

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO**

RENATA DE MEIRELLES SANTOS PEREIRA

**Estudo do papel da Proteína Kinase R
(PKR) na infecção por *Leishmania***

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

**Rio de Janeiro
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Renata de Meirelles Santos Pereira

**Estudo do papel da Proteína Kinase R (PKR) na
infecção por *Leishmania***

Tese Submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas
(Biofísica) do Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho, Universidade
Federal do Rio de Janeiro, visando a
obtenção do grau de Doutor em
Ciências.

Orientador: Prof. Ulisses Gazos Lopes

**Rio de Janeiro
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Renata de Meirelles Santos.

Estudo do papel da Proteína Kinase R (PKR) na infecção por *Leishmania* / Renata de Meirelles Santos Pereira - Rio de Janeiro, 2009

Xi,147f.: Il.: 31 cm

Tese de Doutorado em Ciências. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Programa de Pós-Graduação em Ciências biológicas (Biofísica), 2009.

Orientador: Ulisses Gazos Lopes

1. *Leishmania*. 2. PKR . 3. macrófago. 4. IL-10 5. IFN I 6. NF-κB

I. Lopes, UG. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia Molecular, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação do Prof. Ulisses Gazos Lopes, tendo sido a autora financiada por bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Quando você sabe alguma coisa, reconhecer que sabe; e, quando você não sabe alguma coisa, reconhecer que não sabe. Isso é conhecimento.”

Confúcio (século IV A.C.)

“O valor de praticar com rigor, por algum tempo, uma ciência rigorosa não está propriamente em seus resultados: pois eles sempre serão uma gota ínfima, ante o mar das coisas dignas de saber. Mas isso produz um aumento de energia, de capacidade dedutiva, de tenacidade; aprende-se a alcançar um fim de modo pertinente. Neste sentido é valioso, em vista de tudo o que se fará depois, ter sido um homem de ciência.”

Nietzsche (1878)

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ulisses Gazos Lopes pela orientação e confiança ao longo de todos estes anos. Por me dar apoio nos momentos de dificuldade e a liberdade necessária para meu aprendizado;

À Dra. Elvira Saraiva pelos ensinamentos com *Leishmania* e por estar sempre disposta a ajudar e discutir os rumos do trabalho. Por todos os reagentes e parasitos cedidos;

À Dra. Maria Bellio pela ajuda fundamental nesta minha incursão no mundo da Imunologia e pelo apoio material fundamental;

Ao Dr. Aristóbolo Silva por ceder animais, células e reagentes necessários para a realização deste trabalho, pelo constante apoio e participação científica no trabalho;

Ao Dr. Dummith Bou-Habib e ao Victor Brasil (Fio-Cruz) pelo apoio científico e material e pela solicitude em todos os momentos;

À Prof. Marcela Lopes (IBCCF) por compartilhar um pouco de seu vasto conhecimento em Imunologia e pelo apoio e carinho de sempre;

A Karina, por me acompanhar neste projeto desde o Início de sua Iniciação Científica, compartilhando momentos de muito trabalho e também de amizade. Espero que sua contribuição para o trabalho tenha sido também um grande aprendizado;

À Teresa, por estarmos também juntas na mesma "grande linha" do laboratório desde o início de sua Iniciação Científica. Pelo apoio constante, pela dedicação, pelas trocas científicas, pelo bom-humor e pela amizade;

A todos os integrantes do Laboratório de Parasitologia Molecular: ao Rodrigo, por estar sempre disposto a ajudar, auxiliando nos momentos de sufoco, pelas boas idéias, pelas conversas e pela amizade dentro e fora do laboratório; ao Áislan pela imensa dedicação e seriedade em tudo que faz e pela boa vontade em ajudar sempre; ao Dione, por ter sempre uma grande contribuição científica a dar, pelos momentos de descontração; à Maíra, grande companheira dos "horários alternativos" fazendo as noites e fins de semana no fundão mais agradáveis, pelo apoio e amizade; à Ilana, sempre com grande interesse, prestatividade e bom humor; à Natália por também tornar o ambiente do laboratório mais agradável, sempre com muito trabalho, esforço e dedicação; ao Odilon e Andréia, que se tornaram parte do grupo, pela maturidade e profissionalismo mesmo sendo tão novos; àqueles que já não estão mais no laboratório mas fizeram parte da minha formação científica: ao Paulo Redner pela criatividade e gosto por ensinar; ao Zé, pelos eternos ensinamentos, por ser sempre um exemplo em dedicação, conhecimento e amor pela ciência. Finalmente, ao Paulo Cordeiro pelo apoio técnico (e gastronômico) e pelo carinho;

À Sandrinha da secretaria da pós, pelo auxílio com todas as burocracias;

À professora Clarissa Damaso (IBCCF) pela ajuda material e pelas conversas científicas;

Aos membros do laboratório de Imunologia da leishmaniose (IMPPG), em especial, ao Deivid, à Michelle, à Carol, ao Anderson, à Natália, à Karen, à Eliete. Por fornecerem um ambiente de profissionalismo, ajudando em todos os momentos e pela simpatia e hospitalidade de sempre em seu laboratório;

Ao Prof. Marcelo Bozza e aos membros do Laboratório de Inflamação (IMPPG) pela solicitude e simpatia de sempre, em especial ao Fabiano, à Patrícia, ao Feijó e ao Guilherme;

Ao Prof. Januário pelo constante apoio ao longo de todos esses anos;

Aos laboratórios do Programa de Biologia Molecular pela ajuda nos momentos necessários, em especial ao Deivid (LBMMM), à Michelle, à Carol e à Letícia (Unidade Genômica) e à Sheila (LBMV).

Ao Laboratório de Neurobiologia da Retina pelo apoio material e pelo Real-time, em especial ao Brian e à Prof. Mariana;

Ao lab do Prof. Célio e aos membros do Laboratório de Fisiologia Endócrina por terem sido sempre vizinhos tão prestativos e agradáveis, em especial ao Álvaro, ao Thiago, à Renatinho e ao Bruno;

Ao meu namorado André, por entrar minha vida de forma tão decisiva. Por sermos sempre amigos e companheiros e por termos conseguido colocar a Ciência como parte de nossas vidas de forma tão prazerosa.

À minha família querida: meu pai, minha mãe e meus irmãos Fred e Fernando, por termos aprendido juntos que a união e o amor vencem qualquer dificuldade. Pelo apoio incondicional.

A todos que me ajudaram de alguma forma neste trabalho e não foram citados;

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Ab- anticorpo

2-AP- 2-aminopurina

BSA- albumina de soro bovino

cDNA- DNA complementar

CR- receptor de complemento

DMEM – meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO- dimetil sulfóxido

DN- dominante negativo

DNA- ácido desoxirribonucléico

dsRNA- RNA dupla-fita

DTT- ditioneitol

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

EGTA- Etilenoglicol-bis (B-aminoetil)-N,N,N',N' - ácido tetracético

EMSA- Ensaio de Mudança de Mobilidade eletroforética

HEPES- N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2- ácido etanosulfônico

HIV-1- vírus da imunodeficiência humana

I κ B- inibidor de NF- κ B

IKK- I κ B cinases

IFN- interferon

Ig- Imunoglobulina

IL- interleucina

iNOS ou NOS2- óxido nítrico sintase induzível

IL-R- receptor de interleucina

LPG- lipofosfoglicana

LPS- Lipopolissacarídeo

MHC- complexo principal de histocompatibilidade

mRNA- RNA mensageiro

NF- κ B- fator nuclear κ B

NO- óxido nítrico

PBS- tampão salina fosfato

PMA- forbol-12 miristato-13 acetato

PMSF– Fluoreto de fenilmetilsulfônico

PKR- proteína kinase R

RNA- ácido ribonucléico

ROS- espécies reativas de oxigênio

SDS- dodecil sulfato de sódio

STAT- transdutor de sinal e ativador de transcrição

TAE- tris acetato EDTA

Tat- ativador da transcrição

TBS- tampão salino tris

TBST- tampão salino tris *tween*

TE- tampão Tris-EDTA

TEMED- NNN'N' tetra metil etileno diamina

TLR- receptor do tipo *Toll*

TNF- α - fator de necrose tumoral alpha

TNF-R- receptor de TNF

Tris- hidroximetil aminometano

U- unidades

V- volts

μCi - microCurie

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença parasitária que afeta 350 milhões de pessoas em todo o mundo e vem emergindo como uma infecção oportunista freqüente em pacientes de AIDS. O curso da infecção por *Leishmania* depende de um balanço entre funções microbicidas e supressoras dos macrófagos, associadas a estratégias adaptativas do parasito. A produção de óxido nítrico (NO) representa o principal mecanismo efetor para a eliminação da *Leishmania* por macrófagos, e a produção de IL-10 é capaz de inibir esta resposta, favorecendo a infecção. PKR (proteína cinase dependente de dupla-fita de RNA), uma clássica proteína de resposta anti-viral, é capaz de regular uma série de vias de transdução de sinais e funções dos macrófagos. No presente trabalho, investigamos o possível papel de PKR na modulação da infecção por *Leishmania*. Em ensaios com células monocíticas THP-1 diferenciadas e macrófagos humanos derivados de PBMCs (células mononucleares de sangue periférico) verificamos que o tratamento com a dupla-fita de RNA sintética poly(I:C), um potente indutor de PKR, levou ao agravamento da infecção por *Leishmania amazonensis* e este efeito foi revertido pelo tratamento com 2-aminopurina, um inibidor farmacológico de PKR. O aumento da proliferação intracelular de *L. amazonensis* promovido pelo poly(I:C) também foi revertido pela expressão do dominante negativo de PKR (DN-PKR) em células Raw. Similar ao observado para *L. amazonensis*, a infecção por *L. chagasi* também é favorecida pelo tratamento com poly(I:C), mas não a infecção por *L. major*. LPS, um outro indutor de PKR, também favoreceu a infecção de *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Análises de EMSA demonstraram que *L. amazonensis* é capaz de modificar a ativação do fator de transcrição NF- κ B dependente de PKR, o que levou à inibição da expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e da produção de NO. *L. major* não foi capaz de subverter esta via. O favorecimento da infecção por *L. amazonensis* pode ser devido à produção de IL-10 e IFN I dependente de PKR observada. De forma interessante, a infecção por *L. amazonensis* induziu a modulação dos níveis de PKR e sua ativação. Consistente com este dado, em macrófagos oriundos de camundongos 129sv/ev PKR-KO ou células Raw expressando DN-PKR, a infecção por *L. amazonensis* é reduzida, mesmo na ausência de outros indutores desta cinase. Análises *in vivo* demonstraram que em camundongos PKR-KO, a lesão causada por *L. amazonensis* em 4 semanas de infecção é menor, comparada aos animais WT. Este dado correlaciona com uma maior produção de IFN- γ , citocina associada a um perfil de resposta Th1, em animais PKR-KO após 2 semanas de infecção por *L. amazonensis* e pode explicar o título de parasitas reduzido no baço de animais PKR-KO observado em estágios mais tardios de infecção. Em suma, nossos dados demonstram pela primeira vez o papel de PKR na resposta imune a leishmaniose e abre perspectivas para a investigação desta molécula como um fator importante no curso de infecções parasitárias.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic disease that affects 350 million people around of the world and is emerging as a frequent opportunistic infection in AIDS patients. The course *Leishmania* infection depends on the balance between microbicidal or supressor macrophage functions, associated with parasitic adaptive strategies. The production of nitric oxide (NO) represents the main effector mechanism for *Leishmania* elimination by macrophages, and the production o IL-10 can inhibit this response, favoring *Leishmania* infection. PKR (dsRNA-activated protein kinase R), a classic host anti-viral response protein, is able to regulate a series of signalling pathways and macrophage functions. The present work investigated the possible role of PKR in *Leishmania* infection modulation. In assays with differentiated THP-1 cells and human PBMCs macrophages (Peripheral Blood Mononuclear Cell) we verified that the treatment with the synthetic double-strand RNA poly(I:C), a potent PKR inducer, aggravates *Leishmania amazonensis* infection and this effect was reverted by the treatment with 2-aminopurine, a pharmacological inhibitor of PKR. The increased intracellular proliferation of *L. amazonensis* promoted by poly(I:C) was also reverted by expression of the dominant negative of PKR (DN-PKR) in Raw cells. Similar to *L. amazonensis*, *L. chagasi* infection was also favored by poly(I:C) treatment, but not the infection caused by *L. major*. LPS, an other PKR inducer, has also favored *L. amazonensis* and *L. chagasi* infection. EMSA analyses have demonstrated that *L. amazonensis* was able to modify PKR-dependent activation of transcription factor NF- κ B, leading to the inhibition of iNOS (inducible nitric oxide synthase) promoter activity and NO poduction. *L. major* was not able to subvert this pathway. The favoring of *L. amazonensis* infection may be due to the PKR-dependent IL-10 and IFN I production. Interestingly, the infection with *L. amazonensis* leads to increased levels of PKR and its activation. Consistently, in macrophages from PKR-KO 129sv/ev mice or Raw expressing DN-PKR *L. amazonensis* infection was reduced, even in the absence of others inducers of this kinase. Analyses *in vivo* demonstrated that in PKR-KO mice, the lesion caused by *L. amazonenis* infection was smaller at 4 weeks compared to WT animals. This observation correlates with increased production of Th1 response associated cytokine IFN- γ in PKR-KO animals after 2 weeks of *L. amazonenis* infection and can explain the reduction of parasite load in the spleen of PKR-KO mice at late stagies. Taken together, these data indicate for the first time that PKR is not only an anti-viral protein, but can also modulate parasitic infection.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
SUMÁRIO	xiii
INTRODUÇÃO	1
1.a) Leishmaniose	1
1.b) O Gênero <i>Leishmania</i> (Ross, 1903)	2
1.c) Ciclo Biológico da <i>Leishmania</i>	3
1.d) A resposta imune na leishmaniose: Resistência X Suscetibilidade	5
1.e) Interação da <i>Leishmania</i> com macrófagos: a subversão de vias de sinalização intracelular	8
2- PKR	12
2.a) Estrutura e função de PKR	12
2.b) Modulação de NF- κ B por PKR	17
2.c) PKR e a produção de Interferon do tipo I	20
JUSTIFICATIVA	23
OBJETIVO	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
METODOLOGIA	25
1) Macrófagos e Parasitas	25
2) Western blot	28
3) RT-PCR	30
4) EMSA (eletrophoretic mobility shift assay)	32
5) ELISA	34
6) Análise da produção de NO	35
7) Ensaio de repórter luciferase	36
8) Ensaios de infecção em camundongos knockout para PKR	37
9) Análise Estatística	40
Soluções	41
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	89
CONCLUSÕES	111
BIBLIOGRAFIA	112

INTRODUÇÃO

1.a) Leishmaniose

Os parasitas do gênero *Leishmania* são agentes de zoonoses que infectam humanos em regiões tropicais e subtropicais do Novo e Velho Mundo, causando doenças do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos (Neves, 2005). Em função da espécie causadora da infecção, a leishmaniose apresenta diversas manifestações clínicas: lesões ulcerativas de pele (leishmaniose cutânea), inflamações destrutivas das mucosas (leishmaniose mucocutânea) e infecção visceral disseminada (leishmaniose visceral ou *Kala azar*). Ocorrem também inúmeras variações epidemiológicas e imunopatológicas da doença, tendo em vista a enorme variedade de áreas endêmicas em que se manifesta (Murray *et al*, 2005).

A transmissão da doença se dá através da picada de dípteros da subfamília *Phlebotominae* (dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*) no momento da hematofagia (De Almeida *et al*, 2003).

A leishmaniose é endêmica em 88 países e 5 continentes (África, Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul), com um total de 350 milhões de pessoas sob risco. Mais de 12 milhões de pessoas estão infectadas pela leishmaniose no mundo, sendo estimados 1,5 a 2 milhões de novos casos anualmente, sendo que apenas 600 mil são oficialmente declarados. Atualmente, a leishmaniose é considerada pela OMS uma das seis mais importantes endemias do mundo (WHO, 2003).

1.b) O Gênero *Leishmania* (Ross, 1903)

Os agentes causadores das leishmanioses humanas são protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (Schmidt & Roberts, 2000).

Os tripanosomatídeos apresentam alternância de formas celulares em seus ciclos biológicos, sobretudo na transição entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os estágios do gênero *Leishmania* encontrados parasitando os insetos vetores flebotomíneos são as formas **promastigotas**, alongadas com flagelo livre a partir da porção anterior da célula. Nos vertebrados, a forma encontrada é a **amastigota**, forma arredondada ou oval, com flagelo curto. As leishmanias apresentam-se ainda nas formas **paramastigota**, arredondadas ou ovais, aderidas à porção anterior do trato digestivo do vetor. Finalmente, as formas infectivas para o hospedeiro vertebrado, presentes livres nas porções anteriores do trato digestivo dos insetos vetores, denominadas **promastigotas metacíclicos**, são bem alongadas, possuem flagelo muito longo e intensa mobilidade (Dominguez *et al*, 2003; Neves *et al*, 2005).

Apesar de todas as *Leishmania spp* exibirem morfologia similar, elas diferem clinicamente, biologicamente e sorologicamente.

As leishmanias que infectam humanos são agrupadas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. No subgênero *Viannia* encontramos as espécies causadoras da leishmaniose tegumentar americana que são agrupadas no “complexo *Leishmania brasiliensis*”. Neste grupo encontramos a *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*. A espécie *L. (V.) brasiliensis* está relacionada à leishmaniose mucocutânea, causando lesões oro-faríngeas (Laisson & Shaw, 1994; Rey, 2001, Murray *et al*, 2005).

Já o subgênero *Leishmania*, é composto pelo “complexo *Leishmania mexicana*”, que compreende espécies causadoras da leishmaniose cutânea (ou cutâneo-difusa) do Novo Mundo (*L. (L.) mexicana*, *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (L.) garnhami*); pelo “complexo *Leishmania donovani*”, cujas espécies são causadoras da leishmaniose visceral (*L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* ou *chagasi*) onde os parasitas proliferam em macrófagos do fígado, baço, medula óssea, pulmões, mucosa intestinal e sistema nervoso; e pelas *Leishmanias* cutâneas do Velho Mundo (*L. (L.) tropica* e *L. (L.) major*) (Rey, 2001 & Murray *et al*, 2005).

A *Leishmania amazonensis*, principal alvo de análise em nosso estudo, é peculiar à Bacia Amazônica, também sendo encontrada nas Regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, mas também há relatos em Trinidad, Colômbia e Panamá. Esta espécie causa lesões cutâneas nodulares e verrugosas únicas ou em pequeno número, que poucas vezes se curam espontaneamente. Não está associada a metástases mucosas, estando, entretanto, relacionada a formas cutâneo-difusas ou formas disseminadas (anérgicas) em indivíduos com deficiência inata da resposta imune (Silveira *et al*, 2005; Gramiccia & Gradoni, 2005).

1.c) Ciclo Biológico da *Leishmania*

A infecção dos hospedeiros vertebrados ocorre quando formas promastigotas metacíclicas da *Leishmania* são inoculadas pela fêmea do inseto vetor durante o repasto sanguíneo (de Almeida *et al*, 2003).

Leishmanias apresentam, nas diferentes formas evolutivas, uma variedade de moléculas em sua superfície fundamentais para a determinação de virulência, infectividade, sobrevivência e patogênese. As duas principais famílias de moléculas de superfície de promastigotas, gp63 e as fosfoglicanas, são os principais ligantes para a adesão aos

macrófagos. gp63 é um metaloprotease presente abundantemente na superfície de promastigotas. A família de fosfoglicanas de *Leishmania* compreende glicolipídeos, como lipofosfoglicana (LPG) e as proteínas fosfoglicosiladas, como as fosfatases-ácidas secretadas e proteofosfoglicanas (PPG). Ambas as moléculas podem também estar presentes em formas amastigotas de algumas espécies de *Leishmania* (Handman & Bullen, 2002).

A internalização da *Leishmania* se dá através de endocitose mediada por receptores de superfície do macrófago. Os receptores de complemento (CR)1 e CR3 são fundamentais neste processo. CR4, receptor de fibronectina e receptor de manose também estão implicados na invasão (Handman & Bullen, 2002).

Após a internalização, o promastigota metacíclico é inicialmente encontrado em um fagossoma contíguo à membrana do macrófago. O fagossoma é então modificado pela passagem de enzimas dos lisossomas para o mesmo, resultando no vacúolo parasitóforo (PV). O parasito, então, diferencia-se para a forma amastigota, capaz de se desenvolver e multiplicar no meio ácido. O amastigota dentro do vacúolo sofre, então, sucessivas divisões, havendo então a ruptura da célula hospedeira e liberação dos amastigotas. As formas amastigotas livres também são capazes de invadir outros macrófagos através de receptores Fc para imunoglobulina G, CR3 e receptor de manose (Handman & Bullen, 2002).

A infecção do inseto vetor ocorre no momento do repasto sanguíneo em indivíduos ou animais infectados. Formas amastigotas são ingeridas juntamente com o sangue e/ou a linfa intersticial. No intestino anterior ou médio do inseto, o alimento é envolvido pela matriz periotrófica, uma membrana quitinosa secretada pelas células epiteliais do intestino que promove uma barreira a enzimas secretadas pelo intestino. Em algumas espécies, a

colonização pode ocorrer no intestino posterior. Após quatro a cinco dias de multiplicação dos parasitas ocorre a transformação em formas promastigotas. A matriz é rompida e os parasitas liberados migram para porções torácicas do intestino do inseto enquanto se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas que irão alcançar a probóscide e reiniciar o ciclo (Pimenta *et al*, 1997; Neves *et al*, 2005).

1.d) A resposta imune na leishmaniose: Resistência X Suscetibilidade

De uma forma geral, a imunidade protetora contra a leishmaniose é mediada pela clássica resposta imune mediada por célula (CMI), enquanto a doença não curável é associada a uma forte resposta humoral, na ausência de CMI. Estudos imunológicos analisando perfis de resistência ou suscetibilidade em modelos murinos deram origem à identificação de uma dicotomia Th1/Th2 de resistência/suscetibilidade no desenvolvimento das respostas imunes. Um conjunto específico de citocinas secretadas por células TCD4⁺, IFN- γ e IL-12 ou IL-10 e IL-4, caracterizam as respostas Th1 e Th2, respectivamente. Entretanto, este paradigma foi largamente determinado utilizando *L. major* como modelo, onde é, sobretudo, reconhecido o papel de IL-12 e IL-4 no direcionamento destas respostas. Mais especificamente, acredita-se atualmente que a imunidade protetora a esses organismos seja mediada por uma resposta do tipo 1, embora a identificação de uma papel arquétipo de suscetibilidade conferido pelas citocinas do tipo 2 ainda não esteja muito claro (McMahon-Pratt & Alexander, 2004).

Até recentemente, uma resposta do tipo 1 induzida por IL-12 (interleucina 12) foi aceita como promotora de imunidade protetora contra todas as espécies de *Leishmania* (Sypek *et al*, 1993). IL-12 ativa células NK (*natural killer*), que produzem IFN- γ (interferon γ). Estas citocinas não apenas controlam a resistência inata à infecção através

da indução da produção de NO (óxido nítrico) pelos macrófagos (Liew & O'Donnell, 1993), como influenciam a iniciação de uma resposta do tipo I por células Th1 (Scharton-Kersten *et al*, 1995). Paradoxalmente, um estudo com *L. mexicana* sugere que a resistência a este parasito é independente de IL-12, apesar de dependente de STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4) (Buxbaum *et al*, 2002).

Estudos com *L. major* sugerem que uma resposta do tipo 2 induzida por IL-4 contrapõe a resposta do tipo 1 e conseqüentemente leva a uma lesão não curável. Outros estudos, entretanto, sugerem que a não-cura, na realidade, é devida a uma ausência de resposta Th1, e como conseqüência, falha em produzir e responder a IL-12. Apesar de estudos demonstrarem que IL-4 pode diminuir a expressão de IL-12 e seu receptor, estudos recentes indicam que este efeito pode ser causado por mecanismos independentes de IL-4 (McMahon-Pratt & Alexander, 2004).

Diferente do perfil observado para *L. major*, parasitas do complexo *L. mexicana* produzem infecções crônicas na maioria das linhagens de camundongo (Blackwell, 1996). Ao contrário do papel inconclusivo para as infecções por *L. major*, IL-4 desempenha um papel importante em impedir a cura da infecção por *L. mexicana* em linhagens de camundongo (Satoskar *et al*, 1997). Em contrapartida, a suscetibilidade a *L. amazonensis*, espécie fortemente relacionada a *L. mexicana*, parece ter um papel insignificante de IL-4. Consistente com este fato, a inibição de IL-12R β 2, considerada o principal mecanismo de prevenção do desenvolvimento de uma resposta do tipo 1 e cura da infecção por *L. amazonensis*, é independente de IL-4 (Jones *et al*, 2000).

Ao contrário do descrito até agora para as infecções cutâneas, no caso da infecção por *L. donovani*, a resposta do tipo 2 pode promover resistência à infecção. IL-4 parece

importante para a eliminação dos parasitos no fígado e baço e para a manutenção da produção de IL-12 e IFN- γ (Alexander *et al*, 2000). Aparentemente a suscetibilidade à infecção visceral por *L. donovani*, assim como em *L. major*, parece ser, em parte, mediada por IL-10 (Murphy *et al*, 2001).

Estas aparentes contradições nos mecanismos de resposta, na realidade, ilustram que a diversidade evolutiva dos protozoários parasitas do gênero *Leishmania* determina diferentes adaptações e fatores de virulência o que leva a profundas diferenças em mecanismos imunes de resistência/suscetibilidade à infecção e patologias associadas à doença.

Especial atenção vem sendo dada a um subtipo especial de células T, as CD4⁺, CD25⁺ regulatórias (T reg). As T reg são capazes de reconhecer antígenos próprios em desordens auto-imunes e antígenos não próprios em doenças infecciosas, diminuindo as respostas Th1 e Th2, respectivamente (Sakaguchi, 2003; Piccirillo and Thornton, 2004). Fenotipicamente, as Treg são caracterizadas pela expressão de CTLA-4, *phenotypically glucocorticoid-induced TNF receptor* (GITR), CD86 e FoxP3 (um fator transcrricional) (Ramsdell, 2003). Muitos estudos vêm sendo realizados visando avaliar o papel das células T reg no controle da imunidade em modelos de infecção e resultados interessantes foram demonstrados no modelo de infecção por *L. major*. Células T reg suprimem células Th1 dominantes e previnem a completa eliminação de *L. major* em camundongos B6 e também suprimem as células Th2 dominantes e o desenvolvimento da doença em camundongos BALB/c (Belkaid *et al*, 2002; Xu *et al*, 2003). Ji e colaboradores (2005) demonstraram que após a infecção por *L. amazonensis*, ocorre um aumento de células Treg no sítio da

infecção e nos linfonodos drenantes. Além disso, demonstraram que estas células podem limitar a imunopatogênese causada por *L. amazonensis*.

1.e) Interação da *Leishmania* com macrófagos: a subversão de vias de sinalização intracelular

No hospedeiro vertebrado, as espécies de *Leishmania* são encontradas majoritariamente no interior de macrófagos, portanto, o equilíbrio entre funções microbidas e supressoras dos macrófagos, bem como as estratégias de subversão associadas ao parasita irão ditar, em grande parte, o sucesso do processo infeccioso.

A produção de óxido nítrico (NO) pela isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS ou NOS2) representa um dos principais mecanismos efetores para a eliminação de *Leishmania* spp por macrófagos humanos e de camundongo. Os principais indutores desta enzima são IFN- γ , como já mencionado, e TNF- α , citocinas liberadas principalmente por células CD4⁺ do tipo Th1 (Bogdan & Rollinghoff, 1999; Bogdan, Rollinghoff & Diefenbach, 2000). Entretanto, citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-10 e TGF- β (transforming growth factor β), irão não só inibir a morte do parasita mediada por IFN- γ (Kane & Mosser, 2001; Vouldoukis *et al*, 1997), como favorecer diretamente o crescimento da *Leishmania* no interior de macrófagos através da produção de poliaminas (Iniesta, Gómez-Nieto & Corraliza, 2001; Iniesta *et al*, 2002; Iniesta *et al*, 2005).

Tanto a produção de NO quanto de poliaminas requer a metabolização da arginina. Enquanto iNOS catalisa a conversão da L-arginina em NO e citrulina, a arginase catalisa a conversão da arginina em ornitina e uréia. Um dos caminhos metabólicos da ornitina é a síntese de poliaminas através da ornitina descarboxilase (ODC). O balanço da ativação entre

as duas enzimas é competitivamente regulado por células Th1 e Th2: citocinas do tipo Th1 induzem a ativação de iNOS, enquanto citocinas do tipo 2 induzem a arginase I. A indução de uma dessas enzimas é acompanhada pela supressão da outra através de metabólitos intermediários e depleção de substrato (Modolell *et al*, 1995).

Apesar do seqüestro da *Leishmania* no interior dos macrófagos representar um mecanismo de escape de diversas respostas imunes hospedeiras, para que o parasita sobreviva dentro destas células são necessários uma série de mecanismos de escape no sentido de inibir as funções leishmanicidas. Desta forma, os próprios parasitas são capazes de inibir iNOS e a produção de NO em resposta a LPS e/ou INF- γ (Proudfoot *et al*, 1995, 1996); inibir moléculas envolvidas com a apresentação de antígenos, como MHC-II (De Almeida *et al*, 2003) e B7-1 (moléculas co-estimulatória para apresentação de antígeno) (Kaye *et al*, 1994); inibir a produção de citocinas, particularmente as envolvidas com o processo inflamatório, como TNF- α (Descoteaux & Matlashewski, 1989) e na regulação da resposta imune celular, como IL-12 (Carrera *et al*, 1996); e induzir moléculas imunossupressivas, como PGE-2 (Matte *et al*, 2001), TGF- β e IL-10 (De Freitas Balanco *et al*, 2001).

As diversas alterações nos mecanismos de resposta aqui exemplificadas decorrem de modificações nas vias de transdução de sinal das células hospedeiras pela *Leishmania*. A supressão da produção de NO e MHC-II induzida por IFN- γ está relacionada à inibição da sinalização de JAK2/STAT1 pela *Leishmania*. A inibição dessa via parece se dever a uma fosforilação defectiva de JAK1, JAK2 e STAT1, em virtude da ativação de fosfotirosina fosfatases (PTPs), em particular, SHP-1 (Nandan & Reiner, 1995). Entretanto, dados mais recentes mostram um papel direto da via de degradação por proteossoma na proteólise de

STAT1 em macrófagos infectados com *Leishmania* (Gregory & Oliver, 2005). A infecção por *Leishmania* é capaz ainda de levar à inibição de uma série de proteínas da família das MAPK (*mitogen activated proteins kinase*), como ERK1/2 (*Extracellular-regulated kinase*), p38 e JNK (*Jun N-terminal kinase*), resultando em uma entrada “silenciosa” no macrófago (Gregory & Oliver, 2005). Em um estudo, esta inativação da ERK1/2 mediada por ceramida resultou na inibição dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B, o que parece explicar a ausência de geração de NO em células infectadas por *L. donovani*. Entretanto, este resultado parece ser dependente da origem dos macrófagos infectados, uma vez que o fenômeno ocorre em células oriundas de camundongos BALB/c, mas não nas oriundas dos camundongos resistentes C.D2 (Ghosh *et al*, 2002). Por outro lado, a *L. donovani* é capaz de ativar NF- κ B na linhagem macrofágica J774 de uma forma dependente da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Singh *et al*, 2004).

Outros estudos demonstram que não somente *L. donovani* é capaz de modular a ativação de NF- κ B. Formas amastigotas de *L. mexicana* são capazes de induzir a degradação de NF- κ B de uma forma dependente da atividade da cisteína peptidase B, o que leva à repressão da produção de IL-12 (Cameron *et al*, 2004). Formas promastigotas de *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* e *L. braziliensis* também são capazes de levar à clivagem de p65 em macrófagos, embora a subunidade truncada possa continuar se ligando ao p50 e mediando a produção de quimiocinas (Gregory *et al*, 2008). Já as formas promastigotas de *L. major* inibem o complexo de NF- κ B induzido por PMA na linhagem monocítica U937 e levam à ativação de um outro complexo capaz de induzir a expressão de IL-10 (Guizani-Tabbane *et al*, 2004). Recentemente, Ben-Othman e colaboradores (2008) demonstraram que *L. major* e *L. donovani* são capazes de induzir uma ativação inicial e transiente de NF-

κ B e MAPKs em células Raw264.7 e macrófagos derivados de monócitos humanos. Entretanto, uma vez infectadas, as células se tornam não resposivas a ativação dessas moléculas em infecções subseqüentes. De forma similar ao que ocorre com algumas espécies de *Leishmania*, o parasita *Toxoplasma gondii* também possui a habilidade de bloquear a translocação nuclear do dímero de NF- κ B ativado por LPS (Butcher *et al*, 2001).

Consistente com a modulação da ativação do NF- κ B por espécies de *Leishmania*, alguns trabalhos na literatura demonstram o papel dos receptores TLR (*Toll-like receptors*) no reconhecimento de moléculas da *Leishmania* e no controle da infecção por este parasita.

Os *toll-like receptors* (TLR) apresentam importante papel na imunidade inata e em sua integração com a imunidade adaptativa subseqüente. Assim como outros PRRs (*pattern-recognition receptors*), os TLR reconhecem PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) que correspondem a componentes microbianos essenciais para a sobrevivência dos microorganismos e, como consequência, ativam cascatas de sinalização intracitoplasmáticas que culminam com a ativação de fatores transcricionais e a expressão de genes cujos produtos estão relacionados à resposta antimicrobiana (Revisto por Akira *et al*, 2006).

Muraille e colaboradores (2003) demonstraram a importância de MyD88, uma molécula adaptadora que participa das vias de sinalização a partir dos TLRs, no controle da infecção por *L. major* em camundongos C57Bl6 e na produção de IFN- γ e IL-10. Consistente com a ativação de MyD88, foi demonstrado que TLR4 é requerido para o controle eficiente da *Leishmania* (Kropf *et al*, 2004) e LPG é capaz de ativar TLR2 (de Veer *et al*, 2003). TLR9 pode também ser importante no controle deste parasito. Li e colaboradores (2004) demonstraram a produção de citocinas, especialmente IL-12, via

TLR9, em camundongos infectados por *L. major*. Um estudo ainda mais recente mostra que TLR3 também pode contribuir para o reconhecimento de *Leishmania* (Fladin *et al*, 2006). Uma vez que dsRNA não é encontrado em *Leishmania*, uma possível explicação é a presença de RNA viral no parasito (Ogg *et al*, 2003).

Espécies de *Leishmania* podem também subverter a ativação das vias de TLR o que pode estar relacionado com sua capacidade de inibir a ativação de NF- κ B. Abu-Dayyeh e colaboradores (2008) demonstraram que *Leishmania* é capaz de inibir a ativação de IRAK-1 (*IL-1 receptor-associated kinase 1*), uma cinase envolvida na sinalização dos TLR, através da fosfatase hospedeira SHP-1 (*Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase*). Outras moléculas que participam das vias disparadas por TLR (e.g. Erk1/2, IKK α/β) também são capazes de interagir com SHP-1, o que sugere que a *Leishmania* possa interferir em várias etapas da sinalização por esses receptores (Abu-Dayyeh *et al*, 2008).

2- PKR

2.a) Estrutura e função de PKR

A proteína kinase R (PKR) é uma serina-treonina cinase, ubiquamente expressa, que atua no controle transcricional e traducional em vias de transdução de sinais (Williams, 2001). PKR foi descoberta como a enzima responsável pela inibição da síntese protéica induzida por RNA dupla-fita (dsRNA) através da fosforilação do fator de iniciação da tradução eIF-2, bloqueando sua atividade e, desta forma, impedindo a ligação do iniciador Met-tRNA ao ribossoma. A replicação de muitos vírus envolve a produção de dsRNA, o

que pode levar a ativação de PKR, inibindo a tradução e, conseqüentemente, a replicação viral. Assim, desde sua descrição, PKR é reconhecida como um agente “anti-viral”, sendo ativada por vírus como influenza, adenovírus e HIV (Proud, 1995). Esta função biológica postulada é suportada por achados de que diversos vírus são capazes de desenvolver diferentes estratégias para inibir a atividade de PKR (Katze, 1995).

O cDNA codificando PKR humano foi clonado pela primeira vez em 1990 e origina uma proteína com o peso molecular predito de 68kDa (Meurs *et al*, 1990).

Muitos tipos celulares expressam níveis constitutivos de PKR, mas a exposição de células a IFN-I resulta em um aumento dos níveis de PKR, como consequência da ativação transcricional de seu gene (Meurs *et al*, 1990). O gene PKR humano se localiza no cromossomo 2p, tem aproximadamente 50 Kb e 17 exons (Kuhlen and Samuel, 1997; Kuhlen *et al*, 1996). O promotor de PKR, contendo 503 pb, não apresenta seqüências consenso associadas à iniciação da transcrição, como TATA Box. A expressão basal e induzida de PKR depende da presença de um elemento de 15 pb denominado KCS (*kinase conserved sequence*), que é exatamente conservado em humano e camundongo em relação à seqüência e posição relativa ao elemento ISRE (*interferon stimulated response element*). ISRE possui 13 pb e é responsável pela expressão de PKR em resposta a IFN (Kuhlen and Samuel, 1997).

Na ausência de IFN, a indução de PKR depende da cooperação de sp1 e sp3 que se ligam ao elemento KCS presente no promotor (Das *et al*, 2006). Entretanto, a ativação da transcrição de genes induzidos por IFN I, como PKR, depende da ligação do fator heterodimérico ISGF3 (STAT1, STAT2, and IRF9) ao elemento ISRE (Samuel, 2001; Darnell, 1997; Ward and Samuel, 2002).

PKR possui dois domínios funcionalmente distintos: um domínio N-terminal regulatório de ligação a dsRNA e um domínio catalítico C-terminal. O domínio de ligação a dsRNA (*dsRNBD- dsRNA Binding Domain*) compreende a região entre os aminoácidos 1-170 e contém dois motivos de ligação a RNA (*dsRBMs- dsRNA Binding Motifs*) compreendendo aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos cada (Williams, 1999) (**Figura 1**). Após a ligação de PKR a dsRNA, ocorre uma mudança conformacional desta proteína, que a libera de uma auto-inibição, expondo assim seu sítio ativo e levando a sua auto-fosforilação (Williams, 2001).

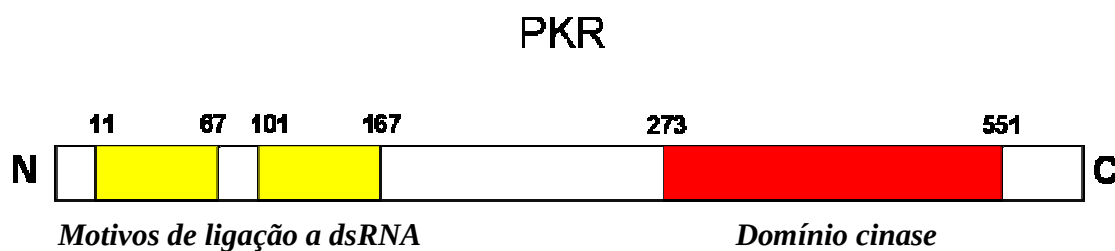


Figura 1- Estrutura de PKR

Além de sua atividade anti-viral, diferentes papéis vêm sendo sugeridos para PKR em diversos processos celulares, incluindo modulação de respostas inflamatórias, regulação da apoptose, proliferação e diferenciação. Muitos tipos celulares expressam níveis constitutivos de PKR, mas a exposição de células a IFN-I resulta em um aumento dos níveis de PKR, como consequência da ativação transcricional de seu gene (Meurs *et al*, 1990). A descoberta de que dsRNA é capaz de ativar NF- κ B levou à identificação de PKR como uma molécula transdutora de sinal (revisto por Williams, 1999).

A diversidade de processos celulares modulados por PKR corrobora a crescente descrição de novas moléculas capazes de ativar esta proteína. Diversos estímulos pró-inflamatórios, como LPS (lipopolissacarídeo), IFN- γ (interferon- γ) , IL-1 β (interleucina-1- β) e TNF- α (fator de necrose tumoral – α), além de indutores de estresse, como choque térmico e privação de soro, requerem PKR em suas vias de transdução de sinal (revisto por Williams, 1999 e 2001) (**Figura 2**).

A ativação de PKR por diversos estímulos pró-inflamatórios depende da sinalização a partir de TLR. Hsu e colaboradores (2004) demonstraram que PKR participa da via de TLR4 como mediador crítico da apoptose em macrófagos induzida por patógenos. Outro trabalho que reforça o papel de PKR na via de sinalização de TLR4 demonstra que esta cinase interage com a molécula adaptadora TIRAP e é fosforilada em macrófagos em resposta a LPS (Horng *et al*, 2001). O mesmo trabalho demonstra que PKR também é ativado em consequência da ativação de TLR9 por CpG, entretanto, neste caso, através do uso da molécula adaptadora MyD88. PKR também participa da sinalização de TLR3 induzida por dsRNA, sendo recrutado para um complexo de proteínas contendo TAK1 (Jiang *et al*, 2003). Mais recentemente, Cabanski e colaboradores (2008) confirmaram o papel de PKR nas vias de TLR4 e demonstraram sua importância na sinalização de TLR2 em macrófagos alveolares, sendo essencial para produção de citocinas inflamatórias.

Sua ativação por estímulos pró-inflamatórios, além de seu papel em mediar a ativação de NF- κ B fazem de PKR uma molécula central em muitas vias de transdução de sinais da imunidade inata. PKR participa da ativação de macrófagos induzida por poly(I:C) induzindo a expressão do mRNA codificante de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), IL-1 α e IL-1 β (Maggi *et al*, 2000). Foi mostrado recentemente o papel de PKR na regulação

da citocina anti-inflamatória IL-10 em macrófagos (Chakrabarti *et al*, 2008). A infecção de monócitos primários de sangue humano pelo bacilo Calmette-Guérin (BCG) também estimula a indução da expressão de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-10 de forma dependente de PKR (Cheung *et al*, 2005). Então, além de mediar respostas anti-virais, PKR pode também regular a resposta inata contra bactérias.

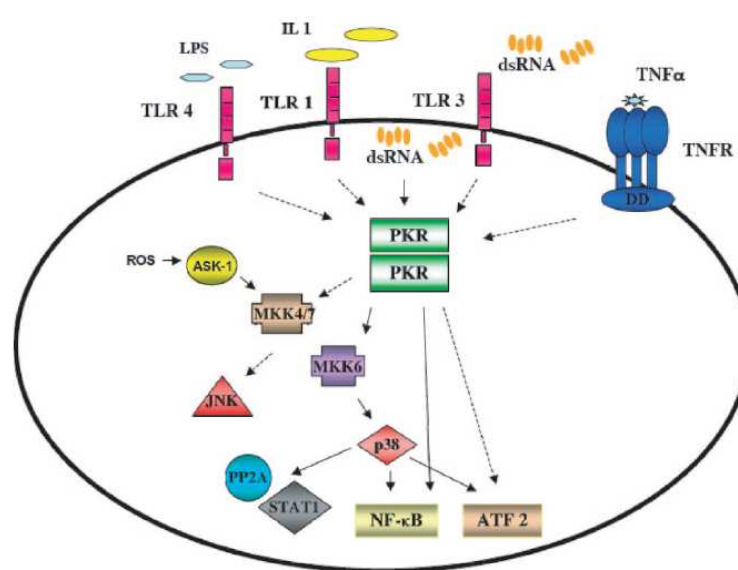


Figura 2- PKR é ativado por estímulos pró-inflamatórios e indutores de *stress*, levando à indução de vias dependentes de MAPKs e culminando com a ativação de fatores de transcrição inflamatórios, como NF- κ B, STAT1 e ATF2 (retirado de Garcia *et al*, 2006).

PKR também é capaz de mediar efeitos da proteína regulatória tat do HIV. Muitos dos efeitos de tat na expressão de genes da célula hospedeira se devem à sua capacidade de interagir com e/ou modular a ativação de fatores de transcrição celulares (Macián & Rao, 1999; Marecki *et al*, 2004; Kulkarni *et al*, 2005; Jeang *et al*, 1993), dentre eles, o NF- κ B. Tat induz a ativação de NF- κ B em diversos tipos celulares e esta indução é de fundamental importância para a ativação do promotor viral LTR (Demarchi *et al*, 1996). Demarchi e

colaboradores (1999) demonstraram que a ativação de NF- κ B por tat é dependente de PKR. A relação entre tat e PKR é corroborada pelo fato de que ambos são capazes de interagir fisicamente através do domínio básico de tat (Mcmillan *et al*, 1995). A produção de IL-10 induzida por tat também é dependente de PKR, embora seja independente de NF- κ B (Li *et al*, 2005).

2.b) Modulação de NF- κ B por PKR

NF- κ B é um fator transcricional de fundamental importância na modulação de processos inflamatórios, regulando a expressão de genes imunomodulatórios como os que codificam citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. NF- κ B foi inicialmente identificado por Sen & Baltimore (1986) como um fator transcricional capaz de ligar-se ao *enhancer* do gene que codifica a cadeia leve kappa de imunoglobulina em células B maduras. Estudos subsequentes mostraram a grande importância deste fator em diversos tipos celulares, mediando informações entre o citoplasma e o núcleo. Dentre as respostas celulares reguladas por NF- κ B estão: proliferação celular, diferenciação, apoptose, sobrevivência e inflamação (Mercurio & Manning, 1999). Além de citocinas, como TNF α e IL-1, produtos bacterianos (como LPS), mitógenos (como PMA - forbol-12 miristato-13 acetato), produtos de genes virais, luz ultravioleta e radiação ionizante são capazes de ativar NF- κ B (Perkins, 1997; May & Ghosh, 1998).

NF- κ B, em mamíferos, encontra-se na forma de homo- ou heterodímeros formados pela combinação de cinco distintas subunidades homólogas da família Rel: NF- κ B1 (p50 e seu precursor p105), NF- κ B2 (p52 e seu precursor p100), RelA (p65), c-Rel e RelB

(Baldwin, 1996) (**Figura 3**). Os dímeros de NF- κ B são sequestrados no citoplasma de células não estimuladas por interação não covalente com uma classe de proteínas inibitórias denominadas I κ Bs. Através desta interação, as moléculas I κ B mascaram o sinal de localização nuclear (NLS) de NF- κ B e impedindo sua translocação para o núcleo (May & Gosh, 1998). A ativação clássica de NF- κ B ocorre através da degradação proteolítica de I κ B no citoplasma através da ativação do complexo IKK, cujas subunidades catalíticas IKK α (ou IKK1) e IKK β (ou IKK2) fosforilam I κ B em resíduos amino-terminais específicos. I κ B fosforilado é então ubiquitinado por uma E3 ubiquitina ligase e seletivamente degradado pelo proteossoma 26S. Esse processo expõe a sequência de localização nuclear de NF- κ B, permitindo que este transloque para o núcleo e se ligue à região promotora de genes-alvo (Karin, 1999; Mercurio & Manning, 1999).

Diversos estudos demonstram que PKR é requerida para a ativação de NF- κ B por dsRNA. Em um sistema *in vitro*, a atividade de NF- κ B de ligação ao DNA foi induzida em extratos celulares por PKR recombinante selvagem, mas não pelo mutante cataliticamente inativo de PKR. Além disso, foi apresentada evidência direta de que PKR pode fosforilar I κ B- α (Kumar *et al*, 1994). O papel de PKR na ativação de NF- κ B por dsRNA também foi demonstrado através da estratégia de antisenso (Maran *et al*, 1994) ou *knockout* de PKR (Yang *et al*, 1995). Em adição à sinalização por dsRNA, PKR também está envolvida com a estabilização da sinalização de TNF- α para a ativação de NF- κ B, além de aumentar a ativação deste fator transcricional por IFN- γ em conjunção com TNF- α (Cheshire *et al*, 1999; Kumar *et al*, 1997).

Zamanian-Daryoush e colaboradores (2000) trouxeram importante contribuição para o entendimento desta ativação do NF- κ B por dsRNA, mostrando que (além da fosforilação

direta de I κ B- α previamente demonstrada (Kumar *et al*, 1994)) PKR age acima de NIK (NF- κ B inducing kinase) e IKK e é capaz de se associar fisicamente ao complexo IKK. O sinal a partir de dsRNA parece ser mediado por IKK β , porque células deficientes nesta subunidade não respondem mais eficientemente a dsRNA (Chu *et al*, 1999).

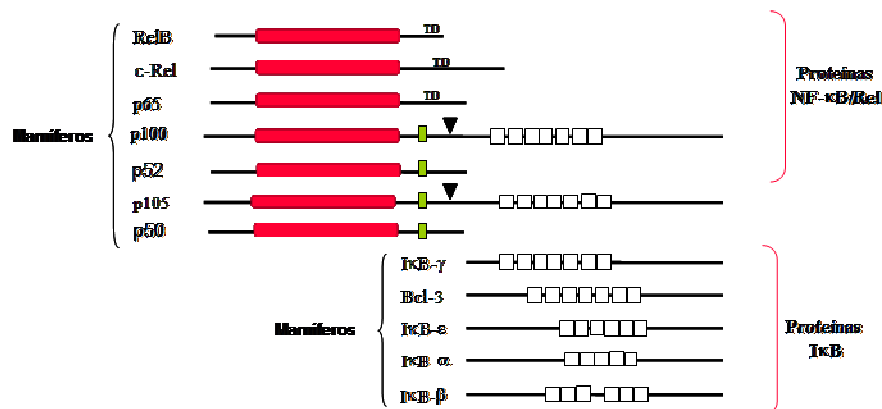


Figura 3: Proteínas homólogas da família Rel e da família I κ B em mamíferos

TD- Domínio de transativação, GRR- região rica em glicina. As pontas de seta indicam sítios de processamento proteolítico. Adaptado de Ghosh *et al*, 1998.

De fato, Bonnet e colaboradores (2000) demonstraram que PKR é capaz de interagir com a subunidade IKK β do complexo IKK. O grupo demonstrou, ainda, que a atividade cinase de PKR não é requerida para a ativação de IKK. Este resultado leva à sugestão de que PKR ativa IKK através de interação proteína-proteína estimulando a autofosforilação de IKK β e não induzindo diretamente sua fosforilação

Entretanto, Kumar e colaboradores (1997) demonstraram que a atividade de um repórter dependente de NF- κ B e IRF-1 em resposta a dsRNA era resgatada em células deficientes em PKR pela expressão do tipo selvagem de PKR, mas não pelo mutante

cataliticamente inativo. Em outro trabalho, ainda em um modelo de células deficientes em PKR, apenas a expressão do tipo selvagem de PKR ativava IKK e estimulava a atividade de NF- κ B, embora tanto o tipo selvagem quanto o mutante pudessem se associar com o complexo IKK (Gil *et al*, 2001). Estes dados aparentemente contraditórios sugerem que em condições normais a atividade catalítica de PKR, como um componente do complexo IKK, é requerida para a sinalização induzida por dsRNA para a ativação de NF- κ B. A expressão de um excesso de DN PKR pode perturbar este complexo através de interações heterodiméricas com o tipo selvagem de PKR, levando a perturbação do complexo de autofosforilação de IKK β (Williams, 2001).

2.c) PKR e a produção de Interferon do tipo I

Interferons (IFNs) formam uma família de proteínas com distintas propriedades biológicas, sendo mais proeminente, a capacidade em interferir na replicação viral (Samuel, 1991). Os IFNs são subdivididos em, pelo menos, três grupos distintos: os tipos I, II e III. Os IFNs do tipo I são compostos por vários genes, incluindo IFN- α e β . Em humanos e camundongos, existem mais de 13 subfamílias para os genes que codificam IFN- α (13 para humanos e 14 para camundongos), enquanto apenas um gene para IFN- β é encontrado. O IFN do tipo II é referido como IFN- γ , um gene existente em apenas uma cópia, não relacionado aos IFN do tipo I e tipicamente induzido por células T e NK (*natural killer*). Alguns novos membros da família dos IFN chamados IFN- λ 1, - λ 2 e - λ 3, foram recentemente identificados e classificados como IFN III, que podem ser induzidos por mecanismos similares aos dos IFN do tipo I (revisto por Honda *et al*, 2006).

Embora os IFN α e β exerçam atividades semelhantes, o controle de sua expressão é diferenciado, tendo em vista a presença de diferentes elementos regulatórios em seus promotores. Enquanto na região promotora de IFN- β , após infecções virais, é formado um “enhanceossoma” pela reunião dos fatores de transcrição NF- κ B, AP-1 (Proteína ativadora 1) IRFs (Fatores de transcrição de Interferon), o promotor de IFN- α possui apenas sítios de ligação para membros da família IRF. Esta família de fatores transcricionais apresenta nove membros, embora IRF3 e IRF7 ganhem maior atenção como reguladores-chave da expressão de genes para IFN induzidos por vírus (revisto por Honda *et al*, 2006, Unterholzner & Bowie, 2007).

Em 1988, Marcus & Sekellic propuseram que PKR seria requerido para a indução da expressão de genes que codificam IFN do tipo I. Os pesquisadores demonstraram o bloqueio da produção de IFN induzida por infecção viral ou poly(I:C) quando do tratamento com o análogo de nucleosídeo 2-aminopurina (2-AP), um inibidor de PKR. A inibição da produção de IFN- β por 2-AP também foi observada por Zinn e colaboradores na mesma época (1988).

O papel de PKR na indução de genes de IFN foi corroborado por Yang e colaboradores (1995), que demonstraram que em fibroblastos de camundongos *knockout* para PKR, a indução destes genes por poly(I:C) é diminuída, assim como a ativação de NF- κ B, entretanto, o defeito é corrigido quando as células são primadas com IFN- α , o que demonstra que embora PKR esteja envolvido na indução de IFN do tipo I por poly(I:C), ele não é essencial para esta resposta.

Der & Lau (1995) utilizaram duas estratégias diferentes para a avaliação da perda de função de PKR: um dominante negativo de PKR (Arg²⁹⁶PKR) e um RNA anti-senso para

PKR, ambos na linhagem promonocítica U937. Os pesquisadores verificaram que as células sem o PKR funcional, além de serem mais permissivas à replicação viral do que o controle, apresentavam menor indução de IFN- α e IFN- β em respostas a vários indutores, como: EMCV (vírus da encefalomiocardite), LPS (lipopolissacarídeo) e PMA (forbol 12-miristato 13-acetato). Entretanto, embora a produção de IFN- α por poly(I:C) tenha sido inibida nestas células deficientes de PKR, a produção de IFN- β foi inalterada. Recentemente, McAllister e Samuel (2009) demonstraram o papel de PKR na produção de IFN- β por dsRNA transfectada em células de mamíferos, amplificando a resposta de outros sensores citoplasmáticos.

JUSTIFICATIVA

A proteína cinase R (PKR), desde sua descrição, vem sendo intensivamente estudada por sua propriedade de inibir infecções virais, além de participar da regulação de processos celulares como proliferação e apoptose. Entretanto, não há relatos de seu possível papel no controle ou patogênese de infecções parasitárias. O entendimento da participação desta cinase na infecção por *Leishmania* pode contribuir para a compreensão de seu papel nestas infecções *per se*, bem como seu possível envolvimento como um elemento conector da imunidade anti-viral e a modulação da infecção por parasitas em modelos de co-infecção. Esta questão torna-se sobretudo relevante com o atual aumento nas notificações de casos de infecções parasitárias oportunistas em pacientes com HIV.

OBJETIVO

Estudar o papel da proteína cinase R (PKR) na modulação da infecção por *Leishmania*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da ativação de PKR no desenvolvimento da infecção de macrófagos por *Leishmania*;
- Avaliar a possível ativação de PKR ou modulação de seus níveis em macrófagos infectados por *Leishmania*;
- Verificar se o efeito de PKR na infecção por *Leishmania* depende da ativação do fator de transcrição NF- κ B;
- Avaliar se o efeito de PKR na infecção por *Leishmania* depende da produção de IL-10 e IFN do tipo I;
- Avaliar a produção de NO em células cujo PKR foi ativado, verificando se esta produção interfere no crescimento da *Leishmania*;
- Avaliar o efeito de PKR *in vivo* através da infecção de camundongos selvagens ou *knockout* para PKR por *Leishmania* analisando o curso da infecção, a produção de citocinas e as subpopulações de células T nos linfonodos drenantes;

METODOLOGIA

1) Macrófagos e Parasitas

1.a) Linhagens celulares e condições de cultivo

A linhagem monocítica humana THP-1 (ATCC: TIB-202™) era mantida em meio DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab), 200mM de L-Glutamina (Invitrogen), 1mM de piruvato (Sigma), 614 U/l de penicilina e 100 mg/L de estreptomicina (Invitrogen), em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Os repiques eram realizados com um inóculo inicial de 5x10⁵ células/mL, a cada três ou quatro dias ou até a cultura atingir um máximo de 10⁶ células/mL. Para a diferenciação, estas células eram cultivadas por 72 horas na presença de 40 ng/mL de PMA (Calbiochem) e então lavadas com PBS 1X e mantidas em repouso por 48 ou 72 horas para então serem procedidos os ensaios.

A linhagem de macrófagos murinos Raw-264.7 (ATCC: TIB-71) era mantida em DMEM acrescido de 10% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab) e antibióticos supramencionados aderida em placas de 100mm ou 60 mm em estufa de CO₂. Os repiques das culturas eram realizados a cada dois dias. As células eram desaderidas da placa através do uso de solução de tripsina 0,2% acrescida de 0,5mM de EDTA.

O estoque de ambas as linhagens era congelado em solução contendo 90% de soro fetal bovino (Cultilab) e 10% de DMSO a -70°C ou em Nitrogênio líquido.

1.a.1) Linhagem Raw-DN-PKR

As linhagens de macrófagos murinos Raw-264.7 (ATCC: TIB-71) transfectadas com o plamídeo vazio (ptV5), denominada ao longo do trabalho de Raw-Bla, ou superexpressando o dominante negativo de PKR humano (incapaz de se auto-fosforilar) (ptV5K296R), denominada Raw-DN-PKR, foram gentilmente cedida pelo prof. Aristóbolo Silva (UFMG) e eram mantidas nas mesmas condições das células Raw selvagens na presença de 0,5 µg/mL de blasticidina para seleção.

1.b) Obtenção e cultivo de Macrófagos Humanos Primários

Inicialmente, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) eram obtidas de concentrados de células (“*buffy coat*”) de doadores normais (material proveniente de banco de sangue do Hospital Universitário da UFRJ), por centrifugação em gradiente de densidade Histopaque 1077. Então, macrófagos humanos derivados de monócitos eram obtidos por aderência de PBMCs em plástico. Em resumo as PBMCs eram dispensados em LABTEC (Permanox®) de 4 poços, em frascos de cultura ou placas de 24 poços em meio DMEM sem soro, e incubadas 60 minutos a 37°C e 5% de CO₂. A seguir, as células não aderentes eram desprezadas, e os monócitos aderentes eram mantidos em cultura com DMEM suplementado com 10% de soro humano (Sigma) durante 6 a 7 dias para diferenciação em macrófagos.

1.c) Obtenção e cultivo de Macrófagos de peritônio de camundongos

Macrófagos peritoneais de camundongos 129/Sv/Ev selvagens ou *knockout* para PKR (mencionados no tópico **8.a**) eram elicitados com tioglicolato por 3 dias e obtidos através da injeção de 10 mL de PBS 1X na cavidade peritoneal dos animais. A suspensão

celular era lavada em PBS 1X e resussuspensa em DMEM sem soro. As células eram plaqueadas em lâminulas de vidro (2×10^5 por poço), em placas de 24 poços (TPP), e incubadas por 2h a 37°C em 5% CO₂. As células não aderentes eram retiradas através de lavagem com PBS 1X, enquanto a população aderente era incubada por 1 dia em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino para ensaios de infecção por *Leishmania*.

1.d) *Leishmania*: condições de cultivo e infecções

Leishmania amazonensis, cepa WHOM/BR/75/Josefa, *Leishmania major* cepa LV-39 MHRO/Sv/59/P e *Leishmania chagasi*, cepa MHOM/BR/2001/HP-EMO eram mantidas em *Schneider Insect Medium* (Sigma) suplementado com 10% de SFB e 10% de urina em uma densidade de 10^7 parasitos/mL em estufa a 26°C. Os repiques eram realizados duas vezes por semana. As leishmanias eram congeladas a -70°C em uma solução contendo 90% de SFB e 10% de glicerol.

Para a infecção, eram selecionados formas promastigotas em fase estacionária. Os parasitos eram coletadas das culturas e centrifugados a 4000g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o precipitado era ressuspenso em 10 mL de PBS 1X gelado para a lavagem e centrifugado nas mesmas condições citadas (este procedimento era repetido 3 vezes). Para a contagem dos parasitos era utilizada a câmara de *Neubauer*.

A avaliação da replicação das leishmanias era feita corando-se as células com Giemsa e contando-se o número de parasitas por macrófagos. Os resultados eram expressos pelo Índice de Infecção, que é calculado através da multiplicação do percentual de células infectadas pela média de parasitas por célula. Alternativamente, avaliamos a produção de promastigotas pelas células da seguinte forma: após o tempo de infecção/tratamento, o meio das células era removido e era adicionado *Schneider* suplementado com 20% de soro fetal

bovino (SFB) e 10% de urina. As células eram incubadas a 26°C por 3/4 dias e o número de promastigotas produzidos era quantificado em câmara de *Newbauer*.

1.e) Tratamento das células

Para a indução da ativação do PKR era utilizado o Poly (cytidylic-inosic) acid potassium salt (Poly I:C) (Calbiochem) a uma concentração final de 25µg/mL e sua inibição era realizada com o pré-tratamento por 1h com 2mM de 2-aminopurina (2-AP) (Sigma).

Para avaliar o possível papel de IL-10 e IFN do tipo I no favorecimento da infecção pela *Leishmania* conferido pela ativação de PKR, era procedida a imuno-neutralização da citocina com anticorpo monoclonal específico anti-IL-10 humano (e-Bioscience) e para IFN-β humano (R&D) respectivamente, que eram acrescentados à cultura logo após os tratamentos a uma dose de 10µg/mL.

Para verificar o papel de IFN do tipo I na infecção por *Leishmania*, era também realizado o tratamento das culturas infectadas com 500U/mL de IFN-α recombinante.

2) Western blot

2. a) Extração de proteínas totais

Após as incubações e/ou infecções, as células eram lavadas com PBS 1X e centrifugadas. O precipitado era ressuspensão em tampão de lise de proteína (item Soluções) gelado acrescido do coquetel de inibidores de protease II (Calbiochem) em uma diluição de 100:1. O tubo era, então, incubado no gelo por 30 minutos e a seguir centrifugado em

microcentrífuga por 20 minutos a velocidade máxima. O sobrenadante era recolhido em um tubo cônico de 1,5 mL e armazenado a -20°C .

2.b) Dosagem de proteínas

Para a dosagem das proteínas obtidas, era utilizado o método descrito por Bradford (1976). A amostra protéica era diluída em água MilliQ (1 μL de amostra para 99 μL de água) e era adicionado um volume (100 μL) de solução de Bradford. A mudança de cor da solução era quantificada através de leitor de ELISA, em um comprimento de onda de 595 nm.

2.c) Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Era realizada segundo o método descrito em Sambrook e colaboradores (1989). O gel era preparado em sistema de eletroforese “Mini-protean II” (Bio-Rad). O gel de corrida tinha concentração de 12% de acrilamida-bisacrilamida (29:1) e o gel de empacotamento, 3% da mesma solução (ítem *Soluções*). Para a preparação da amostra para eletroforese eram misturados 20-40 μg de extrato de proteínas totais e tampão de amostra de proteína em uma concentração final de 1X (ítem *Soluções*). A amostra era incubada a 100°C por 3 minutos para então ser aplicada no gel. A corrida eletroforética era realizada por aproximadamente duas horas a 100V em tampão de corrida Tris-glicina contendo SDS (ítem *Soluções*).

2.d) Transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose

Após a eletroforese, o gel de corrida era transferido para membrana de nitrocelulose Hybond-C extra (Amersham) em tampão de transferência (ítem *Soluções*) utilizando o sistema de transferência “Mini-trans-blot” (Bio-Rad). A transferência era realizada por 16 horas a 30V, a 4°C .

2.e) Reação com anticorpo

A membrana de nitrocelulose contendo as proteínas era incubada em solução BLOTTO (ítem *Soluções*) por 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação constante. A membrana era então incubada com anticorpo anti-PKR diluído 1:250 (Sigma), anti-pPKR (Santa-Cruz Biotechnology) diluído 1:1000, anti-eIF2- α (Cell Signalling) diluído 1:1000, anti-peIF2- α (Cell Signalling) diluído 1:250, anti-tubulina ou anti-CDK2 (Santa-Cruz Biothecnology) diluídos 1:1000, como controle de carregamento, todos em solução BLOTTO. A incubação era realizada por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida, a membrana era lavada com TBS-T 0,15% (ítem *Soluções*). Após incubação da membrana com o anticorpo primário, era procedida a incubação com anticorpo secundário anti-IgG apropriado conjugado a HRP (*Horseradish peroxidase*) (Santa Cruz Biothecnology) diluído 1:3000 em solução BLOTTO por 1 hora. A membrana era lavada, revelada pelo *kit* de detecção de quimioluminescência ECL (Amersham) e exposta a filmes de raio-X (X-Omat, Kodak).

2.f) Desligamento do anticorpo da membrana

Para desligar anticorpos das proteínas contidas na membrana de nitrocelulose, visando posterior ligação com outros anticorpos, a membrana (mantida a -20°C) era incubada em *stripping buffer* (ítem *Soluções*), a 65°C por 30 min sob agitação ocasional.

3) RT-PCR

3.a) Extração de RNA total

Para extração de RNA era utilizado o reagente TRIzol[®] (Invitrogen) ou o *kit RNeasy Plus* (Qiagen), seguindo as instruções fornecidas pelos fabricantes. A concentração

do RNA extraído era medida pela leitura da absorvância a 260nm. Sua pureza era estimada pela razão das leituras das DOs a 260/280 nm. O RNA era armazenado a -70° C até o uso.

3.b) Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA era realizada através do uso da enzima *SuperscriptIII Reverse Transcriptase* (Invitrogen), na presença de oligodT, seguindo as orientações do fabricante.

3.c) PCR semi-quantitativo

As reações de PCR eram realizadas utilizando a primeira fita de cDNA gerada anteriormente, 10µM de iniciadores:

PKR: F- 5'-GACCTTCCTGACATGAAAGAA-3'

R-5'AACTATTTTGTGCTGTTCTCAGG3'

ou

Actina: F-5'-GTTGCTATCCAGGCTGTGC-3'

R-5'-GCATCCTGTCGGCAATGC-3'

2,5U GoTaq DNA polimerase (Invitogen) e 1,5mM MgCl₂, em tampão apropriado, com temperatura de anelamento de 50°C e 25 ciclos de amplificação (fase exponencial de amplificação). Os produtos de PCR eram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,3% com brometo de etídeo e fotografados em transiluminador UV.

3.d) PCR quantitativo em tempo real

As reações de PCR em tempo real eram realizadas utilizando a primeira fita de cDNA gerada anteriormente. Era utilizado o equipamento *Step One (Applied Biosystems)* e o ensaio era realizado utilizando o *SYBR green (Applied Biosystems)*, segundo o método da curva padrão comparativa utilizando a actina como controle endógeno e os primers:

Actina: F-5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT-3'

R- 5'-CCTAGAAGCATTGCGGTGCACGATG-3'

IFN- β : F- 5'- TCC AAG AAA GGA CGA ACA TTC G 3'

R -5'- TGA GGA CAT CTC CCA CGT CAA 3'

A reação era procedida em volume final de 15 μ L, contendo: 400nM de primers, 1 μ L de cDNA diluído 20X, 7,5 μ L de *SYBR green PCR master mix* e água milliQ. As análises eram realizadas utilizando o *software Step One v2.0 (Applied Biosystems)*.

4) EMSA (*eletrophoretic mobility shift assay*)

4.a) Extrato de proteínas nucleares

Após o término das infecções e/ou incubações, as células eram lavadas com PBS, centrifugadas e o precipitado era ressuspenso em 900 μ L de tampão A gelado (ítem *Soluções*) acrescido do coquetel de inibidores de protease II (Calbiochem) em uma diluição de 1:1000. A suspensão era incubada no gelo por 15 min. Em seguida, eram adicionados 100 μ L de NP40 5% (v/v) e a suspensão homogeneizada por inversão do tubo. A amostra era, então, submetida à centrifugação a 1810 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante era removido completamente e o precipitado descolado do fundo do tubo. A este era acrescentado 1mL de tampão A, sendo o mesmo submetido a centrifugação a 4070 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante era descartado com cuidado. Posteriormente, o precipitado era ressuspenso em 70 μ L de tampão C gelado (ítem *Soluções*) acrescido do coquetel de inibidores de protease II (Calbiochem) em uma diluição de 1:1000 e incubado no gelo por 30 minutos. A suspensão era centrifugada a 12.000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante

transferido para outro tubo. Esse sobrenadante, contendo as proteínas nucleares, era aliquotado e armazenado a -70°C. A dosagem das proteínas das amostras era realizada conforme o método de Bradford, descrito anteriormente.

4.b) Marcação radioativa dos oligonucleotídeos

Para a reação de marcação do oligonucleotídeo, eram misturados 5 pmol de oligonucleotídeo fita dupla contendo a sequência consenso para a ligação de qualquer dímero de NF- κ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', Santa Cruz Biotechnology), a seguir denominado como sonda consenso ou contendo a sequência mutante para a ligação deste fator transcricional (5'-AGT TGA GGC GAC TTT CCC AGG C-3', Santa Cruz Biotechnology), a seguir denominado como sonda mutante, tampão da enzima T4 polinucleotídeo quinase (BioLabs) em concentração final de 1X, 20U de T4 polinucleotídeo quinase (BioLabs) e 40 μ Ci γ ³²P]ATP e água MilliQ para um volume final de 30 μ L. A mistura era incubada a 37°C por 1 hora sendo a reação de fosforilação bloqueada com a adição de 1 μ L de EDTA 0,5M pH 8,0. Após a marcação, os oligonucleotídeos eram purificados por cromatografia de exclusão em uma coluna de Biogel 30. A coleta das frações era realizada através de eluição em 30 μ L de TE (ítem *Soluções*) e centrifugação a 1500g em centrífuga clínica por 1 min. A contagem da radioatividade incorporada ao DNA era realizada através do método de cintilação líquida.

4.c) Ligação do complexo de NF- κ B ao oligonucleotídeo

Eram misturados: 3 μ g de extrato de proteínas nucleares, 4 μ L de tampão de ligação 5X (ítem *Soluções*), 1 μ g de Poly (dI-dC): Poly (dI-dC) (Amersham Pharmacia), 40.000

cpm de oligonucleotídeo marcado e água MILLI-Q para um volume final de 20µL. Essa mistura era incubada em temperatura ambiente por 30 minutos, sendo então submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 4%.

5.d) Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese dos produtos da reação de ligação era realizada em gel de poliacrilamida 4% (ítem *Soluções*) em condições não desnaturantes. A corrida era realizada em tampão TGE (ítem *Soluções*) a 4°C por aproximadamente 3 horas sob corrente elétrica de 6V/cm. O gel era adsorvido em papel de filtro, desidratado a 80°C por 2 horas sob pressão negativa (secador de gel, modelo SE 1160, Hoeffer Scientific Instruments), exposto ao *PhosphoImage* (Amershan-Pharmacia) e as imagens analisadas através do *Software ImageQuant*.

4.d) Supershift

Para a detecção das subunidades constituintes do complexo de NF-κB ativado, extratos de proteínas nucleares eram incubados por 1 hora com 1 µg de anticorpo no gelo, anteriormente à incubação com o DNA marcado radioativamente. A corrida eletroforética era realizada nas mesmas condições descritas anteriormente para o EMSA. Os anticorpos utilizados nestes ensaios eram: anti-p50 (sc114), anti-p65 (sc109), anti p52 (sc 298), anti c-Rel (sc 71), anti-RelB (sc 226) todos da Santa Cruz Biotechnology.

5) ELISA

Para a determinação da produção de IL-10, todos os sobrenadantes foram recolhidos e mantidos a -20°C até o momento do uso. A dosagem foi realizada através do método de

ELISA “sandwich”, através de kits DuoSet da R&D Systems, contendo dois anticorpos monoclonais específicos para IL-10, sendo um deles biotinizado. O procedimento foi realizado de acordo com recomendações do fabricante. A reação foi revelada através da utilização da enzima peroxidase conjugada a avidina, utilizando como substrato 3,3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB). Para a realização da curva padrão, foram utilizadas concentrações conhecidas da IL-10 recombinante fornecida no *kit*. A leitura das amostras foi feita por absorvância em 450 nm através de leitor de microplacas (Microplate Reader-VESRSA Max- Molecular Devices).

6) Análise da produção de NO

Como o nitrito é um dos produtos da reação do óxido nítrico com o oxigênio, sua quantificação representa uma detecção indireta do óxido nítrico. A concentração de nitrito nos sobrenadantes das culturas era determinado pelo Método de *Griess*. Sucintamente, eram misturados 50µL de sobrenadante de cultura, 50µL de solução A e 50µL de solução B (item *Soluções*). A intensidade da coloração resultante da reação é diretamente proporcional à concentração de nitrito na amostra. Esta coloração era quantificada através do leitor de ELISA em um comprimento de onda de 570nm. Para relacionar os valores de absorvância obtidos com a concentração de nitrito na amostra era realizada uma curva padrão utilizando nitrito de sódio.

7) Ensaio de repórter luciferase

7.1) Extração dos plasmídeos

Bactérias XL-1 blue contendo os plasmídeos pTK-3XNS (repórter luciferase contendo na região promotora sítios para a ligação de NF- κ B e STAT presentes no promotor de iNOS) e pTK-3XS (repórter luciferase contendo na região promotora sítios para a ligação de STAT presentes no promotor de iNOS) (gentilmente cedidos pelo Dr. David Geller da Universidade de Pittsburgh, EUA) foram crescidas em 100 mL de meio LB (*Luria-Bertani*) contendo 100 μ g/mL de ampicilina (USB) a 37°C por 18 horas. Para a obtenção dos plasmídeos em larga escala foi utilizado o *kit Maxiprep* (Promega), conforme orientações do fabricante. A integridade do DNA foi verificada através de gel de agarose 1,3% corado com brometo de etídeo e visualizado com luz ultravioleta. Sua concentração foi determinada pela medida da absorvância a 260nm em espectrofotômetro (*Eppendorf*). A corrida eletroforética ocorria em TAE a 90 volts.

7.2) Transfecção

Previamente, foram realizados testes de padronização da transfecção para linhagem celular Raw 264.7 utilizando a Lipofectamina 2000 (*Invitrogen, Life Technologies*) e o plasmídeo de expressão contendo o gene GFP (proteína fluorescente verde) (Clontech). Nestes testes, diferentes quantidades de Lipofectamina 2000 e diferentes concentrações do plasmídeo GFP foram utilizadas. A eficiência da transfecção foi verificada por citometria de fluxo avaliando-se a porcentagem de células viáveis que continham o plasmídeo. A melhor condição de transfecção estabelecida para esta linhagem foi a utilização de 2 μ g do pTK- 3XNS ou pTK- 3XS e 5 μ L de Lipofectamina 2000.

A linhagem Raw 264.7 foi plaqueada em uma placa de 24 poços a uma concentração de 2×10^5 células por poço em DMEM sem antibiótico suplementado com 10% de SFB por 18h. O meio foi removido e 400µL de DMEM sem antibiótico e sem SFB foi acrescentado em cada poço. A transfecção foi então realizada de acordo com o protocolo fornecido pela Invitrogen.

Para a infecção com *L. amazonensis* e tratamento com poly(I:C) das células transfectadas, o meio foi retirado e 500µL de DMEM acrescido de 10% SFB e antibiótico foi adicionado. Após 24 horas de tratamento, a quantificação da atividade da luciferase foi verificada utilizando-se o kit de “Dual-Luciferase Repórter Assay System” (Promega) e luminômetro, conforme orientações do fabricante.

8) Ensaios de infecção em camundongos *knockout* para PKR

8.a) Animais e Infecção

Ensaios de infecção in vivo eram procedidos utilizando camundongos 129/Sv/Ev selvagens ou knockout para PKR que nos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Aristóbolo Silva da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos de acordo com as normas institucionais.

Os animais eram subcutaneamente injetados com 10^6 promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* em DMEM na pata traseira.

8.b) Análise do curso da infecção

O diâmetro da lesão era avaliado uma vez por semana através do uso de paquímetro e expresso como a diferença entre as espessuras das patas infectadas e não infectadas. A carga parasitária na lesão (pata), no linfonodo drenante (poplíteo) e no baço era avaliada

após 2 meses de infecção. O material obtido das disseções era macerado em PBS 1X e a suspensão celular era plaqueada em diluições seriadas de 4X em meio Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino e 10% de urina. O título de parasitas era avaliado após aproximadamente 7 dias de cultura (de acordo com o tempo de produção de promastigotas) a 26° C.

8.c) Citometria de Fluxo

8.c.1) Obtenção das células

Após 2 e 4 semanas de infecção, os linfonodos poplíteos drenantes eram obtidos e macerados em RPMI sem soro. O número de linfócitos era estimado em câmara de Neubauer e o macerado era centrifugado a 1500 rpm e 4°C, em centrífuga clínica. Para a análise de citocinas intracelulares (IL-10 e IFN- γ), eram plaqueadas 10⁶ células por poço em RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino (em placa de 96 poços). As células eram estimuladas com 20ng/mL de PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*- Calbiochen), 200 ng/mL de Ionomicina A23187 (Sigma) e 200 ng/mL de Monensina Sódica (Sigma), ou 10 μ g/mL de Brefeldina (e-Bioscience), por 5 horas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Alternativamente, amostras que seriam marcadas para FoxP3, CD4 e CD25 foram marcadas logo após a obtenção dos macerados e plaqueamento.

8.c.2) Marcação e leitura

Após a estimulação, as células que seriam marcadas para citocinas intracelulares, além de CD4 e CD8, eram centrifugadas em centrífuga de placa a 2000 rpm por 3 minutos e ressuspendidas em 100 μ L de tampão de FACS (PBS 1X, 1% de Azida e 1% de BSA). As células eram então centrifugadas novamente e bloqueadas por 5 minutos a 4°C com anti-mouse CD16/CD32 (e-Bioscience - bloqueador de de FCR γ II/III) e 10% de soro de

camundongo. Após o bloqueio, as células eram então marcadas com anti-CD4 FITC e anti-CD8 Cy7 (todos da e-Bioscience) de acordo com orientações do fabricante por 30 min. As células eram então lavadas uma vez em tampão de FACS como descrito anteriormente e fixadas em paraformaldeído 2% (diluído em tampão de FACS). Após 18 horas a 4°C, as células eram lavadas 3X em tampão de FACS e permeabilizadas em saponina (Sigma) 0,2% p/v (em tampão de FACS) por 15 minutos a 4°C. A placa era centrifugada mais uma vez, as células bloqueadas como descrito anteriormente e marcadas com anti-IFN γ e anti-IL-10 (e-Bioscience), ou isotipos controle Rat IgG1 ou Rat IgG2b (e-Bioscience), respectivamente, conforme orientações do fabricante. As células eram lavadas em tampão de FACS por 2X e as amostras adquiridas no FACSCalibur (Becton & Dickson), utilizando o *software* CellQuest 3.0 (Becton & Dickson).

Alternativamente, células não estimuladas eram bloqueadas e marcadas com anti-CD4 FITC e anti-CD25 APC (e-Bioscience), conforme descrito anteriormente. As amostras eram então fixadas e permeabilizadas com o *kit Fixation & Permeabilization* (e-Bioscience), marcadas com anti-FoxP3 PE (e-Bioscience), conforme orientações do fabricante e adquiridas como descrito.

8.c.2) Análise dos dados

As leituras do FACS eram analisadas no *software* CellQuest 3.0 (Becton & Dickson). Inicialmente era criado um gráfico de tamanho (FSC) X granulosidade (SSC) e demarcada a região condizente com a população de linfócitos. Eram então definidas regiões positivas para os marcadores de superfície utilizados e as marcações intracelulares eram consideradas como regiões negativas para a marcação pelos isotipos controle.

9) Análise Estatística

Experimentos quantitativos eram realizados, no mínimo, em triplicatas, conforme indicado nos resultados. Os dados eram analisados através do teste de *t Student* para variáveis independentes utilizando o *Software* Prisma 5. Foram determinadas como significativas as diferenças para as quais $p < 0.05$.

Soluções

Tampões

PBS pH 7.4

8 g de NaCl
0,2 g de KCl
1,44 g de Na₂HPO₄
0,24 g KH₂PO₄
o meio pronto era autoclavado por 20 minutos

TE

100 mM de Tris.Cl pH 8.0
1 mM de EDTA pH 8.0

Soluções utilizadas para EMSA:

Tampão A

10 mM de HEPES pH 7,9
10 mM de KCl
0,1mM de EDTA
0,1 mM de EGTA
1mM de DTT

Tampão C

20 mM de HEPES pH 7,9
0,4 M de NaCl
1 mM de EDTA
1 mM de EGTA
1 mM de DTT
20% (v/v) de glicerol

Tampão de ligação 5X

50 mM de HEPES pH 7,9
20% de glicerol
5 mM de DTT
5 mM de EDTA
0,5 µg de BSA

Gel de poliacrilamida 4%

3,8% de acrilamida
0,13% de bis-acrilamida
25 mM de Tris
190 mM de glicina
1mM de EDTA

0,09% de persulfato de amônia
0,08% de TEMED

Tampão de amostra

50% de glicerol;
0,25% de azul de bromofenol

Tampão de corrida (TGE)

25 mM de Tris
190 mM de glicina
1mM de EDTA

Soluções utilizadas para Western blot:

Tampão de lise de proteína

50 mM de Tris-HCl pH 7,5
5 mM de EDTA
10 mM de EGTA
50 mM de NaF
20 mM de β -Glicerofosfato
250 mM de NaCl
0,1% de Triton X-100
1 mg/mL de BSA

Gel de corrida 12%

2 mL de acrilamida-bisacrilamida 30% (29:1)
0,75 μ L de Tris 2M pH8,8
50 μ L de SDS 10%
50 μ L de persulfato de amônia 10%
2 μ L de TEMED
2,148 mL de água destilada

Gel de empacotamento 5%

500 μ L acri-bis 30% (29:1)
190 μ L de Tris 2M pH 6,8
30 μ L de SDS 10%
30 μ L de persulfato de amônia 10%
3 μ L de TEMED

Tampão de amostra para proteína 3X

1 mL de glicerol
0,5 mL de β -mercaptoetanol
3 mL de SDS 10%

1,25 mL de Tris-HCl 1M pH 6,7
2 mg de azul de bromofenol
Aliquotado e estocado a -20°C

Tampão de corrida Tris-glicina contendo SDS

25 mM de Tris
250 mM de glicina
0,1% de SDS

Tampão de transferência

25 mM de Tris
192 mM de glicina
20% v/v de metanol

Solução BLOTTO

5% de leite desnatado Mollico
0,15% de Tween 20
10 mM de Tris-HCl pH 8,0
150 mM de NaCl

stripping buffer

100mM de 2-mercaptoetanol
2% de SDS
62,5 mM de Tris-HCl pH 6,7

Soluções utilizadas para Reação de Greiss:

Solução A

0,3 g de Sulfa
3 mL de ácido fosfórico
27 mL de água MilliQ

Solução B

0,05 g Naftil
5 mL de ácido fosfórico
45 mL de água

RESULTADOS

Efeito da ativação de PKR na proliferação de *Leishmania amazonensis* em macrófagos humanos e murinos

Visando avaliar o papel da ativação de PKR na modulação da infecção de macrófagos humanos por *L. amazonensis*, realizamos o tratamento de células infectadas com a dupla-fita de RNA sintética poly(I:C), um clássico indutor desta cinase.

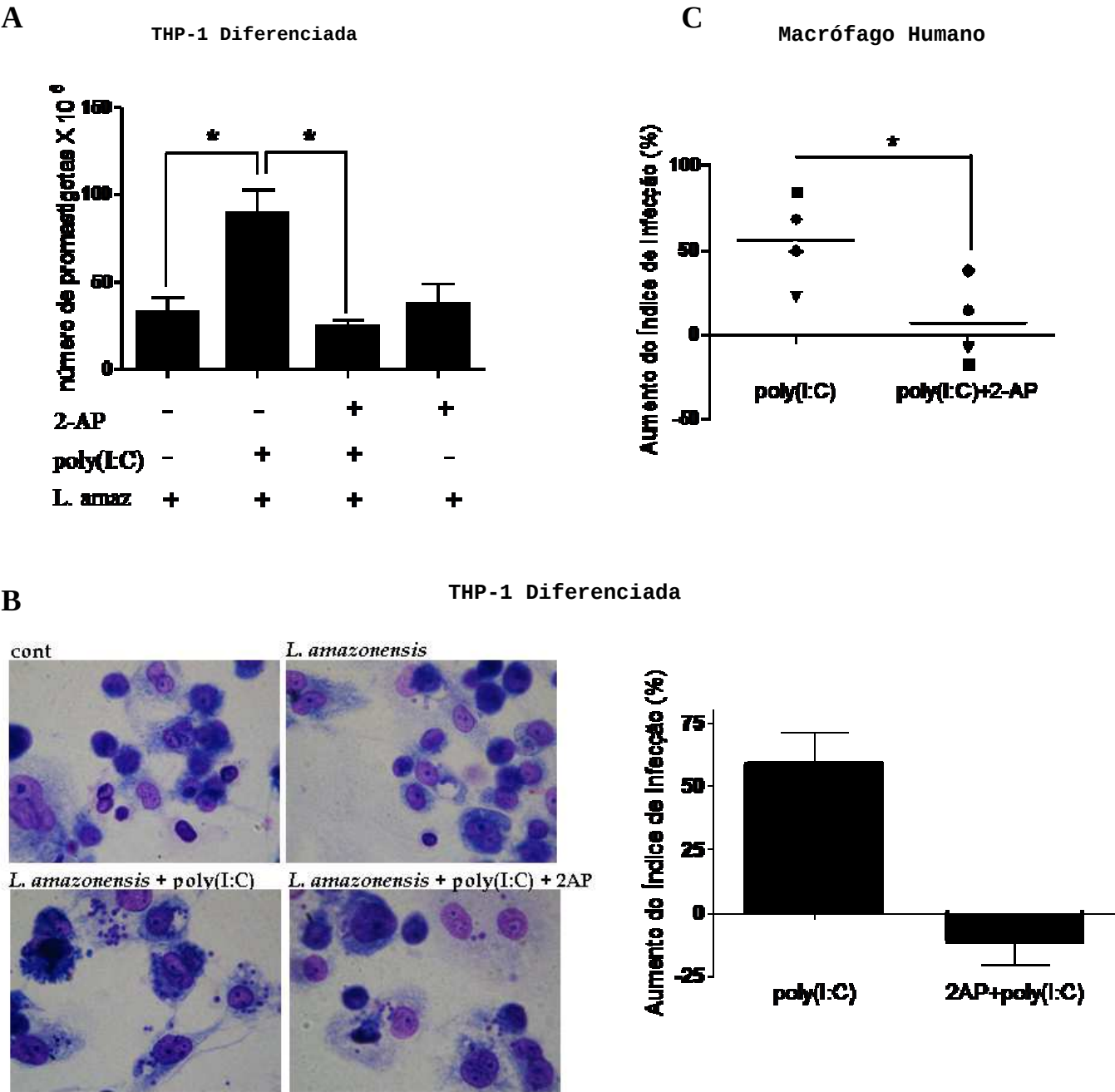
Como demonstrado na **Figura 4A**, células THP-1 (linhagem monocítica humana) diferenciadas e tratadas com poly(I:C) apresentavam um aumento significativo de parasitos como evidenciado pela produção de formas promastigotas. Este aumento foi revertido pelo tratamento com 2-aminopurina (2-AP), um inibidor farmacológico de PKR, o que sugere que a ativação desta cinase contribui para a infecção pela *L. amazonensis*. O favorecimento da infecção pela *L. amazonensis* pelo poly(I:C) foi ainda confirmado através da coloração dos macrófagos infectados e tratados ou não com poly(I:C) com Giemsa. Nestes experimentos, foi observado um aumento de 50% do Índice de Infecção nas células tratadas com o indutor de PKR (**Figura 4B**). Tal efeito foi revertido pelo tratamento com 2-AP.

Visando confirmar o efeito de favorecimento promovido pelo poly(I:C) observado em células THP-1, realizamos também ensaios com macrófagos humanos oriundos de doadores saudáveis. Como podemos verificar na **Figura 4C**, poly(I:C) também favorece a infecção por *L. amazonensis* em macrófagos primários e esse favorecimento é revertido pelo tratamento com 2-AP.

Figura 4- Ativação de PKR por poly(I:C) favorece a proliferação intracelular de *Leishmania amazonensis* em macrófagos humanos

Células THP-1 foram diferenciadas pelo tratamento com PMA (forbol-12 miristato-13 acetato), infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* por 18h, pré-tratadas com 2-AP (2 aminopurina) por 1 hora e tratadas com 25 µg/mL de poly(I:C) por 3 dias . O meio de cultura foi trocado por meio de crescimento para *Leishmania* e a produção de promastigotas foi avaliada (**A**) ou as células foram fixadas e coradas com Giemsa (**B**, esquerda) para análise do Índice de Infecção (**B**, direita). Em **A**, gráfico representa número total de promastigostas produzido por poço contendo 2×10^5 células. **C**- Macrófagos primários humanos oriundos de PBMCs (células mononucleares de sangue periférico) foram tratados conforme descrito em A e B e foi procedida a análise do Índice de Infecção. Cada símbolo representa um doador. Asteriscos indicam diferenças significativas entre grupos pelo teste de *t student*, com $p < 0,05$. *cont*-controle de células não estimuladas.

Figura 4



Visando confirmar o requerimento de PKR para o favorecimento da replicação intracelular de *L. amazonensis* induzida por poly(I:C), realizamos ensaios de infecção utilizando a linhagem de macrófagos murinos Raw-264.7 transfectada estavelmente com construção expressando um dominante negativo de PKR. Como observado na **Figura 5**, o tratamento com poly(I:C) e LPS (um outro indutor de PKR) de células Raw transfectadas com o plasmídeo vazio e contendo resistência a blasticidina (Raw-Bla) levou a um aumento da replicação intracelular de *L. amazonensis* em macrófagos. Já nas células Raw transfectadas com o dominante negativo de PKR (Raw-DN-PKR), o tratamento com poly(I:C) e LPS não levou a um aumento na proliferação intracelular deste parasito no mesmo tempo estudado. Estes dados indicam importante envolvimento de PKR no favorecimento da replicação intracelular de *L. amazonensis* induzida pelo poly(I:C) e LPS em macrófagos.

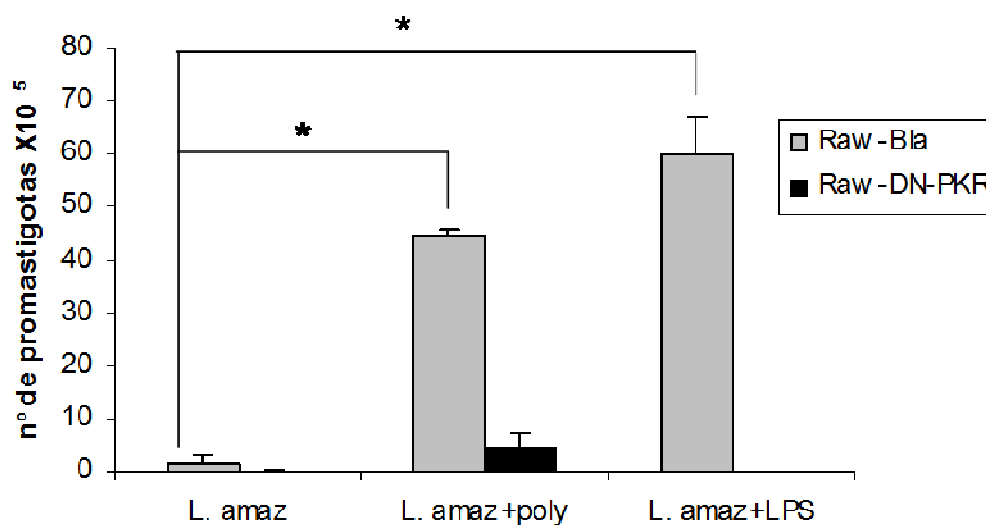


Figura 5- Ativação de PKR por poly(I:C) ou LPS favorece crescimento intracelular de *Leishmania amazonensis* em macrófagos murinos

Células Raw-Bla e Raw-DN-PKR foram infectadas com formas promastigotas de fase estacionário de *L. amazonensis* por 18h e tratadas com 25 µg/mL de poly(I:C) ou 100 ng/mL de LPS por 3 dias. O meio de cultura foi trocado por meio de crescimento para *Leishmania* para a produção de promastigotas. O gráfico representa número total de promastigostas produzido por poço contendo 2×10^5 células. Asteriscos indicam diferenças significativas entre grupos pelo teste de *t student*, com $p < 0,05$.

Efeito da ativação de PKR no crescimento intracelular de outras espécies *Leishmania*

Para investigar se o efeito de favorecimento promovido pelo poly(I:C) ou LPS é exclusivo para *L. amazonensis*, realizamos ensaios de infecção por outras espécies de *Leishmania*.

Verificamos que, em células THP-1, há um aumento do crescimento intracelular de *L. chagasi* quando do tratamento com poly(I:C) (**Figura 6A**). Verificamos o mesmo efeito com o tratamento por LPS em células Raw-Bla, entretanto, o aumento da replicação intracelular desta espécie não é observado em células Raw-DN-PKR (**Figura 6B**). Esses resultados indicam que PKR favorece a replicação intracelular de *L. chagasi* em macrófagos, assim, como o verificado para *L. amazonensis*. Já a infecção por *L. major* é desfavorecida pelo tratamento com poly(I:C) (**Figura 7A**). O desfavorecimento da infecção por *L. major* foi confirmado em um mesmo experimento onde a infecção por *L. amazonensis* foi favorecida pelo tratamento com poly(I:C) (**Figura 7B**). Estes resultados sugerem que a modulação do crescimento intracelular de *Leishmania* por PKR é espécie-específico.

THP-1 Diferenciada

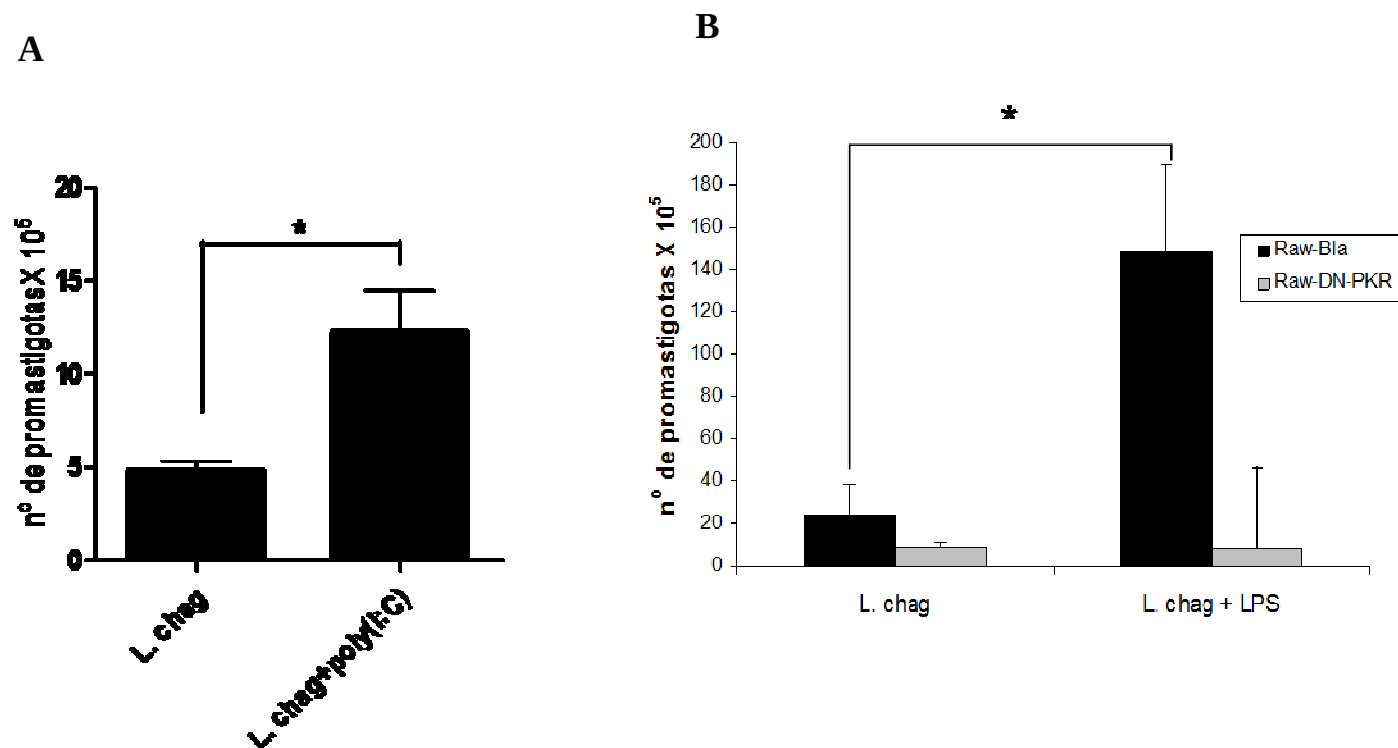


Figura 6- Ativação de PKR por poly(I:C) ou LPS favorece crescimento intracelular de *L. chagasi* em macrófagos

Células THP-1 foram diferenciadas pelo tratamento com PMA (forbol-12 miristato-13 acetato), infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. chagasi* por 18h e tratadas com 25 µg/mL de poly(I:C) por 3 dias (A) . Células Raw-Bla e Raw-DN-PKR foram infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. chagasi* por 18h e tratadas com 100 ng/mL de LPS por 3 dias (B). A e B- O meio de cultura foi trocado por meio de crescimento para *Leishmania* para a produção de promastigotas. Os gráficos representam o número total de promastigostas produzido por poço contendo 2×10^5 células. Asteriscos indicam diferenças significativas entre grupos pelo teste de *t student*, com $p < 0,05$.

THP-1 Diferenciada

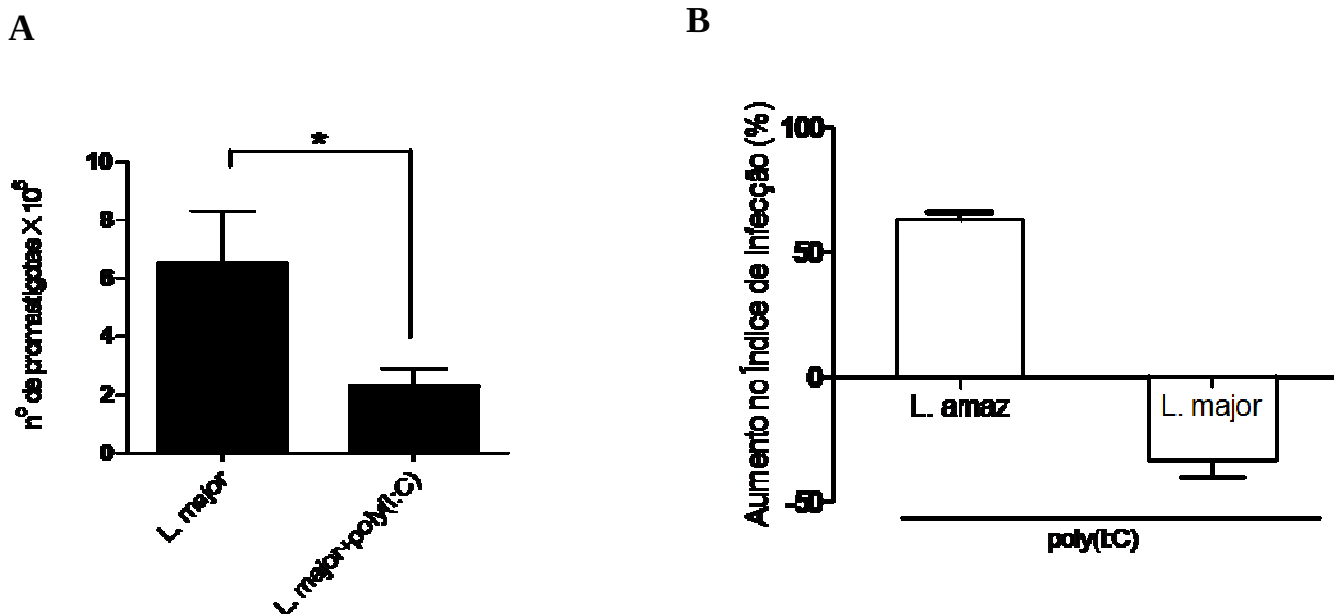


Figura 7- Efeito da ativação de PKR no crescimento intracelular de *Leishmania* é espécie-específico

A- Células THP-1 foram diferenciadas pelo tratamento com PMA (forbol-12 miristato-13 acetato), infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. major* por 18h e tratadas com 25 µg/mL de poly(I:C) por 3 dias. O meio de cultura foi trocado por meio de crescimento para *Leishmania* para a produção de promastigotas. O gráfico representa número total de promastigostas produzido por poço contendo 2×10^5 células. **B-** Células THP-1 foram diferenciadas pelo tratamento com PMA, infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. major* ou *L. amazonensis* por 18h e tratadas com 25 µg/mL de poly(I:C) por 3 dias. As células foram fixadas e coradas com Giemsa para análise do Índice de Infecção. Asterisco indica diferença significativa entre grupos pelo teste de *t student*, com $p < 0,05$.

Análise da ativação de PKR em células THP-1 infectadas com *Leishmania amazonensis* e tratadas com poly(I:C)

Para confirmar a ativação de PKR em células THP-1 diferenciadas e infectadas por *Leishmania*, realizamos ensaios de *western blot* utilizando anticorpo específico para a forma fosforilada da PKR (forma ativa) no resíduo de treonina 446 e verificamos que, o tratamento com poly(I:C) leva à fosforilação de PKR tanto em células infectadas quanto não infectadas por *L. amazonensis*. A ativação de PKR também pôde ser evidenciada indiretamente através da fosforilação de seu clássico substrato eIF2- α . Verificamos a fosforilação de eIF2- α no resíduo de serina 51 de forma coincidente com a fosforilação de PKR, ou seja, em células tratadas com poly(I:C), infectadas ou não. Para nossa surpresa, entretanto, verificamos que a infecção por *Leishmania* leva a um aumento nos níveis totais de PKR. Os níveis totais de eIF2- α , entretanto, permaneceram inalterados em todos os tratamentos (**Figura**

THP-1 Diferenciada

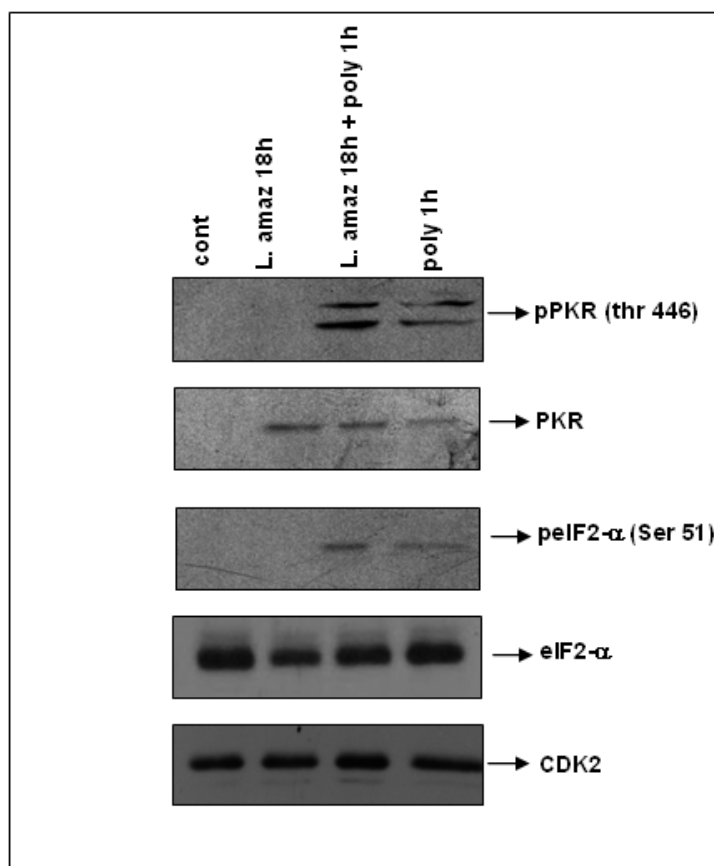


Figura 8- *L. amazonensis* induz aumento nos níveis totais de PKR enquanto poly(I:C) induz sua ativação

Células THP-1 foram diferenciadas pelo tratamento com PMA (forbol-12 miristato-13 acetato), infectadas com formas promastigotas de fase estacionário de *L. amazonensis* por 18h e tratadas com de 25 $\mu\text{g/mL}$ de poly(I:C) por 1h . Extrato de proteínas totais foi obtido e submetido a *western blot* utilizando os anticorpos indicados. *cont*-controle de células não estimuladas, *p*-fosforilação.

Análise dos níveis de mRNA de PKR em células THP-1 infectadas por *Leishmania amazonensis* e tratadas com poly(I:C)

Para verificar se o aumento dos níveis de PKR pela infecção por *L. amazonensis* decorre do aumento nos níveis de seu mRNA, realizamos ensaios de RT-PCR e verificamos que em células THP-1, a infecção por *L. amazonensis* por 18 horas leva a um aumento do acúmulo do mRNA para esta cinase. Com 48 horas de infecção, entretanto, estes níveis tendem a diminuir (**Figura 9A**). A infecção por 4 dias com *L. amazonensis* confirma a tendência de redução de nível do mRNA para PKR quando da infecção das THP-1 por este parasita, entretanto, se estas células forem tratadas com poly(I:C) após 18h de infecção por *L. amazonensis*, este estímulo é capaz de resgatar os níveis de PKR aos níveis do controle das células não tratadas (**Figura 9B**). Controles positivos da indução de aumento de níveis de mRNA para PKR foram realizados através de tratamento das células com IFN- α e poly(I:C) (**Figura 9B**).

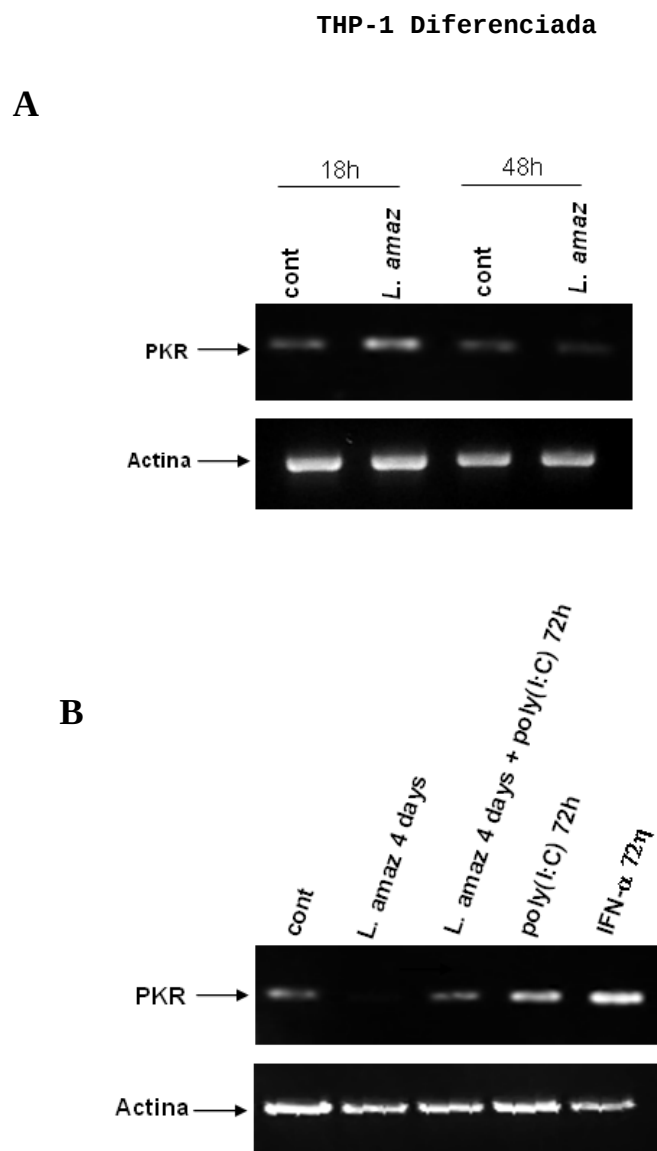


Figura 9- Infecção por *L. amazonensis* leva à modulação dos níveis de mRNA de PKR em THP-1 e tratamento com poly(I:C) interfere nesta modulação

Células THP-1 foram diferenciadas pelo tratamento com PMA (forbol-12 miristato-13 acetato), infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*, tratadas com 25 µg/mL de poly(I:C) ou 500 U/mL de IFN-α pelos tempos indicados. O RNA total foi obtido e o RT-PCR para PKR e actina procedido conforme em *Metodologia*. *cont*-controle de células não estimuladas

Análise da ativação de NF- κ B por PKR em macrófagos infectados por *Leishmania*

Uma vez que NF- κ B desempenha papel fundamental em vários processos regulados por PKR, fomos verificar se a ativação de PKR em nosso modelo culmina com a ativação deste fator transcricional. Inicialmente confirmamos que poly(I:C) é capaz de induzir a ativação de NF- κ B dependente de PKR em células THP-1, já que esta ativação é revertida pelo tratamento com o inibidor de PKR (**Figura 10A**).

Partimos para a avaliação da ativação de NF- κ B em células infectadas pela *Leishmania* e tratadas com o poly(I:C). Quando infectamos as células THP-1 com *L. amazonensis* por 18h, observamos a ativação de um complexo de NF- κ B (**Figura 10B**) caracterizado em ensaios de *supershift* como o homodímero p50-p50 (**Figura 10C**), um clássico repressor da atividade transcricional dependente de NF- κ B. Já a *L. major*, induz predominantemente a ativação de um complexo de NF- κ B com menor mobilidade eletroforética (**Figura 10B**) que ensaios de *supershift* demonstram ser o corresponde ao clássico heterodímero de NF- κ B p65-p50 (**Figura 10D**), o mesmo ativado por PKR. Quando células são infectadas por *L. major* e tratadas com poly(I:C), permanece a ativação do complexo p65-p50. Já quando a célula é infectada por *L. amazonensis* e tratada com poly(I:C), o complexo induzido pelo poly(I:C) não apresenta mais capacidade de ser ativado (**Figura 10B**). Em uma análise minuciosa de *supershift* (**Figura 10E**), verificamos que de fato, células infectadas por *L. major* e tratadas com poly(I:C) apresentam a ativação de p65-p50. Entretanto, células infectadas por *L. amazonensis* e tratadas com poly(I:C) apresentam: um complexo, que apresenta migração retardada apenas quando é utilizado o anticorpo anti-p50, e que portando corresponde ao homodímero p50-p50 ativado pela *L. amazonensis* e um outro de maior mobilidade eletroforética retardado com o uso de

anticorpos para p65 e p50. Este complexo provavelmente corresponde ao complexo induzido pelo poly(I:C), mas, por ter maior mobilidade, possivelmente está sofrendo algum tipo de clivagem induzida pela *L. amazonensis* (**Figura 10E**).

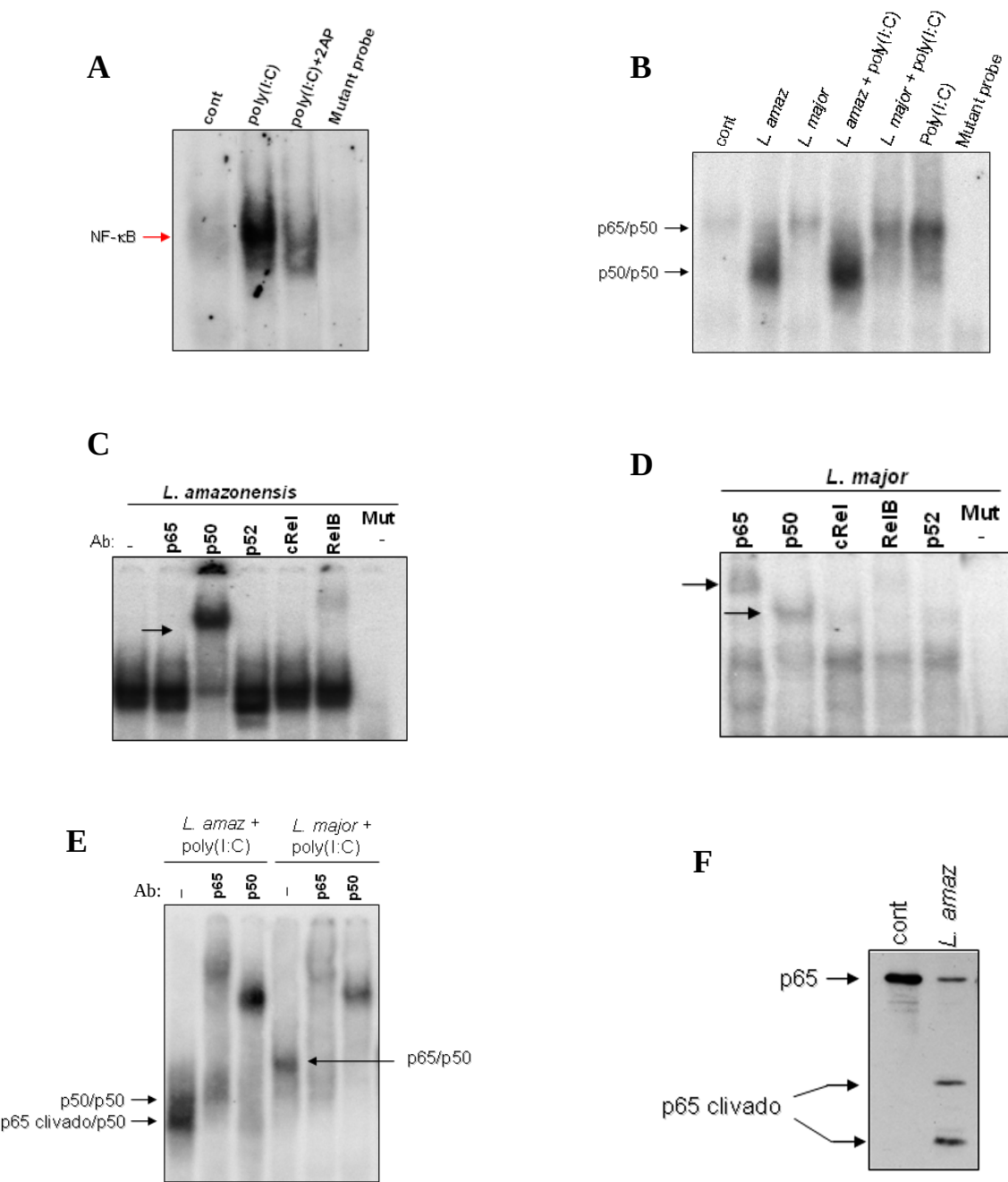
De fato, ensaios de *western blot* com linhagem de macrófagos (Raw) infectados por *L. amazonensis* demonstram a clivagem de p65 por esta espécie de *Leishmania* (**Figura 10F**).

Estes dados sugerem que *L. amazonensis* é capaz de subverter a ativação de NF- κ B induzida por poly(I:C), através da ativação do complexo repressor de NF- κ B p50-p50 e da clivagem da subunidade transativadora p65, se valendo, desta forma, apenas dos efeitos positivos da ativação de PKR. Já *L. major* ativa o mesmo complexo induzido por PKR, não sendo capaz de subverter esta via e, portanto sofrendo os efeitos anti-parasita da ativação desta cinase.

Figura 10- Infecção por *L. amazonensis* modifica dímero de NF-κB induzido por poly(I:C)

Células THP-1 foram diferenciadas pelo tratamento com PMA (forbol-12 miristato-13 acetato), pré-tratadas com 2mM de 2-AP (2 aminopurina) por 1h e tratadas com 25μg/mL de poly(I:C) por 1h (**A**) ou foram infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* ou *L. major* por 18h e/ou tratadas com 25 μg/mL de poly(I:C) por 1h, como indicado (**B**). Extrato de proteínas nucleares foi obtido e submetido a EMSA (ensaio de mudança de mobilidade eletroforética) utilizando sonda consenso para a ligação de NF-κB. **C**, **D**, **E** - Amostras de **B** foram submetidas a *supershift* utilizando anticorpos específicos para as possíveis subunidades de NF-κB. **F** - Células Raw foram infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*, foi obtido extrato de proteínas totais e submetido a *western blot* utilizando anticorpo específico para a subunidade p65 de NF-κB. *cont*-controle de células não estimuladas

Figura 10



Análise da produção de IL-10 dependente de PKR em macrófagos infectados por *Leishmania* e tratados com poly(I:C)

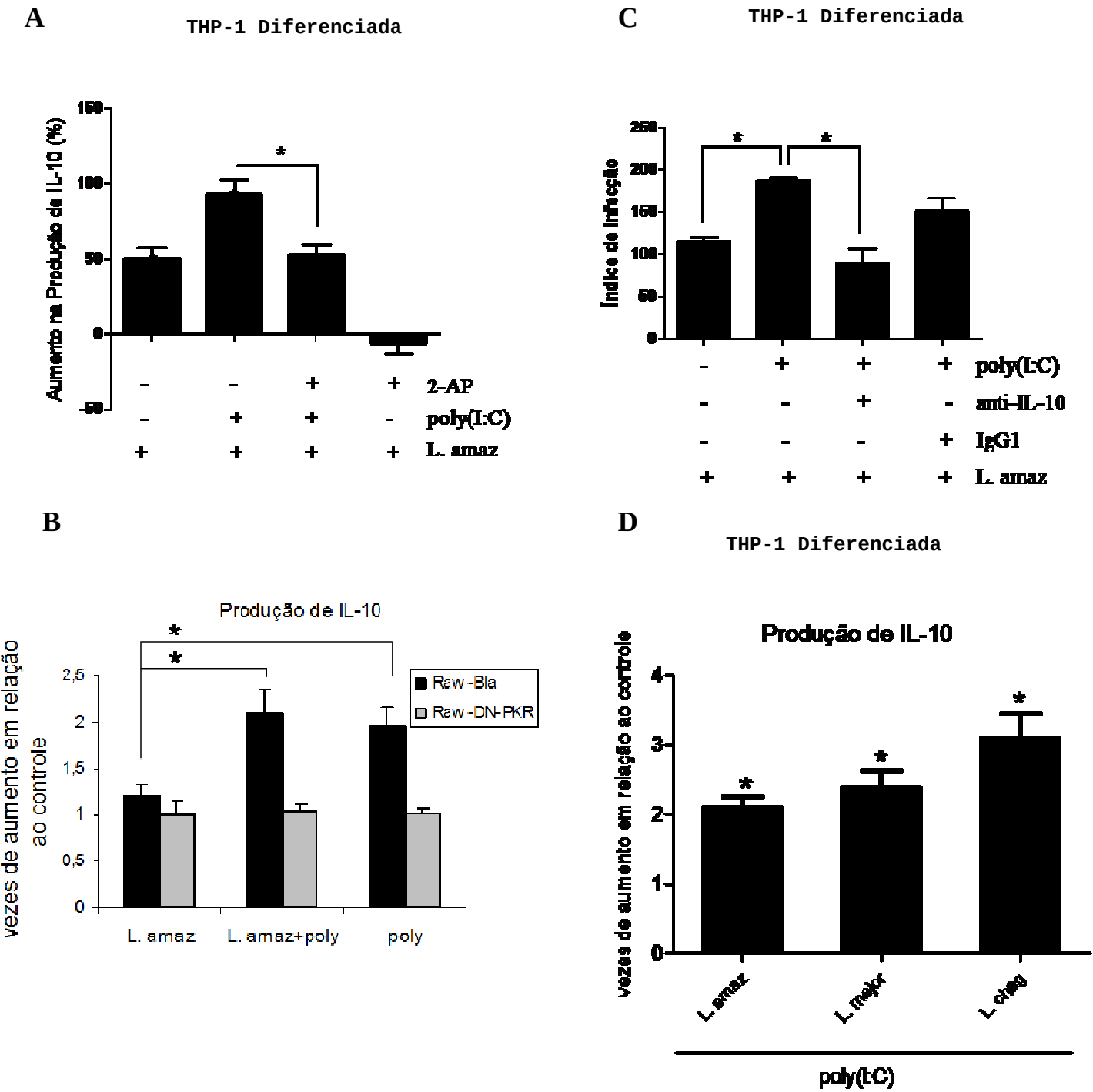
Visando investigar quais mediadores induzidos pela via de PKR poderiam estar favorecendo o crescimento intracelular de *L. amazonensis*, quantificamos os níveis de IL-10, já que a secreção desta citocina é induzida por PKR de forma independente de NF- κ B e sua produção está relacionado à suscetibilidade de macrófagos à infecção por *Leishmania*. Células infectadas por *L. amazonensis* e tratadas com poly(I:C) induzem secreção de IL-10 e esta produção foi parcialmente reduzida pelo tratamento com o inibidor de PKR (**Figura 11A**). A secreção de IL-10 também foi observada em células Raw-Bla tratadas com poly(I:C), mas não em células Raw-DN-PKR tratadas com o mesmo estímulo (**Figura 11B**), o que confirma o papel de PKR na produção de IL-10 em nossos modelos. Verificamos através de ensaios de neutralização utilizando anticorpo monoclonal anti-IL10, que a neutralização desta citocina reverte o favorecimento da proliferação intracelular de *L. amazonensis* promovido pelo tratamento com poly(I:C) (**Figura 11C**), confirmando o papel de IL-10 no efeito de PKR sobre a proliferação de *Leishmania*.

Entretanto, IL-10 é secretada por células infectadas com as três espécies de *Leishmania* testadas e tratadas com poly(I:C) (**Figura 11D**). Desta forma, embora IL-10 possa estar favorecendo o crescimento de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, o não favorecimento de *L. major* pode ser explicado pela incapacidade desta espécie em subverter efeitos negativos para o seu crescimento induzidos por outras vias ativadas por poly(I:C), incluindo a mencionada ativação de NF- κ B.

Figura 11- IL-10 é secretada de forma dependente de PKR por células THP-1 e Raw infectadas por *Leishmania* e tratadas com poly(I:C)

Células THP-1 diferenciadas pelo tratamento com PMA (forbol-12 miristato-13 acetato) (**A** e **D**), Raw-Bla ou Raw-DN-PKR (**B**) foram infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*, *L. chagasi* ou *L. major* por 18h, pré-tratadas com 2mM de 2AP (2 aminopurina) (somente em **A**) e tratadas com 25 µg/mL de poly(I:C) por 3 dias. O meio de cultura foi recolhido e a quantificação de IL-10 foi procedida por ELISA. **C**-Células THP-1 foram diferenciadas pelo tratamento com PMA, infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. major* por 18h, tratadas com 25 µg/mL de poly(I:C) e por 10 µg/mL de anticorpo neutralizante para IL-10 por 3 dias. As células foram fixadas e coradas com Giemsa para análise do Índice de Infecção. Asteriscos indicam diferenças significativas, conforme indicado em A, B e C, e dos referidos pontos em relação aos pontos somente infectados pelas respectivas espécies *Leishmania* em D (teste de *t student*, com $p < 0,05$).

Figura 11



Análise do papel de IFN do tipo I no favorecimento da infecção por *Leishmania* e de sua produção dependente de PKR

Para verificar o possível papel de IFN do tipo I no favorecimento da infecção por *L. amazonensis* promovido pelo poly(I:C), inicialmente adicionamos IFN- α recombinante à cultura de células THP-1 infectadas por este parasito. Como podemos verificar na **Figura 12**, o tratamento com esta citocina recombinante levou a um aumento significativo da infecção por *L. amazonensis*, efeito não observado para *L. major*.

Fomos então verificar a produção de IFN do tipo I em nosso modelo. Dada a dificuldade de detecção destas citocinas em sobrenadante de culturas, realizamos ensaios de PCR em Tempo Real para a verificação do acúmulo do mRNA. Como podemos verificar na **Figura 13A**, o tratamento com poly(I:C) ou LPS levou a uma aumento significativo nos níveis de mRNA para IFN- β em células Raw-Bla infectadas ou não por *L. amazonensis*. Entretanto, os mesmos estímulos não foram capazes de induzir este aumento em células Raw-DN-PKR (**Figura 13A**), o que confirma o papel de PKR na produção de IFN do tipo I em nosso modelo.

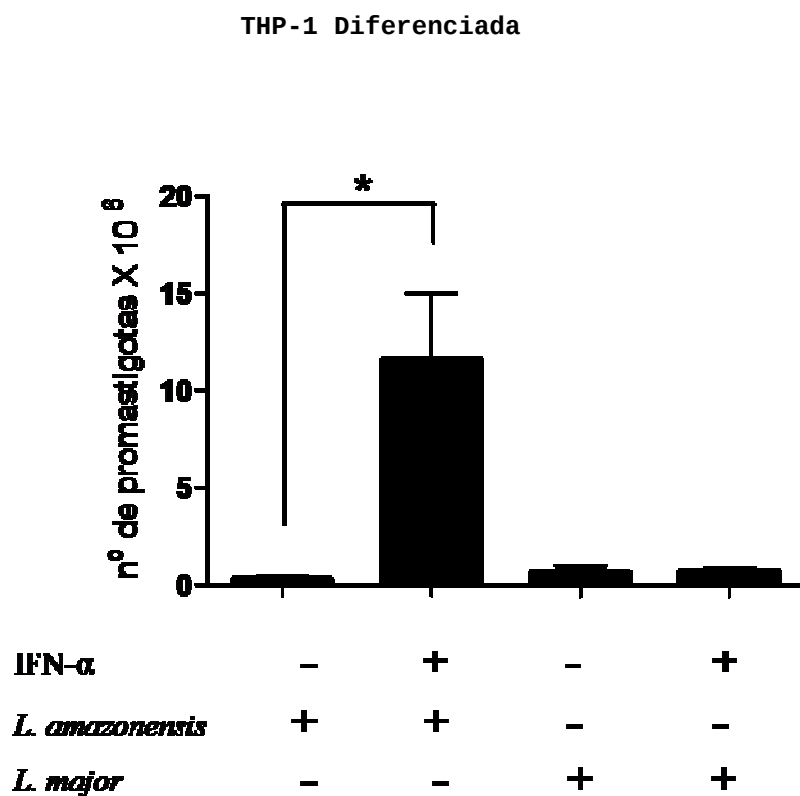


Figura 12- Tratamento de macrófagos com IFN do tipo I favorece infecção por *L. amazonensis* mas não por *L. major*

Células THP-1 foram diferenciadas pelo tratamento com PMA (forbol-12 miristato-13 acetato), infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* por 18h e tratadas com 500U/mL de IFN- α por 3 dias. O meio de cultura foi trocado por meio de crescimento para *Leishmania* para a produção de promastigotas. O gráfico representa número total de promastigotas produzido por poço contendo 2×10^5 células. Asteriscos indicam diferenças significativas entre grupos pelo teste de *t student*, com $p < 0,05$.

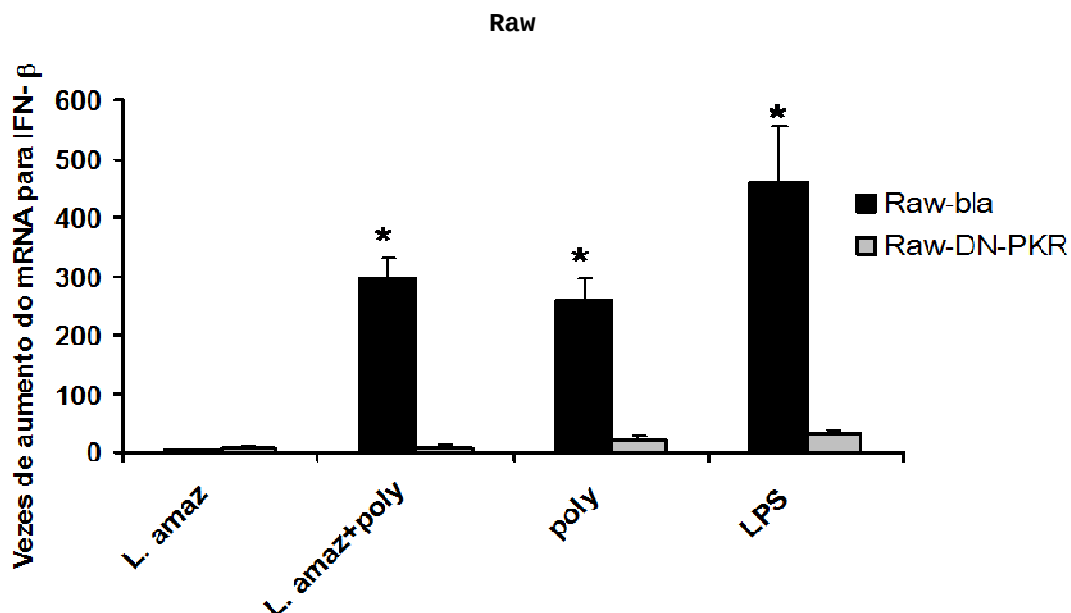


Figura 13- Ativação de PKR por poly(I:C) ou LPS induz aumento nos níveis de mRNA para IFN do tipo I em macrófagos

Células Raw-Bla e Raw-DN-PKR foram infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* por 18h e tratadas com 25 µg/mL de poly(I:C) ou 100 ng/mL de LPS por 4 h. O RNA foi extraído, a primeira fita de cDNA sintetizada e procedido um PCR quantitativo em Tempo Real para IFN-β, utilizando SYBRgreen e o método da curva padrão comparativa. Os valores representados indicam as vezes de aumento da intensidade de fluorescência de cada ponto em relação à quantidade de fluorescência detectadas nas células Raw-Bla não estimuladas. Asteriscos indicam diferenças significativas entre grupos marcados e todos os demais pelo teste de *t student*, com $p < 0,05$.

Avaliação da produção de NO dependente de PKR por macrófagos murinos infectados por *L. amazonensis* e tratados com poly(I:C)

O tratamento com poly(I:C) pode induzir a produção de óxido nítrico, que classicamente exerce efeito negativo sobre a proliferação intracelular de *Leishmania*. Uma vez que macrófagos humanos não produzem quantidades de NO apreciáveis pelo método de Griess, realizamos a análise da produção desse composto em macrófagos murinos. Como podemos verificar na **Figura 14**, o tratamento com poly(I:C) induz aumento significativo da produção de NO em células Raw-Bla e nas Raw-DN-PKR, entretanto, na ausência de PKR, esses níveis são significativamente menores. Em células Raw-Bla infectadas por *L. amazonensis* ocorre redução da produção de NO induzida por poly(I:C) ao nível das Raw-DN-PKR (**Figura 14 A**). Desta forma, o nível de produção de NO dependente de PKR é completamente inibido por *L. amazonensis* em Raw-Bla.

Visando avaliar se a inibição da ativação de NF- κ B induzida por poly(I:C) pela *L. amazonensis* observada anteriormente (Figura 10) se correlaciona com a capacidade deste patógeno de inibir a expressão de iNOS e, portanto, a conseqüente produção de NO dependente de PKR observada (Figura 14 A), realizamos ensaios de gene repórter. As células Raw foram transfectadas com uma construção contendo 3 cópias dos motivos NF- κ B/Stat1 presente a -5,8kb do promotor de iNOS. No dia após a transfecção, as células foram infectadas com *L. amazonensis* por 1h e tratadas com poly(I:C). Após 24h, a atividade da luciferase foi avaliada. Como demonstrado na **Figura 14 B**, a infecção por *L. amazonensis* reduz a atividade transcricional dependente de NF- κ B/Stat1 induzida por poly(I:C). Entretanto, a transfecção das Raw com a construção Stat1 luciferase, correspondendo ao motivo mapeado a -5,2kb do promotor de iNOS, revelou que a infecção

por *L. amazonensis* não reduz a atividade transcricional dependente apenas de Stat1 induzida por poly(I:C).

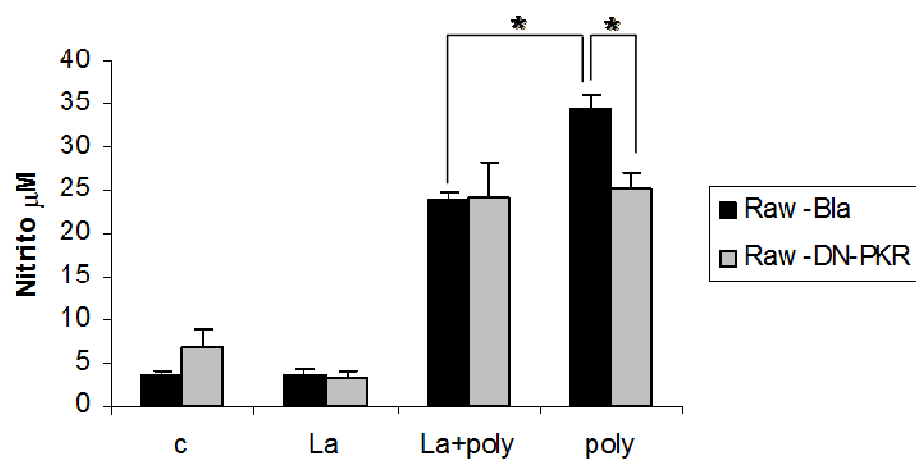
Figura 14- Infecção por *L. amazonensis* reduz a produção de óxido nítrico dependente de PKR e de NF-κB induzida por poly(I:C) em macrófagos murinos

A- Células Raw-Bla e Raw-DN-PKR foram infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* por 18h e tratadas com 25 µg/mL de poly(I:C) por 48h. O sobrenadante foi recolhido e os níveis de óxido nítrico foram avaliados indiretamente através da Reação de Griess. B- células Raw foram transfectadas com os plasmídeos repórter luciferase contendo na região promotora sítios para a ligação de NF-κB e STAT (pTK-3XNS) ou apenas STAT (pTK-3XS) presentes no promotor de iNOS. Após 24h, foram infectadas por *L. amazonensis* e tratadas por poly(I:C) por 24h. Foi então avaliada a atividade da luciferase em bioluminômetro. Asteriscos indicam diferenças significativas entre grupos pelo teste de *t student*, com $p < 0,05$.

Figura 14

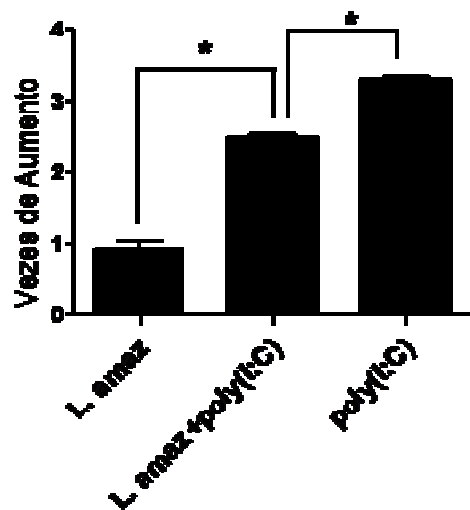
A

Raw

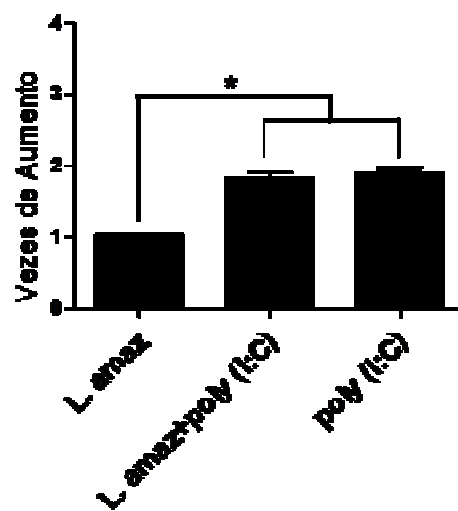


B

NF- κ B/STAT1 Luciferase Activity



STAT1 Luciferase Activity



Análise do papel de PKR em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e não tratados com estímulos indutores desta cinase

Uma vez que verificamos importante papel de PKR na modulação da infecção de macrófagos por *Leishmania*, fomos verificar se este parasito é capaz de modular a ativação desta cinase. Como podemos verificar em ensaios de *western blot*, tempos curtos de infecção (1-4 horas) por *L. amazonensis* são capazes de induzir a fosforilação de PKR em células THP-1 diferenciadas (**Figura 15A**) e Raw (**Figura 15B**). Verificamos ainda o aumento correspondente da fosforilação de eIF2 α , em células THP-1 (**Figura 15A**), confirmando a indução da atividade de PKR por *L. amazonensis*.

Tendo em vista que a própria *Leishmania* é capaz de induzir a ativação de PKR, partimos para a investigação do papel desta cinase na infecção de macrófagos por *L. amazonensis*, na ausência de outros estímulos indutores sua atividade. Ensaios de avaliação do Índice de Infecção em macrófagos de peritônio demonstraram uma redução da proliferação intracelular de *L. amazonensis* em células oriundas de animais *knockout* para PKR em comparação aos resultados obtidos para células de animais selvagens (**Figura 16A**). Como nos experimentos anteriores com as linhagens Raw-Bla e Raw-DN-PKR (**Figura 5**) tínhamos o objetivo de verificar o papel do poly(I:C) na infecção por *Leishmania*, utilizamos tempos de produção de promastigostas que não priorizaram a verificação dos níveis de infecção pela *Leishmania per se*. Repetimos, então, infecções destas linhagens com *L. amazonensis* e observamos, por tempos mais longos, a produção de promastigostas em meio Schneider após os 4 dias de infecção em meio de cultura de células. Como pudemos verificar na **Figura 16B**, a expressão do dominante negativo de PKR levou a uma redução significativa da replicação intracelular de *L. amazononesis* em

células Raw. Esses resultados indicam que o papel de PKR na infecção por *Leishmania*, não depende da presença de outros estímulos indutores desta cinase, já que o próprio parasito é capaz de induzir sua ativação.

A

THP - 1



B

Raw

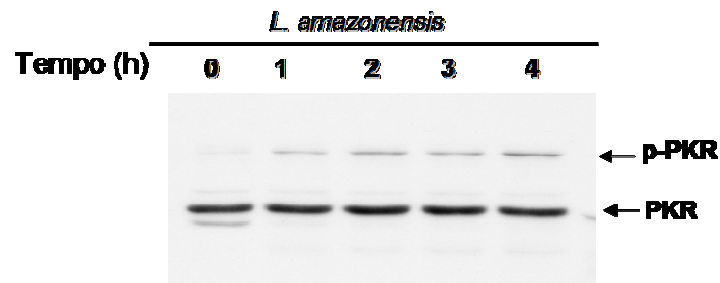


Figura 15- Infecção por *L. amazonensis* induz ativação de PKR em macrófagos humanos e murinos

Células THP-1 diferenciadas com PMA (forbol-12 miristato-13 acetato) (**A**) ou células Raw (**B**) foram infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* pelos tempos indicados. O extrato de proteínas totais foi submetido a *western blot* utilizando anticorpos específicos para p-PKR, p-eIF2α ou tubulina em A ou anticorpo que reconhece as formas fosforilada e não fosforilada de PKR em B. *p*-fosforilação.

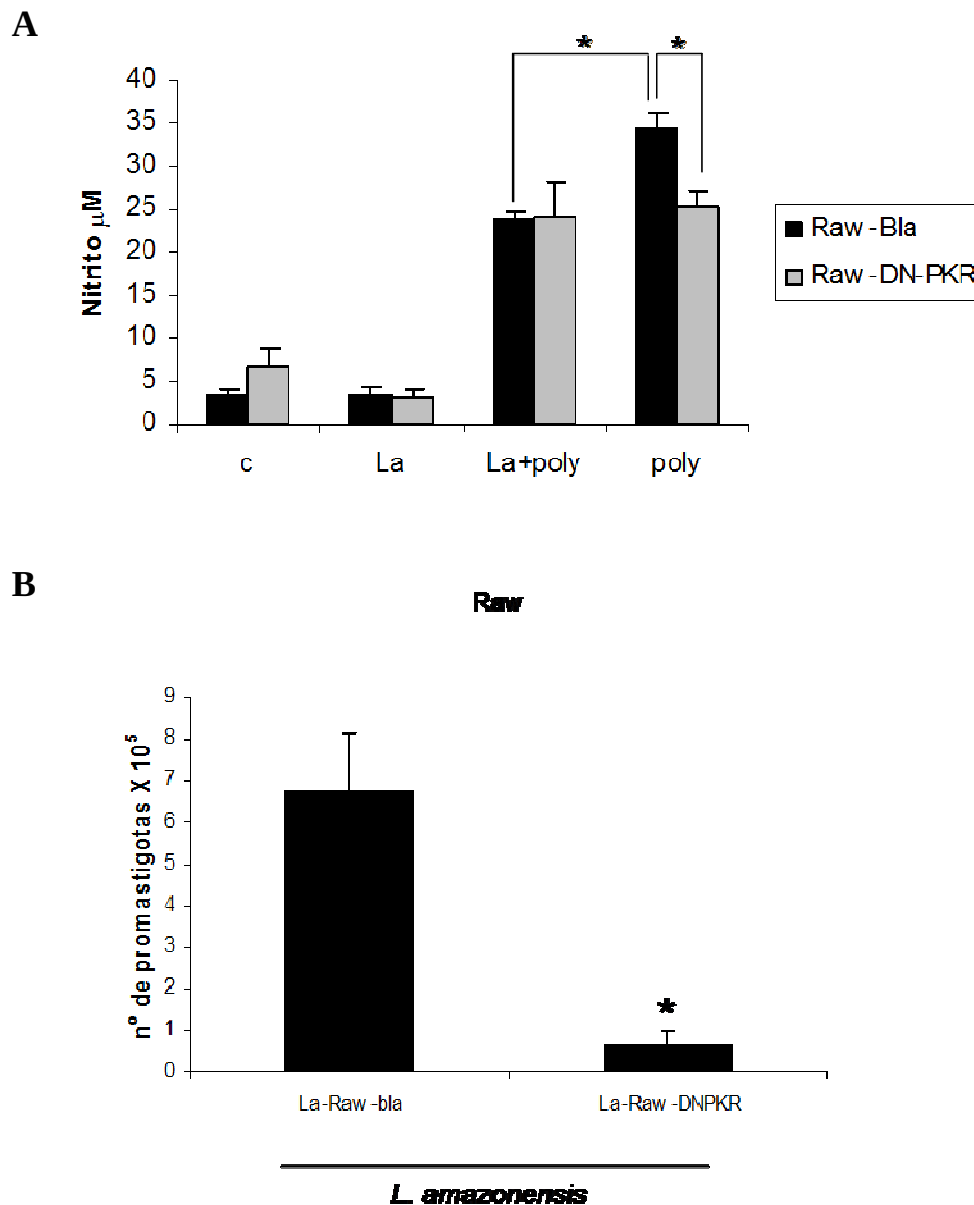


Figura 16- Importância de PKR na proliferação intracelular de *L. amazonensis* em macrófagos humanos e murinos, na ausência de outro estímulo indutor desta cinase

Células Raw (A) ou THP-1 diferenciadas com PMA (forbol-12 miristato-13 acetato) (B) foram infectadas com formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* por 18h. O meio de cultura foi trocado por meio de crescimento para *Leishmania* para a produção de promastigotas (B) ou as células foram fixadas e coradas com Giemsa (A) para análise do Índice de Infecção. Em B, o gráfico representa número total de promastigotas produzido por poço contendo 2×10^5 células. Asteriscos indicam diferenças significativas entre grupos pelo teste de *t student*, com $p < 0,05$.

Análise do papel de PKR na infecção de camundongos por *L. amazonensis*

Uma vez que verificamos importante papel de PKR na modulação da infecção por *L. amazonensis* *in vitro*, partimos para a avaliação do papel desta cinase na infecção *in vivo*. Camundongos 129 sv/ev selvagens (WT) ou *knockout* para PKR (PKR-KO) foram infectados com 10^6 formas promastigotas de fase estacionárias de *L. amazonensis* no coxim da pata traseira. A análise do tamanho da lesão indicou uma redução significativa da mesma em animais PKR-KO em relação aos animais do tipo selvagem após 4 semanas de infecção (**Figura 17A e B**).

A análise do título da infecção após 2 meses, demonstrou uma tendência (não significativa estatisticamente) à redução do título de parasitas na pata dos animais PKR-KO (**Figura 18A**), entretanto, não foi observada nenhuma diferença no título no linfonodo (**Figura 18 B**). Já a análise do baço, mostrou a visceralização em todos os animais WT e em apenas um animal PKR-KO (em baixo título) (**Figura 18 C**).

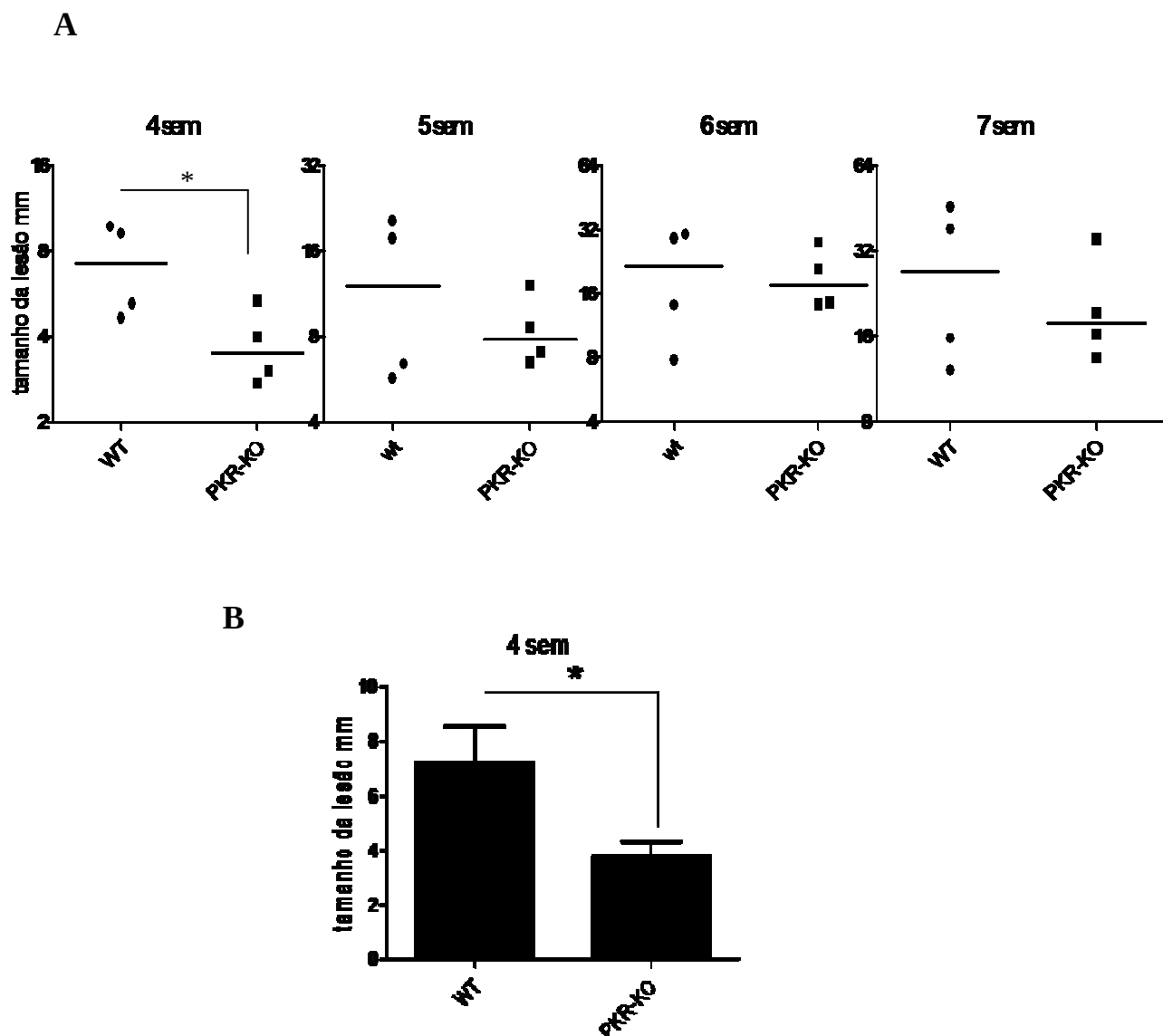


Figura 17- Animais *knockout* para PKR apresentam menor medida de lesão em quatro semanas de infecção por *L. amazonensis*

A- Camundongos 129 *sv/ev* WT ou PKR-KO foram infectados no coxim da pata traseira com 10^6 formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*. O diâmetro da lesão foi avaliado nos tempos indicados (sem = semana) através do uso de paquímetro e expresso como a diferença entre as espessuras das patas infectadas e não infectadas. **B-** Representação dos dados de 4 semanas em gráfico de barras. Asteriscos indicam diferenças significativas entre grupos pelo teste de *t student*, com $p < 0,05$.

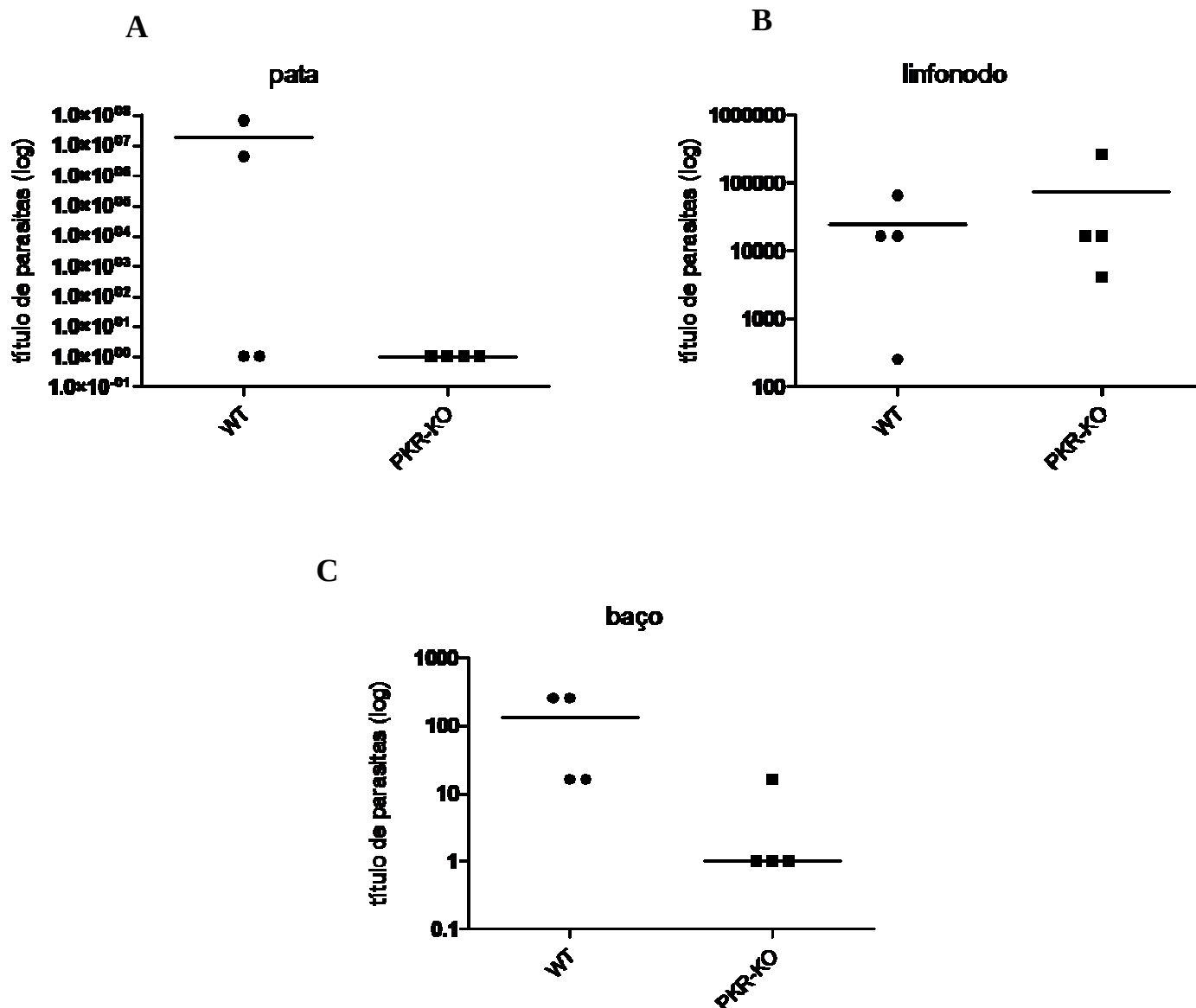


Figura 18- Animais *knockout* para PKR apresentam menor migração de *L. amazonensis* para o baço em 2 meses de infecção

Camundongos 129 *sv/ev* WT ou PKR-KO foram infectados no coxim da para traseira com 10⁶ formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*. A carga parasitária na lesão (pata), no linfonodo drenante (poplíteo) e no baço foi avaliada após 2 meses de infecção. O material obtido das dissecações foi macerado e plaqueado em diluições seriadas em meio Schneider completo. O título de parasitas foi avaliado após aproximadamente 7 dias de cultura a 26° C.

Análise do papel de PKR na indução de uma resposta celular em camundongos infectados por *L. amazonensis*

Uma vez que verificamos que a ativação de PKR pode favorecer o desenvolvimento da lesão em estágios iniciais da infecção de camundongos por *L. amazonensis*, o que pode determinar uma amplificação da visceralização do parasito em tempos mais tardios, nos perguntamos sobre o possível papel desta cinase na indução de uma resposta celular supressora. Inicialmente, avaliamos a resposta imune no linfonodo drenante em animais WT e PKR-KO após 2 e 4 semanas de infecção por *L. amazonensis* na pata. Verificamos que ocorre um aumento no número de linfócitos no linfonodo poplíteo de animais PKR-KO em 2 semanas de infecção (**Figura 19**), entretanto, esses níveis tendem a se igualar após 4 semanas de infecção (**Figura 24A**). Apesar de haver um maior número de linfócitos no linfonodo drenante de animais PKR-KO, em 2 semanas de infecção, não verificamos diferenças significativas no percentual de células TCD4⁺, TCD8⁺ (**Figura 20**) ou TregCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (**Figura 21**).

Visando avaliar o papel de PKR no perfil de produção de citocinas no linfonodo de animais infectados por *L. amazonensis*, avaliamos a produção de IFN γ e IL-10 (clássicas citocinas Th1 e Th2, respectivamente) por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ oriundos de camundongos WT e PKR-KO. Como podemos observar na **Figura 22**, animais PKR-KO apresentam um percentual significativamente maior de células TCD4⁺IFN- γ ⁺ em comparação ao tipo selvagem. Linfócitos TCD8⁺ também apresentaram um mesmo perfil de produção de IFN- γ , entretanto as diferenças entre os tipos WT e PKR-KO não foram significativas (**Figura 23**). As quantidades de IL-10 intracelular nos subtipos de linfócitos T observados não foram detectáveis em 2 semanas de infecção.

Após 4 semanas de infecção, a produção de IL-10 e IFN γ por células T CD4⁺ e TCD8⁺ não foi significativamente diferente entre animais WT e PKR-KO (**Figura 24B-E**). Avaliamos ainda o percentual de células TCD4⁺, TCD8⁺ e TRegCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e, da mesma forma, não observamos diferença significativa (dados não mostrados).

2 semanas de infecção

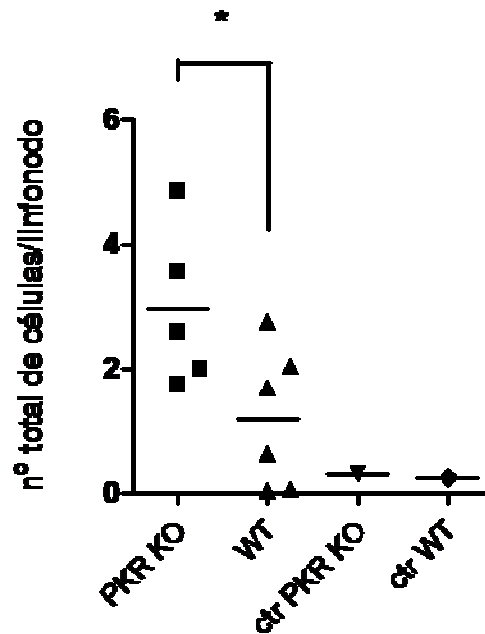


Figura 19- Animais *knockout* para PKR apresentam um aumento no número de linfócitos no linfonodo drenante quando infectados por *L. amazonensis* por 2 semanas
Camundongos 129 sv/ev WT ou PKR-KO foram infectados no coxim da pata traseira com 10^6 formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*. Após 2 semanas de infecção, o linfonodo drenante foi obtido e o número total de linfócitos avaliado em câmara de Neubauer. Asterisco indica diferenças significativas entre grupos pelo teste de *t student*, com

2 semanas de infecção

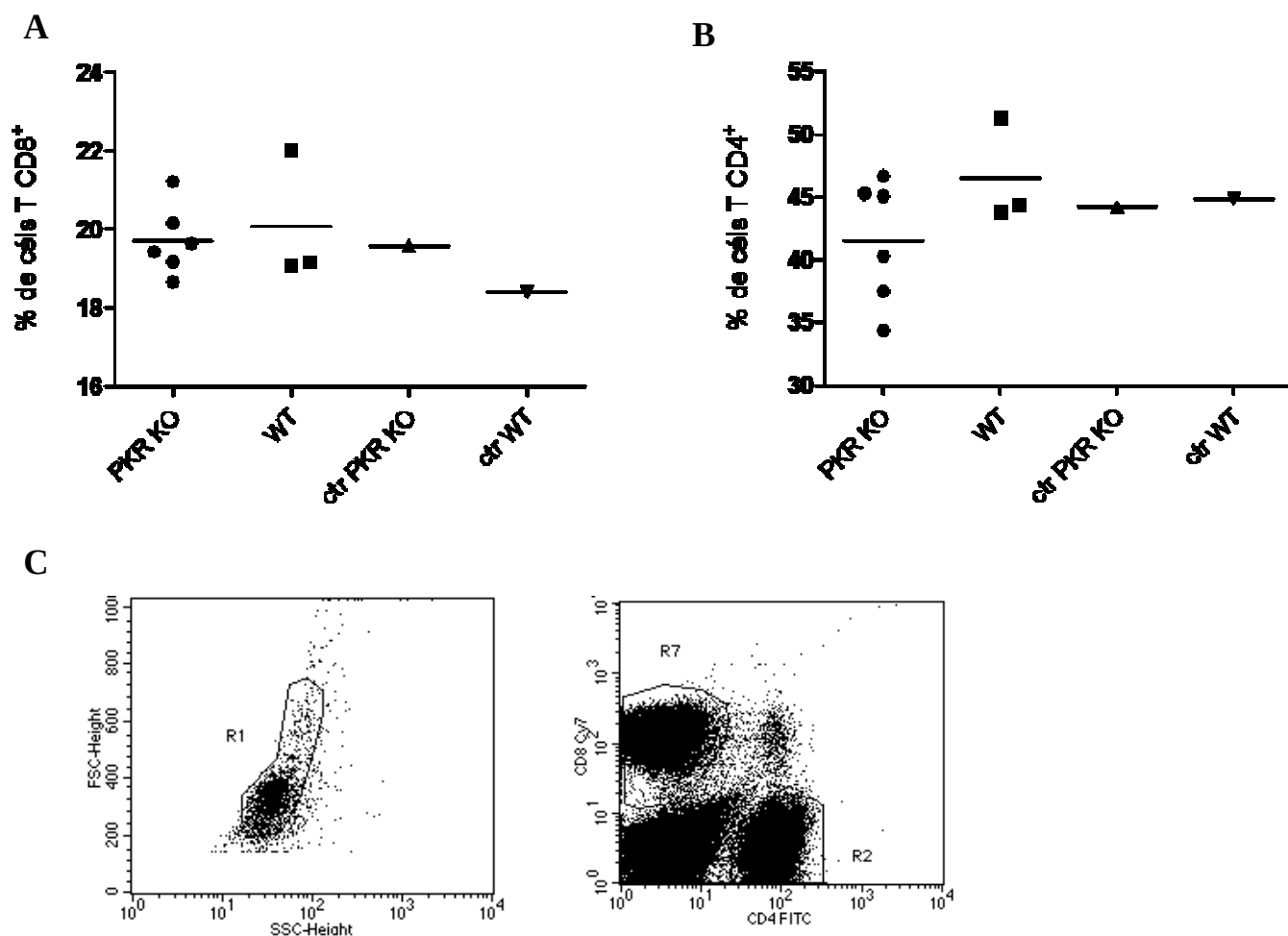


Figura 20- Animais *knockout* para PKR não apresentam diferenças no percentual de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no linfonodo drenante quando infectados por *L. amazonensis* por 2 semanas

Camundongos 129 sv/ev WT ou PKR-KO foram infectados no coxim da pata traseira com 10^6 formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*. Após 2 semanas de infecção, o linfonodo drenante foi obtido e o percentual de células T CD8⁺ (A) e CD4⁺ (B) foi avaliado por citometria de fluxo. PKR-KO e WT- animais infectados; ctr PKR-KO e ctr WT- animais não infectados. Em C, R1 corresponde à região de células considerada para a análise em um gráfico de tamanho (FSC) X granulosidade (SSC), R2 consiste na população de células CD4⁺ utilizadas para a quantificação e R7 a população de CD8⁺ analisada. R2 e R7 estão contidos em R1.

2 semanas de infecção

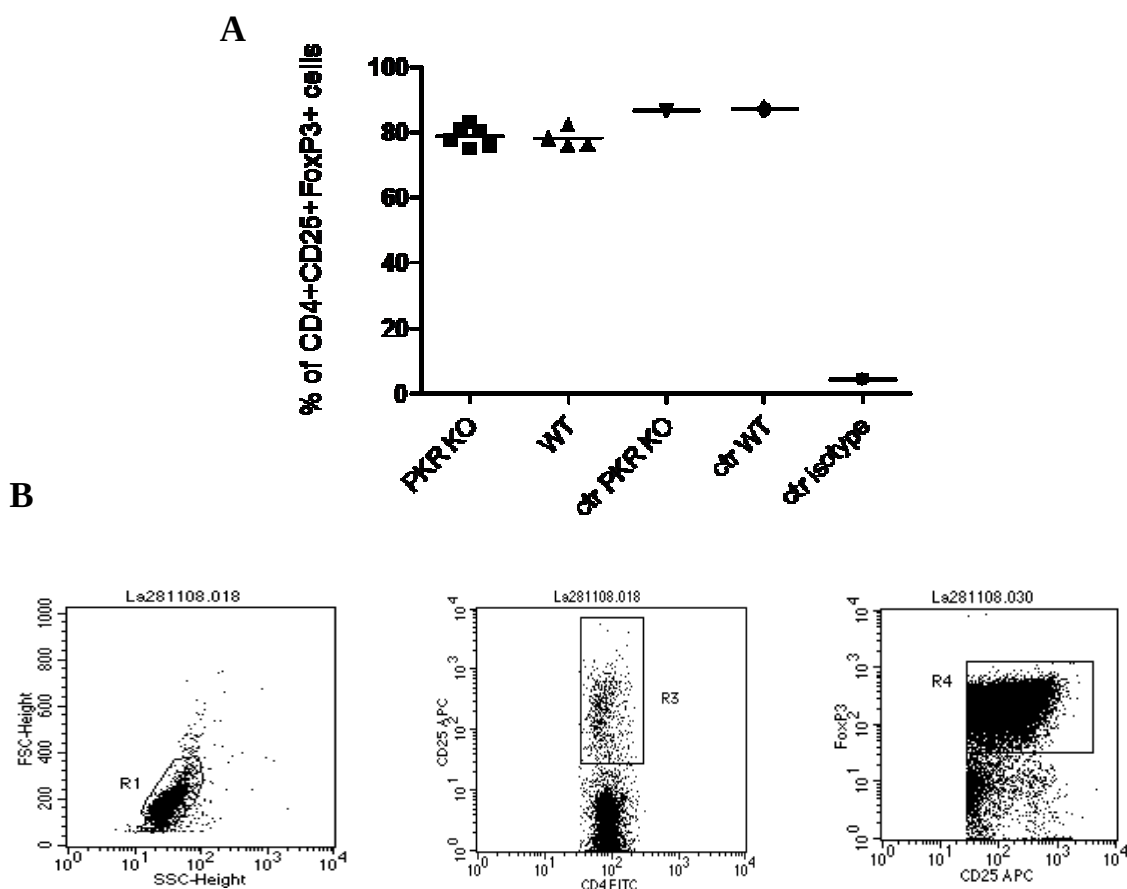


Figura 21- Camundongos *knockout* para PKR não apresentam diferenças no percentual de linfócitos TregCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ no linfonodo drenante quando infectados por *L. amazonensis* por 2 semanas

A- Camundongos 129 *sv/ev* WT ou PKR-KO foram infectados no coxim da pata traseira com 10⁶ formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*. Após 2 semanas de infecção, o linfonodo drenante foi obtido e o percentual de células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ foi avaliado por citometria de fluxo. PKR-KO e WT- animais infectados; ctr PKR-KO e ctr WT- animais não infectados; ctr isotipo- marcação com isotipo controle do anticorpo anti-FoxP3. Em **B**, R1 corresponde à região de células considerada para a análise em um gráfico de tamanho (FSC) X granulosidade (SSC). R3, pertencente a R1, consiste na população de células CD4⁺ CD25⁺ e R4, contida em R3, corresponde à população de CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ analisada.

Figura 22- Camundongos *knockout* para PKR apresentam maior percentual de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ no linfonodo drenante quando infectados por *L. amazonensis* por 2 semanas

A- Camundongos 129 *sv/ev* WT ou PKR-KO foram infectados no coxim da pata traseira com 10⁶ formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*. Após 2 semanas de infecção, o linfonodo drenante foi obtido e o percentual de células T CD4⁺ IFN γ ⁺ foi avaliado por citometria de fluxo. PKR-KO e WT- animais infectados; ctr PKR-KO e ctr WT- animais não infectados; ctr isotipo- marcação com isotipo controle do anticorpo. Em **B**, *R4* corresponde à região de células CD4⁺IFN γ ⁺ analisada. Esta região exclui células marcadas com isotipo controle do anticorpo anti-IFN- γ . Cada gráfico corresponde a um animal representativo da condição descrita em sua parte superior. Asterisco indica diferença significativa entre grupos pelo teste de *t student*, com $p < 0,05$.

2 semanas de infecção

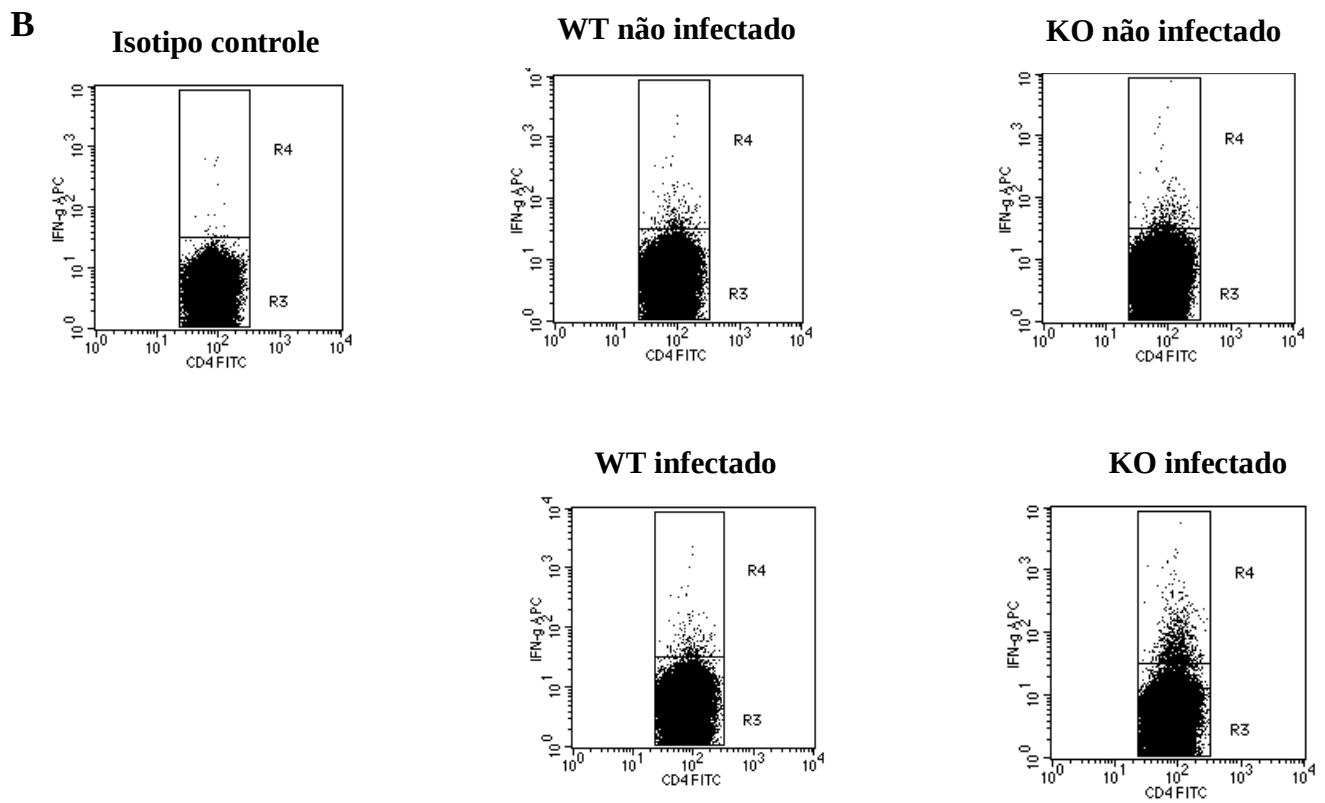
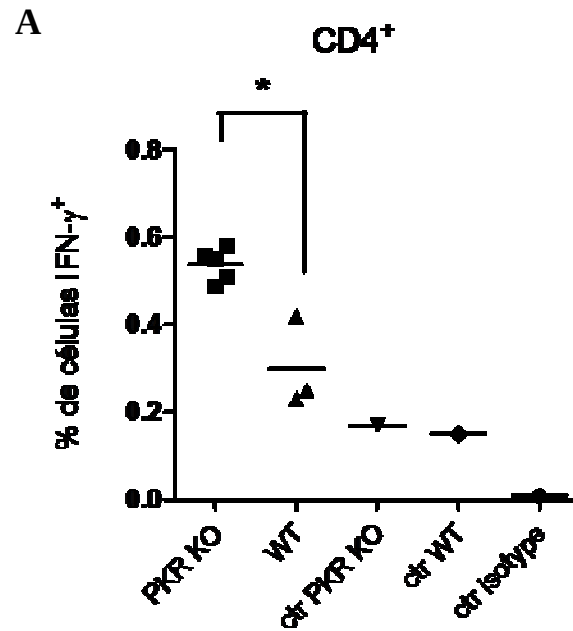
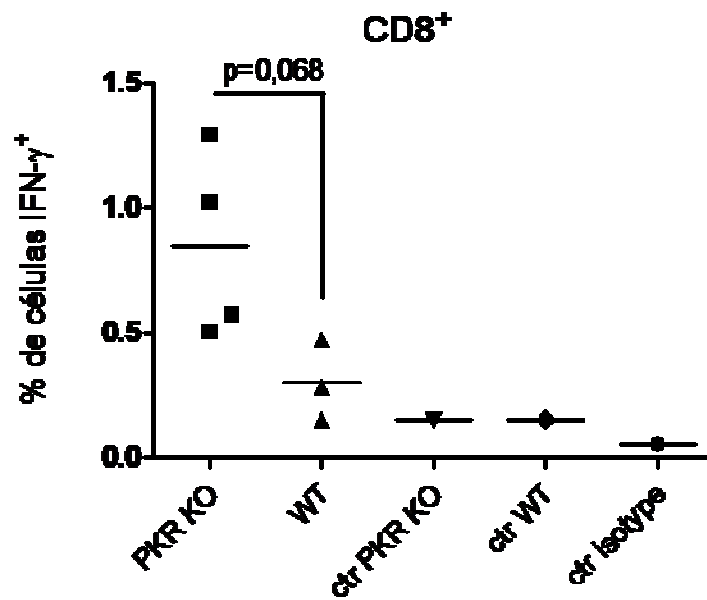


Figura 23- Camundongos *knockout* para PKR apresentam maior percentual de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ no linfonodo drenante quando infectados por *L. amazonensis* por 2 semanas

A- Camundongos 129 *sv/ev* WT ou PKR-KO foram infectados no coxim da pata traseira com 10⁶ formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*. Após 2 semanas de infecção, o linfonodo drenante foi obtido e o percentual de células TCD8⁺ IFN γ ⁺ foi avaliado por citometria de fluxo. PKR-KO e WT- animais infectados; ctr PKR-KO e ctr WT- animais não infectados; ctr isotipo- marcação com isotipo controle do anticorpo. O valor de *p* obtido no teste *t student*, está informado no gráfico para os grupos indicados. Em **B**, R4 corresponde à região de células CD8⁺IFN γ ⁺ analisada. Esta região exclui células marcadas com isotipo controle. Cada gráfico é corresponde a um animal representativo da condição descrita em sua parte superior.

2 semanas de infecção

A



B

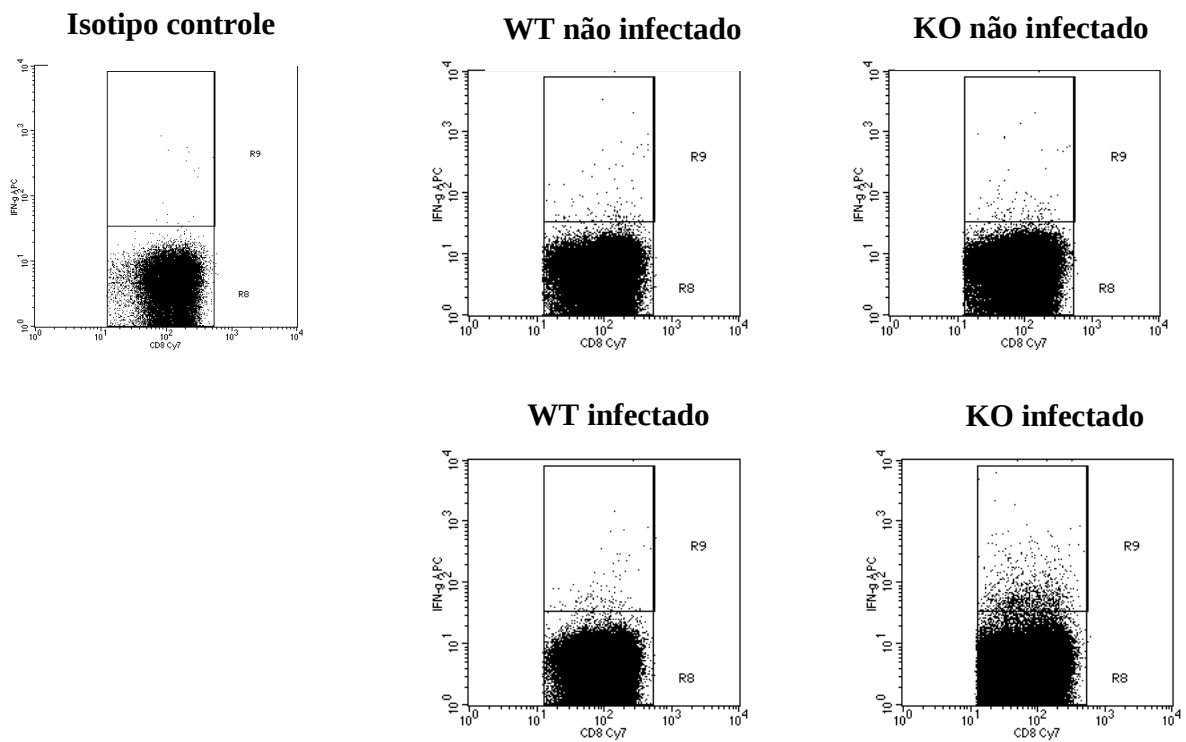
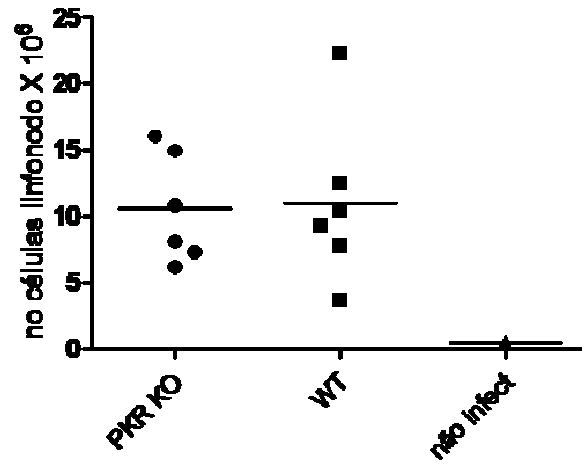


Figura 24- Camundongos *knockout* para PKR não apresentam diferença nos parâmetros imunes avaliados quando infectados por *L. amazonensis* por 4 semanas

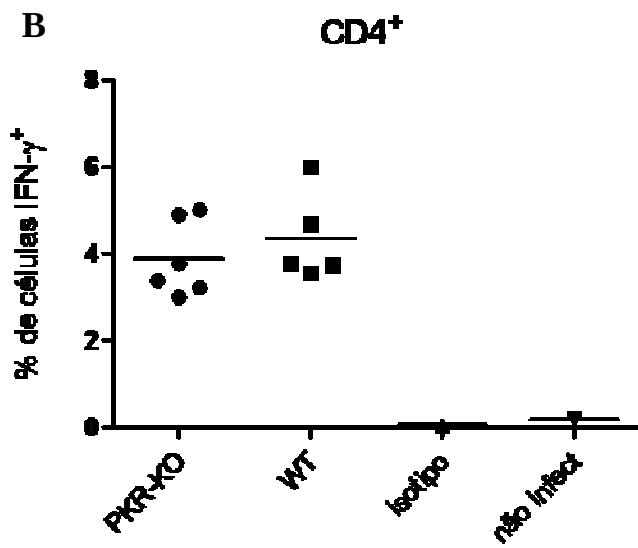
Camundongos 129 *sv/ev* WT ou PKR-KO foram infectados no coxim da pata traseira com 10^6 formas promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis*. Após 4 semanas de infecção o linfonodo drenante foi obtido e o número total de linfócitos avaliado em câmara de Neubauer (**A**), ou submetido à análise de citometria de Fluxo (**B, C, D, E**) utilizando anticorpos específicos para CD8, CD4, IFN γ e IL-10, conforme indicado. As análises foram realizadas como descrito nas figuras 22 e 23.

1 mês de infecção

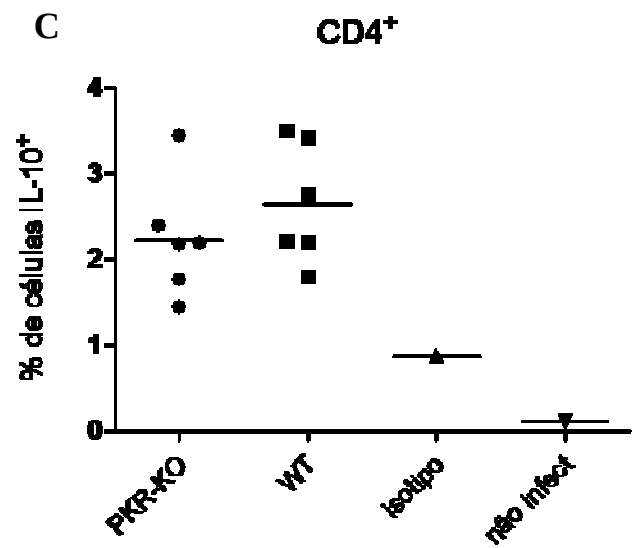
A



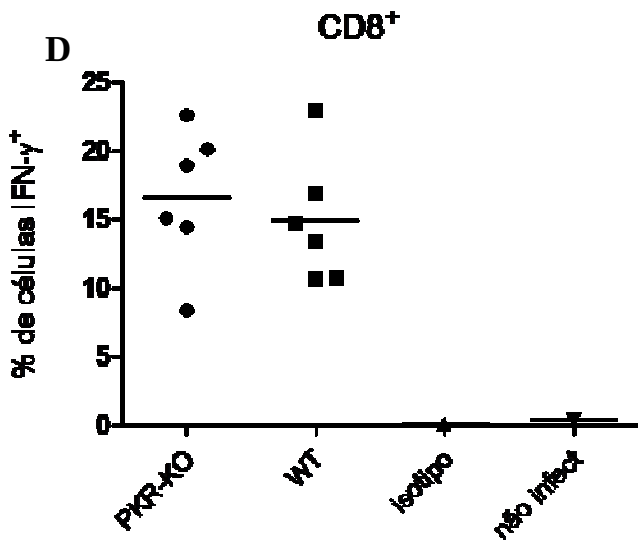
B



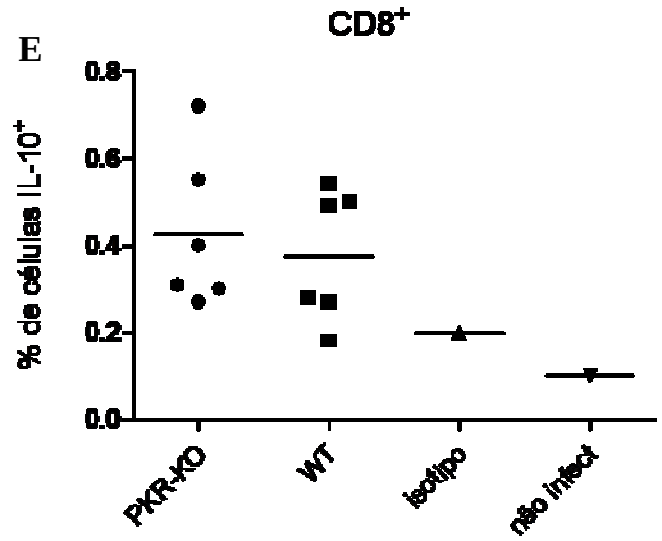
C



D



E



DISCUSSÃO

O estudo mais intensivo das cascatas de transdução de sinais nos últimos anos vem mostrando importantes inter cruzamentos entre essas vias, sugerindo múltiplos “papéis” para proteínas sinalizadoras. Na resposta imune contra patógenos, a conservação de vias relacionadas à produção de mediadores é consistente com o fato de que cada vez mais reconhecemos que uma combinação específica de um mesmo grupo de mediadores e tipos celulares, pode determinar padrões de resposta apropriados a diferentes classes de patógenos.

A proteína cinase dependente de dupla-fita de RNA (PKR) é bem caracterizada por sua atividade anti-viral, devido a sua capacidade de inibir a síntese de proteínas através da fosforilação do fator de iniciação da tradução eIF2- α . Entretanto, a participação de PKR em uma série de vias de transdução de sinais que culminam com a ativação de diversos fatores de transcrição implicam essa cinase na regulação da expressão de genes cujos produtos não apresentam apenas um papel no controle de infecções virais. De fato, diversos trabalhos vêm demonstrando o papel de PKR na modulação de importantes processos celulares, não só relacionados à defesa, como apoptose, proliferação e diferenciação (Garcia *et al*, 2007).

Ativação de PKR por estímulos pró-inflamatórios, como LPS, IFN- γ , IL-1 β e TNF- α , e sua participação em vias induzidas a partir de TLRs (Williams, 1999 e 2001; Garcia *et al*, 2006), sugerem um papel mais amplo do que o anteriormente pensado para PKR também na resposta imune. Cheung e colaboradores (2005), demonstraram um papel importante de PKR na produção de citocinas em monócitos humanos infectados por BCG, sugerindo o envolvimento esta cinase no controle de infecções bacterianas. Entretanto, de

nosso conhecimento, não há relato na literatura sobre o possível papel de PKR em infecções parasitárias.

A leishmaniose é um modelo de infecção causada por protozoários parasitos intensivamente estudados, tendo em vista sua incidência global, afetando 12 milhões de pessoas nos 5 continentes (WHO, 2003). Adicionalmente, o aumento no número de casos de co-infecção HIV-*Leishmania* vêm intensificando o interesse de estudo na leishmaniose e a melhor compreensão dos mecanismos de suscetibilidade e controle associados a esta infecção parasitária.

Hipotetizamos um possível papel de PKR na infecção de macrófagos por *Leishmania*, tendo em vista o papel desta cinase na regulação de mediadores envolvidos no controle da ativação desse tipo celular (Maggi *et al*, 2000; Chakrabarti *et al*, 2008; Cheung *et al*, 2005). Para testar esta hipótese, induzimos a ativação de PKR em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, através do uso de seu clássico indutor poly(I:C), uma dupla-fita de RNA sintética. Verificamos em linhagem monocítica humana (THP-1) diferenciada com PMA e em macrófagos primários humanos, um aumento da proliferação intracelular de *L. amazonensis* dependente de PKR quando realizamos tratamento destas células infectadas com o poly(I:C) (Figura 4). A dependência de PKR para esse favorecimento foi confirmada em linhagem de macrófagos murinos (Raw) expressando a forma dominante negativa de PKR (Figura 5).

O favorecimento da replicação intracelular de *L. amazonensis* pela ativação de PKR é consistente com os achados dos grupos do Dr. Dumith Bou-Habib e da Dra. Elvira Saraiva, com os quais colaboramos, que demonstraram que a proteína regulatória tat do HIV induz um aumento da replicação intracelular de *L. amazonensis* em macrófagos humanos (Barreto-de Souza *et al*, 2006). Isto porque, muitos dos efeitos de tat na célula hospedeira

dependem de sua interação com PKR (Demarchi *et al*, 1999; Li *et al*, 2005) e estas proteínas são capazes, inclusive, de interagir fisicamente (Mcmillan *et al*, 1995). Baseado nestas observações e em nossos dados, podemos imaginar que a ativação de PKR pelo HIV, através de tat ou da estrutura secundária do RNA viral TAR (Dever *et al*, 2007), poderia determinar uma permissividade à infecção por determinadas espécies de *Leishmania* em pacientes HIV-positivos, o que poderia apontar uma relação co-evolutiva interessante entre a resposta imune anti-viral e o progresso de infecções parasitárias.

Observamos que não só *L. amazonensis*, mas a espécie viscerotrópica *L. chagasi*, também apresenta maior proliferação intracelular conseqüente da ativação de PKR (Figura 6). Este dado é interessante, tendo em vista que quadros de co-infecção HIV-*Leishmania* são particularmente mais bem descritos em infecções com forma visceralizante da *Leishmania* (Karp & Neva, 1999). Já na infecção pela *L. major*, o tratamento com poly(I:C) levou a uma redução da proliferação intracelular do parasito (Figura 7). Este achado é consistente com a observação de que camundongos expressando a proteína E3L do vírus Vaccinia, que entre outras interferências na sinalização da célula hospedeira, inibe a ativação de PKR, são mais suscetíveis à infecção por *L. major* (Domingo-Gil *et al*, 2007).

Também verificamos que a indução de PKR por LPS é capaz de induzir um aumento da proliferação intracelular de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (Figuras 5 e 6B), o que indica que o efeito da ativação do PKR não é restrito ao uso do poly(I:C). Baseado nesta observação, podemos sugerir o papel de outros estímulos indutores de PKR no contexto da infecção por *Leishmania*, como IFN- γ , TNF- α e IL-1.

A avaliação da ativação de PKR em nosso modelo nos revelou que a infecção por *L. amazonensis* foi capaz de levar a um aumento nos níveis totais desta cinase em macrófagos

humanos (figura 8). Esse aumento foi confirmado pelo maior acúmulo de transcritos para PKR verificado após 18 horas de infecção (Figura 9 A). Entretanto, tempos mais tardios de infecção, levam a uma redução no acúmulo de mRNA para PKR (Figura 9 A e B). Mas, a presença do estímulo indutor de PKR, o poly(I:C), é capaz de recuperar esses níveis (Figura 9B), possivelmente através da indução da produção de IFN do tipo I. Foi recentemente confirmado o papel de PKR na regulação da expressão de IFN I induzida por dsRNA (McAllister & Samuel 2009). Além disso, já é bem caracterizado o papel do IFN I no aumento dos níveis desta cinase (Meurs *et al*, 1990), através da indução da ligação do fator heterodimérico ISGF3 (STAT1, STAT2, and IRF9) ao elemento ISRE presente em seu promotor (Samuel, 2001; Darnell, 1997; Ward & Samuel, 2002). A indução do aumento dos níveis do PKR pela *Leishmania* pode ser uma consequência da possível indução de IFN I por este parasito. Desta forma, estamos realizando ensaios de PCR em tempo real para avaliar os níveis desta citocina em tempos curtos da infecção de macrófagos por *L. amazonensis*.

Tendo em vista o papel positivo exercido pela ativação de PKR na proliferação intracelular de *L. amazonensis*, torna-se evolutivamente favorável para o parasito a seleção de mecanismos de exploração desta via em macrófagos. O aumento dos níveis de PKR pode representar um mecanismo de “disponibilização” de moléculas de PKR que seriam alvo para a fosforilação por estímulos indutores desta cinase presentes no sítio de infecção. Entretanto a indução prolongada deste aumento de níveis, poderia favorecer a ativação de vias que seriam danosas ao próprio hospedeiro e ao parasito, como a produção elevada de TNF- α e NO, como será discutido mais adiante, o que justificaria o *feedback* negativo da indução dos níveis de PKR pela *Leishmania* observado (figura 9B).

Dentro desta perspectiva de co-evolução de mecanismos que modulam a relação parasita-hospedeiro, observamos ainda que em tempos curtos de infecção, *L. amazonensis* leva à fosforilação de PKR e de seu substrato eIF2- α em macrófagos humanos e murinos (Figura 15). Tendo em vista que a indução da fosforilação de PKR pode ocorrer por vias disparadas a partir de TLR4 (Horng *et al*, 2001; Hsu *et al*, 2004; Cabanski *et al*, 2007), TLR2 (Cabanski *et al*, 2008), TLR9 (Horng *et al*, 2001) e TLR3 (Jiang *et al*, 2003), é plausível supor que a indução desta cinase por *L. amazonensis* possa depender da indução desta família de receptores por este parasito. Está cada vez mais claro na literatura que componentes estruturais de *Leishmania* podem se ligar aos TLR. Alguns trabalhos reportam o papel de TLR na resposta imune à infecção por *L. major* (Muraille *et al*, 2003; Kropf *et al*, 2004; Li *et al*, 2004) e LPG foi identificado com um ligante de TLR2 (de Veer *et al*, 2003). Ainda existem muitas questões na literatura no tocante ao papel dos TLRs na infecção por parasitos do gênero *Leishmania*. Novos componentes estruturais que atuem como ligantes desses receptores ainda devem ser descritos e é necessário o estudo do papel desta família de sensores na infecção por espécies de *Leishmania* cutânea do Novo Mundo.

Uma vez que muitos dos papéis de PKR dependem de sua capacidade de ativar NF- κ B, investigamos a indução deste fator de transcrição em nosso modelo. Confirmamos a ativação de NF- κ B dependente de PKR em células THP-1 diferenciadas, entretanto, a infecção por *L. amazonensis* é capaz de subverter esta ativação através da clivagem da subunidade p65 induzida pelo poly(I:C) e da indução do homodímero p50/p50 (Figura 10), um clássico repressor da atividade transcricional dependente de NF- κ B, uma vez que a subunidade p50 não apresenta domínio de transativação (May & Gosh, 1998) e é capaz de

se associar com HDAC-1 (histona deacetilase-1) (Zhong *et al*, 2002). A clivagem das subunidades p65 e c-Rel de NF- κ B por *Leishmania* foi demonstrada anteriormente na literatura. Cameron e colaboradores (2004) observaram que formas amastigotas de *L. mexicana* (espécie pertencente ao mesmo complexo que *L. amazonensis*) são capazes de induzir a degradação de NF- κ B de forma dependente da atividade da cisteína peptidase B e que esta degradação determina a repressão da produção de IL-12, citocina fundamental para o desenvolvimento de uma resposta Th1 protetora.

A degradação da subunidade p65 de NF- κ B também foi observada em infecção de macrófagos utilizando formas promastigotas de diversas espécies de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* e *L. braziliensis*) (Gregori *et al*, 2008). O fragmento N-terminal de p65 gerado no citoplasma e contendo 35KDa é capaz de dimerizar com p50, da mesma forma que observamos em nossos experimentos (Figura 10E), e parece ser capaz de mediar a expressão de uma série de genes (Gregori *et al*, 2008). Entretanto, ensaios de gene-repórter realizados pelo nosso grupo, demonstram uma inibição da transcrição dependente de NF- κ B em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (Calegari-Silva *et al*, submetido), embora não esteja claro em que medida apenas ativação do homodímero p50/p50 repressor possa estar envolvida com este evento. É possível ainda que clivagem de p65 torne esta subunidade ativa para a regulação de promotores específicos, enquanto outros tenham sua atividade reduzida. De forma interessante, Gregori e colaboradores mostram que os genes que tem sua expressão aumentada, codificam para quimiocinas, como MIP-1 β e MIP-2, que induzem o recrutamento de fagócitos para o sítio da infecção, e que podem, portanto, favorecer o espalhamento da infecção.

Semelhante ao observado para *L. amazonensis*, nosso grupo demonstrou anteriormente que *Mycobacterium leprae*, o agente causador da hanseníase, é capaz de induzir a ativação do homodímero repressor de p50/p50 em linhagem de célula de Schwann humana e que esta ativação se correlaciona com a inibição da transcrição dependente de NF- κ B (Pereira et al, 2005). De forma curiosa, *M. leprae* pode apresentar um perfil patológico, associado a anergia da resposta imune hospedeira, onde se verifica alta contagem de bactérias na lesão, denominado perfil lepromatoso (Ridley & Jopling, 1966). Já a *L. amazonensis*, apresenta-se de forma mais agressiva, denominada forma difusa, em indivíduos também apresentando deficiência inata da resposta imune (Gramiccia & Gradoni, 2005). É plausível supor uma relação entre o mecanismo supressor de transcrição associado à indução de p50/p50 observado em ambos os modelos de infecção, e a ocorrência de perfis imunopatológicos associados a um estado não responsivo em indivíduos acometidos por estes patógenos.

A ativação de NF- κ B é alvo de manipulação por diversos patógenos, tendo em vista o papel fundamental deste fator de transcrição na modulação da resposta imune hospedeira (Caamaño & Hunter, 2002). *Yersinia spp.*, por exemplo, é capaz de inibir a ativação de NF- κ B através de sua ubiquitina hidrolase YopJ (Zhou et al, 2005) e *Chlamydia trachomatis* é capaz de induzir a clivagem de p65 humano através da secreção de proteases (Lad et al, 2007). A manipulação da ativação de NF- κ B em nosso modelo, parece apresentar-se como um mecanismo evolutivo de subversão. Verificamos, em ensaios de gene repórter, utilizando construção contendo sítios para ligação de NF- κ B e STAT no promotor de iNOS, que a infecção por *L. amazonensis* leva à repressão da ativação desta sequência regulatória quando estão presentes os sítios de ligação para NF- κ B, mas não quando está

presente apenas o sítio de ligação apenas para STAT (Figura 14 B). Esta repressão transcricional está associada à inibição da produção de NO induzida por PKR pela *Leishmania* (Figura 14 A). Desta forma, a inibição da ativação de NF- κ B por *L. amazonensis* determina a regulação negativa de vias dependentes de PKR que teriam efeito protetor para o hospedeiro na infecção por este parasito.

Já a infecção por *L. major*, não foi capaz de induzir alteração na ativação de NF- κ B dependente de PKR (Figura 10). Podemos supor que a incapacidade desta espécie de *Leishmania* de subverter a ativação deste fator de transcrição pode determinar a produção de mediadores indutores da destruição intracelular deste parasito, como o NO (Calegari-Silva, 2007b). Esta observação é consistente com o fato de que *L. major* apresenta menor replicação intracelular em macrófagos em consequência do tratamento com poly(I:C) (Figura 7 B). De forma interessante, *L. major* não apresenta a forma difusa observada para a infecção por *L. amazonensis* e suas lesões costumam ser auto-curáveis.

A busca da compreensão dos mediadores capazes de explicar o favorecimento da replicação intracelular de *L. amazonensis* dependente de PKR, nos indicou IL-10 como um alvo sugestivo de análise. Foi mostrado recentemente o papel de PKR na regulação desta citocina anti-inflamatória em macrófagos (Chakrabarti *et al*, 2008).

IL-10 foi originalmente descrita como uma citocina produzida por células Th2 que limita a produção de IFN- γ por células Th1. Mais tarde, foi descoberto que IL-10 inibe a produção de TNF- α , ROS (espécies reativas de oxigênio) e IL-12 por macrófagos e/ou células dendríticas, levando a um bloqueio das respostas microbidas. Além disso, IL-10 inibe a expressão de iNOS e induz a atividade de arginase 1 (Arg 1), direcionando o metabolismo da arginina para a produção de poliaminas (que agem como fatores de

crescimento para a *Leishmania*). Importantes fontes de IL-10 são células Th2, macrófagos, células dendríticas, mielóides, células B, células NK, células Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) e vários subtipos de células T com função imunossupressiva ou imunoregulatória (revisto por Bogdan, 2008).

Embora a identificação de um papel arquétipo de suscetibilidade conferido pelas citocinas do tipo 2 não esteja claro para todas as espécies de *Leishmania* na literatura, IL-10 é classicamente aceita com uma citocina supressora em todos os modelos de infecção por estes parasitos observados (McMahon-Pratt & Alexander, 2004). Em humanos, os níveis de IL-10 se correlacionam com a severidade da doença (Karp *et al*, 1993). Nos modelos murinos de leishmaniose cutânea (Chatelain *et al*, 1999; Kane *et al*, 2001) e visceral (Murray *et al*, 2003), IL-10 contribui para a progressão da doença. As lesões nos camundongos *knockout* para IL-10 são substancialmente menores do que em camundongos do tipo selvagem (Kane *et al*, 2001) e a administração de IL-10 exógeno, (Lang *et al*, 2002) ou a indução do endógeno (Miles *et al*, 2005), resultam em exacerbação da doença.

Na infecção por *L. amazonensis*, IL-10 também é importante na limitação da resposta Th1 durante a fase aguda da infecção murina, apesar de não desempenhar o mesmo papel durante a fase crônica da infecção, já que em camundongos C57BL/6, a resposta Th1 é reduzida em estágios mais tardios da doença mesmo em animais deficientes para IL-10 (Jones *et al*, 2002). Além disso, experimentos com camundongos BALB/c deficientes para IL-10 demonstraram que esses animais, embora incapazes de controlar a progressão da lesão, apresentam uma produção aumentada de IFN- γ e NO e uma expressão aumentada de mRNA para IL-12 e seu receptor comparado como tipo selvagem. A

resolução efetiva da infecção por este parasita neste modelo requer a neutralização de IL-10 e IL-4 simultaneamente (Padigel *et al.*, 2003).

Em nossos experimentos, verificamos a produção de IL-10 dependente de PKR por macrófagos humanos e murinos (Figura 11A e B) e que a neutralização desta produção inibe o aumento da proliferação intracelular de *L. amazonensis* promovido pelo poly(I:C). A produção de IL-10 possivelmente irá não só inibir os níveis de produção de NO induzidos por poly(I:C) que não tiverem sido inibidos pela *L. amazonensis*, como dirigir o metabolismo da arginina para a produção de poliaminas que irão favorecer diretamente o crescimento intracelular deste parasito. Entretanto, o aumento dos níveis de IL-10 foi observado para o tratamento com poly(I:C) de células infectadas por todas as espécies de *Leishmania* testadas (Figura 11D). Desta forma, embora *L. amazonensis* e *L. chagasi* possam estar sofrendo os efeitos positivos da desativação dos macrófagos induzida por IL-10, o não favorecimento de *L. major*, conseqüente do tratamento com poly(I:C), pode se explicar pela incapacidade desta espécie em subverter outras vias ativadas em decorrência da indução de PKR, como a mencionada translocação nuclear de NF- κ B e conseqüente produção de NO.

Outro alvo interessante, cuja expressão pode ser regulada pela ativação de PKR, e que é capaz de modular a infecção de macrófagos por *Leishmania* é o IFN do tipo I (IFN- α ou IFN β) (McAllister & Samuel 2009). Estudos recentes vêm mostrando o papel destas citocinas na regulação da infecção por *L. major*, como será discutido a seguir.

O papel dos IFNs de tipo I no Sistema Imune vai além de suas propriedades anti-virais. Numerosas propriedades imunoregulatórias dessas citocinas já foram descritas, como a ativação ou inibição da função dos macrófagos, a modulação da produção de

anticorpos e alteração na proliferação e sobrevivência de células T (revisto por Bogdan *et al*, 2004). Esta enorme gama de propriedades dos IFNs do tipo I justifica a crescente descrição de sua relevância para a patogênese ou controle de certas infecções parasitárias ou bacterianas.

A bactéria do gênero *Chlamydia* foi o primeiro patógeno não viral mostrado ser inibido por IFNs do tipo I. Essas bactérias são potentes indutoras da produção dessas citocinas. IFN do tipo I também inibe a invasão de células epiteliais e fibroblastos por *Salmonella typhimurium* ou *Shigella flexneri*. *Listeria monocytogenes* estimula macrófagos e células NK a produzirem de IFN do tipo I, mas neste caso, esta produção parece ser em detrimento do hospedeiro, reduzindo sua sobrevivência e aumentando os títulos da bactéria. De forma semelhante, a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* induz a produção de IFN do tipo I e esta produção está associada a um aumento da mortalidade induzida por este patógeno. Portanto, em contraste com o crítico papel desempenhado pelos IFN do tipo I na imunidade hospedeira anti-viral, a produção destas citocinas no curso da infecção por bactérias Gram-positivas intracelulares parece ser em detrimento do hospedeiro (revisto por Perry *et al*, 2005 e Bogdan *et al*, 2004).

Infecções causadas por protozoários também induzem a produção de IFN do tipo I e o efeito protetor desta citocina já foi verificado em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondi* e *Leishmania spp.* (revisto por Bogdan *et al*, 2004). No modelo de infecção por *L. major*, durante a fase inata da resposta à infecção, a expressão de iNOS, a atividade citotóxica de células NK, e a produção precoce de IFN- γ em camundongos resistentes foi dependente da produção endógena de IFN do tipo I (Diefenbach *et al*, 1998). *L. major* dispara a liberação de IFN α e β *in vivo* e *in vitro* e o

tratamento com estes parasitos concomitante com IFN do tipo I leva à ativação de macrófagos para a produção de NO (Diefenbach *et al*, 1998, Mattner *et al*, 2000). Mattner e colaboradores (2004) demonstraram que a administração de baixas doses de IFN- β confere proteção contra a leishmaniose cutânea progressiva causada por *L. major* em modelos de camundongos suscetíveis BALB/c. Entretanto, resultado oposto foi obtido recentemente para as leishmanias do Novo Mundo. Khoure e colaboradores (2009) demonstraram que IFN- β aumenta a infecção de macrófagos por *L. amazonensis* e *L. brasilienses*.

Como não havia sido demonstrado o papel do IFN I na infecção por espécies de *Leishmania* cutânea do Novo Mundo na época da execução de nossos experimentos, realizamos um ensaio preliminar onde tratamos macrófagos infectados por *L. amazonensis* com IFN- α recombinante. Nossos achados foram similares aos obtidos por Khoure e colaboradores, onde o tratamento com IFN I levou a um aumento da proliferação intracelular de *L. amazonensis* (Figura 12). Neste trabalho, eles demonstram ainda que este efeito depende da diminuição da produção de superóxido de uma forma dependente da produção de superóxido dismutase (SOD1).

Uma vez verificado que IFN I desempenha um papel favorecedor da infecção por *L. amazonensis*, quantificamos a produção destas citocinas em nosso modelo. Dada a dificuldade de detectar IFN I em sobrenadantes de células de cultura por ELISA, realizamos ensaios de PCR quantitativo em tempo real. Verificamos que o tratamento de células Raw com LPS ou poly(I:C) leva a um aumento importante no acúmulo de mRNA para IFN- β , entretanto, este aumento é revertido pela expressão do dominante negativo de PKR, indicando um papel fundamental desta cinase na produção deste mediador em nosso modelo (Figura 13). Uma vez que estas citocinas parecem mediar efeitos negativos na

proliferação intracelular de *L. major*, torna-se importante avaliar os níveis de expressão das mesmas em macrófagos infectados por este parasito e tratados com os indutores de PKR. A produção de IFN I é um alvo interessante para a investigação dos mecanismos que determinam um papel diferencial de PKR nas infecções por *L. amazonensis* e *L. major*.

Tendo em vista o efeito de PKR no favorecimento da infecção de macrófagos por *L. amazonensis* e a capacidade deste patógeno de induzir a fosforilação desta cinase, investigamos o papel de PKR em células infectadas por *Leishmania* na ausência de outros indutores desta cinase. Resultados com macrófagos de peritônio oriundos de animais PKR-KO e células expressando o dominante negativo de PKR indicaram que a ausência da atividade desta cinase reduz a infecção por *L. amazonensis*. Neste caso, não podemos discernir se o papel desta cinase se dá durante o processo de invasão ou de proliferação intracelular da *Leishmania* nos macrófagos. Tendo em vista que macrófagos apenas infectados por formas promastigotas de *L. amazonensis* não são capazes de secretar IL-10 (Figura 11 A e B; Yang *et al*, 2007), a produção desta citocina não é capaz de explicar o efeito do PKR no favorecimento deste parasita em macrófagos na ausência de outros estímulos.

Apesar de não verificarmos aumento importante da produção de IFN- β em células apenas infectadas por *L. amazonensis* (Figura 13), avaliamos somente o acúmulo de mRNA após 18h de infecção. Tendo em vista que a infecção por *L. major* é capaz de induzir a produção de IFN I (Diefenbach *et al*, 1998), torna-se fundamental avaliarmos o acúmulo de IFN- β em uma curva temporal de infecção por *L. amazonensis*. A possível indução de IFN I por *L. amazonensis* pode explicar, ao menos em parte, o papel de PKR na infecção de macrófagos por este parasita na ausência de outros estímulos indutores desta cinase.

Tendo verificado o papel fundamental de PKR na modulação da infecção de macrófagos por *Leishmania*, partimos para a investigação do papel desta cinase na infecção de camundongos por estes parasitas. Através do uso de camundongos 129sv/ev WT ou PKR-KO, avaliamos diversos parâmetros da infecção por *L. amazonensis* na pata traseira. A análise do curso da infecção demonstrou que em animais PKR-KO a lesão na pata é significativamente menor em 4 semanas de infecção comparada a lesão de animais WT (figura 17). Entretanto, em tempos mais tardios, não verificamos diferença significativa do tamanho da lesão entre os camundongos WT e PKR-KO. Da mesma forma, não verificamos diferença significativa no título de parasitas na pata e no linfonodo após 2 meses de infecção (figura 18). Mas de forma interessante, verificamos que na dose de parasitos utilizada, houve a visceralização da infecção ocorrendo a disseminação para o baço dos parasitas em todos os animais WT avaliados. Já a análise dos animais PKR-KO, demonstrou a migração para o baço apenas em um animal, em título baixo. Estes achados sugerem que PKR possa favorecer a infecção de camundongos por *L. amazonensis* apenas em tempos iniciais. Entretanto, este favorecimento inicial, pode determinar o espalhamento do parasito, e portanto, levar a um agravamento do curso da doença.

A observação de uma tendência de diminuição do tamanho da lesão em tempos iniciais de infecção por *L. amazonensis* em camundongos PKR-KO nos sugeriu um papel desta cinase na inibição de uma resposta imune protetora contra este parasito no início do processo infeccioso. O controle da infecção por parasitos do gênero *Leishmania* depende da ação de macrófagos, células dendríticas, linfócitos auxiliares (*helper*) CD4⁺ do tipo I (Th1) e de citocinas, como IFN- γ , IL-12 e TNF- α (McMahon-Pratt & Alexander, 2004). IL-12 ativa células NK (*natural killer*), que produzem IFN- γ (interferon γ) e influencia a

iniciação de uma resposta do tipo I (Scharton-Kersten *et al*, 1995). A produção de IFN- γ irá controlar a resistência inata à infecção através da indução da produção de NO pelos macrófagos (Liew & O'Donnell, 1993).

Apesar de não estar claro se paradigma o Th1 x Th2 de resistência x suscetibilidade é válido para a infecção por *L. amazonensis*, a habilidade de montar uma resposta Th1 ainda é reconhecida como determinante de um fenótipo de resistência. Entretanto, o fenótipo de suscetibilidade já foi proposto ser determinado por diversos fatores, como: uma resposta predominantemente Th2 (Lemos de Souza *et al.*, 2000), a ausência de uma resposta Th1 (Afonso & Scott, 1993), ou uma resposta mista Th1/Th2 (Ji *et al.*, 2002).

O papel de PKR na determinação de uma inibição da resposta protetora contra *L. amazonensis* foi inicialmente sugerido pela maior presença de linfócitos no linfonodo de animais PKR-KO infectados em relação aos animais WT (figura 19). Este resultado sugere uma maior migração ou proliferação nestes destas células em resposta à infecção, na ausência de PKR. Entretanto, ensaios de FACS demonstraram não haver um maior percentual de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ (figura 20) ou Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (figura 21) no linfonodo dos animais PKR-KO infectados, o que sugere que esta diferença pode ocorrer como consequência de um acúmulo de outras subpopulações de células T regulatórias ou células B.

As células B CD19⁺ foram demonstradas como sendo o principal tipo celular que prolifera em resposta à infecção por *L. amazonensis* nos linfonodos de animais BALB/c infectados, em muito maior extensão do que as células T CD4⁺ e CD8⁺. É possível que células B estejam envolvidas com a resposta protetora por estarem primando células T CD4⁺. Entretanto, ensaios de infecção com camundongos JhD (possuem mutação no

segmento J no gene da cadeia pesada de Ig), que não possuem células B, demonstraram que os anticorpos e as células B estão relacionados à exacerbação da doença, já que estes animais apresentam menor lesão e velocidade de desenvolvimento da patologia do que animais BALB/c WT (Wanasen *et al.*, 2008). É, portanto, fundamental avaliarmos o papel de células B no linfonodo drenante de animais WT ou PKR-KO infectados por *L. amazonensis*, bem como verificarmos os níveis de anticorpos nestes animais, de forma a melhor compreender o papel de PKR na modulação da resposta humoral neste modelo de infecção.

Como discutido anteriormente, a presença de uma resposta Th1 parece determinar proteção à infecção por *L. amazonensis*, por isso, comparamos o perfil de produção de IFN- γ em animais WT ou PKR-KO, visando investigar o papel de PKR no desenvolvimento da resposta protetora ou determinação de suscetibilidade. Em 2 semanas de infecção, verificamos uma maior produção de IFN- γ por células T CD4⁺ (figura 22) e T CD8⁺ (figura 23) em animais PKR-KO, o que sugere que esta cinase esteja envolvida com a supressão da produção desta citocina e, portanto, com a inibição de um perfil Th1 de proteção. O papel protetor das células T CD8⁺ e seus mecanismos efetores (IFN γ e perforina) na resposta protetora contra a *L. amazonensis* já foi descrito (Colmenares *et al.*, 2003). Além disso, existem evidências de que cisteíno-proteases de *L. amazonensis* inibem a apresentação de antígenos através da clivagem de MHC II no vacúolo parasitóforo (De Souza Leão *et al.*, 1995), sugerindo que a resposta adaptativa possa estar sendo conduzida por MHC I durante a infecção murina por este parasita.

Dada a importância das células dendríticas na determinação do perfil de resistência ou suscetibilidade através da produção respectivamente de IL-12 e IL-4 (Qi *et al.*, 2001), é

plausível supor que PKR seja necessário para a repressão da produção de IL-12 por este tipo celular de forma direta ou indireta. Uma possibilidade é a de que a IL-10, produzida de forma dependente de PKR, induza sinais negativos nas células dendríticas (revisto por Bogdan, 2008). Há ainda relatos na literatura de que o IFN I seja capaz de inibir funções de células dendríticas e reprimir a produção de IL-12 por este tipo celular (Bartholomè *et al*, 1999; McRae *et al*, 2000; Hussien *et al*, 2001), o que sugere que a produção de IFN- β por PKR possa estar envolvida de forma indireta com a supressão da resposta Th1.

Após 1 mês de infecção, a análise dos tipos celulares e produção de citocinas, demonstrou não haver diferenças significativas nos parâmetros imunes observados, sugerindo que PKR esteja determinando diferenças no perfil de resposta imune apenas em fases iniciais da infecção por *L. amazonensis*. Dado o possível papel de IL-10 na determinação do perfil de suscetibilidade ditado por PKR, nossa observação é consistente com o fato de que embora importante para limitar a resposta Th1 durante a fase aguda da infecção murina por *L. amazonensis*, esta citocina não desempenha papel similar durante a fase crônica da doença (Jones *et al*, 2002).

No presente trabalho, demonstramos pela primeira vez, o papel de PKR no desenvolvimento de uma infecção parasitária. Este papel parece ser espécie-específico e nossos estudos mais aprofundados com *L. amazonensis* demonstram importante envolvimento desta cinase em funções de macrófagos (figura 25), além de sugerir seu papel na determinação de perfil de resposta imunológica para este parasito (figura 26). O estudo aprofundado do papel desta cinase na determinação de suscetibilidade ou até mesmo possível estado de anergia na resposta hospedeira (como na leishmaniose disseminada), além de seu possível papel como um conector de mecanismos de imunidade anti-viral e

evolução de doenças parasitárias, abre interessante campo de investigação no tocante à determinação de prognósticos e intervenções terapêuticas.

Além das motivantes possibilidades de alternativas de tratamentos que o conhecimento de uma nova via de sinalização envolvida com resposta imune nos traz, é importante destacar que estas observações enriquecem o cenário concebido para nosso conhecimento biológico sobre os parasitas e sua complexa e fascinante interação com os organismos hospedeiros.

Figura 25- Esquema proposto para o papel de PKR na infecção de macrófagos por *L. amazonensis* a partir dos dados obtidos em ensaios *in vitro*

Tempos curtos de infecção por *L. amazonensis* determinam a fosforilação do PKR, possivelmente pelo disparo de TLRs por este parasito (1). Após 18hs de infecção ocorre um aumento dos níveis intracelulares de PKR (2). Esta quinase em maiores níveis pode ser alvo de fosforilação por diversos estímulos pró-inflamatórios presentes no sítio da infecção. Observamos LPS, que está agindo possivelmente via TLR4 (3), e dsRNA que pode agir por interação direta com o PKR (4) ou através de TLR3. A dsRNA poderia estar presente como decorrência de uma co-infecção viral.

PKR fosforilado pode determinar a ativação de vias que teriam efeito negativo sob a proliferação intracelular da *Leishmania*, como a indução do dímero ativador de NF- κ B p65/p50 (5) que leva à expressão de iNOS e consequente produção de NO, que pode levar à destruição intracelular da *Leishmania*, o que aparentemente é o que ocorre no caso de *L. major*. Entretanto, *L. amazonensis* é capaz de levar à modificação do dímero ativado de NF- κ B, clivando a subunidade p65 (6) e levando a ativação de p50/p50 (7), um repressor transcricional, o que irá determinar a supressão da produção de iNOS e a redução intracelular de NO.

A ativação de PKR leva também a produção de IL-10 (8), uma citocina supressora relacionada à suscetibilidade à infecção por *Leishmania*. IL-10 irá levar à repressão da produção de NO (9), o que irá favorecer a proliferação da *Leishmania*, e irá favorecer também diretamente essa proliferação através da produção de poliaminas. Além disso, IL-10 irá também favorecer a replicação de *L. amazonensis* em células vizinhas infectadas (11).

Além de IL-10, a ativação de PKR leva à produção de IFN I (12), que irá induzir o aumento da expressão do próprio PKR (13) e induzir a expressão SOD (superóxido dismutase) que irá levar a uma redução da produção de superóxido (14) e, como consequência, a um aumento da proliferação de *L. amazonensis*. IFN I também irá favorecer a replicação da *Leishmania* em células vizinhas (15). Entretanto, no caso da infecção por *L. major*, novamente haveria um desfavorecimento, já que a exposição a IFN I de células previamente infectadas por este espécie leva a um aumento da produção de NO e a morte intracelular do parasito. Estudos da literatura mostram que IFN I pode ainda aumentar a produção de IL-10, reforçando a supressão dos mecanismos leishmanicidas do macrófago.

Simbolos “?” representam que não está claro se os sinais mais tardios são disparados por amastigotas intracelulares.

Figura 25

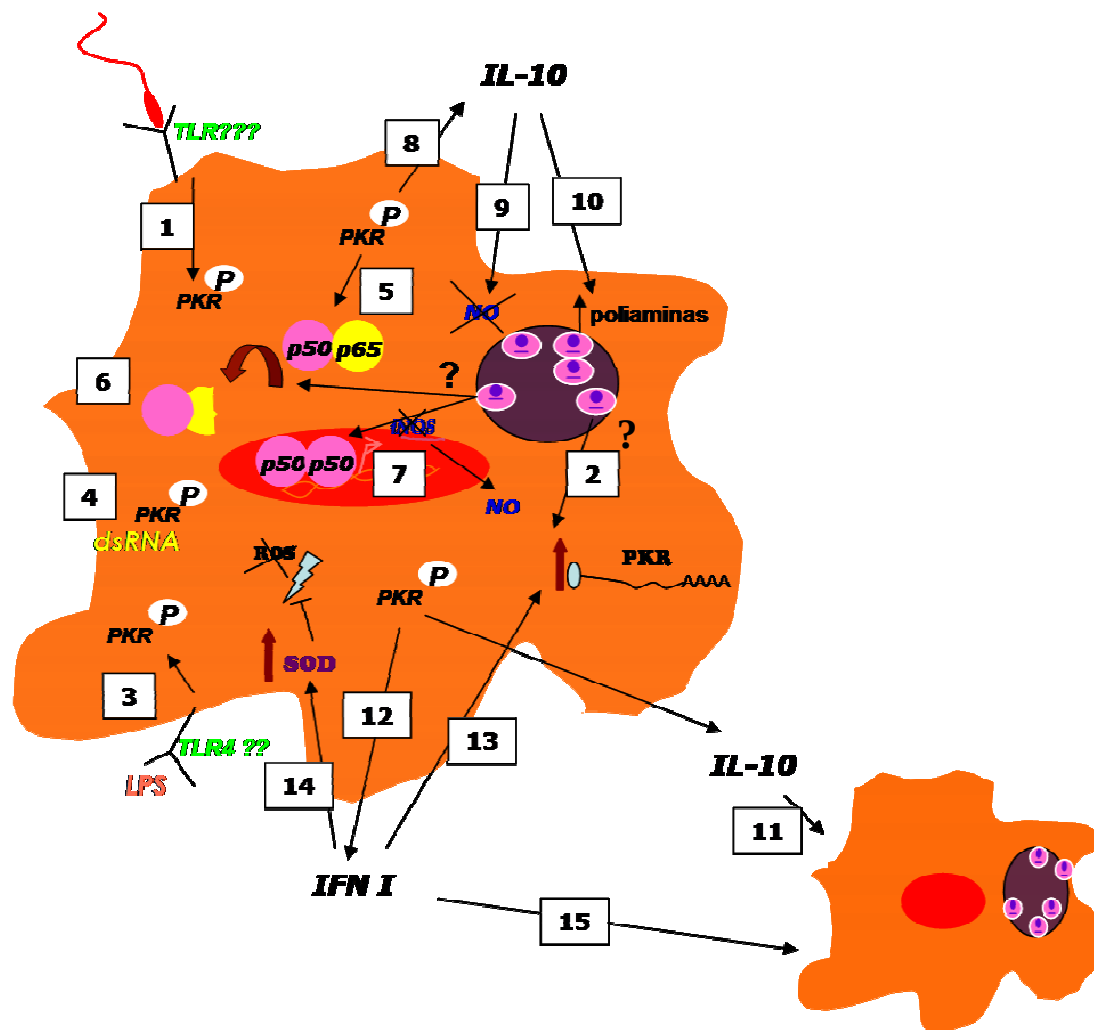


Figura 26- Esquema final proposto, compilando dados obtidos em estudos *in vitro* e *in vivo*, para o papel de PKR na infecção por *L. amazonensis*

O esquema apresenta parâmetros abordados em nosso trabalho e pressupõe algumas interações coerentes na literatura, mas não provadas especificamente em nosso modelo.

Como mencionamos anteriormente, a infecção de macrófagos por *L. amazonensis* determina a fosforilação e aumento dos níveis de PKR. Estímulos pró-inflamatórios presentes no sítio da infecção, como IL-1 e TNF- α , podem induzir maior fosforilação desta quinase (1).

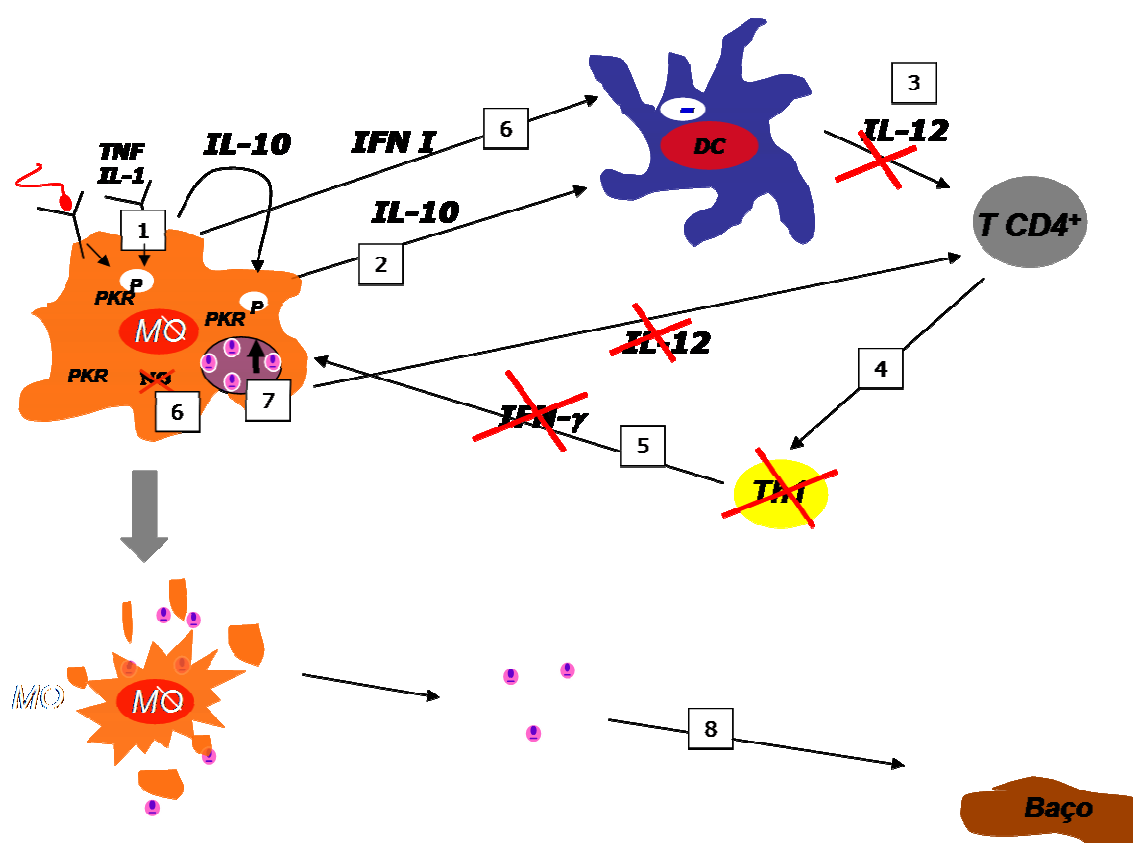
PKR ativado irá induzir a produção de IL-10 (2). IL-10 é uma citocina supressora que gera sinais inibitórios nas células dendríticas (DC) inibindo a produção de IL-12 (3). Como consequência, é inibida a diferenciação de um perfil Th1 (4) que determinaria a produção de altos níveis de IFN γ (5), citocina responsável pela ativação dos macrófagos para a produção de NO (6), que leva à morte intracelular do parasito.

IFN do tipo I também produzido pelos macrófagos de forma dependente de PKR ainda apresenta papel conflitante na literatura, mas pode reforçar a supressão de IL-12 em DC (6), favorecendo a inibição do perfil Th1.

Observamos essa redução da produção de IFN- γ apenas em etapas iniciais da infecção, mas este efeito pode favorecer uma maior replicação inicial do parasito (7) e determinar o seu espalhamento para outras regiões, como o baço (8), agravando o curso da doença.

É importante ressaltar que muitos outros elementos, como tipos celulares e mediadores, que não foram testados, podem ainda estar regulando a infecção por *Leishmania* de forma dependente de PKR.

Figura 26



CONCLUSÕES

- Ativação de PKR por poly(I:C) ou LPS favorece replicação intracelular de *L. amazonensis* e *L. chagasi* em macrófagos, mas sua indução por poly(I:C) desfavorece a replicação de *L. major*, o que sugere ser espécie-específico o papel desta cinase na infecção por estes parasitos;
- Ativação de PKR por poly(I:C) induz a secreção de IL-10 e produção de mRNA para IFN-I em macrófagos infectados por *L. amazonensis*. A produção de IL-10 é requerida para o aumento da proliferação intracelular deste parasito induzida por esta cinase;
- *L. amazonensis* induz aumento dos níveis de PKR em macrófagos e induz a ativação desta cinase em tempos curtos de infecção;
- *L. amazonensis* modifica dímero de NF- κ B ativado por PKR, levando à inibição da produção de NO induzida por poly(I:C);
- Infecção por *L. amazonensis* e visceralização para o baço são reduzidas em animais PKR-KO e a proliferação intracelular deste parasito é deficiente em macrófagos oriundos destes animais e células Raw expressando o DN-PKR;
- Animais PKR-KO infectados por *L. amazonensis* apresentam maior número de linfócitos no linfonodo drenate e uma maior produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e T CD8⁺, o que reforça o papel supressor desta cinase na infecção por este parasito.

BIBLIOGRAFIA

- Abu-Dayyeh I, Shio MT, Sato S, Akira S, Cousineau B, Olivier M. *Leishmania*-Induced IRAK-1 Inactivation Is Mediated by SHP-1 Interacting with an Evolutionarily Conserved KTIM Motif. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008, 2(12):e305.
- Afonso LC., Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun*. 1993, 61: 2952–9.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006, 124(4):783-801.
- Alexander J, Carter KC, Al-Fasi N, Satoskar A, Brombacher F. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol*. 2000, 30(10): 2935-43.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *J. Clin Microbiol Rev*. 1997, 10(2):298-319.
- Artis D, Johnson LM, Joyce K, Saris C, Villarino A, Hunter CA, Scott P. Cutting edge: early IL-4 production governs the requirement for IL-27-WSX-1 signaling in the development of protective Th1 cytokine responses following *Leishmania major* infection. *J Immunol*. 2004, 172(8):4672-5.
- Artis D, Speirs K, Joyce K, Goldschmidt M, Caamaño J, Hunter CA, Scott P. NF-kappa B1 is required for optimal CD4+ Th1 cell development and resistance to *Leishmania major*. *J Immunol*. 2003,170(4):1995-2003
- Barreto-de-Souza V, Pacheco GJ, Silva AR, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Saraiva EM, Bou-Habib DC. Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *J Infect Dis*. 2006, 194(6):846-54.
- Baldwin AS JR. The NF-kappa B and IkappaB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996, 14: 649-83.
- Bartholomè EJ, Willems F, Crusiaux, A, Thielemans K., Schandene L, Goldman M. IFN- β interferes with the differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells: selective inhibition of CD40-dependent interleukin-12 secretion. *J. Interferon Cytokine Res*. 1999, 19: 471–8.
- Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A. *Leishmania*

lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol.* 2003, 130(2):65-74.

- Ben-Othman R, Guizani-Tabbane L, Dellagi K. *Leishmania* initially activates but subsequently down-regulates intracellular mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB signaling in macrophages. *Mol Immunol.* 2008, 45(11):3222-9.
- Blackwell JM. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology.* 1996, 112 Suppl:S67-74.
- Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example *Cell Microbiol.* 2008, 10(6):1221-34.
- Bogdan C, Rölinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today.* 1999, 15(1):22-8.
- Bogdan C, Rölinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev.* 2000, 173:17-26.
- Bogdan C, Mattner J, Schleicher U. The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol Rev.* 2004, 202:33-48.
- Bonnet MC, Weil R, Dam E, Hovanessian AG, Meurs EF. PKR stimulates NF-kappaB irrespective of its kinase function by interacting with the IkappaB kinase complex. *Mol Cell Biol.* 2000, 20(13):4532-42.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72: 248-54
- Butcher BA, Kim L, Johnson PF, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J Immunol.* 2001, 167(4):2193-201.
- Buxbaum LU, Scott P. Interleukin 10- and Fc γ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infect. Immun.* 2005, 73: 2101–08.
- Buxbaum LU, Uzonna JE, Goldschmidt MH, Scott P. Control of New World cutaneous leishmaniasis is IL-12 independent but STAT4 dependent. *Eur J Immunol.* 2002, 32(11):3206-15.
- Caamaño J, Hunter CA. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15(3):414-29.

- Cabanski M, Steinmüller M, Marsh LM, Surdziel E, Seeger W, Lohmeyer J. PKR regulates TLR2/TLR4-dependent signaling in murine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008, 38(1):26-31
- Calegari-Silva TC, Pereira RMS, de Melo LDB, Saraiva EM, Soares DC, Bellio M, Lopes UG. NF- κ B-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. Submetido.
- Calegari-Silva TC. Interação *Leishmania*–macrófago: regulação da atividade de NF- κ B e sua consequência na modulação da expressão gênica. Dissertação de Mestrado. IBCCF/UFRJ, 2007.
- Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH, Mottram JC, Alexander J, Plevin R. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol*. 2004, 173(5):3297-304.
- Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks DL. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med*. 1996, 183(2):515-26.
- Chakrabarti A, Sadler AJ, Kar N, Young HA, Silverman RH, Williams BR. Protein kinase R-dependent regulation of interleukin-10 in response to double-stranded RNA. *J Biol Chem*. 2008, 283(37): 25132-9.
- Chatelain R, Mauze S, Coffman RL. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. *Parasite Immunol*. 1999, 21: 211–8.
- Cheshire JL, Williams BR, Baldwin AS Jr. Involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in the synergistic activation of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon in preneuronal cells. *J Biol Chem*. 1999, 274(8): 4801-6.
- Cheung BK, Lee DC, Li JC, Lau YL, Lau AS. A role for double-stranded RNA-activated protein kinase PKR in *Mycobacterium*-induced cytokine expression. *J Immunol*. 2005, 175(11):7218-25.
- Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu Y, Williams B, Perrault J, Karin M. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity*. 1999, 11(6):721-31.
- Colmenares M, Kima PE, Samoff E, Soong L, McMahon-Pratt D. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect. Immun*. 2003, 71: 3172–82.

- Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science*. 1997, 277(5332):1630-5
- De Almeida MC, Cardoso SA, Barral-Netto M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *Int J Parasitol*. 2003, 33(2):153-62.
- De Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003, 98(7): 861-70
- De Freitas Balanco JM, Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G, Pirmez C, Barcinski MA. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol*. 2001, 11(23):1870-3.
- De Souza V, Souza J, Silva TMC, Veras PST, Rodrigues-de-Freitas LA. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect*. 2000, 2: 1807–15.
- De Souza Leão S, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J. Cell Sci*. 1995, 108: 3219–31.
- Demarchi F, d'Adda di Fagagna F, Falaschi A, Giacca M. Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1996, 70 (7): 4427-37.
- Demarchi F, Gutierrez MI, Giacca M. Human immunodeficiency virus type 1 tat protein activates transcription factor NF-kappaB through the cellular interferon-inducible, double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Virol*. 1999, 73(8):7080-6.
- Der SD, Lau AS. Involvement of the double-stranded-RNA-dependent kinase PKR in interferon expression and interferon-mediated antiviral activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, 92(19):8841-5
- Descoteaux A, Matlashewski G. c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Mol Cell Biol*. 1989, 9(11):5223-7.
- Dever, TE; Arvin, CD; Sicheri, F. The eIF2 α kinases. In: Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB. , editors. *Translational Control in Biology and Medicine*. United States: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2007. pp. 319–344.
- De Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L. *MyD88* is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol*. 2003, 33:2822–2831
- Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, Röllinghoff M, Gresser I, Bogdan C. Type 1 interferon (IFN α /beta) and type 2

nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity*. 1998, 8(1):77-87.

- Domingo-Gil E, Pérez-Jiménez E, Ventoso I, Nájera JL, Esteban M. Expression of the E3L gene of vaccinia virus in transgenic mice decreases host resistance to vaccinia virus and *Leishmania major* infections. *J Virol*. 2008, 82(1): 254-67.
- Domínguez M, Moreno I, Aizpurua C, Toraño A. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes Infect*. 2003, 5(6):507-13.
- Flandin JF, Chano F and Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur. J. Immunol*. 2006, 36:411–20.
- García MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas, Esteban M. Impact of Protein Kinase PKR in Cell Biology: from Antiviral to Antiproliferative Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(4): 1032–60.
- García MA, Meurs EF, Esteban M. The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control, 2007, *Biochimie* 89: 799-811.
- Gil J, Rullas J, García MA, Alcamí J, Esteban M. The catalytic activity of dsRNA-dependent protein kinase, PKR, is required for NF-kappaB activation. *Oncogene*. 2001, 20(3):385-94.
- Ghosh S, Bhattacharyya S, Sirkar M, Sa GS, Das T, Majumdar D, Roy S, Majumdar S. *Leishmania donovani* suppresses activated protein 1 and NF-kappaB activation in host macrophages via ceramide generation: involvement of extracellular signal-regulated kinase. *Infect Immun*. 2002, 70(12): 6828-38.
- Gradoni L, Scalone A, Gramiccia M, Troiani M. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in HIV-1-infected individuals in Italy. *AIDS*. 1996, 10(7): 785-91.
- Gramiccia M., Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005, 35:1169-80.
- Gray PM, Reiner SL, Smith DF, Kaye PM, Scott P. Antigen-experienced T cells limit the priming of naive T cells during infection with *Leishmania major*. *J Immunol*. 2006, 177(2): 925-33.
- Gregory DJ, Olivier M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology*. 2005, 130 Suppl:S27-35.
- Gregory DJ, Godbout M, Contreras I, Forget G, Olivier M. A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression. *Eur J Immunol*. 2008, 38(4):1071-81.

- Guizani-Tabbane L, Ben-Aissa K, Belghith M, Sassi A, Dellagi K. *Leishmania major* amastigotes induce p50/c-Rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. *Infect Immun*. 2004, 72(5):2582-9.
- Handman E, Bullen DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol*. 2002, 18(8):332-4.
- Hawn TR, Ozinsky A, Underhill DM, Buckner FS, Akira S, Aderem A. *Leishmania major* activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway. *Microbes Infect*. 2002, 4(8):763-71.
- Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*. 2006, 25(3):349-60
- Horng, T, Barton GM, and Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol*. 2001, 2:835–41
- Hsu LC, Park JM, Zhang K, Luo JL, Maeda S, Kaufman RJ, Eckmann L, Guiney DG & Karin M. The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature*. 2004, 428: 341-5.
- Hussien Y, Sanna A, Soderstrom M, Link H, Huang YM Glatiramer acetate and IFN-beta act on dendritic cells in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol*. 2001, 121: 102–10.
- Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Corraliza I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med*. 2001, 193(6):777-84.
- Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, Alonso C, Corraliza I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol*. 2002, 24(3):113-8.
- Iniesta V, Carcelén J, Molano I, Peixoto PM, Redondo E, Parra P, Mangas M, Monroy I, Campo ML, Nieto CG, Corraliza I. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infect Immun*. 2005, 73(9): 6085-90.
- Jeang KT, Chun R, Lin NH, Gatignol A, Glabe CG, Fan H. In vitro and in vivo binding of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and Sp1 transcription factor. *J Virol*. 1993, 67(10): 6224-33.
- Ji J, Sun J, Qi H, Soong L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2002, 66: 338–45.
- Jiang, Z., Zamanian-Daryoush M, Nie H, Silva AM, Williams BR and Li X. Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent

pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J. Biol. Chem.* 2003, 278:16713–9.

- Jones DE, Ackermann MR, Wille U, Hunter CA, Scott P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect. Immun.* 2002, 70: 2151–8.
- Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 2000, 165(1):364-72.
- Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol.* 2001, 166(2):1141-7.
- Karin M. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999, 18: 6867-74.
- Karp CL, el-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, Hashim FA, Hag-Ali M, Neva FA, Nutman TB, Sacks DL. *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Invest.* 1993, 91(4):1644-8.
- Karp CL, Neva FA. Tropical infectious diseases in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis.* 1999, 28(5):947-63.
- Katze MG. Regulation of the interferon-induced PKR: can viruses cope? *Trends Microbiol.* 1995, 3(2):75-8.
- Kaye PM, Rogers NJ, Curry AJ, Scott JC. Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *Eur J Immunol.* 1994, 24(11): 2850-4.
- Khouri R, Bafica A, Silva Mda P, Noronha A, Kolb JP, Wietzerbin J, Barral A, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* 2009, 182(4):2525-31.
- Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Müller I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun.* 2004, 72(4):1920-8.
- Kuhen KL, Shen X, Carlisle ER, Richardson AL, Weier HU, Tanaka H, Samuel CE, *Genomics* 1996, 36: 197–201.
- _____ and Samuel CE, *Virology*, 1997, 227: 119–130
- Kulkarni A, Ravi DS, Singh K, Rampalli S, Parekh V, Mitra D, Chattopadhyay S. HIV-1 Tat modulates T-bet expression and induces Th1 type of immune response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 329(2):706-12.

- Kumar A, Haque J, Lacoste J, Hiscott J, Williams BR. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994, 91(14):6288-92.
- Kumar A, Yang YL, Flati V, Der S, Kadereit S, Deb A, Haque J, Reis L, Weissmann C, Williams BR. Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF-kappaB. *EMBO J*. 1997, 16(2):406-16.
- Lad SP, Li J, da Silva CJ, Pan Q, Gadwal S, Ulevitch RJ, Li E. Cleavage of p65/RelA of the NF-κB pathway by *Chlamydia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104: 2933–8.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994, (3):435-43.
- Lang R, Rutschman RL, Greaves DR, Murray PJ. Autocrine deactivation of macrophages in transgenic mice constitutively overexpressing IL-10 under control of the human CD68 promoter. *J. Immunol*. 2002, 168: 3402–11.
- Lemos de Souza V., Ascensão JS, Silva TMC, Veras, PST, Rodrigues-de-Freitas, LA. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect.*, 2000, 2: 1807–15
- Li Y, Ishii K, Hiseida H, Hamano S, Zhang M, Nakanishi M, Yoshimoto T, Hemmi H, Takeda K, Akira S, Iwakura Y, Himeno K. IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in *Leishmania* major-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther*. 2004, 11:941–48.
- Li JC, Lee DC, Cheung BK, Lau AS. Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response. *FEBS Lett*. 2005, 579(14): 3055-62.
- Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 1993, 32:161-259.
- Macián F, Rao A. Reciprocal modulatory interaction between human immunodeficiency virus type 1 Tat and transcription factor NFAT1. *Mol Cell Biol*. 1999, 19(5): 3645-53.
- Maggi LB Jr, Heitmeier MR, Scheuner D, Kaufman RJ, Buller RM, Corbett JA. Potential role of PKR in double-stranded RNA-induced macrophage activation. *EMBO J*. 2000, 19(14): 3630-8.
- Maran A, Maitra RK, Kumar A, Dong B, Xiao W, Li G, Williams BR, Torrence PF, Silverman RH. Blockage of NF-kappa B signaling by selective ablation of an mRNA target by 2-5A antisense chimeras. *Science*. 1994, 265(5173):789-92

- Marcus PI, Sekellick MJ. Interferon induction by viruses. XVI. 2-Aminopurine blocks selectively and reversibly an early stage in interferon induction. *J. Gen. Virol.* 1988, 69: 1637-45.
- Marecki JC, Cota-Gomez A, Vaitaitis GM, Honda JR, Porntadavity S, St Clair DK, Flores SC. HIV-1 Tat regulates the SOD2 basal promoter by altering Sp1/Sp3 binding activity. *Free Radic Biol Med.* 2004, 37(6): 869-80.
- May M J, Gosh S. Signal transduction through NF-kB. *Immunol Today* 1998, 19 (2): 80-88
- Mattner J, Schindler H, Diefenbach A, Röllinghoff M, Gresser I, Bogdan C. Regulation of type 2 nitric oxide synthase by type 1 interferons in macrophages infected with *Leishmania major*. *Eur J Immunol.* 2000, 30(8):2257-67.
- Mattner J, Wandersee-Steinhäuser A, Pahl A, Röllinghoff M, Majeau GR, Hochman PS, Bogdan C. Protection against progressive leishmaniasis by IFN-beta. *J Immunol.* 2004, 172(12): 7574-82.
- Matte C, Maion G, Mourad W, Olivier M. *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite Immunol.* 2001, 23(4):177-84.
- McAllister CS, Samuel CE. The RNA-activated Protein Kinase Enhances the Induction of Interferon- β and Apoptosis Mediated by Cytoplasmic RNA Sensors. *J Biol Chem.* 2009 284(3):1644-51
- McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol Rev.* 2004, 201: 206-24.
- McMillan NA, Chun RF, Siderovski DP, Galabru J, Toone WM, Samuel CE, Mak TW, Hovanessian AG, Jeang KT, Williams BR. HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. *Virology.* 1995, 213(2):413-24.
- McRae BL, Nagai T, Semnani RT, Van Seventer JM, Van Seventer GA. Interferon-alpha and -beta inhibit the in vitro differentiation of immunocompetent human dendritic cells from CD14(1) precursors. *Blood* 2000: 96, 210–17.
- Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol.* 1999,11(2):226-32.
- Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, Hovanessian AG. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell.* 1990, 62(2):379-90.

- Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J. Exp. Med.* 2005, 201: 747–54.
- Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by Th1 and Th2 cytokines. *Eur J Immunol.* 1995, 25(4):1101-4.
- Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol.* 2001, 31(10): 2848-56.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005, 366(9496): 1561-77.
- Murray HW, Moreira AL, Lu CM, DeVecchio JL, Matsushashi M, Ma X, Heinzl FP. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 2003, 188: 458–64.
- Nandan D, Reiner NE. Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infect Immun.* 1995, 63(11): 4495-500.
- Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia Humana. 11^o edição. Editora Atheneu, 2005. Brasil
- Ogg MM, Carrion R, Botelho Jr. AC, Mayrink W, Correa-Oliveira R, and Patterson JL. Short report: quantification of leishmanivirus RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003, 69:309–13
- Pereira RMS, Calegari-Silva TC, Hernandez MO, Redner P, Pessolani MCV, Sarno EN, Sampaio E & Lopes UG. *Mycobacterium leprae* induces NF-κB-dependent transcription repression in human Schwann cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, 335: 20–6
- Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H, Cheng G. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res.* 2005, 15(6):407-22.
- Perkins ND. Achieving transcriptional specificity with NF-κB. *Int J Cell Biol* 1997, 29 (12): 1433-48
- Piccirillo CA and Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4₊CD25₊ regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2004, 25: 374–80

- Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*. 1997, 115 (Pt 4):359-69
- Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*. 1995, 25(3):745-50.
- Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei WQ, Ferguson MA, Brimacombe JS, Liew FY. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996, 93(20):10984-9.
- Proud CG. PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem Sci*. 1995, 20(6):241-6.
- Qi H, Popov V, Soong L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions *in vitro* and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells *in vivo*. *J. Immunol*. 2001, 167: 4534-42.
- Ramsdell, F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 2003, 19: 165-68
- Rey L Parasitologia. 3o edição. Editora Guanabara Kogan, 2001. Brasil.
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966, 34(3): 255-73.
- Sakaguchi S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. *Nat. Immunol*. 2003, 4: 10-11
- Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*. 2001 14(4):778-809.
- Satoskar A, Brombacher F, Dai WJ, McInnes I, Liew FY, Alexander J, Walker W. SCID mice reconstituted with IL-4-deficient lymphocytes, but not immunocompetent lymphocytes, are resistant to cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*. 1997, 159(10):5005-13.
- Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol*. 1995, 154(10):5320-30.
- Scott P, Pearce E, Natovitz P, Sher A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract. *J Immunol*. 1987, 139(9):3118-25
- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986, 46:705-71

- Shimidt GD, Roberts LS. Foundations of Parasitology. Ed The Mc Graw-Hill Companies, 2000. USA
- Silveira F. T., Lainson R., and Cobertt C.E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005, 99(3):239-251
- Singh VK, Balaraman S, Tewary P, Madhubala R. Leishmania donovani activates nuclear transcription factor-kappaB in macrophages through reactive oxygen intermediates. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 322(3):1086-95.
- Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med.* 1993, 177(6):1797-802.
- Unterholzner L, Bowie AG. The interplay between viruses and innate immune signaling: recent insights and therapeutic opportunities. *Biochem Pharmacol.* 2008, 75(3):589-602.
- Vouldoukis I, Bécherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debré P, Mazier D, Mossalayi MD. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur J Immunol.* 1997, 27(4):860-5.
- Wanasen N, Xin L, Soong L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int. J. Parasitol.* 2008, 38: 417–29.
- Ward SV, Samuel CE. Regulation of the interferon-inducible PKR kinase gene: the KCS element is a constitutive promoter element that functions in concert with the interferon-stimulated response element. *Virology.* 2002, 296(1):136-46
- WHO (Organização Mundial de Saúde) 2003. www.who.int. Genebra, Suíça
- Williams BR. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene.* 1999, 18(45):6112-20.
- Williams BR. Signal integration via PKR. *Sci STKE.*, 2001(89):RE2.
- Wolday D, Akuffo H, Fessahaye G, Valantine A, Britton S. Live and killed human immunodeficiency virus type-1 increases the intracellular growth of *Leishmania donovani* in monocyte-derived cells. *Scand J Infect Dis*, 1998, 30:29-34.
- Wolday D, Berhe N, Britton S, Akuffo H. HIV-1 alters T helper cytokines, interleukin-12 and interleukin-18 responses to the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *AIDS.* 2000, 14(8):921-9.

- Yang YL, Reis LF, Pavlovic J, Aguzzi A, Schäfer R, Kumar A, Williams BR, Aguet M, Weissmann C. Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 1995, 14(24):6095-106.
- Zamanian-Daryoush M, Mogensen TH, DiDonato JA, Williams BR. NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Mol Cell Biol.* 2000, 20(4):1278-90.
- Zaph C, Scott P. Th1 cell-mediated resistance to cutaneous infection with *Leishmania major* is independent of P- and E-selectins. *J Immunol.* 2003, 171(9):4726-32.
- Zhao C, Papadopoulou B, Tremblay MJ. *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clin Immunol.* 2004, 113(1):81-8.
- Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell.* 2002, 9(3):625-36.
- Zhou H, Monack DM, Kayagaki N, Wertz I, Yin J, Wolf B, Dixit VM. *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-κB activation. *J. Exp. Med.* 2005, 202: 1327–32.
- Zinn K, Keller A, Whittemore LA, Maniatis T. 2-Aminopurine selectively inhibits the induction of β-interferon, c-fos, and c-myc gene expression. *Science*, 1988, 240: 210-13.

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](#)