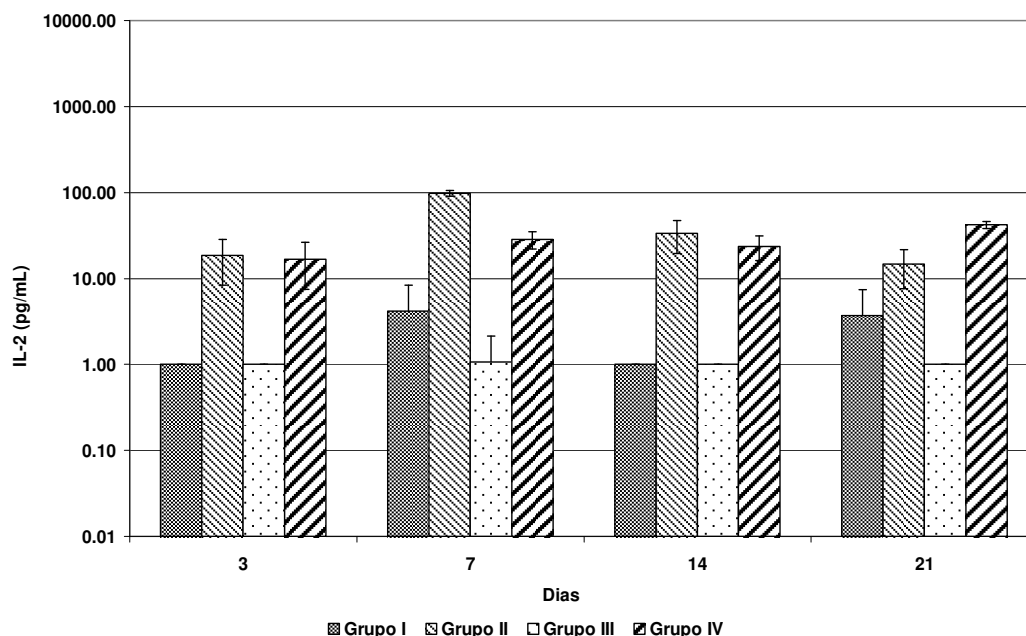


FIGURA 7. Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c sem estímulo, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

Os dados da Tabela 7 referem-se às médias das citocinas produzidas em culturas de células esplênicas estimuladas com conA em todos os grupos e momentos estudados. No momento 3, a produção de IFN- γ no grupo III foi estatisticamente superior ao grupo I e igual aos grupos II e IV. A produção de IL-10 foi estatisticamente menor no grupo II quando comparado com os grupos I e IV. No caso da IL-2 não se observou diferença estatística entre os grupos. A produção de IL-4 foi estatisticamente menor no grupo III quando comparado com os outros grupos. No momento 7, as médias da produção de IFN- γ e IL-4 não revelaram diferença estatística entre os grupos estudados. A IL-10, no grupo II foi estatisticamente maior que nos grupos I e III. A IL-2 do grupo IV foi menor que os outros grupos, com diferença estatística. No momento 14, as médias da produção de IFN- γ e IL-4 não apresentaram diferença estatística entre os grupos. A IL-10 no grupo IV foi estatisticamente menor que no grupo I e na IL-2 os grupos II e IV foram estatisticamente inferiores ao grupo I, mas não foram diferentes entre si. No momento 21, o nível de IFN- γ entre os grupos não

mostrou diferença estatística. A IL-10 do grupo II foi estatisticamente maior que no grupo III. Na IL-2 os grupos II e IV foram estatisticamente inferiores que os grupos I e III e a IL-4 do grupo IV foi estatisticamente menor que os outros grupos. Quando analisou-se o mesmo grupo em diferentes momentos, pode-se observar que no grupo IV, a produção de IFN- γ nos momentos 3 e 7 foi superior que no 21, o nível de IL-10 foi estatisticamente superior nos momentos 3 e 7, a produção de IL-2 foi significativamente superior no momento 3. A produção de IL-4 foi igual em todos os momentos. Nos grupos I, II e III não foi possível realizar esta análise estatística, pois no momento 3 no grupo III e no momento 21 nos grupos I e II, utilizaram-se 3 animais ao invés de 4, não sendo possível assim fazer a comparação entre os momentos.

Na Figura 8 é possível observar que até o momento 7, todos os grupos produziram níveis elevados de IFN- γ , em destaque o grupo III e nos momentos 14 e 21, os grupos II e IV produziram menos que os grupos I e III.

Na Figura 9 é possível observar que no grupo II no momento 3 detectou-se menos IL-10 que nos outros grupos. No momento 7 e 21 o grupo II produziu mais IL-10 que os outros grupos e no momento 14, o grupo IV foi o que menos produziu esta citocina.

Na Figura 10 pode-se observar que os grupos infectados (III e IV) foram os que menos produziram IL-2 e a partir do momento 7, o grupo IV foi o que menos a produziu.

A Figura 11 demonstra a detecção de IL-4 por todos os grupos e pode-se observar que no momento 3, o grupo III foi o que produziu menos IL-4. Nos outros momentos os outros grupos se comportaram de maneira semelhante, a não ser no momento 21 que no grupo IV detectou-se menos IL-4

TABELA 7. Níveis de IFN- γ , IL-10, IL-2 e IL-4 (pg/mL) em culturas de células esplênicas dos camundongos Balb/c estimuladas com ConA, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia 3, 7, 14 e 21, representados pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.

Momento	Citocina	Grupo			
		I	II	III	IV
3	IFN- γ	1852,54 ^a \pm 55,33	1914,95 ^{ab} \pm 68,30	2119,51 ^b \pm 35,72	2045,81 ^{abB} \pm 46,63
	IL-10	3980,32 ^b \pm 1370,58	399,82 ^a \pm 78,67	2939,54 ^{ab} \pm 400,96	5024,44 ^{bC} \pm 353,21
	IL-2	1088,92 ^a \pm 53,17	904,91 ^a \pm 57,02	794,43 ^a \pm 31,93	881,70 ^{aC} \pm 120,54
	IL-4	1163,78 ^b \pm 205,64	1146,73 ^b \pm 40,28	277,35 ^a \pm 88,98	1011,38 ^{bA} \pm 202,54
7	IFN- γ	1976,94 ^a \pm 63,38	2012,64 ^a \pm 52,83	2129,36 ^a \pm 56,61	2059,40 ^{ab} \pm 89,90
	IL-10	4126,47 ^a \pm 183,14	4943,08 ^b \pm 158,39	4231,79 ^a \pm 189,51	4521,30 ^{abC} \pm 109,09
	IL-2	1012,65 ^b \pm 45,16	961,10 ^b \pm 73,74	971,49 ^b \pm 15,72	507,71 ^{ab} \pm 66,19
	IL-4	1188,08 ^a \pm 34,94	1207,62 ^a \pm 7,98	1172,83 ^a \pm 24,12	1208,53 ^{aA} \pm 31,97
14	IFN- γ	2071,36 ^a \pm 24,52	1838,83 ^a \pm 126,16	2075,71 ^a \pm 9,37	1945,04 ^{aAB} \pm 103,95
	IL-10	3860,93 ^b \pm 386,26	3250,47 ^{ab} \pm 272,80	3180,09 ^{ab} \pm 114,71	2491,26 ^{aA} \pm 215,58
	IL-2	1055,43 ^c \pm 18,72	755,49 ^a \pm 60,63	922,66 ^{ac} \pm 17,17	659,95 ^{abA} \pm 73,85
	IL-4	1123,23 ^a \pm 30,86	1159,38 ^a \pm 27,61	1113,62 ^a \pm 38,96	1076,34 ^{aA} \pm 107,13
21	IFN- γ	2052,15 ^a \pm 43,05	1746,40 ^a \pm 120,78	2073,53 ^a \pm 61,04	1809,65 ^{aA} \pm 126,18
	IL-10	3734,14 ^{ab} \pm 342,15	4384,53 ^b \pm 141,09	3289,90 ^a \pm 155,82	3540,97 ^{abB} \pm 132,82
	IL-2	980,87 ^b \pm 44,19	697,99 ^a \pm 44,47	925,79 ^b \pm 48,51	516,89 ^{aA} \pm 61,93
	IL-4	1164,58 ^b \pm 8,79	1106,96 ^b \pm 50,26	1171,47 ^b \pm 16,13	962,46 ^{aA} \pm 41,86

Estatística: Valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pela Análise de Variância, considerando $\alpha=0,05$.
Valores de média seguidos de letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os momentos, par um meso grupo e citocina, pela Análise de Variância, considerando $\alpha=0,05$.

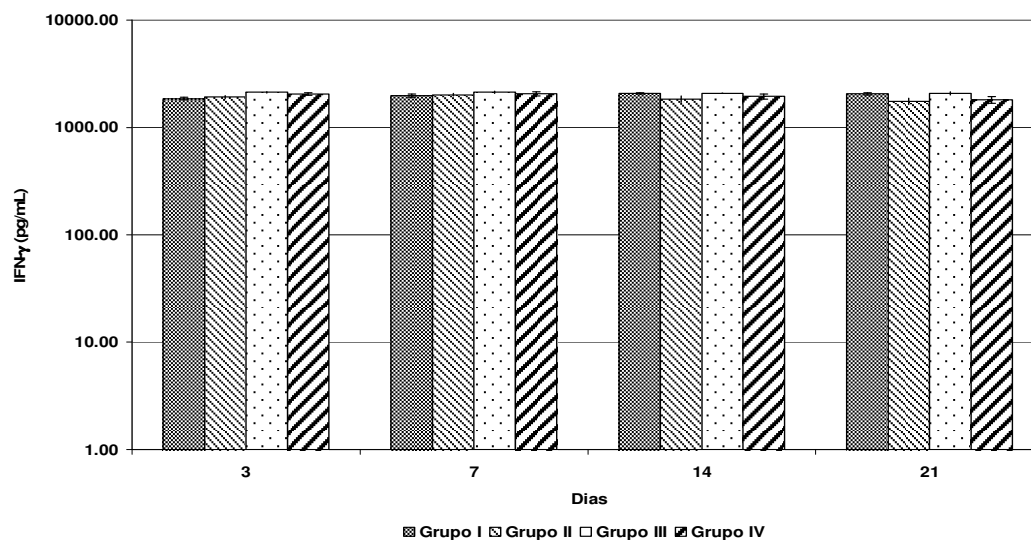


FIGURA 8. Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com conA, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

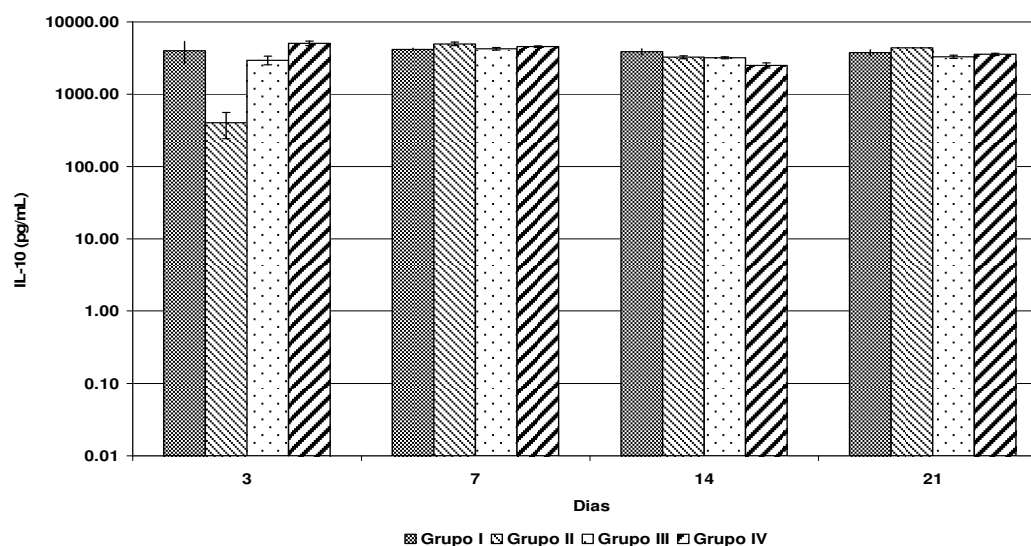


FIGURA 9. Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com conA, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

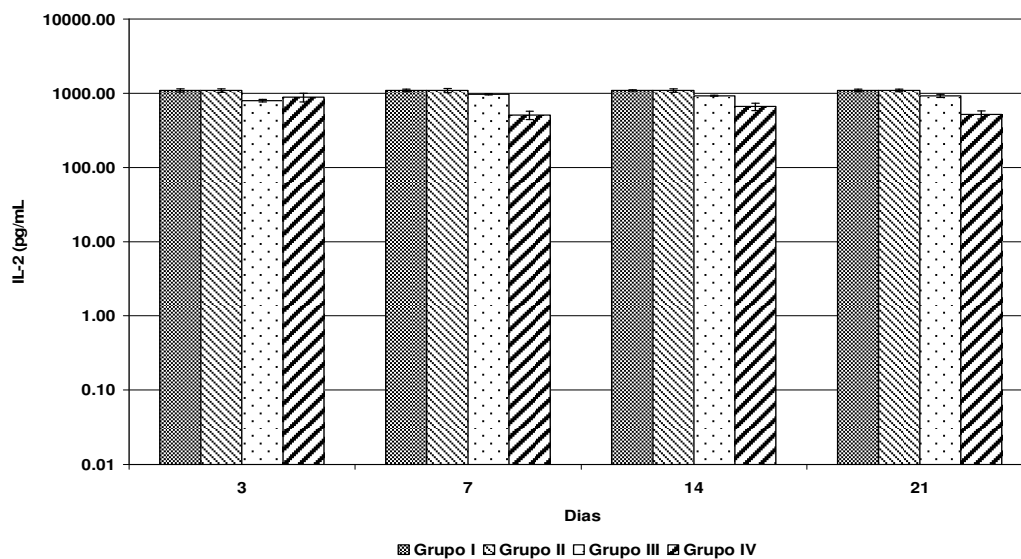


FIGURA 10. Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com conA, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

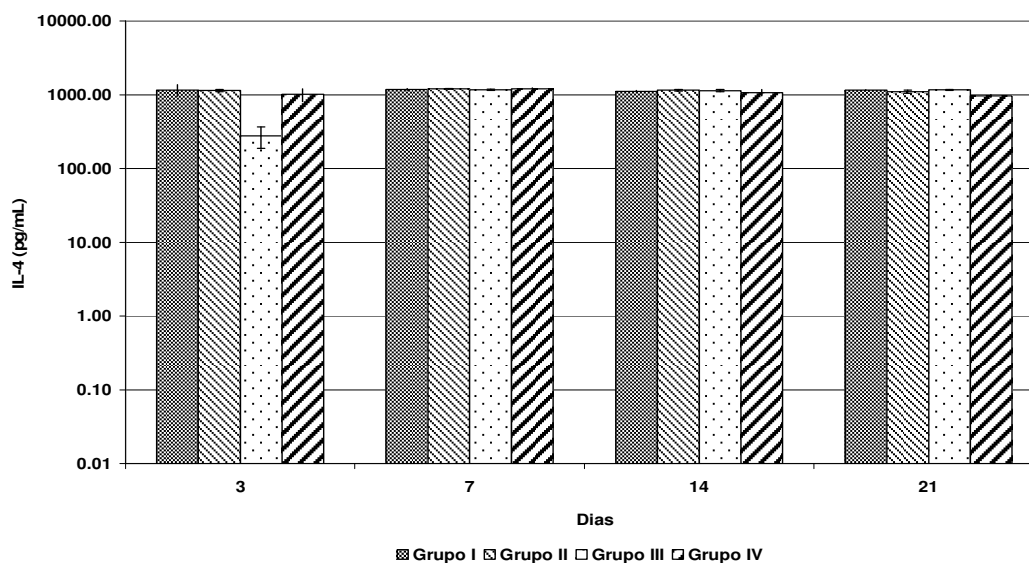


FIGURA 11. Produção de IL-4 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com conA, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

Na Tabela 8 é possível observar as médias das citocinas produzidas em culturas de células esplênicas estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi* em todos os grupos e momentos estudados. Nos momentos 3, 7, 14 e 21 a produção de IFN- γ no grupo IV foi estatisticamente maior que nos outros grupos. No momento 3, a IL-10 foi estatisticamente superior nos grupos II e IV e a IL-2 foi superior apenas no grupo IV. No momento 7, a produção de IL-10 e IL-2 foi estatisticamente maior nos grupos II e IV quando comparados com os grupos I e III. No momento 14, a IL-10 foi estatisticamente maior nos grupos III e IV e a IL-2 nos grupos II e IV. No momento 21, a IL-10 foi estatisticamente superior nos grupos III e IV, no entanto, no grupo IV foi maior que no grupo III. Para IL-2, o grupo IV foi estatisticamente superior aos outros grupos. A IL-4 não foi detectada em nenhum dos momentos e grupos estudados.

Quando se analisou o mesmo grupo em diferentes momentos, pode-se observar que no grupo IV, a produção de IL-10 nos momentos 14 e 21 foi estatisticamente superior que nos momentos 3 e 7. Nos grupos I, II e III não foi possível fazer esta análise estatística, pois no momento 3 no grupo III e momento 21 nos grupos I e II utilizaram-se somente 3 animais ao invés de 4, não sendo possível assim fazer a comparação.

Nas Figuras 12 e 13 é possível observar uma maior detecção de IFN- γ e IL-10 no grupo IV na maioria dos momentos estudados e no grupo III no momento 21. Na Figura 14, os grupos II e IV mostram maior detecção para a citocina IL-2.

Nas Figuras 15 a 20 é possível observar que quando as culturas de células esplênicas dos grupos I e II (não infectados) foram estimuladas com o Ag, a detecção das citocinas (IFN- γ , IL-10 e IL-2) não foi superior à detecção nas culturas não estimuladas.

Nas Figuras 21 a 23 pode-se observar que o grupo III (infectado) quando estimulado com o Ag apresentou mais IFN- γ e IL-10 nos momentos 14 e 21 quando comparados com as culturas não estimuladas e para IL-2 isto aconteceu apenas no momento 21. As cargas parasitárias no baço e no fígado foram aumentando a cada momento, sendo que a do fígado sempre foi maior que a do baço.

Nas Figuras 24 a 26 pode-se observar que o grupo IV (infectado) estimulado com o Ag quando comparado com as culturas não estimuladas detectou mais IFN- γ em todos os momentos estudados, a IL-10 apenas nos momentos 14 e 21 e a IL-2 nos momentos 3 e 7. As cargas parasitárias no baço e no fígado foram aumentando a cada momento, sendo que a do fígado sempre foi maior que a do baço.

TABELA 8. Níveis de IFN- γ , IL-10, IL-2 e IL-4 (pg/mL) em culturas de células esplênicas dos camundongos Balb/c estimuladas com Ag sonificado de *L. chagasi*, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia 3, 7, 14 e 21, representados pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.

Momento	Citocina	Grupo			
		I	II	III	IV
3	IFN- γ	6,04 ^a \pm 0,89	45,49 ^a \pm 7,75	0,00 ^a \pm 0,00	482,27 ^{bA} \pm 125,06
	IL-10	14,85 ^a \pm 6,88	129,28 ^b \pm 17,79	0,17 ^a \pm 0,17	155,23 ^{bA} \pm 20,58
	IL-2	0,00 ^a \pm 0,00	0,00 ^a \pm 0,00	0,00 ^a \pm 0,00	52,91 ^{bA} \pm 19,68
	IL-4	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
7	IFN- γ	0,00 ^a \pm 0,00	98,42 ^a \pm 15,05	7,25 ^a \pm 6,10	871,56 ^{bA} \pm 146,10
	IL-10	0,00 ^a \pm 0,00	187,68 ^b \pm 26,20	0,00 ^a \pm 0,00	151,74 ^{bA} \pm 20,77
	IL-2	0,00 ^a \pm 0,00	67,74 ^b \pm 12,67	0,00 ^a \pm 0,00	40,80 ^{bA} \pm 7,97
	IL-4	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
14	IFN- γ	0,00 ^a \pm 0,00	133,58 ^a \pm 23,68	126,33 ^a \pm 26,55	775,15 ^{bA} \pm 60,00
	IL-10	0,00 ^a \pm 0,00	9,37 ^a \pm 3,36	488,67 ^b \pm 33,46	860,04 ^{bB} \pm 43,87
	IL-2	0,00 ^a \pm 0,00	33,52 ^b \pm 1,44	0,00 ^a \pm 0,00	29,61 ^{bA} \pm 6,59
	IL-4	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
21	IFN- γ	6,79 ^a \pm 2,78	77,39 ^a \pm 7,43	465,06 ^a \pm 104,85	1190,37 ^{bA} \pm 208,70
	IL-10	9,26 ^a \pm 6,62	61,50 ^a \pm 2,90	911,45 ^b \pm 109,23	1566,33 ^{cC} \pm 156,76
	IL-2	3,31 ^a \pm 3,31	16,19 ^a \pm 4,86	2,44 ^a \pm 1,52	31,22 ^{bA} \pm 3,30
	IL-4	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Estatística:		Valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pela Análise de Variância, considerando $\alpha=0,05$.			
		Valores de média seguidos de letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os momentos, par um meso grupo e citocina, pela Análise de Variância, considerando $\alpha=0,05$.			

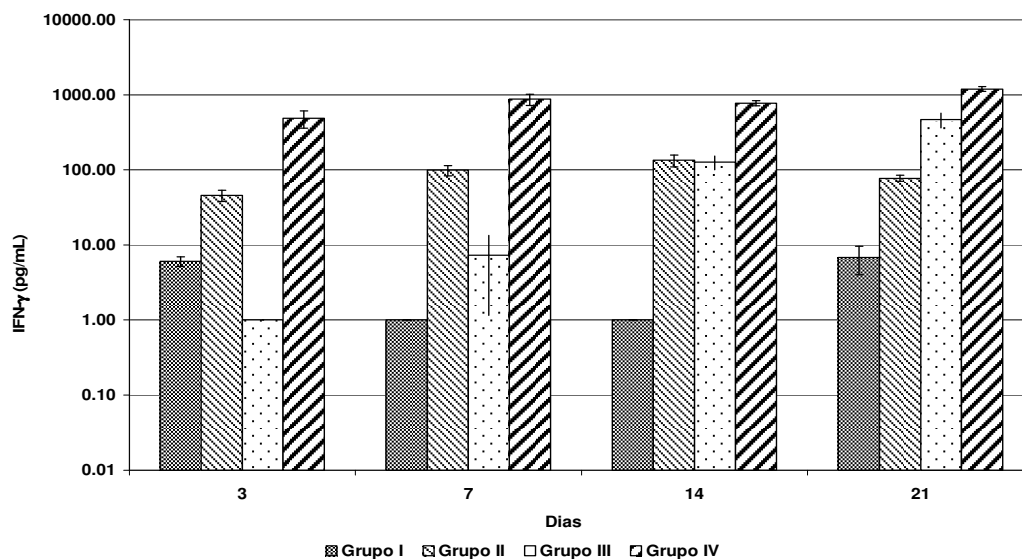


FIGURA 12. Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com Ag sonificado de *L. chagasi*, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infetado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infetado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

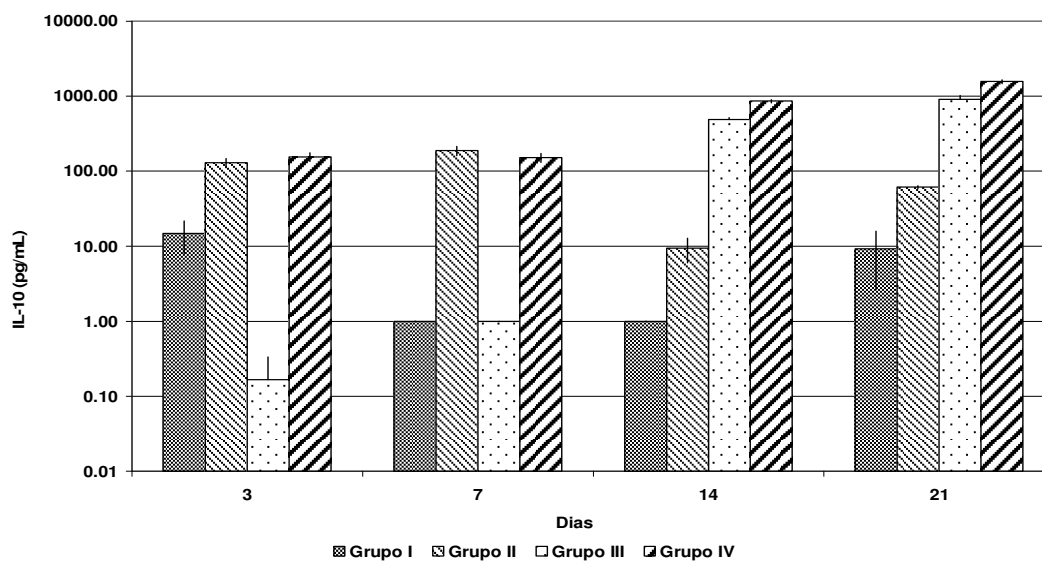


FIGURA 13. Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com Ag sonificado de *L. chagasi*, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infetado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infetado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

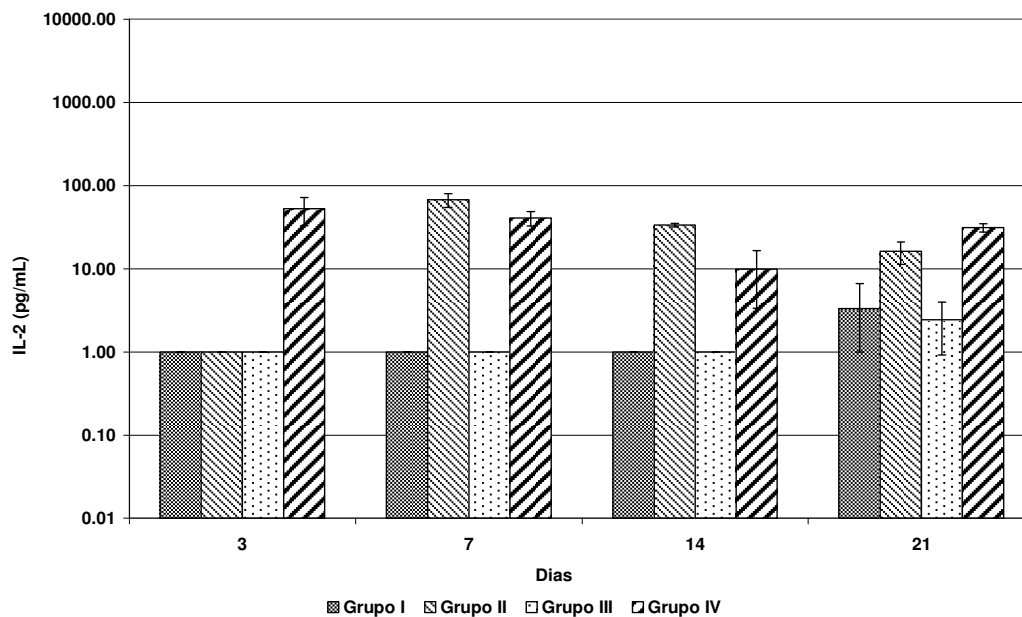


FIGURA 14. Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os grupos I (normal), II (imunossuprimido até momento 0), III (infectado com *L. chagasi* no momento 0) e IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0) e os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

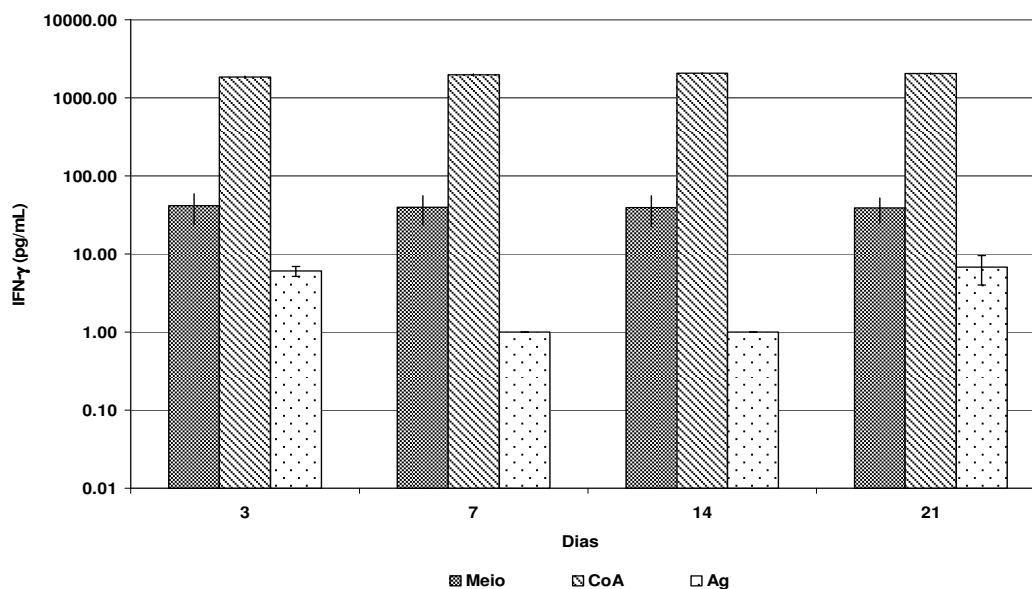


FIGURA 15. Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c do grupo I (normal), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

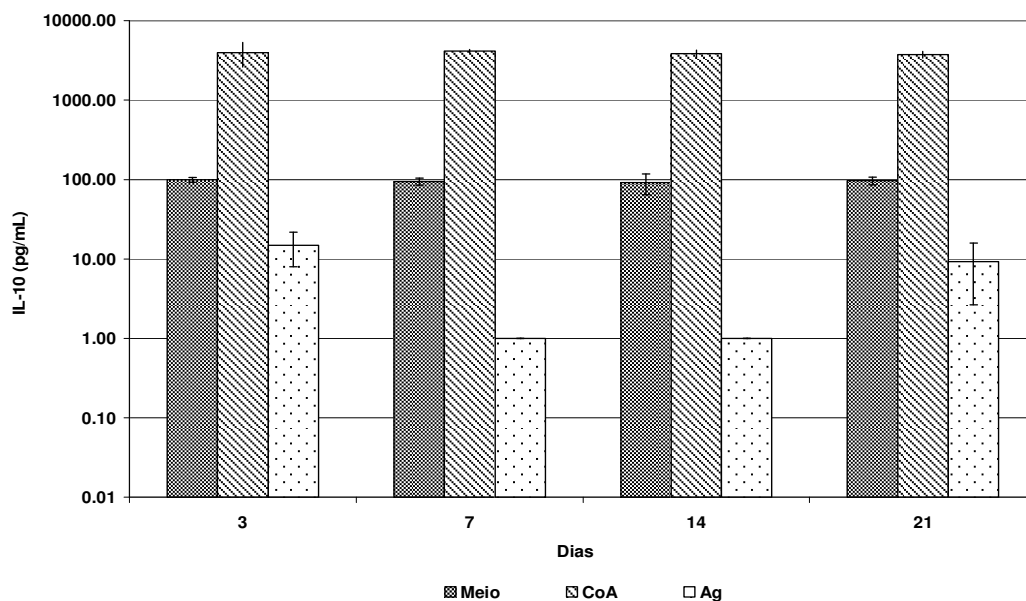


FIGURA 16. Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c do grupo I (normal), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008

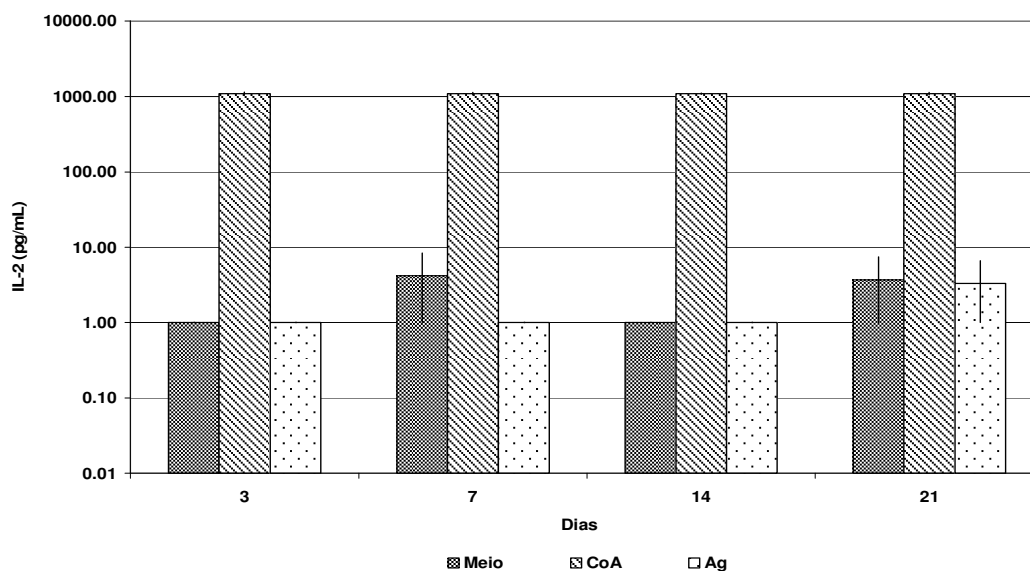


FIGURA 17. Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c do grupo I (normal), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008

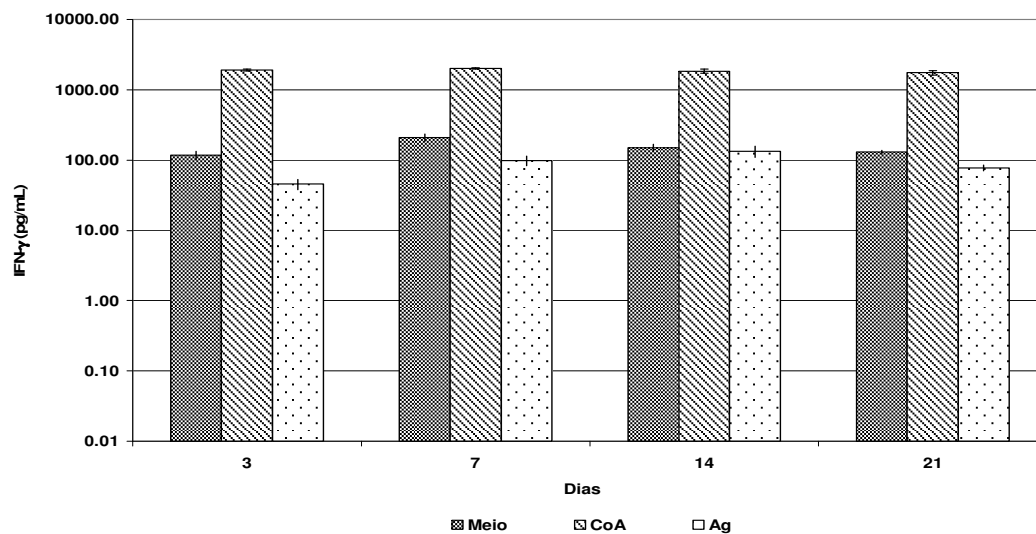


FIGURA 18. Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c do grupo II (imunossuprimido até o momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

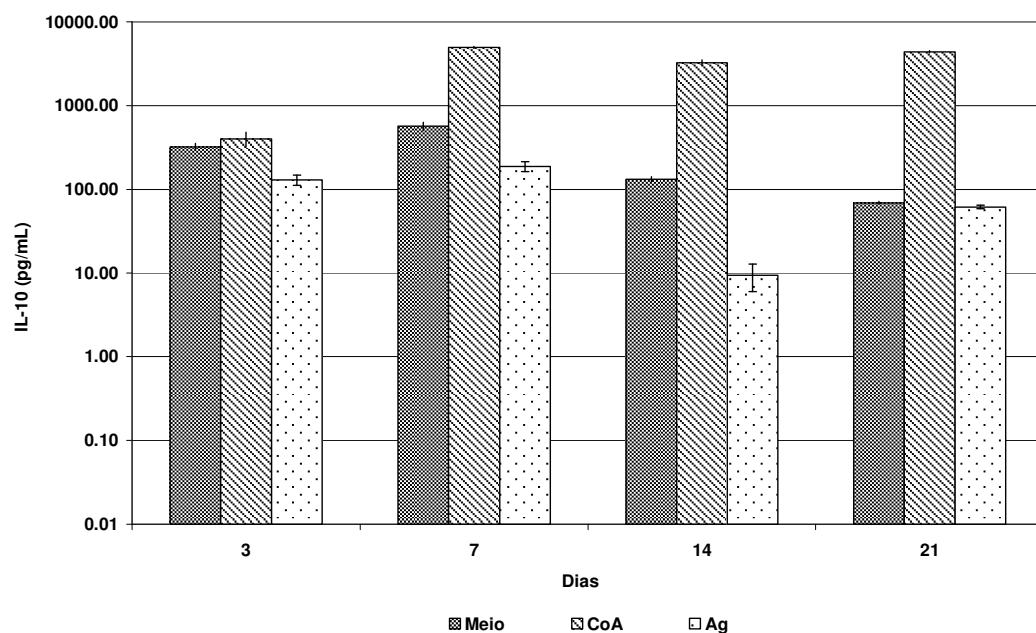


FIGURA 19. Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c do grupo II (imunossuprimido até o momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

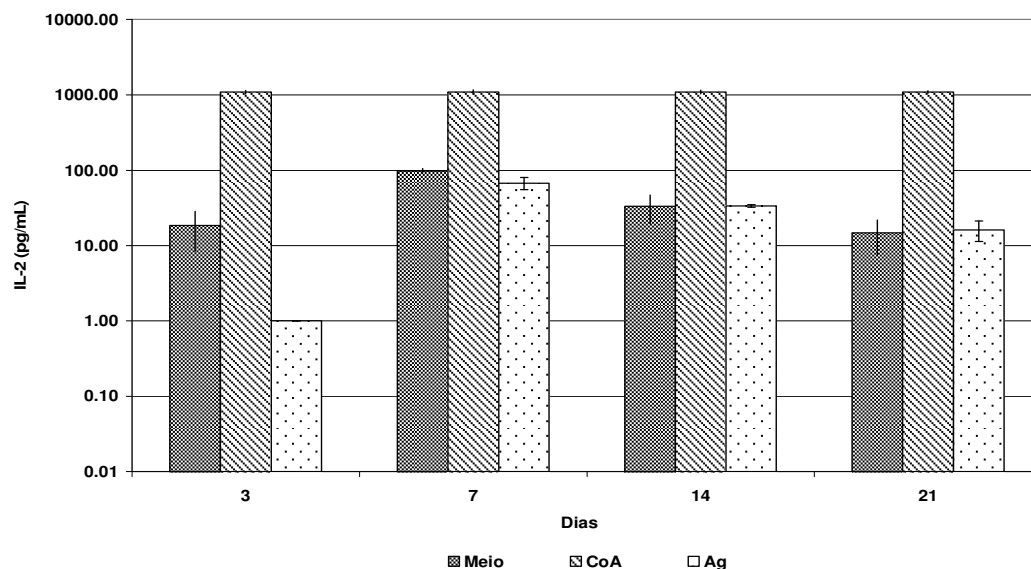


FIGURA 20. Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c do grupo II (imunossuprimido até o momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

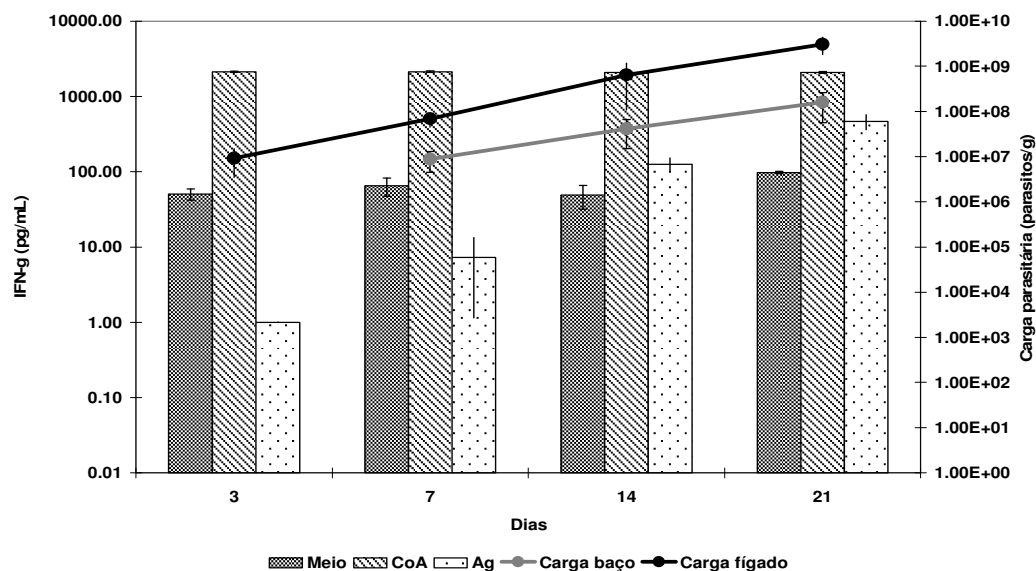


FIGURA 21. Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c e carga parasitária do grupo III (infectado com *L. chagasi* no momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

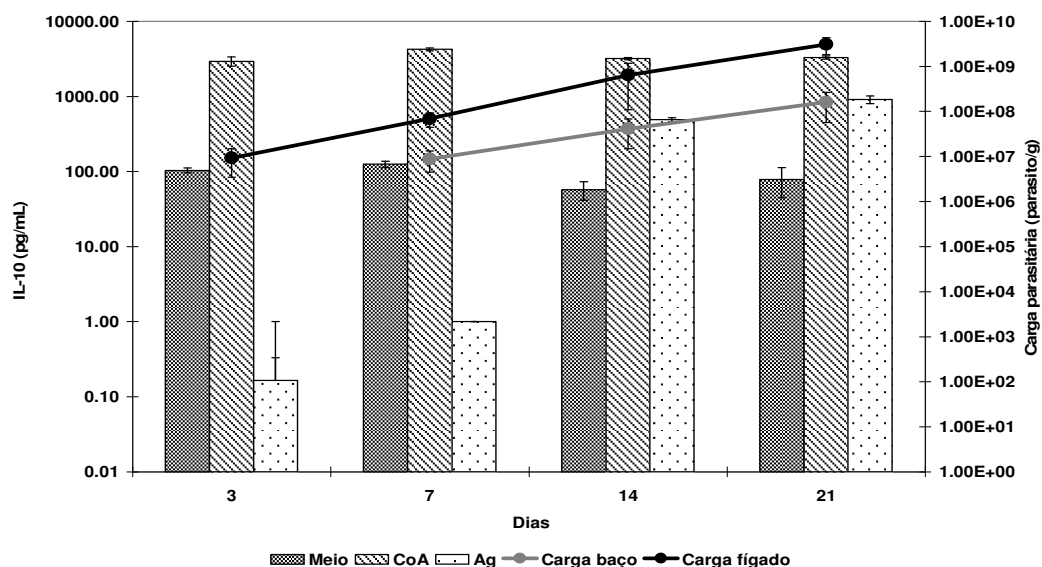


FIGURA 22. Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c e carga parasitária do grupo III (infectado com *L. chagasi* no momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008

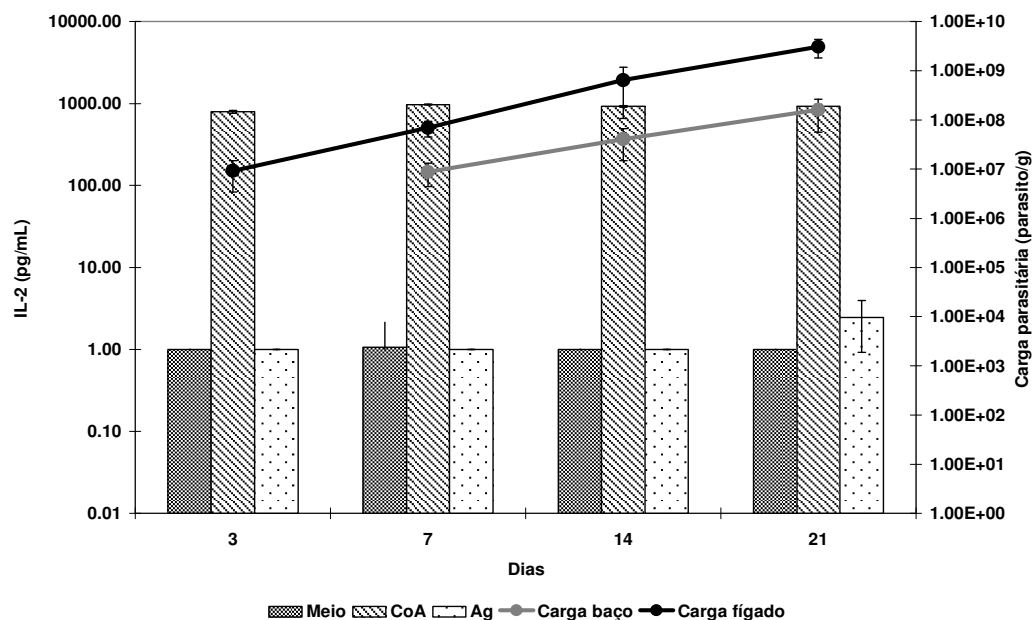


FIGURA 23. Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c e carga parasitária do grupo III (infectado com *L. chagasi* no momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

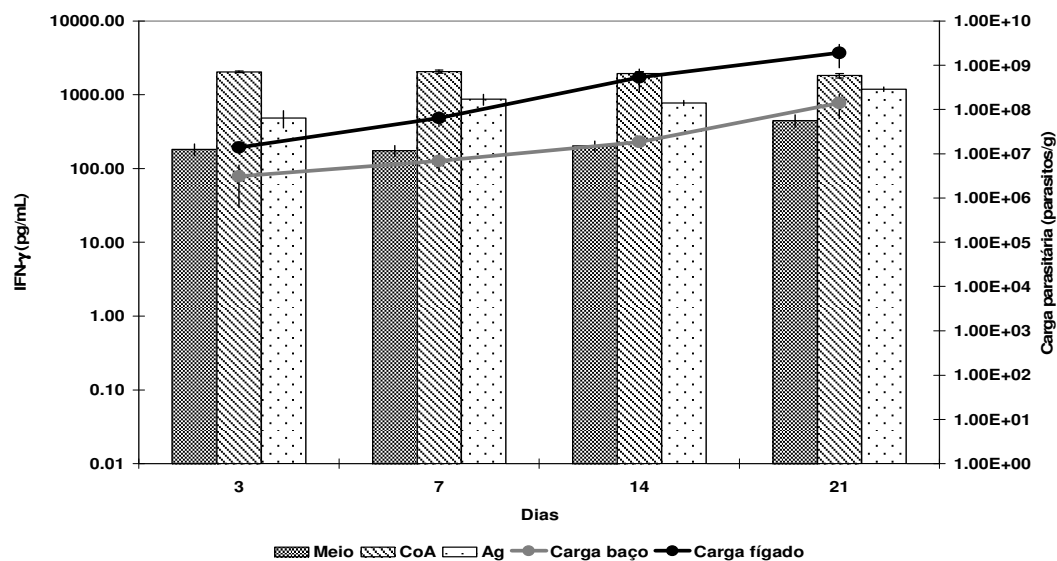


FIGURA 24. Produção de IFN- γ (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c e carga parasitária do grupo IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonificado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008.

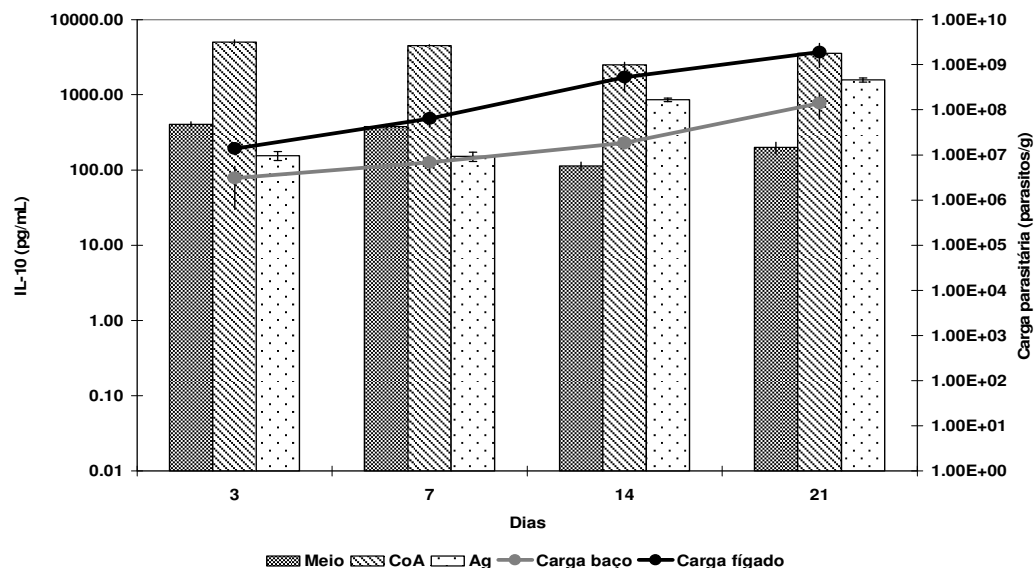


FIGURA 25. Produção de IL-10 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c e carga parasitária do grupo IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonificado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008

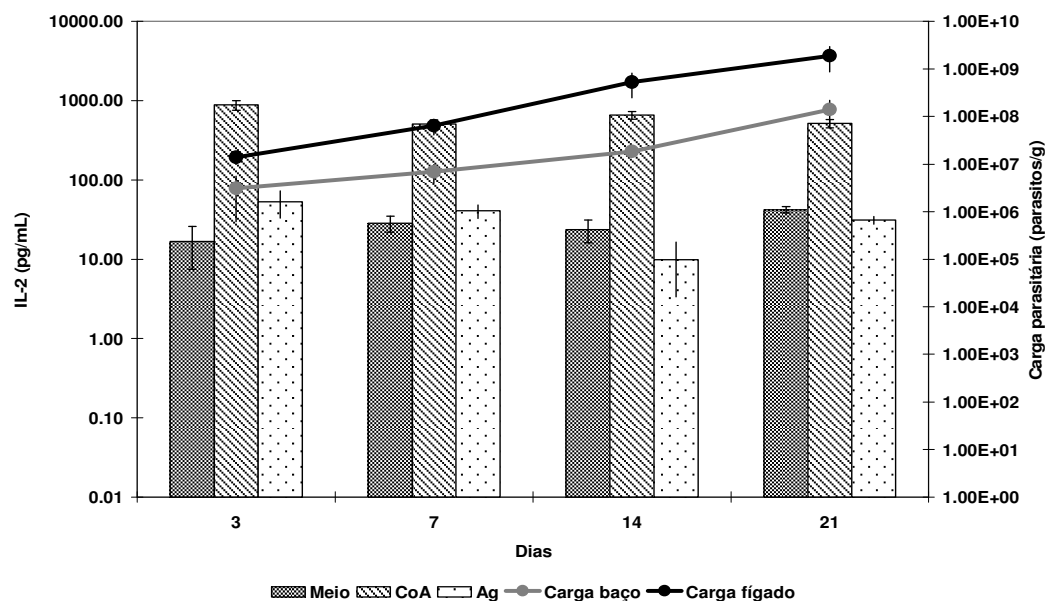


FIGURA 26. Produção de IL-2 (pg/mL) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c e carga parasitária do grupo IV (imunossuprimido até momento 0 e infectado com *L. chagasi* no momento 0), não estimuladas, estimuladas com conA e estimuladas com Ag sonicado de *L. chagasi*, segundo os momentos de eutanásia (3, 7, 14 e 21). Botucatu-SP, 2008

5.5 Carga parasitária no baço e no fígado

Na Tabela 9 pode-se observar a média das cargas parasitárias do baço e do fígado dos grupos infectados no momento 0 (III e IV). Não se observou diferença estatística entre os grupos em nenhum dos momentos estudados, tanto no baço quanto no fígado. Na figura 27 é possível observar que a carga parasitária do fígado em ambos os grupos (III e IV) foi maior que a do baço, além disto, elas se comportaram de maneira semelhante.

TABELA 9. Carga parasitária de animais infectados com *Leishmania chagasi*, segundo os grupos (III - infectado no momento 0 e IV - imunossuprimido até o momento 0 e infectado no momento 0), órgão (baço e fígado) e momentos da eutanásia (3, 7, 14 e 21) representada pela média \pm erro-padrão. Botucatu-SP, 2008.

Momento	Baço		Fígado	
	Grupo III	Grupo IV	Grupo III	Grupo IV
3	$0,00.10^0_{aA} \pm 0,00.10^0$	$3,10.10^6_{aA} \pm 2,48.10^6$	$9,25.10^6_{aA} \pm 5,79.10^6$	$1,38.10^7_{aA} \pm 3,76.10^6$
7	$8,80.10^6_{aA} \pm 4,34.10^6$	$6,92.10^6_{aA} \pm 2,89.10^6$	$6,89.10^7_{aBA} \pm 2,40.10^7$	$6,47.10^7_{aA} \pm 2,37.10^7$
14	$4,11.10^7_{aA} \pm 2,61.10^7$	$1,85.10^7_{aA} \pm 4,36.10^6$	$6,44.10^8_{aBA} \pm 5,36.10^8$	$5,33.10^8_{aA} \pm 2,84.10^8$
21	$1,60.10^8_{aA} \pm 1,04.10^8$	$1,41.10^8_{aA} \pm 7,86.10^7$	$3,08.10^9_{aB} \pm 1,26.10^9$	$1,91.10^9_{aA} \pm 1,05.10^9$

Estatística: Para um mesmo órgão e momento, valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste t de Student, considerando $\alpha=0,05$.
Para um mesmo órgão e grupo, valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os momentos, pela Análise de Variância, considerando $\alpha=0,05$.

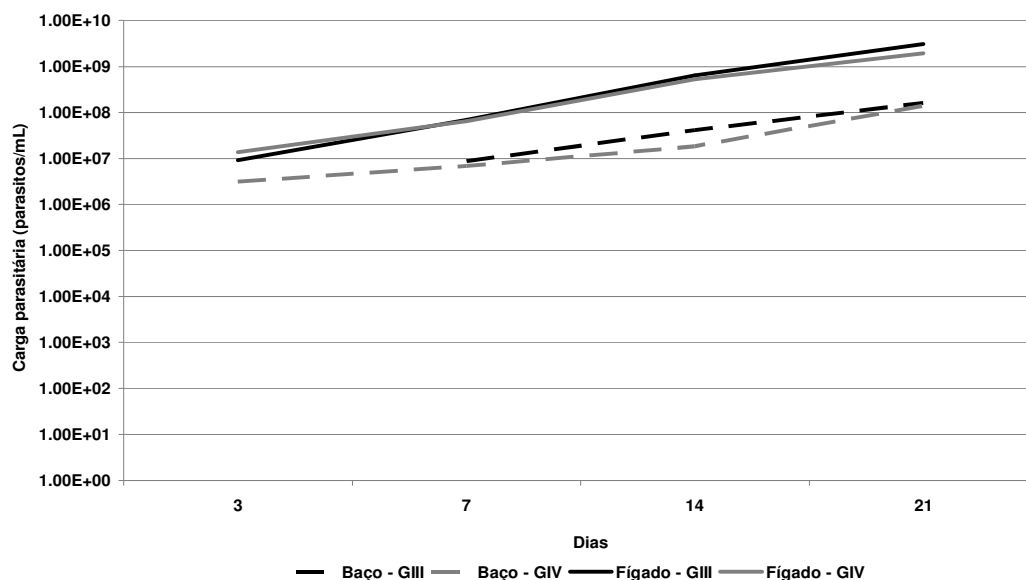


FIGURA 27. Cinética da carga parasitária de *Leishmania chagasi* em baço e fígado de camundongos experimentalmente infectados, segundo o grupo experimental (Grupo III - infectado no momento 0 e IV - imunossuprimido até o momento 0 e infectado no momento 0). Botucatu-SP, 2008.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os glicocorticóides, conhecidos como hormônio do estresse, geralmente suprimem a resposta inflamatória, como também a imunidade específica (MOYNIHAN et al., 1998). A dexametasona é uma droga anti-inflamatória imunossupressora que pode alterar o curso da infecção do *Toxoplasma gondii* e da *Leishmania* (GANGNEUXS et al 1999). Assim sendo, ela foi utilizada neste experimento para imunossuprimir os grupos II e IV até o momento 0, quando os grupos III e IV foram infectados. No momento da infecção, o grupo IV sofria o efeito da DXM aplicada nos 22 dias anteriores.

Os grupos II e IV (imunossuprimidos) se comportam de maneira semelhante e isto se repetiu com os grupos I e III (não imunossuprimidos), mas no momento 6, os grupos II e IV ganharam peso e no último momento (20), nenhum dos grupos foi diferente estatisticamente (Figura 1). Kunicka et al. (1993) afirmaram que a dexametasona tem um efeito reversível, e no presente estudo, isto pode ser evidenciado, pois os grupos imunossuprimidos passaram a ganhar peso após o término da imunossupressão, provavelmente por não estarem mais sob o efeito da DXM.

As médias dos pesos dos baços dos grupos imunossuprimidos (II e IV) foram estatisticamente inferiores aos grupos não imunossuprimidos (I e III), impossibilitando assim a realização da cultura celular das células esplênicas para dosar as citocinas. Estes resultados são condizentes com Lebec, et al. (1994) e Keil et al. (1995) que observaram que os pesos dos baços após a administração de DXM apresentaram redução estatisticamente significativa, no entanto esta redução dependia da dose administrada.

Miller et al. (2007) relataram que o baço e o timo apresentaram redução no tamanho em mais de 80% e após o término do tratamento com DXM houve aumento no tamanho do baço, resultados estes que concordam com o presente estudo, pois de acordo com a Figura 2, os pesos dos baços dos animais do grupo II (imunossuprimido e não infectado), foram aumentando com o passar do tempo da última dose de DXM. Estes resultados sugerem uma recuperação parcial das células do baço sensíveis à DXM (ROUSSEAU, et al., 1998) ou que esta droga apresenta um modelo reversível de imunossupressão (KUNICKA et al. 1993).

A partir do momento 3, pode-se observar nos grupos infectados (III e IV) um aumento no peso do baço em relação aos grupos não infectados (I e II) (Figura 2), com diferença estatística nos momentos 14 e 21 (Tabela 2). A esplenomegalia evidenciada nestes grupos provavelmente foi em decorrência da infecção por uma espécie de leishmania viscerotrópica, como observado por Melby et al. (1998) e Engwerd et al. (2004). Rousseau et al. (1997) também observaram um aumento do baço de camundongos infectados com *L. infantum*, no entanto estes autores relataram que o grau de esplenomegalia estava correlacionado com a carga de leishmania. De acordo com Kaye et al. (2004), a persistência dos parasitos no baço é acompanhada pela falha da formação do granuloma e pela variedade de mudanças patológicas, incluindo esplenomegalia, alteração da microarquitetura do tecido linfóide e aumento da atividade hematopoiética.

De acordo com Finamor et al. (2002), os glicocorticóides interferem na circulação das células imunes, diminuem o número de linfócitos periféricos, principalmente linfócitos T e promovem apoptose das células linfóides. No presente estudo, pode-se observar que no momento 0 houve diminuição das células CD4, diminuição na relação CD4/CD8 e aumento das células CD8 nos animais imunossuprimidos (Figuras 3 e 4) resultados condizentes com Miller et al. (2007) que observaram que a imunossupressão por DXM em camundongos levou a depressão dos linfócitos CD4 e um aumento gradual de linfócitos CD8, após uma diminuição destas células. Estes autores acreditam que a subpopulação de linfócitos CD8 é resistente aos efeitos da DXM e que continuam a proliferar enquanto todos os outros linfócitos sofrem apoptose. No presente estudo, o aumento das células CD8 pode ter ocorrido para compensar a diminuição de CD4. Rousseau et al. (1998) também observaram redução nas contagens de CD4 de aproximadamente 80% no 31^o dia de tratamento com DXM, em comparação com o grupo controle, no entanto relataram a redução das células CD8, o que não ocorreu no presente estudo. Gangneux et al. (1999) relataram que a porcentagem de células do baço CD4 e CD8 de camundongos tratados com glicocorticóides não revelou diferença estatística quando comparada ao grupo controle, resultado discordante do presente estudo, pois os grupos imunossuprimidos apresentaram redução estatisticamente significativa de CD4 e aumento de CD8.

Neste estudo, não se detectou IL-4 em culturas de células esplênicas não estimuladas em nenhum dos grupos estudados, nem mesmo quando a cultura dos grupos infectados foi estimulada com antígeno, resultado este discordante de Rolão et al. (2007) que detectaram IL-4 em culturas de células de animais infectados sem estímulo e estimuladas com Ag específico. De acordo com Goto e Lindoso (2004), na LV a IL-4 não está envolvida na suscetibilidade. A ausência de um papel significativo da IL-4 na infecção com *Leishmania* visceral em modelo murino foi observada por vários autores. Rolão et al. (2007) observaram que a cinética da IL-4 não estava correlacionada com a carga parasitária; Melby et al. (2001) não detectaram a IL-4 analisando sua produção *in situ* no baço pela imuno-histoquímica e Miralles et al. (1994) trataram camundongos com anticorpo anti IL-4 ou receptor solúvel de IL-4 e isto não afetou a carga parasitária. No entanto, no modelo com camundongos e *L. major*, a IL-4 se agrupa com as citocinas que não protegem o hospedeiro (BOGNAN et al., 1996).

Nos grupos infectados (III e IV) foram detectadas tanto citocinas T_H1 (IL-2 e IFN- γ) quanto T_H2 (IL-10) (Figuras 5, 6 e 7) em culturas de células sem estímulo, sendo que estes resultados são condizentes com Miralles et al. (1994) e Rolão et al. (2007) que não observaram um padrão distinto de produção de citocinas T_H1 e T_H2. Isto também foi observado em humanos com infecção aparentemente clínica, nos quais o tipo de resposta T_H1 e T_H2 não é bem definido, ambas citocinas ativadoras (IFN- γ , e IL-12) e supressoras (IL-10, IL-3, IL-4 e TGF) são detectadas (MURRAY et al., 2005; ANSARI et al., 2006). Ao contrário do modelo com *L. major*, o conceito T_H1/T_H2 parece não explicar suscetibilidade e resistência na infecção no modelo experimental de *L. infantum* (HONORE et al., 1998).

Os grupos imunossuprimidos (II e IV) apresentaram valores superiores das citocinas estudadas em quase todos os momentos. Os glicocorticóides causam imunossupressão seletiva da imunidade celular T_H1 e uma mudança em direção a imunidade humoral mediada por T_H2 (FRANCHIMONT et al., 1998; ELENKOV, 2004) ou favorecem a produção de citocinas do tipo T_H2 (RAMIERZ et al., 1996). Isto poderia explicar o aumento da produção da IL-10 nos grupos que foram imunossuprimidos até o momento 0 (Figura 6). Krouwels

et al. (1996) observaram que a produção de IFN- γ foi menos inibida que a produção de IL-4 e IL-5, favorecendo o perfil T_H1. No presente estudo, a DXM favoreceu a produção das citocinas T_H1 (IL-2 e IFN- γ) (Figuras 5 e 7), no entanto, Moynihan et al. (1998) afirmaram que glicocorticóides inibem IL-2, IL-4, IFN- γ . Rousseau et al. (1998) concluíram que o efeito da DXM no perfil T_H1 e T_H2 não é claro.

No grupo IV detectou-se mais IL-10, IL-2 e IFN- γ que nos grupos I e III, sendo que no momento 21, a detecção de citocinas no grupo IV também foi superior ao grupo controle da imunossupressão (II), sugerindo assim que neste momento, provavelmente, a imunossupressão realizada até o dia 0 e infecção por *L. chagasi* fez aumentar a produção de todas as citocinas, no entanto, sem distinção do perfil T_H1 e T_H2, que já foi descrito anteriormente. A IL-2 na infecção por leishmania visceral tem um papel importantíssimo na atividade leishmanicida, aparentemente pela indução de IFN- γ (MURRAY et al., 1987; MURRAY et al., 1993) que ativa os macrófagos para destruírem os parasitos intracelulares (ABBAS et al. 2005). No presente estudo, a IL-2 praticamente foi detectada apenas nos grupos imunossuprimidos (II e IV), sendo que no momento 21, no grupo IV, sua detecção foi estatisticamente superior que nos outros grupos (Tabela 6).

O IFN- γ foi detectado em todos os momentos nos grupos infectados (III e IV), principalmente no momento 21 (Figura 5). Nos outros momentos, a detecção no grupo III foi semelhante à do grupo controle (I). Melby et al. (2001) observaram somente um aumento significativo de células produzindo IFN- γ *in situ* comparado com o grupo controle, no dia 28 de infecção.

A detecção de IFN- γ não coincidiu com a diminuição da carga parasitária, nem mesmo no momento 21 em que a produção de IFN- γ foi superior e a carga parasitária continuou aumentando (Figuras 21 e 24). Este resultado é discordante de Rolão et al. (2007) que observaram que altos níveis de IFN- γ coincidiram com a redução da carga parasitária. No entanto, Ansari et al. (2006) afirmam que apesar da presença de níveis elevados de IFN- γ durante a infecção, o hospedeiro pode falhar no controle da infecção por leishmania devido a resposta inadequada do IFN- γ , que induz sinalização de mecanismos intracelulares. Talvez este aumento de IFN- γ no momento 21

possa sugerir o início do controle da infecção, pois alguns trabalhos afirmam que este controle se inicia com aproximadamente quatro semanas de infecção (MURRAY et al. 1987; MELBY et al., 2001; ENGWERD et al., 2004).

A IL-10 foi detectada em todos os momentos nos grupos infectados (III e IV), mas nos primeiros momentos (3 e 7), apresentou valores maiores que nos momentos 14 e 21 (Figuras 22 e 25). Estes resultados são condizentes com Melby et al. (2001) que observaram que no início do curso da infecção por *L. infantum* a produção de IL-10 e TGF- β foi mais intensa e contribuiu para estabelecimento da infecção, mas a partir do 28^o dia da infecção, quando a carga parasitária visceral (baço e fígado) começou a declinar, o número de células do baço produtoras de IL-10 iniciava o retorno para níveis basais, mas a produção de IFN- γ foi alta e o número de células produtoras de IL-12 foi aumentando drasticamente.

No presente estudo, detectou-se IL-10 e IFN- γ em todos os momentos estudados nos grupos infectados o que concorda com Gomes-Pereira et al. (2004), que acreditam que o nível de IL-10 parece não ser suficiente para inibir a produção do IFN- γ nos leucócitos hepáticos. A IL-10 endógena, primariamente regula a morte da *L. donovani* na infecção, pela supressão da produção assim como da resposta de citocinas do tipo T_H1(IL-12 e IFN- γ) (MURPHY et al., 2001; MURRAY et al., 2003). No entanto, Murray et al. (1997) acreditam que a exacerbação da doença associada à resposta imune T_H2 envolvendo IL-4 e IL-10 não é realmente detectada na infecção visceral experimental.

No presente estudo, pode-se observar que a produção de citocinas detectadas nos grupos infectados (III e IV) em determinados momentos foi semelhante a do grupo normal (I), o que difere de Rolão et al. (2007) que observaram altos níveis de IL-10 e IFN- γ em culturas sem estímulo de células esplênicas de camundongos infectados. Isto poderia estar relacionado com a virulência da cepa utilizada, pois de acordo com Honoré et al. (1998), espécies heterogêneas de *L. infantum* apresentam diferentes perfis de infecção.

A ConA é um estímulo não específico que é utilizado como controle na resposta celular nas culturas de células *in vitro*. Todas as citocinas estudadas (IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ) foram detectadas em todos os momentos e grupos

com algumas variações (Figura 8 a 11). Neste estudo, o grupo III (infectado) produziu mais IFN- γ que o grupo normal (I) nos momentos 3 e 7 quando as culturas de células foram estimuladas com ConA (Figura 8), resultados este condizentes com Murray et al. (1987), que observaram que a produção de IFN- γ detectada no grupo infectado também foi maior que o grupo normal, no entanto, em momentos diferentes aos do presente estudo. Estudos sobre a imunossupressão em hamsters na infecção com *Leishmania chagasi* relatam que a ConA induz resposta linfoproliferativa em todo o período experimental (GOTO e LINDOSO, 2004), mostrando assim, que mesmo células de animais infectados respondem ao estímulo com ConA, o que concorda com o presente estudo, pois foi possível detectar citocinas em culturas de células de camundongos infectados estimuladas com ConA.

De acordo com as Figuras 9 e 11, as diferenças mais evidentes quando se utilizou a conA como estímulo foram no momento 3, quando a IL-10 no grupo II foi estatisticamente menor que nos grupos I e IV e a IL-4 no grupo III apresentou valor significativamente inferior aos outros grupos (Tabela 7). A IL-10 do grupo II apresentar nível inferior pode estar relacionado com o efeito da DXM, pois de acordo com Franchimont et al. (1998) e Kunicka et al. (1993) ela inibe a secreção de IL-10 em culturas de células estimuladas, e neste caso, só teriam se passado três dias após a sua última administração. Além disto, a DXM inibe vários aspectos da imunidade mediada por células, incluindo linfoproliferação induzida por mitógeno (BAUS et al., 1996). No caso do menor nível da IL-4 no grupo III, somente infectado, há alguns relatos que verificaram a não importância desta citocina na infecção por leishmania visceral (MIRALLES et al., 1994; MELBY et al., 2001; ROLÃO et al., 2007), além disto, Mookerjee et al. (2003) observaram um dano da resposta linfoproliferativa para mitógenos em hamsters infectados com leishmania visceral. No grupo IV, a detecção da IL-2 em culturas estimuladas com ConA nos momentos 7, 14 e 21 foi inferior aos outros grupos (Figura 10), que pode estar associado a infecção e a imunossupressão sofrida por este grupo, pois há relatos em que a DXM inibiu a produção de IL-2 (BAUS et al., 1996; FRANCHIMONT et al. 1998).

No grupo normal não infectado (I) quando estimulado com antígeno específico, detectou-se produção muito baixa das citocinas estudadas (IFN- γ ,

IL-10 e IL-2) quando comparado com os outros grupos (Figuras 12 a 14). Estes resultados são condizentes com Murray et al. (1987) que praticamente não detectaram nem IL-2 e nem IFN- γ no grupo normal não infectado. No presente estudo, os grupos I e II não responderam ao estímulo específico (Figuras 15 a 20), pois não apresentavam células de memória para o agente inoculado. Em alguns casos, a produção das citocinas diminuiu nas culturas estimuladas com antígeno quando comparado com as culturas sem estímulo.

A produção de IFN- γ e IL-10 do grupo III em culturas estimuladas com antígeno específico nos momentos 14 e 21, foi maior que no grupo normal e que sua própria produção endógena (Figuras 12, 13 e 21 a 23). Isto indica que este aumento foi devido ao estímulo específico. No entanto, o grupo IV, a produção de IFN- γ , IL-10 e IL-2 em culturas de células estimuladas com o antígeno foi superior ao grupo I em todos os momentos estudados (Figura 12 a 14). Quando se compara a produção da cultura com estímulo específico no grupo IV com a produção sem estímulo (Figuras 24 a 26), pode-se observar que com estímulo também detectou-se mais IFN- γ em todos os momentos, a IL-10 apenas nos momentos 14 e 21, e a IL-2 nos momentos 3 e 14. Talvez a menor carga parasitária evidenciada no grupo IV quando comparada com a carga do grupo III (Tabela 9) na maioria dos momentos, pudesse estar relacionada com a produção de IFN- γ com estímulo específico pelo grupo IV, pois de acordo com Murray et al. (1987), quando se inicia a produção de IL-2 e IFN- γ induzida por antígeno, esta coincide com o início do controle da replicação e subsequente morte de mais de 80% da *L. donovani* intra-hepática.

Murphy et al. (2001) observaram que quando as células foram estimuladas com leishmania, a produção de IFN- γ foi maior com 14 dias de infecção do que com 28 dias, resultados estes que discordam do presente estudo, pois nos grupos infectados (III e IV), a produção de IFN- γ foi maior mais tardiamente (momento 21) do que com duas semanas de infecção (momento 14) (Figura 12). De acordo com Murray et al. (1987), nas primeiras semanas de infecção as células do baço de camundongos infectados com leishmania visceral falham na resposta para o antígeno de leishmania na produção de IFN- γ e IL-2. No entanto, de acordo com Rousseau et al. (1997), na fase crônica (70 dias pós infecção), estas células tem a capacidade de responder a ativação

específica por antígeno específico produzindo IFN- γ . Rolão et al. (2007) detectaram IFN- γ e IL-10 em culturas estimuladas com antígeno nos dias 3, 7 e 14 após a infecção.

As cargas parasitárias no baço e no fígado dos grupos infectados (III e IV) foram semelhantes na maioria dos momentos estudados. No entanto, no momento 3, a carga do grupo IV foi maior que no grupo III, sendo no baço mais evidente, entretanto sem diferença estatística (Tabela 9). O grupo IV provavelmente estaria sob ação da DXM, pois Rousseau et al. (1998) observaram que a carga parasitária dos em camundongos tratados com DXM na fase crônica da infecção com *L. infantum* aumentou no baço e Gangneux et al. (1999) relataram que camundongos tratados com DXM+PTX, as cargas parasitárias do baço e fígado aumentaram significativamente, em relação ao grupo controle. No presente estudo, nos momentos seguintes, as cargas dos dois grupos se comportaram de maneira semelhante (Figura 27), provavelmente pelo modelo reversível de imunossupressão da DXM de acordo com Kunicka et al. (1993) ou ainda, pela recuperação parcial das células do baço sensíveis à DXM (ROUSSEAU et al., 1998).

No momento 3, não se detectou parasito no baço do grupo III com a técnica de microtitulação, provavelmente pela carga ser baixa e por conseguinte indetectável. A utilização de uma técnica mais sensível como o PCR em tempo real (BRETAGNE et al., 2001; ROLÃO et al., 2007) talvez tornasse possível a detecção da carga parasitária neste momento. Rolão et al. (2007) utilizando PCR em tempo real detectou DNA de *Leishmania* spp no baço e no fígado a partir do primeiro dia pós-inoculação e este parasitismo se manteve até o 84^o dia, final do experimento. Melby et al. (1998) detectaram parasitos no baço e no linfonodo em camundongos infectados com *L. chagasi* apenas 48 horas após inoculação

A carga parasitária no fígado em ambos os grupos foi maior que a do baço em todos os momentos (Figura 27), o que concorda com Rousseau et al. (1997) e Honoré et al. (1998). No entanto, Rousseau et al. (1997) afirmaram que a carga parasitária no fígado declina e a do baço aumenta. O fígado aparentemente serve como local inicial para multiplicação do parasito e o baço pode servir como abrigo para a persistência a longo prazo do agente (WILSON et al., 2005). Rolão et al. (2007) sugerem que comparado com o fígado, o baço

é mais suscetível a infecção com *L. infantum*. Melby et al. (2001) afirmam que a carga parasitária nestes dois órgãos diminuem ao redor de 28 dias após infecção. O controle da carga parasitária no fígado relaciona-se com a resposta do tecido com granulomas maduros (MURRAY et al., 1987; STAGER et al., 2003; ENGWERD et al., 2004).

A imunossupressão realizada com dexametasona até o momento 0 não influenciou no perfil de citocinas, tanto dos grupos não infectados quanto nos infectados, além disto, não interferiu na carga parasitária dos grupos infectados.

CONCLUSÕES

7.CONCLUSÕES

- 1) A administração de dexametasona resultou em menor ganho de peso dos camundongos
- 2) A administração de dexametasona causou diminuição no peso do baço dos camundongos, no entanto, mostrou um efeito reversível
- 3) A administração de dexametasona causou diminuição na porcentagem de células CD4 no sangue, porém não se observou isto nas células CD8
- 4) A infecção por leishmania viscerotrópica (*L. chagasi*) causou aumento do peso dos baços dos camundongos após sete dias de infecção
- 5) Os camundongos imunossuprimidos com dexametasona produziram citocinas do tipo T_H1 (IFN- γ e IL-2) e T_H2 (IL-10).
- 6) A imunossupressão com dexametasona não influenciou a produção de citocinas tipo T_H1 e T_H2 nos camundongos infectados com *L. chagasi*
- 7) A imunossupressão com dexametasona não influenciou na carga parasitária em baço e fígado de camundongos infectados com *L. chagasi*

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.B.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. 580p.
- ACTOR, J. K.; SHIAARAI, M.; KULLBERG, M. C.; BULLER, R. M.; SHER, A.; BERZOJSKY, J. A helminth infestation results in decreased virus-specific CD8⁺ cytotoxic T cell and T_H1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 948-952, 1993.
- AHMED, S.; COLMENARES, M.; SOONG, L.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MUNSTERMANN, L.; MOLINA, R.; McMAHON-PRATT, D. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 401-410, 2003.
- ALENCAR, J.E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral. In: _____. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 86, p. 706-717.
- ALVAR, J. Leishmaniasis and Aids co-infection: the Spanish example. **Parasitol. Today**, v. 10, p. 160-163, 1994.
- ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, p. 259-265, 2004.
- ANSARI, N.A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clin. Immunol.**, v. 119, p. 339-345, 2006.
- BADARÓ, R. Progress of research in visceral leishmaniasis in the endemic area of Jacobina-Bahia 1934-1989. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 21, p. 159-164, 1988.
- BALARAMAN, S.; TEWARY, P.; SINGH, V.K.; MADHUBALA, R. *Leishmania donovani* induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense response. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 317, p. 639-647, 2004.
- BAUS, E.; ANDRIS, F.; DUBOIS, P.M.M.; URBAIN, J.; LEIO, O. Dexamethasone inhibits early steps of antigen receptor signaling in activated T

- lymphocytes. **J. Immunol.** v. 156, p. 4555-4560, 1996.
- BOGDAN, C.; GESSNER, A.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Immun. Infect.**, v. 8, p. 517-525, 1996.
- BORGES, A.S.; MACHADO, FERREIRA, M.S.; FIGUEIREDO, J.F.C.; SILVA G. F.; CIMERMAN, S.; BACHA, H.; TEIXEIRA, M.C.L. Concomitância de leishmaniose e infecção pelos vírus da imunodeficiência humana (HIV): estudo de quatro casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 713-719, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2003. 120p.
- BRETAGNE, S.; DURAND, R.; OLIVI, M.; GARIN, J.F.; SULAHIAN, A.; RIVOLLET, D.; VIDAUD, M.; DENIAU, M. Real-Time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 8, n. 4, p. 828-831, 2001.
- BUFFET, P.A.; SULAHIAN, A.; GARIN, Y.J.F.; NASSAR, N.; DEROUIN, F. Culture microtitration: sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 2167-2168, 1995.
- CARVALHO, E.M.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JUNIOR., W.D. Cell-mediated immunity in american visceral leishmaniasis: reversible immuno-supression during acute infection. **Infect. Immun.**, v. 33, p. 498-502, 1981.
- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Leishmaniose Visceral Americana**. São Paulo: CVE 2008. Disponível em: www.cve.saude.sp.gov.br. Acesso em 8 de abril de 2008.
- CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 72, p. 132-141, 2002
- CURL, J.L.; PETERS, L.L. Ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride anesthesia in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Lab. Anim.**, v. 17, p. 290-293, 1983.
- DAYNES, R.A.; ARANEO, B.A. Contrasting effects of glucocorticosteroids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4. **Eur. J. Immunol.**, v. 19, n. 12, p. 2319-2325, 1989.
- DEDET, J.P. ; LAMBERT, M. ; PRATLONG, F. Leishmanioses et infection par

- le virus de immunodeficiency humaine. **Presse Med.**, v. 24, p. 1036-1040, 1995.
- ELENKOV, I.J. Glucocorticoids and T_H1/T_H2 balance. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1024, p. 138-146, 2004.
- ENGWERDA, C.R.; ATO, M.; KAYE, P.M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v. 20, p. 524-530, 2004.
- FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients – A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 443-457, 2002.
- FINAMOR, L.P.; FINAMOR JUNIOR, F.; MUCCIOLI, C. Corticoterapia e Uveítes. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 65, p. 483-486, 2002.
- FRANCHIMONT, D.; LOUIS, E.; DEWE, W.; MARTENS, H.; VRINDTS-GEVAERT, Y.; GROOTE, D.; BELAICHE, J.; GEENEN, V. Effects of dexamethasone on the profile of cytokine secretion in human whole blood cell cultures. **Regul. Pept.**, v. 73, p.59-65, 1998.
- GALATI, E.A.B.; NUNES, V.B.L.; REGO, F.A.; OSHIRO, E.T.; RODRIGUES, CHANG, M. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, p. 378-390, 1997.
- GANGNEUXS, J.P.; SULAHIAN, F.C.; DEROUIN, F.; GARIN, Y.J.F. Effects of immunosuppressive therapy on murine *leishmania infantum* visceral leishmaniasis. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 10, p. 557-559, 1999.
- GANTT, K.R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S.M.B.; NASCIMENTO, E.T.; GOLDMAN, T.L.; RECKER, T.J.; MILLER, M. A.; WILSON, M.E. Activation of TGF- β by *Leishmaniasis chagasi*: importnace for parasite survival in macrophages. **J. Immunol.**, v. 170, p. 2613-2620, 2003.
- GHALIB, H.W.; PIUVEZAM, M.R.; SKEIKY, Y.A.W.; SIDDIG, M.; HASHIM, A. M.; EL-HASSAN, A.M.; RUSSO, D.M.; REED, S.G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 324-329, 1993.
- GILKS, C.F. The clinical chanlleenge of the HIV epidemic in the developing world. **Lancet**, v. 342, p. 1037-1039, 1993.

- GOMES-PEREIRA, S.; RODRIGUES, O.R.; ROLÃO, N.; ALMEIDA, P.D.; SANTOS-GOMES, G.M. Hepatic cellular immune responses in mice with “cure” and “non-cure” phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8⁺ T cells and TGF-beta production. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 41, p. 59-68, 2004.
- GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 615-623, 2004.
- GRANDONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **Vet. Parasitol.**, v. 100, p. 87-103, 2001.
- GRANDONI, L.; SCALONE, A.; GRAMICCIA, M.; TROIANI, M. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in HIV-1 infected individuals in Italy. **Aids**, v. 10, p. 785-791, 1996.
- HONORÉ, S.; GARIN, Y.J.F.; SULAHIAN, A.; GANGNEUX, J.P.; DEROUIN, F. Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 21, p. 231-239, 1998.
- KAYE, P.M.; CURRY, A.J.; BLACKWELL, J.M. Differential production of T_H1 e T_H2- derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 146, p. 2763-2770, 1991.
- KAYE, P.M.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C.R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 239-253, 2004.
- KEIL, D.E.; LUEBKE, R.W.; PRUETT, S.B. Differences in the effects of dexamethasone on macrophage nitrite production: dependence on exposure regimen (in vivo or in vitro) and activation stimuli. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 17, p. 157-166, 1995.
- KROUWELS, F.H.; VAN DER HEIJDEN, J.F.; LUTTER, R.; VAN NEERVEN, R. J.; JANSE, H.M.; OUT, T.A. Glucocorticosteroids affect functions of airway- and blood-derived human T cell clones, favoring the T_H1 profile through two mechanisms. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 14, p. 388-397, 1996.
- KUNICKA, J.E.; TALLE, M.A.; DENHARDT, G.H.; BROWN, M.; PRINCE, L.A.;

- GOLDSTEIN, G. Immunosuppression by glucocorticoides: Inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. **Cell. Immunol.**, v. 149, p. 39-49, 1993.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W., KELICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 1-120.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 517, 1987.
- LEBREC, L.; BLOT, C.; PEQUET, S.; ROGER, R.; BOHUON, C.; PALLARDY, M. Immunotoxicological investigation using pharmaceutical drugs: in vivo evaluation of immune effects. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 23, p. 159-168, 1994.
- LIEW, F.Y. Functional heterogeneity of CD4⁺ T cell in leishmaniasis. **Immunol. Today**, v. 10, p. 40-45, 1989.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUKES, J.; MAURÍCIO, I.L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J.C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J.P.; KUHLS, K.; TINTAYA, Q.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNIK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.
- MALLA, N.; MAHAJAN, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis-some recent concepts. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, p. 267-274, 2006.
- MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; CARVALHO, R.W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitol. Today**, v. 10, p. 359-375, 1994.
- MATTNER, F.; DI PADOVA, K.; ALBER, G. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 4378-4383, 1997.
- MAURÍCIO, I. L.; STOHARD J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 188-199, 2000.
- MBATI, P. A. Standardization of *Leishmania donovani* parasite inoculum dose and

route of challenge for use in infectivity studies: is it necessary? **East Afr. Med. J.**, v. 72, p. 804, 1995.

McELRATH, M.J.; MURRAY, H.W.; COHN, Z.A. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v. 167, p. 1927-1937, 1988.

MELBY, P.C.; TABARES, A.; RESTREPO, B.I.; CARDONA, A.E.; MCGUFF, H.S., TEALE, M. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Exp. Parasitol.**, v. 99, p. 17-25, 2001.

MELBY, P.C.; YANG, Y.Z.; CHENG, J.; ZHAO, W. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 18-27, 1998.

MENON, J.N.; BRETSCHER, P.A. Characterization of the immunological memory state generated in mice susceptible to *Leishmania major* following exposure to low doses of *L. major* and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 243-249, 1996.

MILLER, T.A.; SCHAEFER III, F.W. Changes in mouse circulation leukocyte numbers in C57BL/6 mice immunosuppressed with dexamethasone for *Cryptosporidium parvum* oocyst production. **Vet. Parasitol.**, v. 149, p. 147-157, 2007.

MIRALLES, G.D.; STOECKLE, M.Y.; McDERMOTT, D.F.; FINKELMAN, F.D.; MURRAY, H.W. T_H1 and T_H2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1058-1063, 1994.

MOOKERJEE, A.; SEN, P.C.; GHOSE, A.C. Immunosuppression in hamsters with progressive visceral leishmaniasis is associated with an impairment of protein kinase C activity in their lymphocytes that can be partially reversed by okadaic acid or anti-transforming growth factor β antibody. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 5, p. 2439-2446, 2003.

MORROW, R.H.; COLEBUNDERS, R.L.; CHIN V. Interactions of HIV infection with endemic tropical diseases. **Aids**, v. 3, p. 579-587, 1989.

MOYNIHAN, J.A.; CALLAHAN, T.A.; KELLEY S.P.; CAMPBELL L. M. Adrenal hormone modulation of type 1 and type 2 cytokine production by spleen cells: dexamethasone and dehydroepiandrosterone suppress interleukin-2,

- interleukin-4, and interferon-gamma production in vitro. **Cell Immunol.**, v. 184, p. 58-64, 1998.
- MURPHY, M.L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E.N.; HUNTER, C.A.; FARREL, J.P. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 2848-2856, 2001
- MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet.**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.
- MURRAY, H.W.; HARIPRASHAD J.; COFFMAN, R.L. Behavior of visceral *Leishmania donovani* in an experimentally induced T helper cell 2 (Th2) – associated response model. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 867-874, 1997.
- MURRAY, H.W.; MIRALLES G.D.; STOECKLE, M.Y.; McDERMOTT, D.F. Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 151, p.929-938, 1993.
- MURRAY, H.W.; MOREIRA, A.L.; DeVECCHIO, J.L.; MATSUHASHI, M.; MA, X.J.; HEINZEL, F.P. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v.188, p.458-464, 2003.
- MURRAY, H.W.; STERN, J.J.; WELTE, K.; RUBIN B.Y.; CARRIERO S.M.; NATHAN, C.F. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon- γ , tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon- γ . **J. Immunol.**, v. 138, p. 2290-2297, 1987.
- NEVES, V.L.F.C. A leishmaniose visceral Americana no estado de São Paulo: situação atual. **Bol. Epidemiol. Paul.**, v. 1, n. 6, p. 1-4, 2004.
- NICOLLE, C. Sur trois cas d infection splénique infantile à corps de Leishman observés in Tunisia. **Arch. Inst. Pasteur**, v. 3, p. 1-26, 1908.
- OLIVEIRA, C.L.; ASSUNÇÃO, R.M.; REIS, I.A.; PROIETTI, F.A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil., 1994-1997. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, p. 1231-1239, 2001.
- RAMIERZ, F.; FOWELL, D.J.; PUKLAVEC, M.; SIMMONDS, S.; MASON, D. Glucocorticoids promote a T_H2 cytokine response by $CD4^+$ T cells in vitro. **J. Immunol.**, v. 156, p. 2406-2412, 1996.
- REQUENA, J.M.; SOTO, M.; DORIA, M.D.; ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster

- model. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 76, p. 269-281, 2000.
- RIÇA-CAPELA, M.J.; CORTES, S.; LEANDRO, C.; PELETEIRO, M.C.; SANTOS-GOMES, G.; CAMPINO, L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitol. Res.**, v. 89, p. 163-169, 2003
- RODRIGUES JUNIOR, V.; SILVA, J.S.; CAMPOS-NETO, A. Selective inability of spleen antigen presenting cells from *Leishmania donovani* infected hamsters to mediate specific T cell proliferation to parasite antigens. **Parasite Immunol.**, v. 14, p. 49-58, 1992.
- RODRIGUES JUNIOR, V.; SILVA, J.S.; CAMPOS-NETO A. Transforming growth factor β and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 66, p.1233-1236, 1998.
- ROLÃO, N.; MELO, C.; CAMPINO, L. Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. **Acta Trop.**, v. 90, p. 123-126, 2004.
- ROLÃO, N.; CORTES, S.; GOMES-PEREIRA, S.; CAMPINO, L. *Leishmania infantum*: Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Exp. Parasitol.**, v. 115, p. 270-276, 2007.
- ROSS, R. Notes on the bodies recently described by Leishman na Donovan. **Br. Med. J.**, v. 2237, p.1261-1262, 1903.
- ROSYPAL, ALEXA C.; ZAJAC, ANNE M.; TROY, GREGORY C.; LINDSAY, DAVID S. Infections in immunocompetent and immune-deficient mice with promastigotes of a North American isolate of *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, v. 130, p. 19-27, 2005.
- ROUSSEAU, D.; SUFFIA, I.; FERRUA, P.; PHILIP, Y.; FICHOUX, L.; KUBAR, J. Prolonged administration of dexamethasone induces limited reactivation of visceral leishmaniasis in chronically infected BALB/c mice. **Eur. Cytokine Netw.**, v.9, p.655-662, 1998.
- ROUSSEAU, D.; LE FICHOUX, Y.; STIEN, X.; SUFFIA, I.; FERRUA, B.; KUBAR, J. Progression of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in BALB/c mice is markedly slowed by prior infection with *Trichinella spiralis*. **Infect. Immun.** v. 65, p. 4978-4983, 1997.
- SCOTT, P. T-cell subsets and T-cell antigens in protective immunity against experimental leishmaniasis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 155, p. 35-52,

1990.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Dados de ocorrência de infecção hospitalar, da mortalidade por causas externas e da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. Informes técnicos institucionais. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, p. 141-144, 2004.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 3ª ed. São Paulo: Guanabara, 2002. Cap. 22, p. 240-250.

STÄGER, S.; ALEXANDER, J.; CARTER, K.C.; BROMBACHER, F.; KAYE, P. M. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor α signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 8, p. 4804-4807, 2003.

STAUBER, L.A.; FRANCHINO, E.M.; GRUN, J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in golden hamsters. **J. Protozool.**, v. 5, p. 269-273, 1958.

STERN J.J.; OCA, M.J.; RUBIN, B.Y.; ANDERSON, S.L.; MURRAY, H. W. Role of L3T4⁺ e Lyt-2⁺ cells in experimental visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 140, p. 3971-3977, 1988.

TITUS, R.G.; RIBEIRO, J.M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, v. 239, p. 1306-1308, 1988.

TRAVI, B.L.; MONTOYA, J.; GALLEGOS, J.; JARAMELLO, C.; LLANO R.; VELEZ, I.D. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Colombia. **J. Med. Entomol.**, v. 33, p. 278-285, 1996.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 239-243, 2007.

TRIOLA, M.F. **Introdução à estatística**. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 682p.

TUMANG, M.C.; KEOGH, C.; MOLDAWER, L.L.; HELFGOTT, D.C.; TEITELBAUM, R.; HARIPRASHAD, J.; MURRAY, H.W. Role and effect TNF- α in experimental visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 153, p. 768-775, 1994.

ZHAO, C.; PAPADOPOULOU, B.; TREMBLAY, M.J. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. **Clin. Immunol.**, v. 113, p. 81-

88, 2004.

YOUNG L.S. Infection in the compromised host. **Hosp. Pract.**, v. 16, p. 73-84, 1981.

WILSON, M. E., JERONIMO, S.M.B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb. Pathog.**, v. 38, p. 147-160, 2005.

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](#)