



UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS E SAÚDE  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

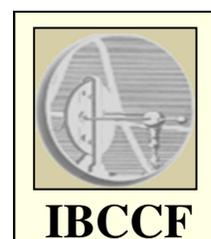
**CARLA DA SILVA PINHEIRO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL IMUNOMODULADOR  
DO RECEPTOR DE PEROXISSOMO ATIVADO -  
 $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) NO MODELO DE INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL COM *Leishmania major***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO, VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS BIOIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

RIO DE JANEIRO

AGOSTO/2007



# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**AVALIAÇÃO DO PAPEL IMUNOMODULADOR DO PPAR- $\gamma$  NO MODELO DE INFEÇÃO EXPERIMENTAL COM *Leishmania major*.**

Carla da Silva Pinheiro

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientação: Célio Geraldo Freire de Lima

Rio de Janeiro

Agosto/2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

Pinheiro, Carla da Silva.

Avaliação do papel imunomodulador do PPAR- $\gamma$  no modelo de infecção experimental com *Leishmania major* / Carla da Silva Pinheiro. Rio de Janeiro: UFRJ/ IBCCF, 2007.

xiii, 82f.:il.; 31cm.

Orientador: Célio Geraldo Freire de Lima.

Tese: Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica) UFRJ/ IBCCF, 2007.

Referências Bibliográficas: f. 69-82

1 - *Leishmania major*

2 - PPAR- $\gamma$

3 - Macrófago

I. Freire de Lima, C.G; Pinheiro, C.S. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Título.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jorge (*in memoriam*) e Eliane

A minha irmã Aline

Aos infinitos amigos

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que com sua infinita generosidade e misericórdia, me concede uma vida plena e feliz.

Ao meu pai, meu eterno exemplo de honestidade e valores humanos; a minha mãe, pela sua coragem e força e, minha irmã pelo incentivo (um pouco estressado, às vezes) para a realização desta dissertação.

Ao professor Dr. Célio Geraldo Freire de Lima pela dedicação e apoio. Obrigada pela orientação e por acreditar em mim de maneira incondicional.

A Dra. Marise P. Nunes e Dra. Roberta O. Pinheiro pelo apoio incondicional, amizade e contribuição científica. Minha gratidão será eterna. Amo vocês !!!

Ao professor Dr. George dos Reis por me receber em seu laboratório.

À professora Dra. Lúcia Mendonça Previato, pela revisão, ensinamentos e sugestões propostas.

A professora Dra. Cristina Takyia pelo carinho, atenção e auxílio científico.

A professora Dra. Suzana Côrte-Real pela atenção e realização da microscopia eletrônica.

Ao meu eterno professor Alcides, pelos ensinamentos de Química, amizade e por ser sempre meu referencial de caráter, dignidade e profissionalismo.

A Jorgete e ao “Lindinho” pelo carinho e auxílio técnico.

A Aline pela sinceridade e carinho diário.

Ao Bruno Ávila pela paciência e auxílio com as fotos.

A Sandrinha pela atenção e incontestável competência.

A minha eterna amiga Carlinha, por me acompanhar desde a infância e participar desta conquista.

Aos amigos integrantes do “Quarteto Fantástico”: Luciene, pela amizade eterna e inúmeras orações; Adriana, pela dedicação e por todos os calmantes que ingeriu por mim; Humberto, pelo

otimismo inabalável, amizade e por todos os exercícios físicos praticados em meu nome. Amo vocês.

A minha “filhota” Marina, que com muita dedicação e amor tem tornado a minha vida mais feliz e por ser o meu referencial de generosidade, profissionalismo e caráter. Muito obrigada pela sua amizade única.

A minha outra amiga “perigosa” Flávia, pelo amor, paciência, dedicação inigualável e aventuras diárias.

A Suellen pela amizade, que creio será eterna, por todos os experimentos frustrados (em especial *Western Blotting*) e por me contagiar diariamente com sua alegria e fé.

A Taty, pela amizade e por me ensinar a ver a vida de maneira mais simples e feliz.

A minha nova amiga “Waninha” pelo carinho e atenção incondicional, além dos momentos de diversão.

A Aninha e Landi pela preocupação e carinho diário.

Ao Fabrício pelas intermináveis conversas de fim de tarde e pela sua amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Imunitária pela paciência e convívio.

A todos os colegas do laboratório de Glicobiologia.

Aos meus eternos amigos do LASSBio pela amizade e ensinamentos que me acompanharão pela vida.

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente, para a minha felicidade e realização desta dissertação.

## SUMÁRIO

	PÁGINAS
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	24
3.2 PARASITAS	24
3.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS	25
3.4 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE MACRÓFAGOS MURINOS POR <i>Leishmania major</i>	25
3.5 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA <i>IN VITRO</i>	26
3.6 DOSAGEM DE CITOCINAS E MEDIADORES LIPÍDICOS	26
3.7 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	27
3.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR-LIBERAÇÃO DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH)	27

<b>3.9 DETECÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS <i>IN SITU</i> – TUNEL</b>	<b>28</b>
<b>3.10 <i>WESTERN BLOTTING</i></b>	<b>29</b>
<b>3.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA</b>	<b>30</b>
<b>3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>30</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>63</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo infeccioso das leishmanioses.	<b>02</b>
<b>Figura 2:</b> Utilização diferencial da L-arginina por macrófagos ativados.	<b>07</b>
<b>Figura 3:</b> Prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) estimula a produção de citocinas do tipo Th2 e anticorpos.	<b>15</b>
<b>Figura 4:</b> A infecção com <i>L. major</i> exacerba a expressão do PPAR- $\gamma$ .	<b>33</b>
<b>Figura 5:</b> Os ligantes de PPAR- $\gamma$ promovem alterações na carga parasitária.	<b>34</b>
<b>Figura 6:</b> Os ligantes de PPAR- $\gamma$ promovem alterações na carga parasitária intracelular.	<b>35</b>
<b>Figura 7:</b> Os ligantes de PPAR- $\gamma$ não comprometem a viabilidade celular.	<b>37</b>
<b>Figura 8:</b> Os ligantes de PPAR- $\gamma$ modulam a expressão de iNOS e produção de nitrito.	<b>39</b>
<b>Figura 9:</b> Atividade da ciglitazona e GW 9662 sobre a produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos infectados por <i>L. major</i> .	<b>41</b>
<b>Figura 10:</b> Os ligantes de PPAR- $\gamma$ modulam o perfil de citocinas anti-inflamatórias.	<b>43</b>
<b>Figura 11:</b> Os ligantes de PPAR- $\gamma$ modulam o perfil de citocinas anti-inflamatórias	<b>45</b>
<b>Figura 12:</b> Efeito da ciglitazona e GW 9662 sobre a expressão de enzimas associadas à produção de mediadores lipídicos.	<b>47</b>
<b>Figura 13:</b> Atividade moduladora do PPAR- $\gamma$ sobre a produção de PGE <sub>2</sub> .	<b>48</b>
<b>Figura 14:</b> Efeito da ciglitazona e GW 9662 sobre a expressão da arginase.	<b>50</b>

<b>Figura 15:</b> A ciglitazona induz aumento no percentual de células apoptóticas.	<b>52</b>
<b>Figura 16:</b> A ciglitazona promove alteração na morfologia celular.	<b>55</b>
<b>Figura 17:</b> O GW 9662 promove modificações no parasita.	<b>56</b>
<b>Figura 18:</b> Modelo esquemático I – Efeito do GW 9662 no modelo de infecção experimental por <i>L. major in vitro</i> .	<b>67</b>
<b>Figura 19:</b> Modelo esquemático II – Atividade da ciglitazona no modelo de infecção experimental por <i>L. major in vitro</i> .	<b>68</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais citocinas associadas à resposta imune na infecção com <i>L. major</i> .	<b>11</b>
<b>Tabela 2a:</b> Ligantes endógenos de PPAR.	<b>19</b>
<b>Tabela 2b:</b> Ligantes exógenos de PPAR.	<b>20</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 12-LO**- 12- Lipoxigenase.
- 13-HODE** - Ácido 3-hidroxiocetadecadecadénico.
- 15-d-PGJ<sub>2</sub>** - 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - Prostaglandina J<sub>2</sub>.
- 15-HETE** - Ácido hidroxiicosaetetraenico.
- 15-LO** - 15- Lipoxigenase.
- 5-LO**- 5- Lipoxigenase.
- 9-HODE** - Ácido 9-hidroxiocetadecadecadénico.
- AA** -Ácido araquidônico.
- AF 1**- Função de ativação dependente do ligante 1.
- AF 2**- Função de ativação dependente do ligante 2.
- APC** - Células apresentadoras de antígenos.
- BADGE** - Éter bifenol A diglicidil.
- COX-1** - Ciclooxigenase - 1.
- COX-2** - Ciclooxigenase - 2.
- DBD** - Região de Ligação ao DNA.
- DC** - Células Dendríticas.
- DHA** - Ácido dodecahexanico.
- DMEM** - *Dulbecco's Modification of Eagle Medium*.
- DMSO** - Dimetilsulfóxido.
- DO** - Densidade óptica.
- ELISA** - Ensaio imunoenzimático em fase sólida.
- EPA** - Ácido eicosapentanico.

**FasL** - Ligante de Fas.

**FITC** - Isotiocianato de fluoresceína.

**FLAP** - Proteína ativadora da 5-LO.

**FMS** - Fmazina metassulfato.

**HETE** - Ácido 8S-hidroxi-eicosatetraenóico.

**IFN- $\gamma$**  - Interferon- $\gamma$ .

**IgG** - Imunoglobulina G.

**IL** - Interleucina.

**iNOS** - Óxido nítrico sintase induzida.

**iTregs** - Células T regulatórias induzidas.

**LBD** - Domínio de ligação ao ligante.

**LDH** - Lactato desidrogenase.

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**LTB<sub>4</sub>**. Leucotrieno B<sub>4</sub>

**LTC<sub>4</sub>**. Leucotrieno C<sub>4</sub>

**LTD<sub>4</sub>**. Leucotrieno D<sub>4</sub>

**LTE<sub>4</sub>**. Leucotrieno E<sub>4</sub>

**LTs** - Leucotrienos

**MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade.

**NK** - *Natural Killer*.

**NO** - Óxido nítrico.

**nTregs** - Células T regulatórias naturais.

**ODC** – Ornitina decarboxilase.

**PBS** - Tampão fosfato salina.

**PGD<sub>2</sub>** - Prostaglandina D<sub>2</sub>.

**PGE<sub>2</sub>** - Prostaglandina E<sub>2</sub>.

**PGF<sub>2</sub>** - Prostaglandina F<sub>2</sub>.

**PGH<sub>2</sub>** - Prostaglandina H<sub>2</sub>.

**PGI<sub>2</sub>** - Prostaglandina I<sub>2</sub>.

**PLA<sub>2</sub>** - Fosfolipase A<sub>2</sub>.

**PPARs** - Receptores de proliferação de peroxisomo ativado.

**PPAR- $\alpha$**  - Receptores de proliferação de peroxisomo ativado isoforma  $\alpha$ .

**PPAR- $\beta/\delta$**  - Receptores de proliferação de peroxisomo ativado isoforma  $\beta/\delta$ .

**PPAR- $\gamma$**  - Receptores de proliferação de peroxisomo ativado isoforma  $\gamma$ .

**RXR** - Receptor X retinóide.

**SFB** - Soro Fetal Bovino.

**TCR** - Receptor de célula T.

**TGF- $\beta$**  - Fator de transformação e crescimento.

**Th1** - Célula T auxiliar tipo 1.

**TLR** - Receptores *Toll-like*.

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral –  $\alpha$  .

**TUNEL** - Marcação da porção final dUTP mediada pela TdT.

**TZD** - Tiazolidinodiona.

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO DO PAPEL IMUNOMODULADOR DO PPAR- $\gamma$ NO MODELO DE INFEÇÃO EXPERIMENTAL COM *Leishmania major*.**

Carla da Silva Pinheiro.

Orientação: Célio Geraldo Freire de Lima.

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Receptores de proliferação de peroxissomo ativado (PPAR) são fatores transcricionais que pertencem à superfamília de receptores nucleares. Até o momento, foram identificadas três isoformas de PPAR denominadas de PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  e PPAR- $\gamma$ . PPAR- $\gamma$  é expresso pelas células inflamatórias, incluindo linfócitos e macrófagos, e desempenha um papel nas respostas imunológicas. Em macrófagos, a ativação do PPAR- $\gamma$  inibe a expressão de citocinas inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6. O objetivo deste estudo foi explorar a ação do PPAR- $\gamma$  na infecção com *Leishmania major* utilizando ciglitazona (agonista de PPAR $\gamma$ ) e GW 9662 (antagonista de PPAR- $\gamma$ ). Macrófagos murinos peritoniais de camundongos BALB/c infectados com *L. major* foram tratados com ciglitazona e GW 9662. Resultados mostraram uma diminuição na liberação de formas promastigotas quando as células foram tratadas com o antagonista - GW 9662. Este dado pode ser explicado por alterações nas citocinas produzidas pelos macrófagos. A ativação do PPAR- $\gamma$  com ciglitazona induziu a produção de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub>, enquanto o tratamento com o antagonista de PPAR- $\gamma$  resultou em aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e óxido nítrico. Também foi observado um aumento da expressão de PPAR- $\gamma$  em macrófagos infectados. Os ligantes de PPAR- $\gamma$  parecem atuar diretamente sobre o parasita. Resultados obtidos através da microscopia eletrônica demonstraram que a ciglitazona e o GW 9662 podem induzir alterações morfológicas sobre as formas intracelulares do parasita. Tais resultados sugerem que uma sinalização via PPAR- $\gamma$  poderia modular a infecção por *L. major*.

**Palavras-chave:** *Leishmania major*, macrófagos, PPAR- $\gamma$

Rio de Janeiro

Agosto/2007

## ABSTRACT

### **EVALUATION OF PPAR- $\gamma$ IMMUNOMODULATORY ROLE IN EXPERIMENTAL *Leishmania major* INFECTION.**

Carla da Silva Pinheiro.

Orientação: Célio Geraldo Freire de Lima.

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) are transducer proteins that belong to the nuclear receptor superfamily. To date, three PPAR isoforms called PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  and PPAR- $\gamma$  have been identified and cloned. PPAR- $\gamma$  is expressed by inflammatory cells, including lymphocytes and macrophages, and is reported to play a role in immunological responses. In macrophages, the activation of PPAR- $\gamma$  inhibits the expression of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  and IL-6. The aim of this study was exploring the role of PPAR- $\gamma$  action in *Leishmania major* infection using ciglitazone (PPAR $\gamma$  agonist) and GW 9662 (PPAR $\gamma$  antagonist). Peritoneal murine macrophages from BALB/c mice infected with *L. major* were treated with ciglitazone and GW 9662. Results showed a decrease in promastigotes release when cells were treated with antagonist – GW 9662. This data can be explained by a change in cytokines produced by macrophages. Activation of PPAR- $\gamma$  with ciglitazone induced TGF- $\beta$  and PGE<sub>2</sub> production, while treatment with PPAR- $\gamma$  antagonist resulted in increasing TNF- $\alpha$  and nitric oxide levels. It was also observed a higher PPAR- $\gamma$  expression in infected macrophages. PPAR- $\gamma$  ligands seems to act straight on parasite. Results obtained through electronic microscopy demonstrated that ciglitazone and GW 9662 induced morphological changes in intracellular forms. These results suggest that signaling through PPAR- $\gamma$  can modulate *L. major* infection.

**Key-words:** *Leishmania major*, macrophages, PPAR- $\gamma$ .

Rio de Janeiro.

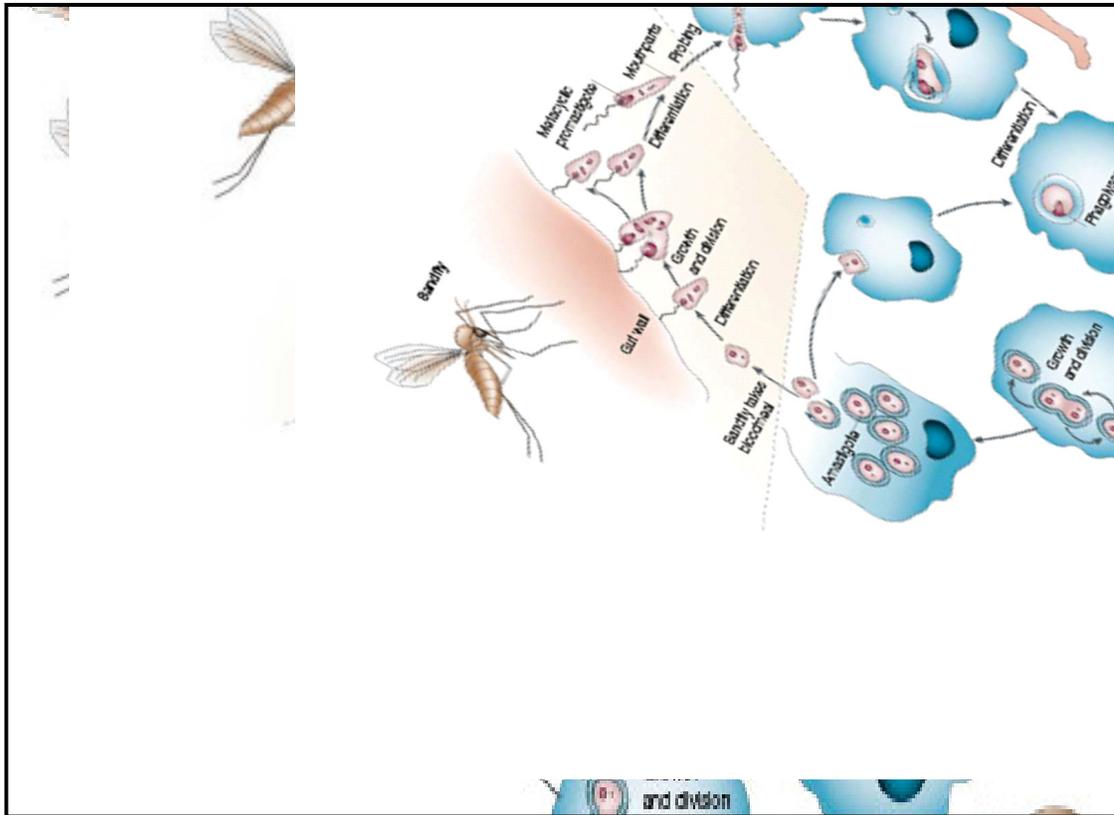
Agosto/2007.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 AS LEISHMANIOSES.

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Distribuídas por 88 países, as leishmanioses acometem 12 milhões de indivíduos, sendo que 350 milhões vivem em áreas de risco. Estimativas revelam de 1,5-2,0 milhões de novos casos por ano muitos dos quais, não são oficialmente notificados às autoridades sanitárias (WHO, 2004; DESJEUX, 2004).

Os parasitas apresentam um ciclo de vida heteroxeno, apresentando uma forma flagelada extracelular (promastigota) no trato digestivo do inseto vetor e outra intracelular (amastigota) dentro de células dos hospedeiros vertebrados. O parasita, transmitido durante o repasto sanguíneo dos vetores dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), é inoculado sob a forma promastigota metacíclica na pele do hospedeiro vertebrado, infectando as células fagocíticas profissionais (monócitos e macrófagos), bem como células dendríticas (DCs) e fibroblastos (RITTIG & BOGDAN, 2000). A principal célula do hospedeiro vertebrado a ser infectada é o macrófago, onde ocorre a multiplicação do parasita no interior do vacúolo parasitóforo sob a forma amastigota e, eventualmente, ruptura da célula e disseminação do parasita para células não infectadas. Ao realizar o repasto sanguíneo, as fêmeas dos flebotomos captam células infectadas e os parasitas, sob a forma amastigota, se transformam em promastigotas metacíclicas reiniciando o ciclo (Fig.1) (SACKS & NORBEN-TRAUTH, 2002).



**Figura 1:** Ciclo de vida da infecção por leishmania. Fonte: Adaptado de SACKS & NORBEN-TRAUTH, 2002.

Quanto às formas clínicas, a leishmaniose pode se apresentar em quatro manifestações distintas: a leishmaniose visceral e as formas tegumentares, mucocutânea, cutânea difusa e cutânea localizada. Além das diferentes espécies de parasitas e de flebotomíneos vetores, a constituição genética e imunocompetência do hospedeiro infectado, contribuem para a diversidade clínica e epidemiológica das leishmnioses (HANDMAN, 2001).

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar é causada por espécies do complexo *L. donovani* no Velho Mundo e a *L. chagasi* no Novo Mundo. O calazar é a forma mais severa da doença, resultando em febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia, apresentando alta taxa de mortalidade resultado da imunossupressão e de infecções secundárias (KEDZIERSKI *et al.*, 2006).

A forma cutânea-localizada é causada, principalmente pelas espécies *L. major*, *L. tropica* no Velho Mundo e espécies do gênero *L. mexicana* (especialmente *L. mexicana*, *L. amazonensis*, e *L. venezuelensis*), resultando em lesões ulcerativas no local da picada do vetor na face, pescoço, braços e pernas. A patologia é usualmente autolimitante. Todavia, o tempo da resolução da lesão varia de acordo com a espécie do vetor e estado imunológico do hospedeiro (KEDZIERSKI, *et al.*, 2006).

A forma mucocutânea, causada por espécies do subgênero *Viannia*, principalmente pela *L. braziliensis*, inicia-se por lesões das cutâneas simples, orofacialmente localizadas, as quais podem evoluir para metástases na região oronasal, causando em alguns casos, destruição tecidual multilante (DA-CRUZ & PIRMEZ, 2005) Quanto à forma cutânea difusa, esta se manifesta através de erupções papulares e não-ulcerativas, as quais se assemelham às da hanseníase - é causada pelas espécies *L. aethiopica* (Velho Mundo) e por espécies do complexo *L. mexicana* (Novo Mundo) (HERWALDT, 1999a).

O controle da doença é realizado através do combate ao inseto vetor e identificação de reservatório canino (em especial na leishmaniose visceral). Após o diagnóstico da leishmaniose, o tratamento da infecção humana é feito por antimoniais pentavalentes. Embora seja uma terapêutica disponível no mercado, os efeitos tóxicos são severos (KISHORE *et al.*, 2006).

## **1.2 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.**

Apesar da grande prevalência mundial, poucos avanços terapêuticos têm sido evidenciados para o tratamento das leishmanioses. No âmbito da prevenção, até o momento, não há vacinas disponíveis para o uso em humanos (COLER & REED, 2005). Diversos estudos vêm

sendo realizados em modelos animais, indicando que uma imunização eficaz pode ser alcançada com o uso de vacinas de DNA e de antígenos por vias de administração diferentes (mucosa, oral, intranasal) (KEDZIERSKI, 2006; HOLMGREN *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, 2004). Em relação à terapêutica, observa-se que os medicamentos disponíveis no mercado apresentam elevada toxicidade e baixa eficácia. Os compostos pentavalentes antimoniais, representados pelo estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de n-metil glucamine (Glucantime®) são os mais empregados na terapêutica (BERMAN, 1988). Todavia, estes compostos apresentam efeitos colaterais severos tais como distúrbios gastrintestinais, alterações eletrocardiográficas, artralgia/mialgias, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e, em alguns casos, podem culminar em neutropenia e pancreatites (FRANKE *et al.*, 1990; FRANKE *et al.*, 1994; GASSER *et al.*, 1994). No caso de pacientes refratários aos antimoniais, a pentamidina e a anfotericina B são utilizados como segunda escolha de tratamento. Entretanto, a via de administração (via parenteral) e a elevada incidência de efeitos tóxicos, também limitam a utilização da pentamidina e a anfotericina B (BERMAN, 1988). Outras formulações de anfotericina B, tais como AmBisome®, Abelcet®, Amphocil™ têm sido desenvolvidas com o objetivo de reduzir a toxicidade deste quimioterápico. Contudo, custo alto deste fármaco inviabiliza o seu uso em larga escala (MEYERHOFF, 1999; ROBINSON & NAHATA, 1999; MURRAY, 2004).

A miltefosina constitui o primeiro medicamento de administração oral disponível para o tratamento da leishmaniose visceral (HERWALDT, 1999b; CROFT *et al.*, 2003). Entretanto, a teratogenicidade, potencial desenvolvimento de resistência e pequena janela terapêutica, constituem limitações para a utilização terapêutica da miltefosina (CROFT *et al.*, 2006).

No caso dos produtos naturais, diversos estudos químicos e imunofarmacológicos vêm sendo realizados com o objetivo de identificar extratos e/ou isolar compostos de plantas de baixa

toxicidade, economicamente acessíveis e de elevada eficácia. Dentre as numerosas plantas com potencial na modulação da resposta imune à infecção por *Leishmania* sp, a *Kalanchoe pinata* tem demonstrado um aumento na produção de óxido nítrico em macrófagos de camundongos susceptíveis (DA-SILVA *et al.*, 1999). Alcalóides provenientes de diversas espécies vegetais como *Cardiopetalum calophyllum*, *Abuta rufescens* e a *Abuta pahni* também têm sido extensivamente estudados quanto ao seu potencial leishmanicida (FOURNET *et al.*, 1992). Todavia, a maioria destes compostos apresenta atividade microbicida restrita aos ensaios *in vitro*, sendo necessário a continuidade de ensaios *in vivo* para viabilizar a utilização em humanos.

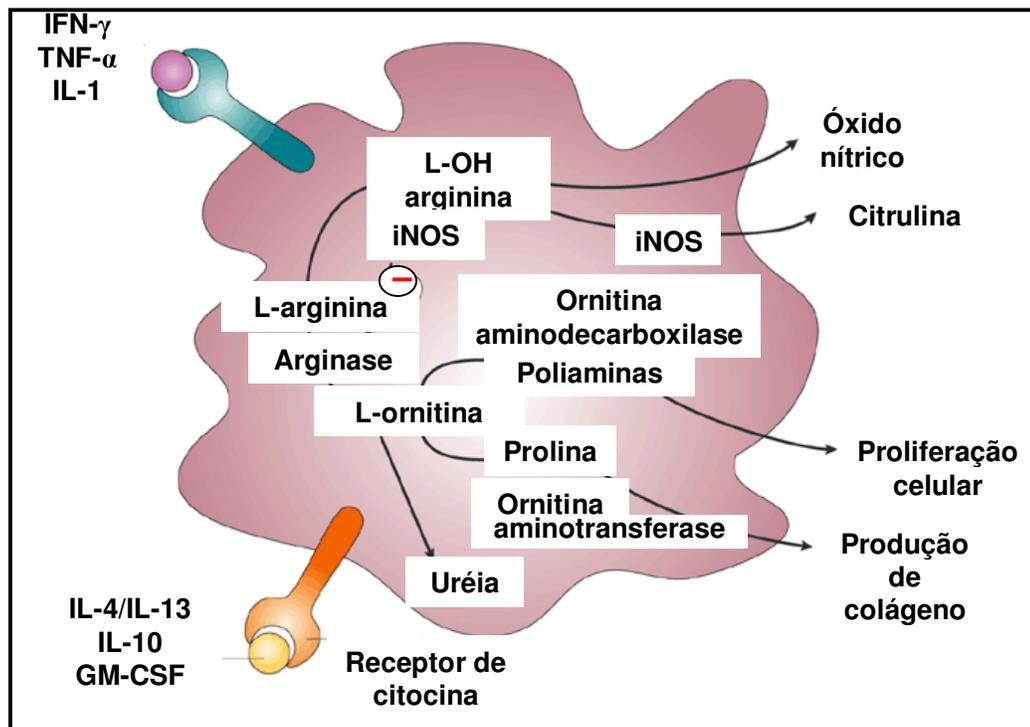
Considerando-se a baixa eficácia e elevada toxicidade dos medicamentos disponíveis no mercado, diversos programas em multicentros de pesquisa vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de disponibilizar fármacos menos tóxicos, mais eficazes e de fácil administração para o tratamento das leishmanioses.

### **1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO CAUSADA POR *Leishmania major*.**

O modelo experimental mais amplamente utilizado em estudos da forma tegumentar da leishmaniose é o modelo murino de infecção com *L. major*. A infecção de camundongos de diferentes linhagens genéticas constitui uma importante ferramenta experimental e, portanto, têm contribuído para a elucidação dos fenômenos imunológicos envolvidos na leishmaniose tegumentar (MITCHELL *et al.*, 1981). Em algumas linhagens, tais como BALB/c (susceptível), observa-se o desenvolvimento de lesões progressivas e disseminação sistêmica da doença (SACKS & NOUBERN-TRAUTH, 2002). Em outras linhagens, ditas como resistentes, incluindo

C57BL/6, desenvolvem-se pequenas ulcerações que se curam espontaneamente (VON STEBUT & UDBEY, 2004). Neste paradigma susceptibilidade/resistência, observa-se que a principal população de células envolvidas na resposta à infecção são as células T CD4<sup>+</sup> (LIEW & O'DONNELL, 1993). Estudos em camundongos BALB/c evidenciaram que células T CD4<sup>+</sup>, mas não células B ou T CD8<sup>+</sup> são indispensáveis na resistência à doença (FOOTE & HANDMAN, 2005). As células TCD4<sup>+</sup> apresentam duas subpopulações: T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2), distintas pelo padrão de citocinas secretadas a partir de um estímulo (MOSMANN & COFFMAN, 1989). A resposta Th1, mediada por células produtoras de IFN- $\gamma$ , promove o perfil de resistência. Entretanto, a susceptibilidade, relacionada com uma resposta do tipo Th2, caracteriza-se principalmente pelos elevados níveis de IL-4, uma citocina que pode antagonizar a atividade de diferenciação Th1, IL-3 e IL-10 (SACKS & NOUBERN-TRAUTH, 2002).

O IFN- $\gamma$  é uma citocina capaz de induzir nas células fagocíticas infectadas (em especial macrófagos), a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Utilizando como substrato a L-arginina, a iNOS atua na produção de óxido nítrico (NO), resultando na morte do parasita intracelular (Fig.2). Além do NO outros intermediários reativos de oxigênio (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, dentre outros) podem ser gerados, levando à eliminação do patógeno (BOGDAN *et al.*, 2000). Contudo, estudos realizados por MODOLELL e colaboradores (1995) estabeleceram que a expressão de arginase (enzima responsável pela síntese de poliaminas e prolina a partir de L-arginina) é induzida em macrófagos sob o estímulo de citocinas do tipo Th2 e que a atividade L-arginase/iNOS está diretamente vinculada ao equilíbrio da resposta Th1/Th2 (MUNDER *et al.*, 1998; MUNDER *et al.*, 1999). Tem sido proposto que as citocinas IL-4 e IL-13 apresentam atividade inibitória *in vitro* sobre a expressão de iNOS em populações de macrófagos (Fig.2); um mecanismo de competição por substrato dependente de STAT 6 (RUTSCHNAN *et al.*, 2001).



**Figura 2:** Utilização diferencial da L-arginina por macrófagos ativados. Fonte: Adaptado de GORDON, 2003.

Além das células T CD4<sup>+</sup>, células natural killer (NK), T CD8<sup>+</sup> e  $\gamma/\delta$  também participam da produção de IFN- $\gamma$  na leishmaniose. As células NK induzem uma imunidade protetora inicial via produção de IFN- $\gamma$  em camundongos C3H/HeN resistentes à infecções por *L. major*, enquanto em camundongos BALB/c esta atividade inicial das células NK é reduzida (GHOSH *et al.*, 2003). A contribuição das células T CD8<sup>+</sup> pode ser demonstrada sob condições específicas. Camundongos BALB/c redesiados com parasitas vivos mostraram um fenótipo protetor associado à produção de IFN- $\gamma$  (MULLER *et al.*, 1993; STEFANI *et al.*, 1994). Uma significativa expansão das células T  $\gamma/\delta$  na fase crônica da infecção e os efeitos adversos da sua depleção na progressão da doença sugerem uma atividade leishmanicida dessa população de células (AWASTHI *et al.*, 2004).

Um amplo espectro de citocinas, além do IFN- $\gamma$ , tais como IL-12, IL-18 e mais recentemente, IL-23 e IL-27 corroboram com o perfil da imunidade de resistência (GUMY *et al.*, 2004). Diversos tipos celulares, dentre os quais células dendríticas (DCs), macrófagos, polimorfonucleares, são responsáveis pela síntese de IL-12 (TRINCHIERI, 1995). Estudos *in vivo* evidenciaram que a administração de IL-12 durante a primeira semana da infecção por *L. major* de camundongos BALB/c resulta no desenvolvimento de uma resposta Th1, associada com o decréscimo da produção de IL-4 *in vitro* e resolução das lesões (HEINZEL *et al.*, 1993; SYPEK *et al.*, 1993). Entretanto, em outros estudos, camundongos selvagens originalmente resistentes (C57BL/6), porém geneticamente modificados e tornando-se deficientes duas subunidades, p35 e p40 da IL-12 desenvolveram lesões progressivas, fato associado ao aumento nos níveis de IL-4 mRNA em seus linfonodos, equivalentes aqueles observados em camundongos BALB/c susceptíveis a leishmaniose (MATTNER *et al.*, 1996). O papel da IL-12 na diferenciação Th1 também têm sido descrito em modelos experimentais deficientes de fatores transcricionais como T-bet ou moléculas co-estimulatórias (CD40-CD40L), as quais estão vinculadas ao desenvolvimento da resposta Th1 (SZABO *et al.*, 2002; CAMPBELL *et al.*, 1996; KAMANAKA *et al.*, 1996; NUNES *et al.*, 2005). Na tabela 1, são apresentadas as principais funções da IL-12 durante a infecção por *L. major*.

Estudos *in vitro* com macrófagos murinos revelaram que o TNF- $\alpha$  apresenta um papel protetor ao atuar sinergicamente com o IFN- $\gamma$  mediando a produção de NO e, portanto, a morte do parasita (LIEW *et al.*, 1990; GREEN *et al.*, 1990). Todavia, nos ensaios *in vivo*, o papel do TNF- $\alpha$  parece não estar completamente elucidado. Camundongos deficientes no receptor de TNF- $\alpha$  (TNFR1<sup>-/-</sup> ou TNFR2<sup>-/-</sup>) exibem uma produção normal de NO indicando a existência de uma via de ativação de macrófagos independente de TNF (tabela 1) (NASHLENAS & SCOTT 2000; DEROUICH-GUERGOUR *et al.*, 2001). RITTER e colaboradores (2004) demonstraram

que outros fatores, tais como o tipo de cepa infectante poderiam estar associados ao controle da infecção de *L. major* pelo TNF- $\alpha$  *in vivo*.

A susceptibilidade a IL-4 constitui um dos princípios mediadores do mecanismo imunomodulatório nas leishmanioses provocada pela *L. major* (BEEBE *et al.*, 1997; BLACKWELL, 1996). Na aparente cura de infecções por *L. major* observada em camundongos BALB/c tratados com anticorpo monoclonal  $\alpha$ -IL-4 ou em camundongos BALB/c deficientes em IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) foi evidenciada que a produção inicial de IL-4 direcionava a polarização Th2, suprimindo a resposta Th1 e, portanto, a produção de IFN- $\gamma$  necessário para ativação de macrófagos e morte do parasita (tabela 1) (SADICK *et al.*, 1990; CHATELIAN, 1992; KOPF *et al.*, 1996; MOHRS *et al.*, 1999). Aparentemente, a IL-4 produzida rapidamente após a infecção seria derivada de uma população policlonal de células V $\alpha$ 8<sup>+</sup>V $\beta$ 4CD4<sup>+</sup> que reconheceria o antígeno de *Leishmania* homólogo ao receptor de quinase C ativada (LACK) (JULIA *et al.*, 1996). Aparentemente, as células V $\alpha$ 8<sup>+</sup>V $\beta$ 4CD4<sup>+</sup> representam a única população em camundongos BALB/c secretoras de IL-4, uma vez que seu receptor de célula T (TCR) tem relativamente baixa afinidade pelo complexo peptídeo/complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (MALHERBE *et al.*, 2000).

A secreção de IL-4 também parece exercer efeitos sobre a produção de outras citocinas, promovendo a redução na expressão da subunidade  $\beta$ 2 de receptores de IL-12 em células Th1. Em consequência, não há responsividade à IL-12 e portanto, havendo comprometimento na produção de IFN- $\gamma$  e de óxido nítrico (NO), cruciais à morte do parasita (SACKS & NOUBERN-TRAUTH, 2002).

Outras citocinas, tais como IL-13 e IL-10 também desempenham importante papel na susceptibilidade ao parasita. Diversos estudos indicam a atividade sinérgica da IL-13 com a IL-4 associada à vulnerabilidade à infecção (CHOMARAT & BANCHEREAU, 1998). Como

mostrado na tabela 1, camundongos BALB/c IL-4<sup>-/-</sup> tratados com IL-13R $\alpha$ 2 (proteína de fusão inibidora da atividade da IL-13) são totalmente resistentes à infecção por *L. major* (KOPF *et al.*, 1996). A IL-10 constitui outro mediador celular de relevância na infecção por *L. major* (tabela 1). Embora o tratamento com IL-10 exógena no início do processo infeccioso tenha pouco efeito sobre a maturação das células T e no desenvolvimento de lesões, camundongos BALB/c IL-10<sup>-/-</sup> mostraram-se mais resistentes à infecção quando comparados aos camundongos selvagens (CHATELAIN *et al.*, 1999; KANE & MOSSER, 2001).

Em linhagens de camundongos resistentes (C57BL/6) à leishmaniose e tratadas com adenovírus recombinante expressando IL-10, evidencia-se a incapacidade de cura, sugerindo que a IL-10 seja tão efetiva quanto a IL-4 na diferenciação Th2 (VIANA da COSTA *et al.* 2002; SACKS & ANDERSON, 2004). Em outros modelos experimentais *in vivo* foi evidenciado que a principal fonte de IL-10 são as células T CD4<sup>+</sup> (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Entretanto, outra subpopulação de células T CD4<sup>+</sup>, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatórias, também participam da produção de IL-10. Essas células suprimem a função das células T efetoras e, contribuem, em parte, para a persistência do parasita. Tanto em camundongos quanto em humanos, as células T CD25<sup>+</sup> regulatórias secretam altos níveis de IL-10 e fator de transformação e crescimento tumoral (TGF- $\beta$ ), resultando em supressão da resposta imune a patógenos de uma maneira geral (SACKS & ANDERSON, 2004).

Além das células T CD4<sup>+</sup>, KANE & MOSSER (2001) mostraram que a produção de IL-10 pode ser induzida em macrófagos via receptores FcR em culturas de amastigotas de *L. major* de evidenciando a participação dos macrófagos como outra fonte produtora de IL-10.

Em relação ao TGF-  $\beta$  estudos realizados com camundongos BALB/c demonstraram que o bloqueio da sinalização desta citocina, via expressão transgênica do receptor dominante negativo exclusivamente em células T, resulta em resistência à infecção com *L. major*

(GORELIK *et al.*, 2002). Sob condições específicas, o TGF- $\beta$ , pode atuar como supressor do desenvolvimento da resposta Th1, inibindo a ativação dos macrófagos e produção de NO (LI *et al.*, 1999; SACKS & NOUBERN-TRAUTH, 2002). Além da atividade sobre os macrófagos, o TGF- $\beta$  também pode inibir fatores transcripcionais, tais como o fator central de transcrição (T-bet) para diferenciação de célula Th1 (tabela 1) (GORELIK *et al.*, 2002).

**Tabela 1:** Principais mediadores associados à resposta imune na infecção com *L. major*.

-----	LINHAGEM DO CAMUNDONGO	ATIVIDADE IMUNOLÓGICA	REFs.
IL-12	BALB/c	Administração de IL-12 na primeira semana de infecção: $\uparrow$ resposta Th1 e $\downarrow$ IL-4.	HEIZEL <i>et al.</i> , 1993.
IL12p35 <sup>-/-</sup> / IL-12p40 <sup>-/-</sup>	C57BL/6	Desenvolvimento de lesões progressivas associadas ao $\uparrow$ IL-4.	SYPEK <i>et al.</i> , 1993. MATTNER <i>et al.</i> , 1996
TNFR1 <sup>-/-</sup> ; TNFR2 <sup>-/-</sup>	C57BL/6	Participação nos estágios iniciais da doença; apesar de mediar com o IFN- $\gamma$ a produção de NO, há evidências de vias de ativação de macrófagos independentes de TNF- $\alpha$ .	NASHLEANAS <i>et al.</i> , 2000.
IL-4 <sup>-/-</sup>	BALB/c	É demonstrado o papel da produção inicial de IL-4 no direcionamento da resposta Th2.	CHATELAIN <i>et al.</i> , 1992.
IL-10 <sup>-/-</sup>	BALB/c	$\uparrow$ Resistência à infecção quando comparados aos camundongos normais.	KANE <i>et al.</i> , 2001
IL-10	BALB/c	Em linhagens resistentes tratadas com adenovírus recombinante observa-se perda da capacidade de cura, sugerindo o papel na diferenciação Th2.	VIANA DA COSTA <i>et al.</i> , 2002.
IL-13	BALB/c	Atividade sinérgica com IL-4; camundongos BALB/c IL-4 <sup>-/-</sup> tratados com a proteína inibidora da atividade da IL-13 são totalmente resistentes à infecção.	CHOMARAT <i>et al.</i> , 1998. KROPF <i>et al.</i> , 1996.
TGF- $\beta$	BALB/c	Inibição de T-bet suprimindo a diferenciação Th1.	GORELIK <i>et al.</i> , 2002.

#### **1.4 PARTICIPAÇÃO DA APOPTOSE NO PROCESSO DE INFECÇÃO PARASITÁRIA.**

O fenômeno de apoptose foi inicialmente descrito como uma forma fisiológica ou programada de morte celular, desprovida de efeitos inflamatórios (KERR *et al.*, 1972). As células apoptóticas apresentam características morfológicas que são consideradas marcadoras da apoptose: fragmentação celular; cromatina nuclear condensada, geralmente acompanhada de fragmentação do DNA. Todavia, a integridade da membrana e organelas celulares é mantida, diferenciando a apoptose de outros tipos de morte celular (KERR *et al.*, 1972).

No contexto imunomodulatório, VOLL e colaboradores (1997) demonstraram que a presença de células apoptóticas poderia levar ao aumento da secreção de citocinas antiinflamatórias, tais como a IL-10 e TGF- $\beta$ , e redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-12. Diante da capacidade de modificação da resposta celular, o processo de apoptose, atualmente, constitui um dos mais elucidados mecanismos de silenciamento da resposta imune (VOLL *et al.*, 1997; FADOK *et al.*, 1998).

Em modelos de infecção parasitária foi evidenciado por FREIRE-DE-LIMA e colaboradores (2000) que a captação de células T apoptóticas exacerba a replicação do *T. cruzi* por vias bioquímicas dependentes da produção de TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, indução da atividade da enzima ornitina decarboxilase (ODC) e produção de poliaminas. Na infecção por *L. major*, ensaios *in vivo* mostraram a exacerbação da infecção quando o parasita é inoculado com neutrófilos apoptóticos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004).

## 1.5 PAPEL DOS MEDIADORES LIPÍDICOS NAS LEISHMANIOSES.

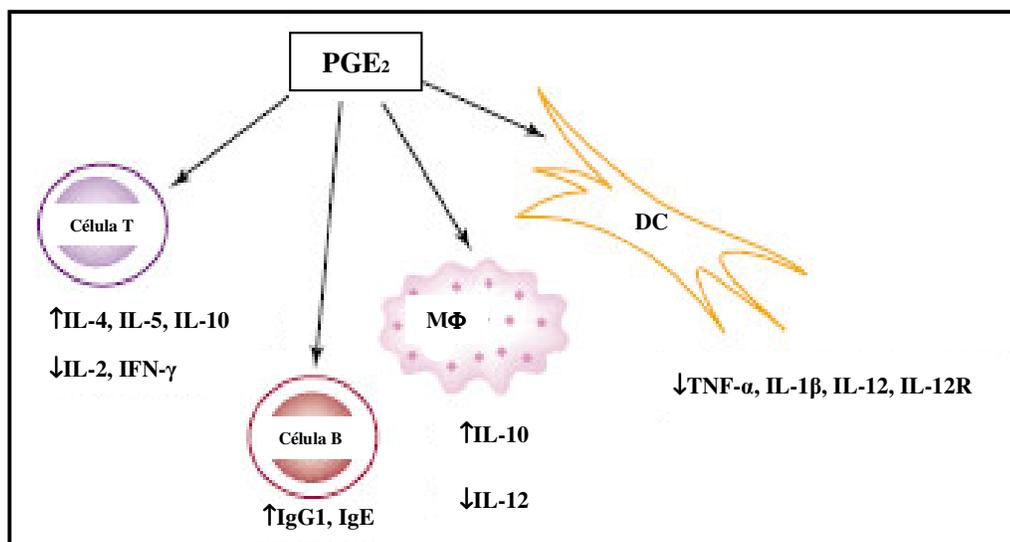
As prostaglandinas (PGs) constituem um grupo de moléculas lipídicas que regulam diversas funções biológicas, incluindo agregação plaquetária, liberação de neurotransmissores, modulação da resposta imune, dentre outras (GOETZL *et al.*, 1995; PHIPPS *et al.*, 1991). A síntese de PGs é iniciada pela liberação de ácido araquidônico (AA) pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) em resposta a um estímulo inflamatório. O AA é convertido pelas enzimas ciclooxigenase -1 (COX-1) e ciclooxigenase - 2 (COX-2) à PGH<sub>2</sub>, o precursor dos demais prostanóides. A isoforma COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, atuando na manutenção do processo homeostático. A COX-2, em contraste, é na maior parte dos tecidos, induzida e está envolvida primariamente na regulação da inflamação (SMITH *et al.*, 1994). As prostaglandina-sintases célula-específica convertem PGH<sub>2</sub> em uma série de outros prostanóides, tais como PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>. Após serem sintetizadas, as PGs são rapidamente liberadas e atuam próximas do sítio de produção, entrando na célula-alvo através de receptores de membrana de alta afinidade (NARUMIYA, 1994).

Uma das PGs cujas atividades estão mais esclarecidas é a PGE<sub>2</sub>. Produzida por um amplo espectro de células – incluindo fibroblastos, macrófagos e células tumorais – a PGE<sub>2</sub> apresenta significativo efeito na produção de citocinas pelas células T (HARRIS *et al.*, 2002a). Embora alguns estudos denotem à PGE<sub>2</sub> um papel inibitório da resposta Th2, a maioria dos estudos demonstra que primariamente, a PGE<sub>2</sub> estimula uma resposta Th2, e inibitória para a produção de citocinas Th1 (como exemplo IFN- $\gamma$  e IL-2) (HILKENS *et al.*, 1996; BLOOM *et al.*, 1999). Quanto às células B imaturas, a PGE<sub>2</sub> suprime a proliferação e induz apoptose em células B imaturas (BROWN 1992; GARRONE *et al.*, 1994). Em células profissionais apresentadoras de antígeno (APCs), tais como células dendríticas (DCs) e macrófagos (M $\Phi$ s), têm sido atribuída à

PGE<sub>2</sub> diversas atividades. Em tecidos periféricos, a PGE<sub>2</sub> parece exercer um efeito modulador sobre as DCs; uma vez que as DCs tenham migrado para o órgão linfóide, a PGE<sub>2</sub> assume uma atividade antagônica, inibindo a maturação e habilidade das mesmas em apresentar antígenos (HARIZI *et al.*, 2001). Outra função já estabelecida é a regulação da produção de citocinas por macrófagos ativados. A PGE<sub>2</sub> reduz a expressão do receptor de IL-12 e inibe a produção TNF- $\alpha$  (inclusive em macrófagos peritoniais tratados com LPS), IL-1- $\beta$ , IL-8 e IL-12 e aumento dos níveis de IL-4, sugerindo uma indução à resposta Th2 (Fig.3) (HARRIS *et al.*, 2001a). No contexto da leishmaniose, DE FREITAS e colaboradores (1999) evidenciaram que o tratamento de camundongos BALB/c infectados por *L. major* com indometacina (inibidor da COX-1 e, portanto, bloqueando a síntese de PGE<sub>2</sub>) reduz a severidade da doença e promove uma resposta Th1. Todavia, essa resposta Th1 não foi suficiente para evitar que esses animais sucumbissem à doença, uma vez que a magnitude da resposta foi inferior àquela observada em C57BL/6 (animais resistentes).

Em outros tripanossomatídeos, também foi evidenciada a atividade antiinflamatória da PGE<sub>2</sub> no modelo de infecção experimental por *T. cruzi*, levando ao aumento da proliferação parasitária (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000).

Além da atividade das PGs na resposta do hospedeiro às diferentes infecções, estudos mais recentes também evidenciaram a presença de enzimas da cascata do AA em espécies do gênero *Leishmania* do Velho Mundo. KABUTUTU e colaboradores (2003) mostraram que lisados de formas promastigotas de *Leishmania* podem metabolizar AA a PGs, embora esta via metabólica não seja inibida por Aspirina® e Indometacina. Utilizando técnicas de PCR, *Western Blotting* e imunofluorescência foi demonstrado a presença da PGF<sub>2</sub> $\alpha$  sintase em espécies de *Leishmania* e que esta enzima está localizada no citosol das promastigotas (KABUTUTU *et al.*, 2002).



**Figura 3:** Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) estimula a produção de citocinas do tipo Th2 e anticorpos.

Fonte: Adaptado de HARRIS *et al.*, 2002a.

Além da PGE<sub>2</sub>, diversas funções biológicas vêm sendo relatadas para a 15-d-PGJ<sub>2</sub>. A série J de prostaglandinas, anteriormente considerada um produto inativo da PGD<sub>2</sub>, dispõe de atividades no mecanismo de adipogênese, inflamação e câncer. A 15-d-PGJ<sub>2</sub>, metabólito final da PGD<sub>2</sub>, é produzida por uma variedade de tipos celulares, incluindo os mastócitos, células T, plaquetas e macrófagos alveolares (HARRIS *et al.*, 2002b) Embora não tenha sido claramente demonstrado que a 15-d-PGJ<sub>2</sub> utilize transportadores para entrar na célula-alvo, sua semelhança estrutural com outras PGs torna o transporte ativo um mecanismo viável. Outra hipótese está baseada na entrada da PGD<sub>2</sub> a partir de um carreador aniônico e posterior metabolização à 15-d-PGJ<sub>2</sub> no citosol (NISHIO *et al.*, 2000). Uma vez dentro das células, pode exercer seus efeitos biológicos de maneira dependente ou independente da ligação a receptores nucleares, tais como receptor de proliferação de peroxissomo ativado (PPAR). VAIDYA e colaboradores (1999) evidenciaram um efeito inibitório da 15-d-PGJ<sub>2</sub> sobre a produção de radicais livres de oxigênio de maneira PPAR-γ independente em neutrófilos. Além dos intermediários reativos a 15-d-PGJ<sub>2</sub>

inibe a produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em macrófagos humanos e de camundongos (ROSSI *et al.*, 2000). Todavia, outros estudos revelam que a 15-d-PGJ<sub>2</sub> pode induzir a expressão de mediadores pró-inflamatórios em células epiteliais e musculares (COUTURIER *et al.*, 1999). Portanto, o papel da 15-d-PGJ<sub>2</sub> na regulação de processos imunológicos e inflamatórios é complexo, sendo necessário maior investigação para a elucidação das efetivas funções desse mediador lipídico. Esta PG ainda pode atuar como um agonista do receptor de peroxisomo ativado isoforma  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), modulando a transcrição de genes envolvidos na resposta imune e inflamatória via NF- $\kappa$ B (FORMAN *et al.*, 1995; ROSSI *et al.*, 2000).

Além das PGs, o AA pode ser utilizado como precursor da síntese de leucotrienos (LTs), metabólitos oriundos da atividade da 5-lipoxigenase (LO) associada à sua proteína ativadora (FLAP). As duas principais classes bioativas de LTs incluem LTB<sub>4</sub> e cisteinil-leucotrienos (cysLTs), LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>. Embora a função dos LTs seja melhor evidenciada no processo asmático e na aterosclerose, sua participação na resposta do hospedeiro a infecções por patógenos tem adquirido importância. Estudos têm demonstrado que os LTs são essenciais na depuração *in vivo* de vários tipos de microrganismos, ao mediar a atividade fagocítica e microbicida de fagócitos (PETERS-GOLDEN *et al.*, 2005). Nas infecções parasitárias foi evidenciado que o LTB<sub>4</sub> é produzido durante a infecção com *L. amazonensis*, levando ao aumento dos níveis de NO e, portanto, sugerindo a sua participação em mecanismos leishmanicidas (SEREZANI *et al.*, 2006).

## 1.6 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE PROLIFERAÇÃO DE PEROXISSOMO ATIVADO (PPARS) NA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA.

Os receptores nucleares são membros de uma superfamília de proteínas que regulam a expressão de genes envolvidos em diversos processos biológicos, tais como desenvolvimento, reprodução e metabolismo (CASTRILLO & TONTONNOZ, 2004). O receptor de proliferação de peroxissomo ativado (PPAR), identificado na década de 90 em roedores, constitui um subgrupo de receptores nucleares, cruciais para o metabolismo de lipídios e de carboidratos, desenvolvimento da resposta imune inata e adquirida, e processos inflamatórios (ISSEMAN & GREEN, 1990; WAHLI & BRAISSANT, 1995; GLASS & OGAWA, 2006).

Estruturalmente, o PPAR apresenta quatro domínios: um domínio de ativação amino (N) terminal, conhecido como função de ativação ligante-dependente (AF 1); uma região de ligação ao DNA (DBD); um domínio de ligação ao ligante carboxi terminal contendo átomos de zinco (LDB) e uma função de ativação transcricional ligante-dependente (AF 2) (EVANS, 1988; GLASS & OGAWA, 2006). A região DBD promove a ligação de monômeros, homodímeros ou heterodímeros aos elementos responsivos de DNA, levando à modulação da transcrição de genes alvo. No caso do PPAR, essa ligação é realizada sob a forma de heterodímero com o receptor X retinóide (RXR) (CHAWLA *et al.*, 2001; KLIEWER, *et al.*, 1992a e b).

Dentre as possíveis atividades biológicas do PPAR conhecidas, atualmente, a sua função como regulador do metabolismo lipídico e de carboidratos é a mais estudada. No entanto, como mencionado acima o PPAR também podem ser expressos em macrófagos, células T, células B, DCs, células endoteliais, dentre outras, participando de processos inflamatórios e imunológicos.

A subfamília do PPAR inclui três grupos distintos: PPAR- $\alpha$  (NR1C1), PPAR- $\beta/\delta$  (NR1C2) e PPAR- $\gamma$  (NR1C3). O PPAR- $\alpha$  é preferencialmente expresso em tecidos envolvidos na

oxidação de ácidos graxos, incluindo fígado, coração e tecido adiposo (CASTRILLO & TONTONNOZ, 2004). Os principais ligantes endógenos para PPAR- $\alpha$  são os ácidos graxos poliinsaturados: ácido linoléico, ácido dodecahexanóico (DHA) e ácido eicosapentanóico (EPA) (LI & PALINSKI, 2006). Diversos estudos têm relatado que PPAR- $\alpha$  é um importante elemento na homeostase lipídica, em parte, por estimular a  $\beta$ -oxidação peroxissomal de ácidos graxos, sendo, portanto, um alvo molecular para os fibratos, grupo de fármacos empregados no tratamento da hipertrigliceridemia (FORMAN *et al.*, 1995). Apesar dos inúmeros estudos que vêm sendo realizados sobre PPARs, o papel fisiológico do PPAR- $\beta/\delta$  ainda é pouco elucidado. Expresso em um amplo espectro de tecidos e células, com níveis relativamente elevados no cérebro, tecido adiposo e pele, o PPAR- $\beta/\delta$  apresenta como ativadores naturais os ácidos graxos e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), sintéticos L-165,041 GW 501516 (BERGER *et al.*, 1999; LIM *et al.*, 2002; OLIVER *et al.*, 2001). Semelhante aos outros grupos de PPARs, é proposto que o PPAR- $\beta/\delta$  regula o metabolismo lipídico e, também, podendo atuar na proliferação celular, diferenciação de queratinócitos e na resposta inflamatória (HIHI *et al.*, 2002; BISHOP-BAILEY & WRAY, 2003).

O terceiro membro da família dos PPARs é o PPAR- $\gamma$ . Seu gene apresenta três promotores, resultando em três isoformas distintas: PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2 e PPAR- $\gamma$ 3; contudo os transcritos do RNA de PPAR- $\gamma$ 1 e  $\gamma$ 3 traduzem a proteína PPAR- $\gamma$  1 (FAJAS *et al.*, 1998; MEIRHAEGHE *et al.*, 2000; KOTA *et al.*, 2005). A isoforma PPAR- $\gamma$ 1 apresenta uma ampla expressão tecidual; altos níveis são observados no tecido adiposo, cólon, baço, retina e células hematopoiéticas, enquanto o PPAR- $\gamma$ 2 é restrita ao tecido adiposo (KERSTEN *et al.*, 1999). O PPAR- $\gamma$ 3 é abundante em macrófagos, intestino grosso e tecido adiposo branco (FAJAS *et al.*, 1998; RICOTE *et al.*, 1998; BRAISSANT *et al.*, 1996).

Quanto aos ligantes endógenos, o PPAR- $\gamma$  pode ser ativado por metabólitos de ácidos graxos, incluindo o ácido 9-hidroxi-octadecadienóico (9-HODE) e 13-hidroxi-octadecadienóico (13-HODE); derivados do AA como 15d-PGJ<sub>2</sub> e o ácido hidroxi-eicosatetraenóico (15-HETE) (Tabela 2a). Dentre os ligantes exógenos destacam-se as tiazolidinodionas (TZDs), agonistas de PPAR- $\gamma$  empregados como hipoglicemiantes na terapêutica de diabetes tipo II (Tabela 1b) (BISHOP-BAILEY & WRAY, 2003). Quanto aos antagonistas, é possível destacar o éter bifenol A diglicidil (BADGE), cuja atividade em receptores nucleares foi recentemente descrita (WRIGHT *et al.*, 2000).

**Tabela 2a:** Ligantes endógenos de PPAR\*.

<b>Ligantes endógenos de PPAR</b>			<b>Efeitos biológicos</b>
<b>Ligantes endógenos</b>			
<b>PPAR-<math>\alpha</math></b>	<b>PPAR-<math>\beta/\delta</math></b>	<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	
Ácido Palmítico	Ácidos graxos	Ácido Linoléico	Metabolismo lipídico e glicose
Ácido Esteárico		Ácido Araquidônico	
Ácido Palmitoléico		15-d-PGJ <sub>2</sub>	
Ácido Oléico		9-HODE	
Ácido Linoléico		13-HODE	
Ácido Araquidônico		15-HETE	

\* KOTA *et al.*, 2005.

**Tabela 2b:** Ligantes exógenos de PPAR\*.

Ligantes exógenos de PPAR			Implicações
Ligantes exógenos			
PPAR- $\alpha$	PPAR- $\beta/\delta$	PPAR- $\gamma$	PPAR- $\alpha$ - aterosclerose e inflamação PPAR- $\beta/\delta$ -agonistas: infertilidade, hiperlipidemia, hiperglicemia, aterosclerose e obesidade; antagonistas:câncer PPAR- $\gamma$ – agonistas: diabetes tipoII, câncer, inflamação, hipertensão e desordens retiniais
WY-14643	L-165041	TZDs	
Clofibrato	NSAIDs (antagonista)	JTT-501 (isoxazolidinodionas)	
Gemfibrozil		GW-7845	
Nafenopin		CDDO	
Bezafibrate		BADGE (antagonista)	
		GW 9662	
Fenofibrato		LG-100641 (antagonista)	

\* Adaptado de KOTA *et al.*, 2005.

Assim como os PPAR- $\alpha$  e PPAR- $\beta/\delta$ , o PPAR- $\gamma$  participa de importante atividade no metabolismo lipídico, proliferação celular, inflamação e imunidade. Expresso em monócitos/macrófagos murinos e humanos, o PPAR- $\gamma$  parece desempenhar um importante papel na diferenciação e modulação das funções dessas células (TONTONOZ *et al.*, 1998).

Os primeiros relatos da atividade moduladora do PPAR- $\gamma$  evidenciaram o efeito inibitório de ligantes de PPAR- $\gamma$  sobre genes relacionados à expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (JIANG *et al.*, 1998, RICOTE *et al.*, 1998). Outros mediadores, tais como o NO também podem ter sua produção suprimida na presença da PGJ<sub>2</sub> e das TZDs (COLVILLE-NASH *et al.*, 1998; REILLY *et al.*, 2000). *In vivo*, verificou-se que camundongos heterozigotos deficientes de PPAR- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ <sup>+/-</sup>) desenvolvem maior severidade em modelos de artrite antígeno-induzida, além da sua participação em modelos de encefalomielite alérgica experimental, ratificando assim, a ação antiinflamatória do PPAR- $\gamma$  (SETOGUCHI *et al.*, 2001; RAIKWAR *et al.*, 2005).

Em outras células do sistema imune, como as células T, as informações obtidas até o momento revelam que a ativação PPAR- $\gamma$  poderia inibir a produção de diversas citocinas de resposta Th1 clássica, incluindo IFN- $\gamma$  e IL-12 em DCs (CUNARD *et al.*, 2002; DAYNES & JONES, 2002). Tais resultados sugerem que este receptor pode desempenhar um papel significativo na diferenciação de células naive, interferindo no equilíbrio da resposta Th1/Th2. Também já foi descrito que a IL-4, uma citocina necessária para o desenvolvimento da resposta Th2, pode induzir a expressão de PPAR- $\gamma$  em células T, bem como promover um potencial aumento da expressão 12/15 lipoxigenase em monócitos (HUANG *et al.*, 1999). De fato, através do uso da técnica de *microarray*, foi evidenciado que o PPAR- $\gamma$  é altamente expresso em células Th2 (CHTANOVA *et al.*, 2001).

Em 2007, WOHLFERT e colaboradores demonstraram o efeito do PPAR- $\gamma$  sobre uma subpopulação específica de células T, as células T regulatórias. Apesar do predominante efeito supressor sobre a maioria das células do sistema imune, a ciglitazona (ligante sintético) apresenta um efeito estimulatório sobre células T regulatórias naturais (nTregs) e células T regulatórias induzidas (iTregs), sugerindo portanto, uma possível aplicação do PPAR- $\gamma$  no tratamento de doenças autoimunes .

Em células B, têm sido mostrado que a 15d-PGJ<sub>2</sub>, bem como outros ligantes sintéticos de PPAR- $\gamma$ , apresentam atividade antiproliferativa e efeito citotóxico tanto em células B normais quanto em células B malignas (PADILLA *et al.*, 2000 a,b e c).

Outros estudos têm mostrado que o PPAR- $\gamma$  constitui a forma predominantemente expressa em DCs. Ensaio *in vitro* realizados na presença de rosiglitazona (agonista), evidenciaram que o tratamento com este ligante pode inibir a expressão de CD80, CD86 e produção de IL-12 (GOSSET *et al.*, 2001).

Entretanto, é necessário ressaltar que efeitos imunes e antiinflamatórios observados na presença de altas concentrações de tiazolidinodionas ou com o uso de 15d-PGJ<sub>2</sub> sugerem que alguns desses efeitos são PPAR- $\gamma$  dependente/independente, sendo portanto, imprescindível um número maior de estudos para elucidação dos efeitos nos sistemas imune e inflamatório (CASTRILLO & TONTONNOZ, 2004).

Durante os processos infecciosos, poucas pesquisas associadas à expressão do PPAR- $\gamma$  foram realizadas. Recentemente, foi evidenciado o envolvimento destes receptores em modelos de infecção por *Plasmodium* sp e *Stahylococcus aureus* (SKOROKHOD *et al.*, 2004; SERGHIDES & KAIN, 2005; PHULWANI *et al.*, 2006). Entretanto, não há relatos do papel imunomodulatório do PPAR- $\gamma$  no modelo de infecção por *Leishmania* sp. Com base nas informações descritas, propomos nesta dissertação avaliar o envolvimento do PPAR- $\gamma$  no curso da leishmaniose experimental *in vitro*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o papel do PPAR- $\gamma$  na leishmaniose experimental *in vitro*.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar os mecanismos imunomoduladores envolvidos na infecção por *L. major* na presença do agonista de PPAR- $\gamma$  (ciglitazona) e antagonista de PPAR- $\gamma$  (GW 9662).
- Avaliar os efeitos do agonista e antagonista de PPAR- $\gamma$  na ultraestrutura parasitária, bem como na morfologia da célula hospedeira.
- Determinar o papel do agonista e antagonista de PPAR- $\gamma$  na indução de morte celular em promastigotas de *L. major*.
- Avaliar o envolvimento de mediadores lipídicos e sua possível relação com o PPAR- $\gamma$  na infecção experimental por *L. major*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.**

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c de ambos os sexos, com 6 a 8 semanas de idade. Os camundongos foram cedidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz e mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Imunitária. A utilização dos animais foi baseada em normas estabelecidas pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

#### **3.2 PARASITAS.**

Utilizaram-se as formas promastigotas de *L. major* (cepa LV39, MRHO/Sv/59/P strain) na fase estacionária. Para a manutenção da infectividade *in vivo*, os parasitas foram isolados mensalmente do linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados com as formas promastigotas ( $6 \times 10^7$ /mL parasitas) na fase estacionária, que foram mantidas em meio Schneider's (Sigma Chemical Co.), suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco - Life Technologies), 2% de urina humana estéril, 10 mg/L de gentamicina (Gibco - Life Technologies) e 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco - Life Technologies).

### **3.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS.**

Macrófagos peritoneais empregados nos experimentos foram obtidos de camundongos BALB/c 4 dias após a injeção intraperitoneal de 1 mL de tioglicolato de sódio 3% (Sigma Chemical Co.) (LI *et al.*, 1997; COOK *et al.*, 2003). Aproximadamente 5 mL de meio DMEM (Gibco - Life Technologies) gelado foram injetados no peritônio dos animais e após vigorosa massagem, o exsudato celular foi recolhido. Após contagem, os macrófagos foram ressuspensos em meio DMEM, suplementado com 10% SFB e distribuídos em microplacas. O número de macrófagos utilizados variou de acordo com a metodologia empregada. Para a infecção *in vitro* foram utilizadas placas de 48 poços ou 24 poços, com ou sem lamínula, na concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL; no ensaio de *WESTERN BLOTTING* (item 11) e MICROSCOPIA ELETRÔNICA (item 14) foram utilizadas placas de 6 poços e placas de Petri respectivamente nas concentrações de  $2 \times 10^6$  células/poço e  $10 \times 10^6$  células/placa.

### **3.4 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE MACRÓFAGOS MURINOS POR *Leishmania major*.**

Os macrófagos peritoneais obtidos (item 3.3) foram infectados com as formas promastigotas de *L. major* na fase estacionária, na proporção de 5 parasitas: 1 macrófago durante 4h em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO<sub>2</sub>. Após este período, a cultura foi lavada com solução de Hank (Gibco Life Technologies) sem soro para remoção das células não-aderentes e parasitas extracelulares. Finalizada a etapa de “lavagem”, os macrófagos foram cultivados com DMEM suplementado com 1% de nutridoma (Roche), na presença de ciglitazona

(5 $\mu$ M) ou GW 9662 (5 $\mu$ M) e mantidos em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO<sub>2</sub> por 3 dias.

### **3.5 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA *IN VITRO*.**

Após 3 dias de cultura em meio DMEM, foi realizada a troca do meio de cultura contendo os macrófagos infectados. O meio DMEM contendo 1% de nutridoma foi substituído por meio Schneider suplementado com 10% de SFB, 2% de urina humana e 2 mM de L-glutamina. Em seguida, a cultura foi mantida em estufa BOD a 27 °C por 3-4 dias, período no qual verificou-se a liberação das formas promastigotas e, portanto, a determinação da carga parasitária. O número de parasitos extracelulares foi quantificado em contador de partículas (Coulter, modelo Z<sub>1</sub>) (GOMES *et al.*, 2000, RIBEIRO-GOMES, *et al.*, 2004).

Para quantificação das formas amastigotas, os macrófagos foram cultivados sobre lamínulas, infectados e mantidos 2 dias em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as lamínulas foram recolhidas, fixadas com metanol e em seguida, coradas com panótico. O percentual de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos foram obtidos a partir de análise em microscópio óptico com objetiva de 100x (imersão) (NUNES *et al.*, 2005).

### **3.6 DOSAGEM DE CITOCINAS E MEDIADORES LIPÍDICOS.**

Os macrófagos peritoniais infectados com *L. major* nas condições descritas no item 3.3 foram incubados com ciglitazona (5 $\mu$ M) ou GW 9662 (5 $\mu$ M) por 48h e mantidos em estufa a 37

°C com atmosfera úmida contendo 7% de CO<sub>2</sub>. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10 e da prostaglandina PGE<sub>2</sub>, avaliada por ELISA (DANIELPOUR, 1993) de acordo com as instruções do fabricante (R& D Systems e Cayman Chemical Co.).

### **3.7 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).**

O NO produzido pelos macrófagos peritoniais foi determinado indiretamente, a partir da quantificação de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), um metabólito estável. O sobrenadante da cultura foi plaqueado em uma proporção de 1:1 com o reagente de Griess (0,1% dihidrocloro naftiletlenodiamina, 1% sulfanamida e 2,5% de ácido fosfórico) e a absorbância lida em 540 nm em leitor de microplaca automático (Versa max tubable microplate reader – Molecular Devices). A determinação da concentração de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) (GREEN *et al* 1982; STUEHR & NATHAN, 1989).

### **3.8 ENSAIO DE MORTE CELULAR POR NECROSE-ATIVIDADE DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE (LDH).**

A avaliação da viabilidade celular após o tratamento com ciglitazona (5 $\mu$ M) ou GW 9662 (5 $\mu$ M) foi realizada empregando-se o ensaio da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) (KOSKY *et al.*, 1983), seguindo os parâmetros técnicos de um kit diagnóstico (Doles Co.). Este método é baseado na reação lactato/piruvato, com determinação quantitativa do NADH formado na reação enzimática. Foram adicionados a 50 $\mu$ L do sobrenadante, 100 $\mu$ L da solução 1 contendo

alúmem férrico e substrato (lactato). Após 3min. em estufa a 37°C, 100µL da solução 2 (FMS:Fnazina Metasulfato + NAD<sup>+</sup>) foram acrescentados ao sistema. Transcorridos 9 min. em estufa a 37°C, o material foi submetido à análise em leitor de microplaca (Versa max tubable microplate reader – Molecular Devices) e determinada a densidade óptica (D.O) à 490nm. Os controles positivos foram células lisadas por congelamento/descongelamento.

### **3.9 DETECÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS *IN SITU* – TUNEL.**

A apoptose em macrófagos peritoniais ( $3 \times 10^5$ /poço) tratados com ciglitazona e GW 9662 foi detectada utilizando a técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) (GAVRIELLI *et al.*, 1992) de acordo com os procedimentos técnicos descritos no kit comercial (Apop Tag Fluorescein *in situ* Apoptosis detection-Chenicon International). Os macrófagos foram incubados em microplacas de 24 poços com lamínula por 48 h. Após esse período, as lamínulas foram fixadas em paraformaldeído (1% - pH 7.4) por 10min à temperatura ambiente e permeabilizadas com etanol:ácido acético (2:1) por 5min. (-20°C). Finalizada a etapa de permeabilização, foram adicionados 75µL/lamínula de *Buffer Equilibration* (componente do Kit); 55µL/lamínula da solução contendo a enzima TdT + *Buffer Reaction* (componentes do Kit), seguindo-se incubação por 1 h a 37°C com 7% de CO<sub>2</sub>. Após esse período foram adicionados 500µL da solução contendo *Working strength Stop/Wash* + H<sub>2</sub>O – 1:34 mL (componentes do kit), sob agitação por 15 seg seguindo-se incubação por 10 min à temperatura ambiente e lavagem das lamínulas em PBS 0,1M (3 vezes). Em ambiente livre de luminosidade, adicionou-se 65 µL/lamínula de *anti-digoxigenin conjugate* (FITC) por 30 min. Após lavagem com PBS (4 x 2 min.), as células foram marcadas com DAPI (0.5 µg/ml) por 5 min. Após nova

lavagem com PBS (2x 5min.) foi realizada a marcação citoplasmática com azul de Evans (0,001%) por 5 min. Finalizada as marcações, as lâminas foram montadas com *Vectashield* (6 µL/lamínula) e realizada análise em microscópio de fluorescência Nikon eclipse E400.

### **3.10 WESTERN BLOTTING.**

*Western blotting* ou imunoblotting é um procedimento para detecção de proteínas separadas por eletroforese, em particular aquelas de menor abundância. Macrófagos peritoneais infectados ou não com *L. major* (2x10<sup>6</sup>/poço) e co-cultivados ou não com neutrófilos foram incubados em microplacas de 6 poços na presença de ciglitazona (5µM) ou GW 9662 (5µM) em meio contendo DMEM + 1 % de nutridoma por 24 h a 37 °C em 7 % de CO<sub>2</sub>. Após esse período as células foram lavadas com PBS (2X) e adicionados 80 µL/mL de tampão de lise (Gibco BRL) por 5 min. em gelo. Em seguida, as células foram coletadas e centrifugadas por 20 min. a 20000xg. Aos sobrenadantes, contendo as proteínas alvo, foram adicionados 20µL de tampão de amostra e a solução submetida a aquecimento (5 min. a 100 °C). As proteínas obtidas foram então separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose por 30 min./30V em um sistema de *blotting* (BIO-RAD, Hercules, CA). A membrana foi bloqueada em tampão de bloqueio (5% BSA) por 1 h à temperatura ambiente e incubada, sob agitação, *overnight* a 4°C com anticorpo primário (anticorpos policlonais de coelho anti-arginase, anti-COX-2, anti-PGD, anti-iNOS e anti-PPAR-γ – Cayman Chemical Co.). Após lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (anti-coelho – Santa Cruz Biotechnology ) por 2h, sob agitação, à temperatura ambiente. As bandas foram reveladas utilizando kit de detecção (ECL Plus Western Blotting detection system –

Amersham Biosciences), seguida de exposição em filme (ECL Plus Hyperfilm Amersham) ou em aparelho (STORM).

### **3.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA.**

Macrófagos peritoniais ( $10 \times 10^6$ /poço) infectados com *L. major* foram incubados em placas de Petri na presença de ciglitazona ( $5 \mu\text{M}$ ) ou GW 9662 ( $5 \mu\text{M}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  em 7% de  $\text{CO}_2$ . Após 24h as células foram lavadas com PBS 2x (centrifugação  $7965 \times g/\text{min.}$ ) e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. A etapa de fixação foi realizada em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2), seguida de tratamento com  $\text{OsO}_4$  1% e FeCNK 0,8%, diluídos no mesmo tampão, por 1 h. Em seguida, as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 10min. O material foi mantido *overnight* em uma solução de acetona 100 % e Epon (1:1 v/v). Após este período, o material foi colocado em Epon puro por aproximadamente 4 h. Após inclusão em resina ( $60^\circ\text{C}$  por 72h) foram realizados cortes ultrafinos, os quais foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 10C.

### **3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD). A análise estatística foi realizada no programa GraphPad InStat versão 3.01 (San Diego, EUA), empregando o teste One-Way ANOVA, seguido do teste de Tukey.

## 4. RESULTADOS

O modelo murino de infecção experimental com *L. major* tem sido amplamente utilizado para elucidação dos fatores imunológicos envolvidos no processo de resistência e susceptibilidade a patógenos intracelulares (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). O paradigma de resistência/susceptibilidade é baseado no repertório de citocinas produzido na resposta à infecção: uma resposta do tipo Th1, conferindo resistência; e uma resposta do tipo Th2, resultando em um perfil de susceptibilidade.

A resistência é avaliada em modelos de infecção experimental em camundongos das linhagens C57BL/6, CBA e C57BL/10 e está associada à produção de citocinas do tipo Th1. Durante a infecção, é evidenciada a produção de IL-12, a qual promove aumento nos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-2, além de quantidades significativas de TFN- $\alpha$ . O IFN- $\gamma$  e o TFN- $\alpha$  estão diretamente envolvidos na ativação do mecanismo microbicida dos macrófagos via síntese de óxido nítrico (NO). Por outro lado, camundongos BALB/c, que desenvolvem um perfil Th2 com produção de IL-4, são susceptíveis à infecção. As citocinas do tipo Th2, IL-4 e IL-10 inibem a ativação dos macrófagos, favorecendo a proliferação de amastigotas intracelulares e o agravamento da infecção (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

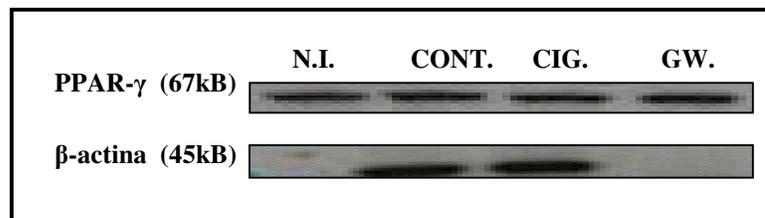
Com o objetivo de avaliar a possibilidade de novas vias de imunomodulação, capazes de alterar o perfil de resposta imune a patógenos intracelulares, foi estudado o papel do PPAR- $\gamma$  no modelo de infecção experimental com *L. major* em macrófagos murinos. O PPAR- $\gamma$  é um dos membros da família de receptores nucleares que atua como um fator de transcrição de diversos genes. A modulação destes receptores pode ser promovida por diversos ligantes naturais como o 5-HETE e a 15-d-PGJ<sub>2</sub>, por exemplo; ou compostos sintéticos, tais como a ciglitazona e a

rosiglitazona, pertencentes à classe das tiazolidinodionas - agonistas do PPAR- $\gamma$  utilizados como hipoglicemiantes na terapêutica do diabetes tipo II. Nesta dissertação foram utilizados a ciglitazona (agonista) e o GW 9662 (antagonista) para a avaliação do possível efeito imunomodulador destes ligantes no processo de infecção experimental com *L. major*.

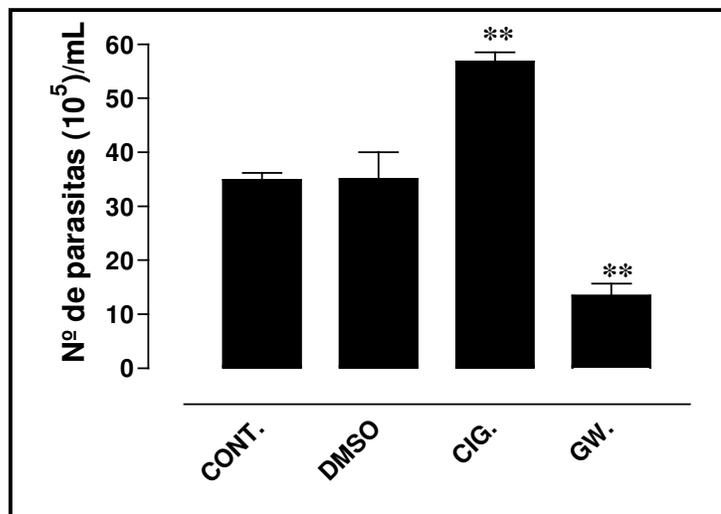
#### **4.1 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO PPAR- $\gamma$ DURANTE A INFECÇÃO COM *L. major*.**

Na etapa inicial deste trabalho foi avaliado como seria a expressão do PPAR- $\gamma$  na infecção experimental com *L. major*. Utilizando-se a técnica de *Western Blotting* foi evidenciada que a infecção com *L. major* de macrófagos peritoneais murinos promove aumento na expressão do PPAR- $\gamma$  (Fig. 4).

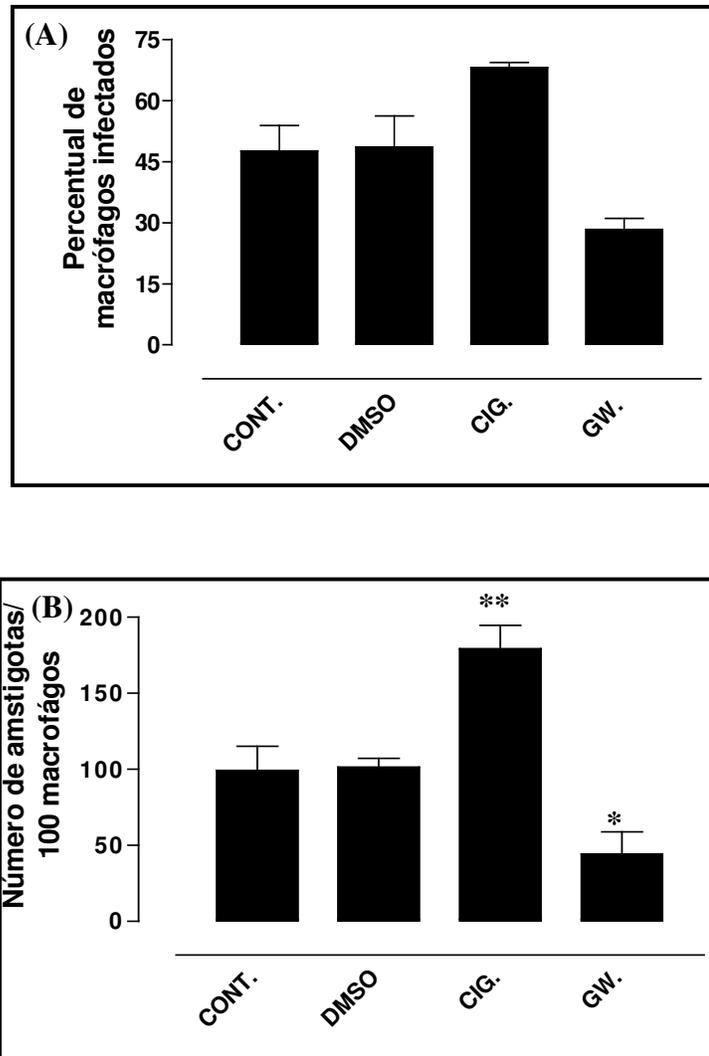
Considerando-se a expressão diferenciada do PPAR- $\gamma$  durante a infecção, é possível que a utilização de compostos moduladores da expressão do PPAR- $\gamma$  pudesse alterar o perfil de infecção pela *L. major*. Para avaliar tal hipótese, macrófagos peritoneais infectados com *L. major* foram tratados com ciglitazona (agonista) ou GW 9662 (antagonista). Foi observado que o tratamento com o GW 9662 apresentou um efeito redutor da carga parasitária *in vitro* (Fig. 5). Ao contrário, a ciglitazona induziu um aumento no percentual de macrófagos infectados e no número de amastigotas/100 macrófagos (Fig.6).



**Figura 4: A infecção com *L. major* exacerba a expressão do PPAR- $\gamma$ .** Macrófagos infectados com *L. major* foram tratados por 24h com ciglitazona e GW 9662 (5 $\mu$ M). A expressão do PPAR- $\gamma$  foi avaliada a partir da técnica de *Western Blotting*. N.I. (macrófago não-infectado); CONT. (macrófago infectado); CIG. (ciglitazona); GW. (GW 9662). Figura representativa de um experimento. n=2.



**Figura 5: Os ligantes de PPAR- $\gamma$  promovem alterações na carga parasitária.** Macrófagos peritoneais infectados com *L. major* foram incubados com ciglitazona ou GW 9662 (5 $\mu$ M) até troca do meio DMEM por Schneider. A determinação da carga parasitária foi determinada a partir da contagem no Coulter (Contador de partículas) das formas promastigotas liberadas no meio extracelular. Os asteriscos indicam (\*\*) $p \leq 0,01$  em relação ao veículo (DMSO). CONT. (macrófago infectado com *L. major*); DMSO (macrófago infectado e tratado com DMSO); CIG. (ciglitazona); DMSO (dimetilsulfóxido); GW (GW 9662). MÉDIA  $\pm$  S.D. Gráfico representativo de um experimento. n=3.

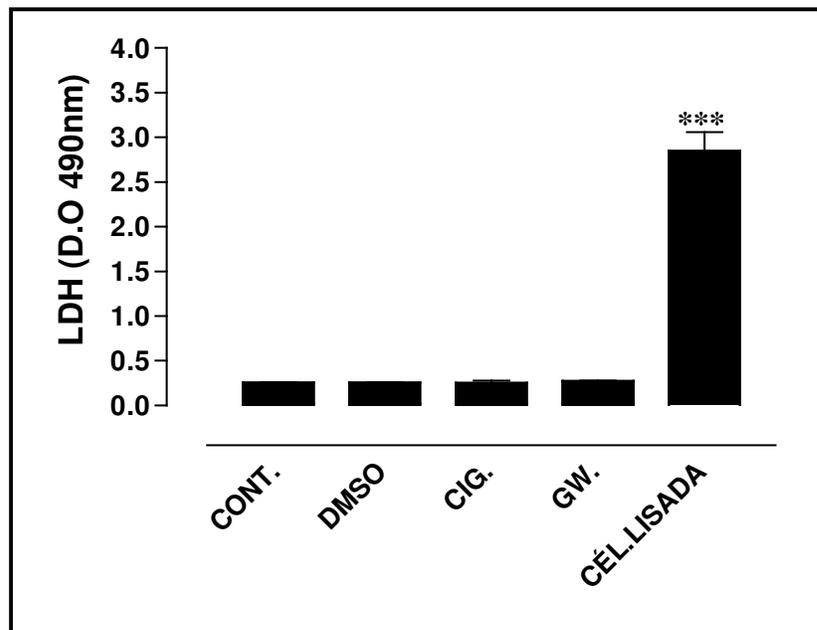


**Figura 6: Os ligantes de PPAR- $\gamma$  promovem alterações na carga parasitária intracelular.** A carga parasitária intracelular (forma amastigota) foi determinada através da contagem em microscópio óptico das formas amastigotas previamente coradas (Panótico) e após 48h de incubação com ciglitazona (5 $\mu$ M) ou GW 9662 (5 $\mu$ M). **(A)** percentual de macrófagos infectados **(B)** Número de amastigotas/100 macrófagos. Os asteriscos indicam (\*\*)  $p \leq 0,01$  e (\*)  $p \leq 0,05$  em relação ao veículo (DMSO). CONT. (macrófago infectado com *L. major*); DMSO (macrófago infectado e tratado com DMSO); CIG. (ciglitazona); DMSO (dimetilsulfóxido); GW. (GW 9662). MÉDIA  $\pm$  S.D. Gráfico representativo de um experimento. n=3.

## 4.2 CIGLITAZONA E GW 9662 NÃO APRESENTAM ATIVIDADE CITOTÓXICA.

A redução da carga parasitária observada nos resultados obtidos poderia ser resultante de dois fenômenos: morte dos macrófagos murinos infectados, reduzindo a liberação de formas promastigotas; ou, uma possível atividade dos ligantes de PPAR- $\gamma$ , induzindo a produção de citocinas e mediadores celulares (espécies reativas de oxigênio, por exemplo) reduzindo a proliferação do parasita. Com o objetivo de investigar o possível perfil citotóxico, resultante de uma via de morte por necrose, realizou-se o ensaio de liberação da enzima lactado desidrogenase (LDH). Não foi evidenciada liberação da LDH nos sobrenadantes dos macrófagos infectados tratados com ciglitazona e GW 9662 (Fig. 7). Este resultado sugere que os compostos não apresentam atividade citotóxica sobre a cultura de macrófagos, não comprometendo, portanto, a viabilidade celular.

Após verificar que os ligantes de PPAR- $\gamma$  não apresentavam um efeito citotóxico sobre os macrófagos infectados, a etapa posterior foi verificar qual o sítio de ação destes compostos. A atividade sobre os macrófagos, resultando em alterações no repertório de citocinas e outros mediadores regulados pelo PPAR- $\gamma$ ; ou a ação direta sobre a *L. major*.



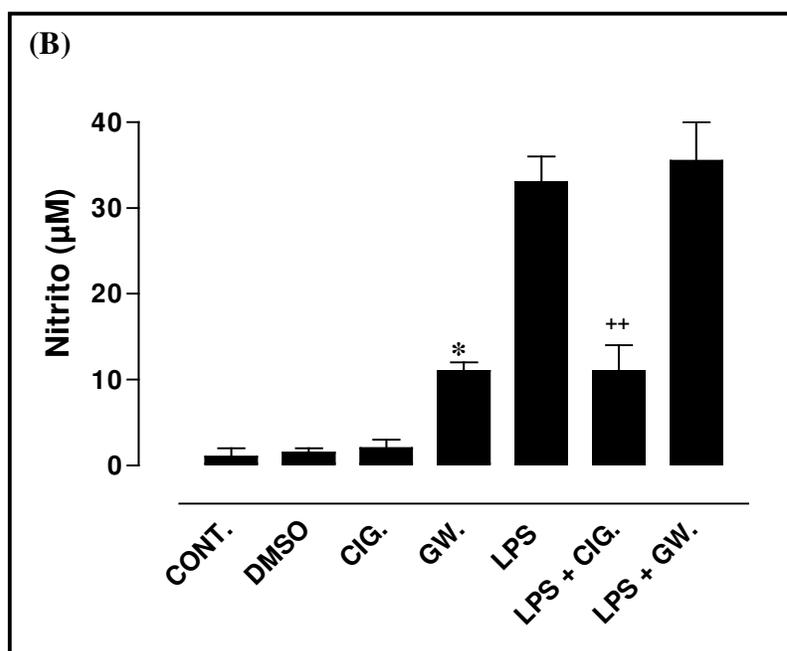
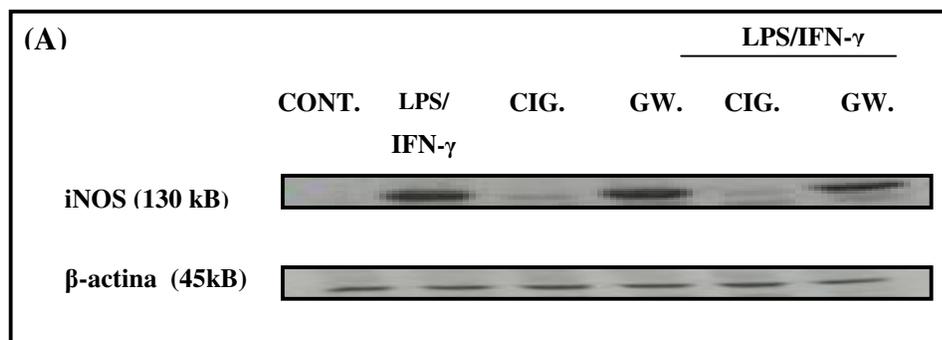
**Figura 7: Os ligantes de PPAR- $\gamma$  não comprometem a viabilidade celular.** Após 48h de tratamento com a ciglitazona (5 $\mu$ M) ou GW 9662 (5 $\mu$ M), o sobrenadante de macrófagos infectados foi analisado quanto à liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Os asteriscos indicam  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) em relação ao controle (DMSO). CONT. (macrófago infectado com *L. major*); DMSO (macrófago infectado e tratado com DMSO); CIG. (ciglitazona); DMSO (dimetilsulfóxido); GW. (GW 9662); CÉL.LISADA (célula lisada). MÉDIA  $\pm$  S.D. Gráfico representativo de um experimento. n=3.

### **4.3 A CIGLITAZONA E O GW 9662 MODULAM A EXPRESSÃO DA ENZIMA INOS E PRODUÇÃO DE NO.**

Uma vez observada a redução da carga parasitária das formas promastigotas e amastigotas, foi iniciada a análise dos possíveis mediadores envolvidos neste fenômeno. Sabendo-se que o óxido nítrico (NO) é um importante agente microbicida sendo responsável pelo controle da proliferação de patógenos intracelulares, inicialmente a expressão da enzima iNOS foi avaliada.

Os macrófagos infectados com *L. major* foram submetidos ao tratamento com ciglitazona (5 $\mu$ M) e GW 9662 (5 $\mu$ M) por 24h. Após este período, as proteínas celulares foram recolhidas e a expressão da enzima iNOS avaliada de acordo com a técnica de *Western Blotting*. A expressão de iNOS é aumentada na presença de GW 9662 e suprimida quando submetida ao tratamento com ciglitazona (Fig.8A)..

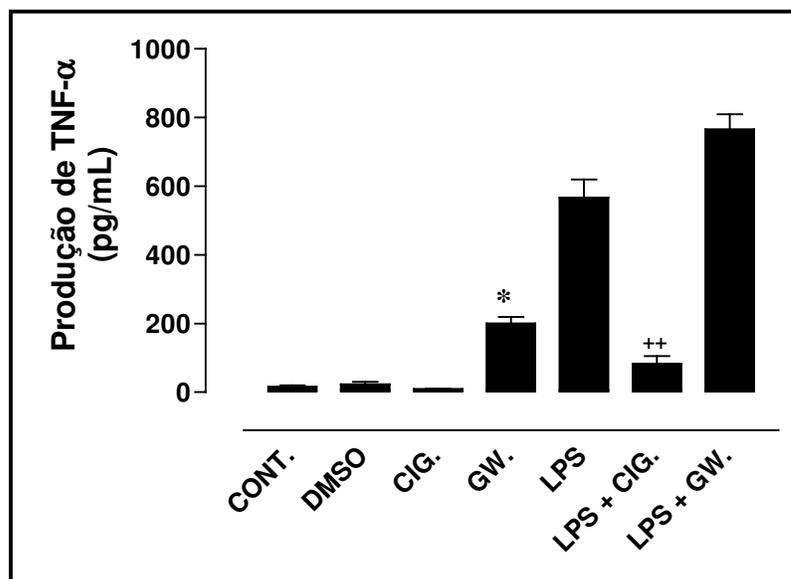
Além da expressão da enzima iNOS a quantificação do produto desta enzima, o NO foi realizada. Os macrófagos infectados foram incubados por 48h com ciglitazona e GW 9662 e após este período, os sobrenadantes foram recolhidos. A quantidade de NO foi determinada de maneira indireta, a partir da quantificação do metabólito estável, o nitrito. Assim como revelado no *Western Blotting*, o GW 9662 foi capaz de elevar os níveis de nitrito produzidos pelos macrófagos infectados (Fig. 8B). Por outro lado, o tratamento com a ciglitazona mostrou um efeito oposto, reduzindo a produção deste mediador quando os macrófagos foram ativados com LPS (Fig. 8B). Estes resultados sugerem que a ativação do PPAR- $\gamma$  promove um efeito inibitório sobre a produção de NO e ao inibir a ação de agonistas endógenos naturais ou sintéticos utilizando o GW 9662 observa-se o efeito oposto, ou seja, um aumento na produção de NO. Esta observação poderia estar associada à redução da carga parasitária.



**Figura 8: Os ligantes de PPAR- $\gamma$  modulam a expressão de iNOS e produção de nitrito.** Macrófagos infectados foram incubados por 24h na presença de ciglitazona (5 $\mu\text{M}$ ) e GW 9662 (5 $\mu\text{M}$ ). A expressão da iNOS (130-135kB) foi realizada por *Western Blotting* (A). Macrófagos peritoneiais foram infectados e tratados por 48h com ciglitazona e GW 9662. Após 48h, os sobrenadantes foram recolhidos e realizada a quantificação do nitrito (B). Os símbolos indicam (\*\*\*)  $p \leq 0,01$  em relação ao veículo (DMSO) e (++)  $p \leq 0,05$  em relação ao LPS. CONT. (macrófago infectado com *L. major*); DMSO (macrófago infectado e tratado com DMSO); CIG (ciglitazona); DMSO (dimetilsulfóxido); GW (GW 9662); LPS (lipopolissacarídeo). MÉDIA  $\pm$  S.D. Gráfico representativo de um experimento realizado em triplicata. n=3.

#### **4.4 OS LIGANTES DE PPAR- $\gamma$ MODULAM A PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ .**

Sendo o TNF- $\alpha$  uma importante citocina pró-inflamatória capaz de atuar sinergicamente com outros mediadores na ativação de macrófagos e, portanto, induzir a produção de NO, tornou-se necessário verificar a produção desta citocina nas monocamadas de macrófagos infectados e tratados ou não com os ligantes de PPAR- $\gamma$ . Como esperado, foi observado um aumento na produção de TNF- $\alpha$  em sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados incubados com GW 9662. Ao contrário, o tratamento com a ciglitazona não promoveu a uma alteração na produção de TNF- $\alpha$ . Entretanto, a adição da ciglitazona em macrófagos infectados e estimulados com LPS reduziu os níveis de TNF- $\alpha$ .

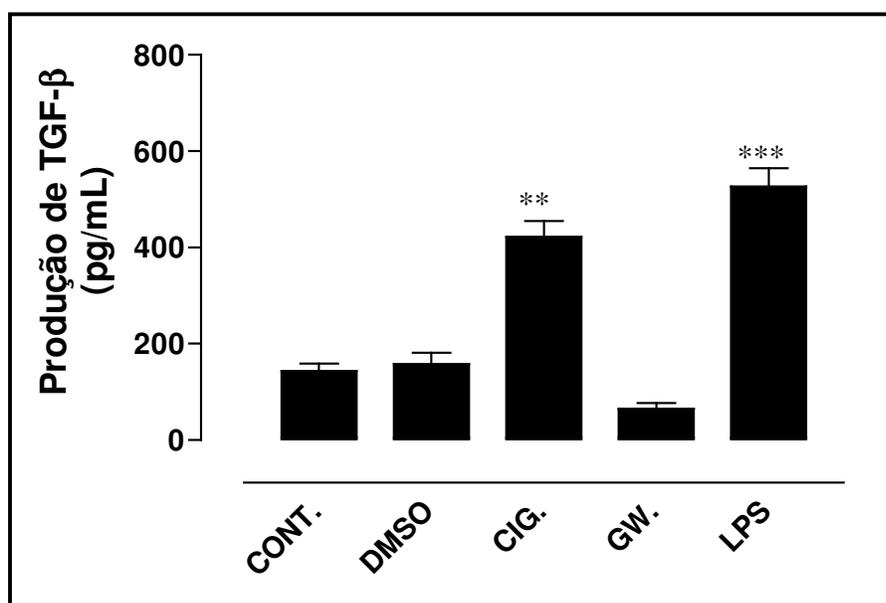


**Figura 9: Atividade a ciglitazona e GW 9662 sobre a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos infectados por *L. major*.** Macrófagos peritoneais foram tratados com os ligantes de PPAR- $\gamma$  (5 $\mu$ M) por 48h. Ao término deste período o sobrenadante foi coletado e realizada a quantificação do TNF- $\alpha$  através da técnica de ELISA. O LPS (200ng/mL) foi utilizado como controle positivo da reação. Os símbolos indicam (+++)  $p \leq 0,001$  em relação ao LPS e (\*\*\*)  $p \leq 0,01$  em relação ao veículo (DMSO) CONT. (macrófago infectado com *L. major*); DMSO (macrófago infectado e tratado com DMSO); CIG. (ciglitazona); DMSO (dimetilsulfóxido); GW 9662; LPS (lipopolissacarídeo). MÉDIA  $\pm$  S.D. Gráfico representativo de um experimento realizado em triplicata. n=3.

#### 4.5 A CIGLITAZONA INDUZ AUMENTO DOS NÍVEIS DE TGF- $\beta$ .

Após evidenciado no ensaio de LDH que os ligantes de PPAR- $\gamma$  não apresentam atividade citotóxica (Fig.7), foi investigado o possível envolvimento de outros mediadores (citocinas e mediadores lipídicos) envolvidos no processo de infecção de macrófagos murinos por *L. major*. A primeira citocina alvo de estudo foi o TGF- $\beta$ . Como descrito na literatura, o TGF- $\beta$  é um importante fator tecidual, capaz de induzir a desativação de macrófagos e promover o crescimento de patógenos intracelulares (LOPES *et al*, 2000; BARRAL-NETTO *et al*, 1992). Quanto ao processo de morte por apoptose, estudos anteriores revelaram que ao fagocitar células apoptóticas, os macrófagos são capazes de secretar TGF- $\beta$ , levando a na produção de NO e aumento na produção de poliaminas, culminando no favorecimento da liberação de tripomastigotas em monocamadas de macrófagos infectados com *Trypanossoma cruzi* (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000).

Na presente dissertação foi observada que a adição de ciglitazona em culturas de macrófagos infectados com *L. major* promove aumento da produção de TGF- $\beta$ , fato que poderia estar associado ao aumento da replicação parasitária. Ao contrário, a adição de GW 9662 não altera a produção de TGF- $\beta$  (Fig. 10).

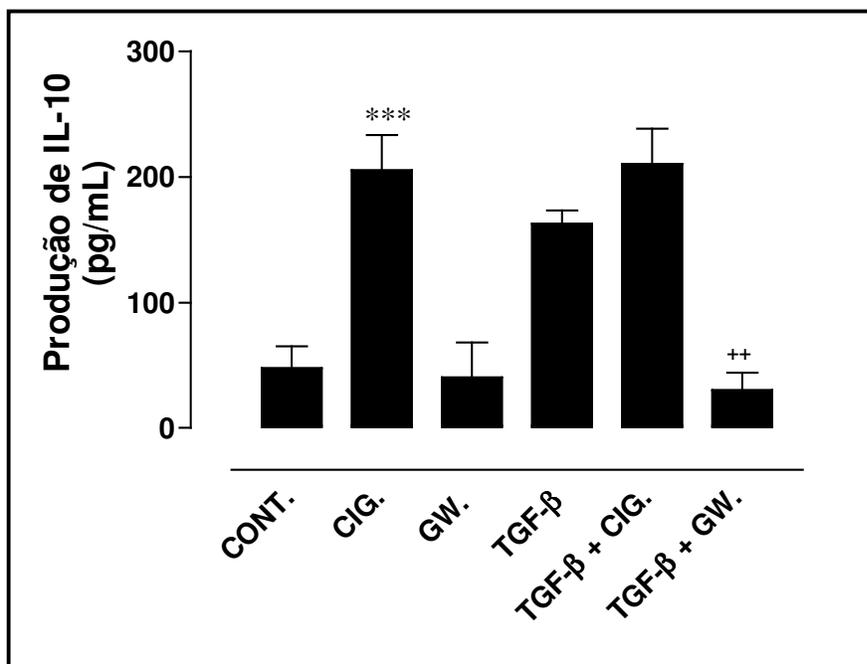


**Figura 10: Os ligantes de PPAR- $\gamma$  modulam o perfil de citocinas anti-inflamatórias.** Macrófagos peritoneais foram tratados com os ligantes de PPAR- $\gamma$  (5 $\mu$ M ambos) por 48h. Ao término deste período, o sobrenadante foi coletado e realizada a quantificação do TGF- $\beta$  secretado através da técnica de ELISA. O LPS (200 ng/mL) foi utilizado como controle positivo da reação. Os asteriscos indicam (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  e (\*\*)  $p \leq 0,01$  em relação ao veículo (DMSO). CONT. (macrófago infectado com *L. major*); DMSO (macrófago infectado e tratado com DMSO); CIG. (ciglitazona); DMSO (dimetilsulfóxido); GW 9662; LPS (lipopolissacarídeo). MÉDIA  $\pm$  S.D. Gráfico representativo de um experimento realizado em triplicata. n=3.

#### **4.8 O AGONISTA DE PPAR- $\gamma$ MODULA POSITIVAMENTE A PRODUÇÃO DE IL-10.**

Como já descrito na literatura, nos modelos de infecção por *Leishmania* spp observa-se a indução da síntese de IL-10 e TGF- $\beta$ , prevenindo a ativação dos macrófagos infectados (MOSSER *et al.*, 1999). Em relação ao PPAR- $\gamma$ , GOSSET e colaboradores (2001) demonstraram que este fator transcricional pode direcionar a resposta imune, favorecendo a resposta do tipo Th2. Considerando-se tais informações, avaliou-se a possível modulação dos ligantes de PPAR- $\gamma$  sobre a produção de IL-10.

Os resultados obtidos mostraram que a ciglitazona induz aumento nos níveis de IL-10 em sobrenadantes de culturas de macrófagos infectados com *L. major*. Quando realizada a incubação simultânea da ciglitazona com o TGF- $\beta$ , foi observado, ainda, um efeito potencializador ou sinérgico da ciglitazona com o TGF- $\beta$ . Quanto ao GW 9662, observou-se que os níveis de IL-10 foram mantidos inalterados. Contudo sob o estímulo exógeno do TGF- $\beta$ , o tratamento com o GW 9662 foi capaz de suprimir a produção de IL-10.



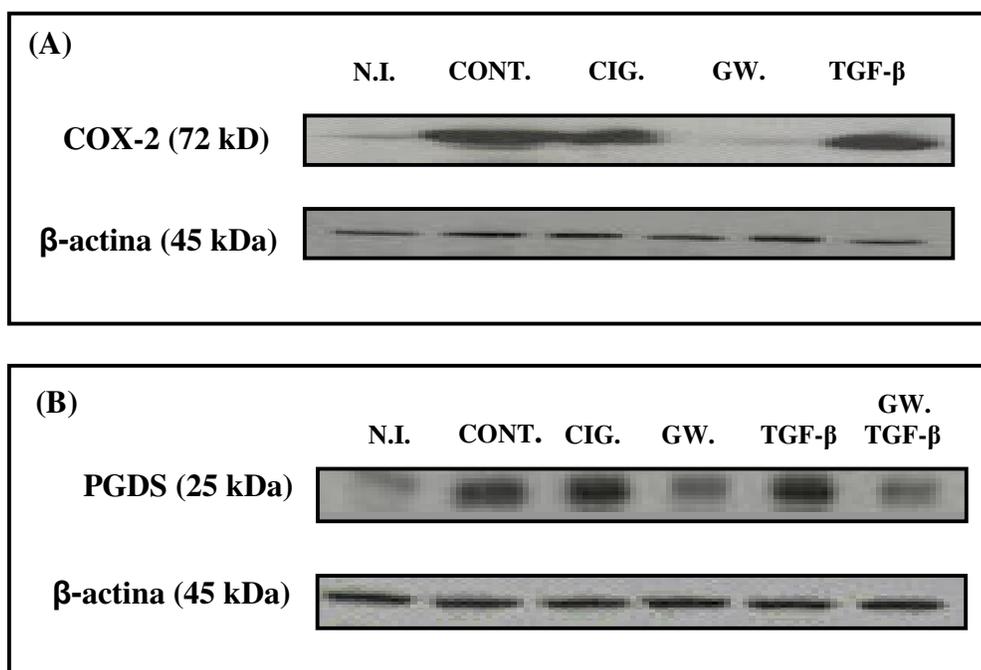
**Figura 11: Os ligantes de PPAR- $\gamma$  modulam o perfil de citocinas anti-inflamatórias.** Macrófagos peritoneais foram tratados com os ligantes de PPAR- $\gamma$ , (ciglitazona (5 $\mu$ M) ou GW 9662 (5 $\mu$ M) por 48h. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e realizada a quantificação de IL-10 através da técnica de ELISA. O LPS (200ng/mL) e TGF- $\beta$  (10ng/mL) foram utilizados como controles positivos da reação. Os símbolos indicam (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  em relação ao veículo (DMSO) e (++)  $p \leq 0,01$  em relação ao TGF- $\beta$ . CONT. (macrófago infectado com *L. major*); DMSO (macrófago infectado e tratado com DMSO); CIG. (ciglitazona); DMSO (dimetilsulfóxido); GW. (GW 9662); LPS (lipopolissacarídeo); TGF- $\beta$  (Fator de transformação e crescimento). MÉDIA  $\pm$  S.D. Gráfico representativo de um experimento realizado em triplicata. n=3.

#### **4.8 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO E SÍNTESE DE MEDIADORES LIPÍDICOS INDUZIDA PELOS LIGANTES DE PPAR- $\gamma$ EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. major*.**

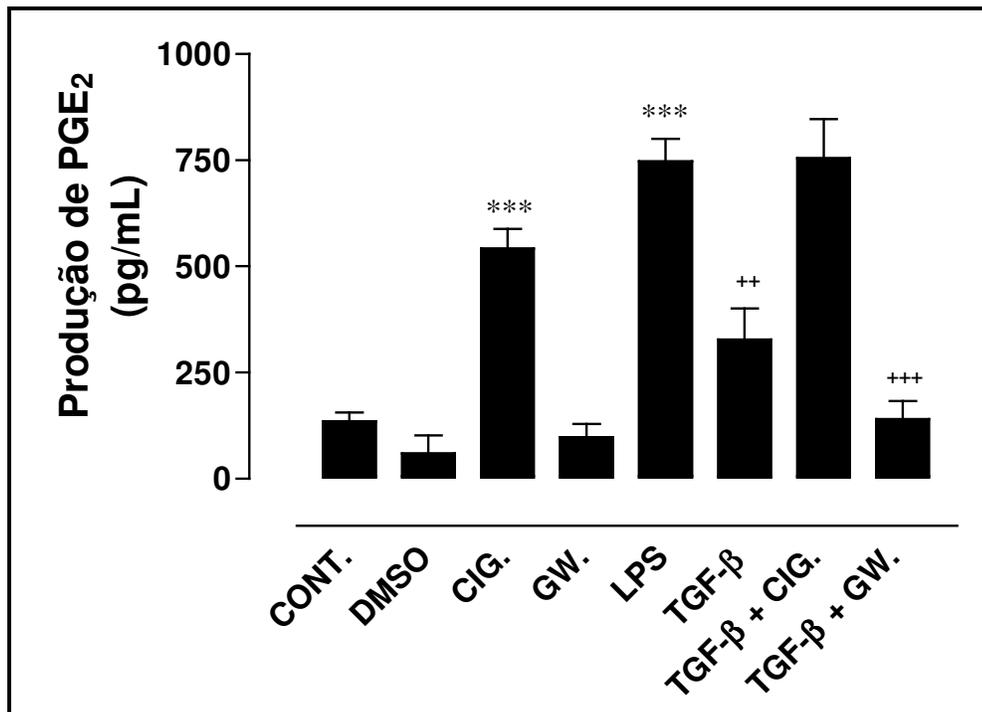
Com o objetivo de avaliar o papel dos mediadores lipídicos sobre o processo de infecção com *L. major*, bem como investigar a associação destes com o PPAR- $\gamma$ , foi analisada a expressão da COX-2, PGD e PGE sintase utilizando a técnica de *Western Blotting*. A figura 12A mostra a diminuição da expressão da COX-2 quando as células infectadas foram tratadas com GW 9662 na presença ou ausência do TGF- $\beta$  (Fig. 12A).

De acordo com as informações da literatura, a PGD<sub>2</sub> pode atuar como ligante de PPAR- $\gamma$  e exercer efeitos biológicos dependentes ou independentes de PPAR- $\gamma$  (HARRIS, 2002). Utilizando-se a técnica de *Western Blotting* verificou-se que o tratamento da cultura de macrófagos com GW 9662 também apresentou efeito inibitório sobre a expressão da PGD sintase com ou sem estímulo do TGF- $\beta$  (Fig 12B).

Além da PGD, outro metabólito da cascata do AA avaliado foi a PGE<sub>2</sub>. Utilizando-se a técnica de ELISA, foi observado que a ciglitazona promoveu aumento significativo nos níveis de PGE<sub>2</sub> quando comparados ao tratamento com DMSO (Fig. 13). Por outro lado, o GW 9662 apresentou um efeito supressor sobre a produção deste mediador lipídico sob o estímulo do TGF- $\beta$ .



**Figura 12: Efeito da ciglitazona e GW 9662 sobre a expressão de enzimas associadas à produção de mediadores lipídicos.** Macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. major* foram incubados por 24h com ciglitazona (5 $\mu$ M) e GW 9662 (5 $\mu$ M). Ao término deste período, as células foram lisadas e o conteúdo protéico avaliado quanto à expressão da COX-2 (A) e PGD sintase (B) através da técnica de *Western Blotting*. COX-2 (ciclooxigenase-2); PGDS (PGD sintase). N.I. (macrófago não-infectado); CONT. (macrófago infectado); DMSO (macrófago infectado e tratado com DMSO); CIG. (ciglitazona); DMSO (dimetilsulfóxido); GW (GW 9662). TGF- $\beta$  (Fator de transformação e crescimento). Figura representativa de um experimento. n=2.

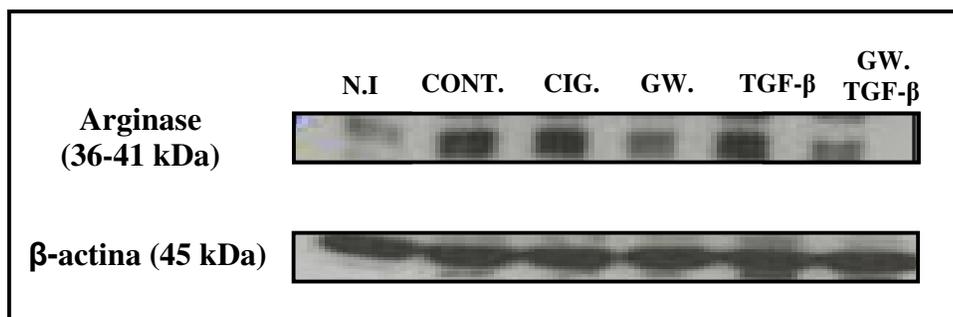


**Figura 13: Atividade moduladora do PPAR- $\gamma$  sobre a produção de PGE<sub>2</sub>.** Macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. major* foram tratados com ciglitazona (5 $\mu$ M) e GW 9662 (5 $\mu$ M) por 48h. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e a dosagem da PGE<sub>2</sub> realizada através da técnica de ELISA. Os asteriscos indicam (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  relação ao veículo (DMSO) e (+++)  $p \leq 0,001$  (++)  $p \leq 0,01$  em relação ao TGF- $\beta$ . CONT. (macrófago infectado com *L. major*); DMSO (macrófago infectado e tratado com DMSO); CIG. (ciglitazona); DMSO (dimetilsulfóxido); GW. (GW 9662); LPS (lipopolissacarídeo); TGF- $\beta$  (Fator de transformação e crescimento tumoral). MÉDIA  $\pm$  S.D. Gráfico representativo de um experimento. n=3.

#### **4.8 EFEITO IMUNOMODULADOR DOS LIGANTES DE PPAR- $\gamma$ SOBRE A EXPRESSÃO DA ENZIMA ARGINASE.**

O macrófago, principal célula hospedeira para a infecção com *L. major*, expressa duas isoformas da enzima arginase, arginase I e arginase II. A isoforma I pode ser induzida por citocinas Th2, tais como IL-4 e IL-10, bem como TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub> (INIESTA *et al.*, 20002; CORRALIZA *et al.*, 1997).

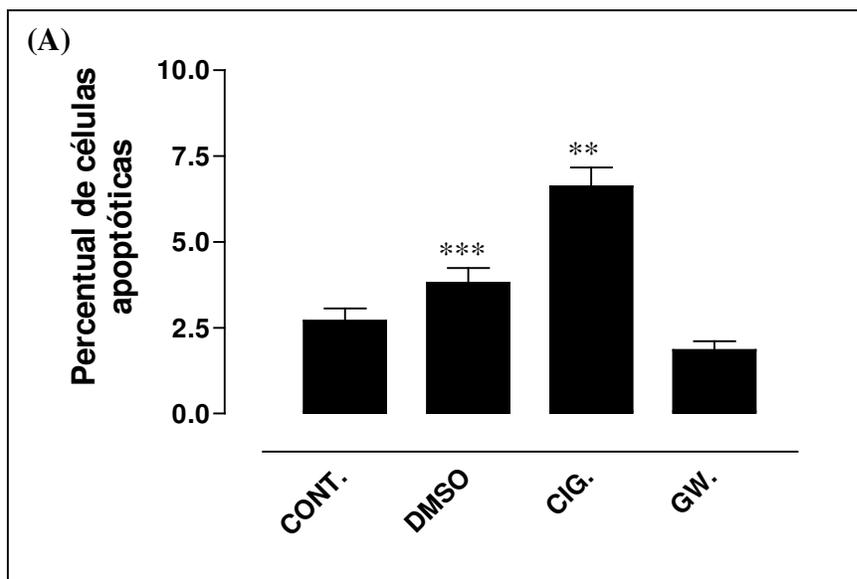
Como os resultados anteriores demonstraram alterações nos níveis de TGF- $\beta$ , IL-10 e PGE<sub>2</sub>, foi verificado se o tratamento com ciglitazona ou GW 9662 poderia modular, também, a expressão desta enzima. Macrófagos peritoneais murinos ( $2 \times 10^6$ /mL) infectados com *L. major* foram submetidos a 24h de tratamento com a ciglitazona e GW 9662. Após este período, as células foram submetidas à lise, recolhidas as proteínas e avaliadas quanto à expressão da enzima arginase empregando a técnica de *Western Blotting*. Os ensaios demonstraram que a ciglitazona induz ao aumento da expressão da arginase. É importante ressaltar que assim como a iNOS, a arginase utiliza como substrato a L-arginina. Portanto, a indução da expressão da arginase promovida pela ciglitazona (agonista) conjugada à atividade estimulatória do GW 9662 (antagonista) sobre a expressão da enzima iNOS sugere um possível mecanismo modulador destes ligantes sobre o equilíbrio da resposta de resistência/susceptibilidade no modelo de leishmaniose experimental utilizado.



**Figura 14: Efeito da ciglitazona e GW 9662 sobre a expressão da arginase.** A expressão da enzima arginase foi avaliada a partir da utilização da técnica de *Western Blotting*. Macrófagos peritoniais infectados com *L. major* foram incubados por 24h com ciglitazona (5μM) e GW 9662 (5μM). Ao término deste período, as células foram lisadas e o conteúdo protéico avaliado quanto à expressão da arginase. N.I. (macrófago não-infectado); CONT. (macrófago infectado com *L. major*); CIG. (ciglitazona); GW. (GW 9662). Figura representativa de um experimento. N=2.

#### **4.9 CIGLITAZONA PROMOVE AUMENTO NO PERCENTUAL DE CÉLULAS APOPTÓTICAS**

Após evidenciado o papel dos ligantes de PPAR- $\gamma$  sobre a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios foi avaliado o envolvimento de vias apoptóticas como alvo da atividade da ciglitazona e GW 9662. Com o objetivo de elucidar tal fenômeno, foi realizada a técnica de TUNEL. Esta técnica apresenta como princípio base a detecção de porções fragmentadas do DNA, uma característica de núcleos apoptóticos. Os experimentos revelaram que a incubação com a ciglitazona na cultura de macrófago infectados ( $3,0 \times 10^5$ /mL) foi capaz de promover um aumento sutil no percentual de células apoptóticas. Como descrito na literatura, os agonistas de PPAR- $\gamma$  podem induzir apoptose em diversos tipos celulares (KANUNFRE *et al.*, 2004). No contexto da infecção, o tênue aumento das células apoptóticas poderia contribuir para o aumento da proliferação do parasita, uma vez que células viáveis fariam o reconhecimento de células apoptóticas infectadas, e desta maneira, auxiliando a desativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos podendo induzir a liberação de fatores antiinflamatórios e favorecer o crescimento do parasita (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2006). Esta produção poderia ser resultado da ação direta da ciglitazona sobre macrófagos e do reconhecimento de células apoptóticas, auxiliando no crescimento do parasita (KANUNFRE *et al.*, 2004).



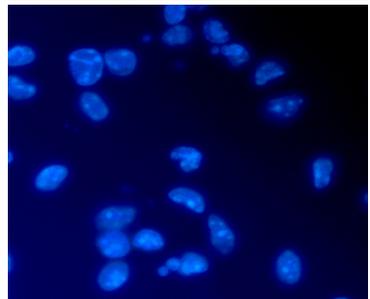
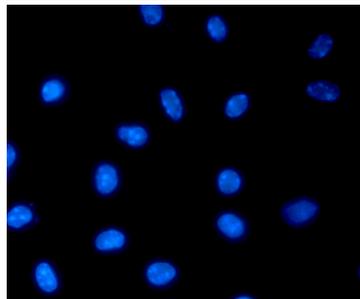
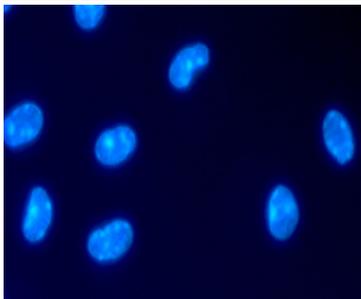
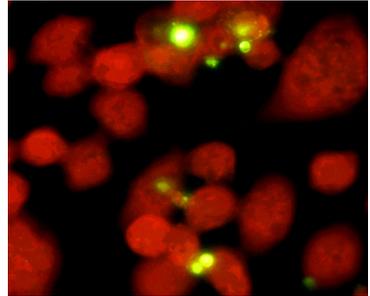
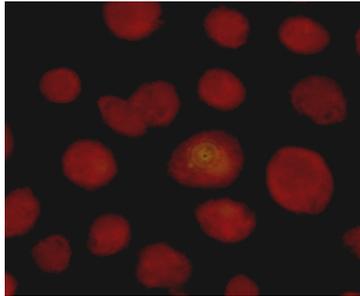
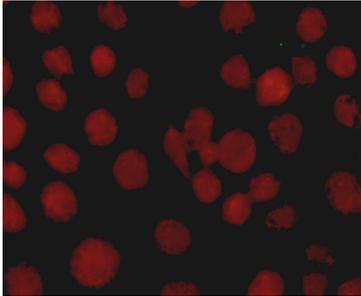
**Figura 15: A ciglitazona induz aumento no percentual de células apoptóticas.** Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com *L. major* por 48h na presença de ciglitazona (5 $\mu$ M) e GW 9662 (5 $\mu$ M). Em seguida foi realizado o ensaio de TUNEL para avaliação de uma possível morte celular por via apoptótica. **(A)** Percentual de células apoptóticas. **(B)** Células apoptóticas visualizadas por microscopia de fluorescência sendo a marcação com FITC de coloração verde (núcleos apoptóticos); marcação com Azul de Evans, coloração vermelha (citoplasma e núcleo celular); e marcação com DAPI, coloração azul (núcleo). Os asteriscos indicam  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0,01$  (\*\*) em relação ao veículo (DMSO). CONT. (macrófago infectado com *L. major*); DMSO (macrófago infectado e tratado com DMSO); CIG. (ciglitazona); DMSO (dimetilsulfóxido); GW. (GW 9662); DEX. (dexametasona ) 1 $\mu$ M. MÉDIA  $\pm$  S.D. n=2 (triplicata).

**(B)**

**CONT.**

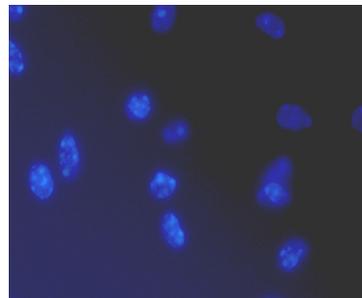
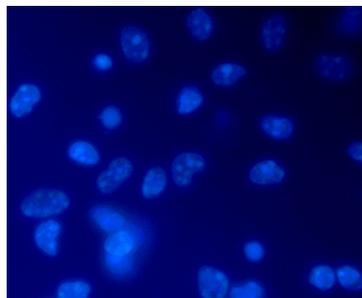
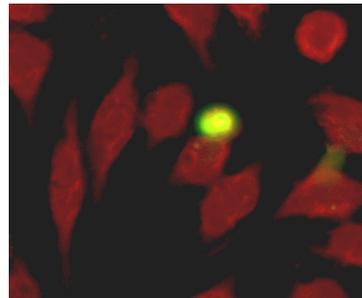
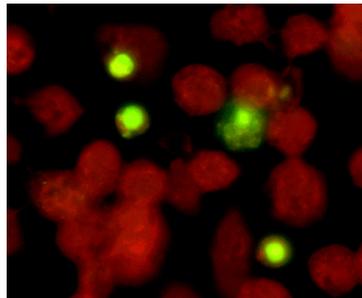
**DMSO**

**DEX.**



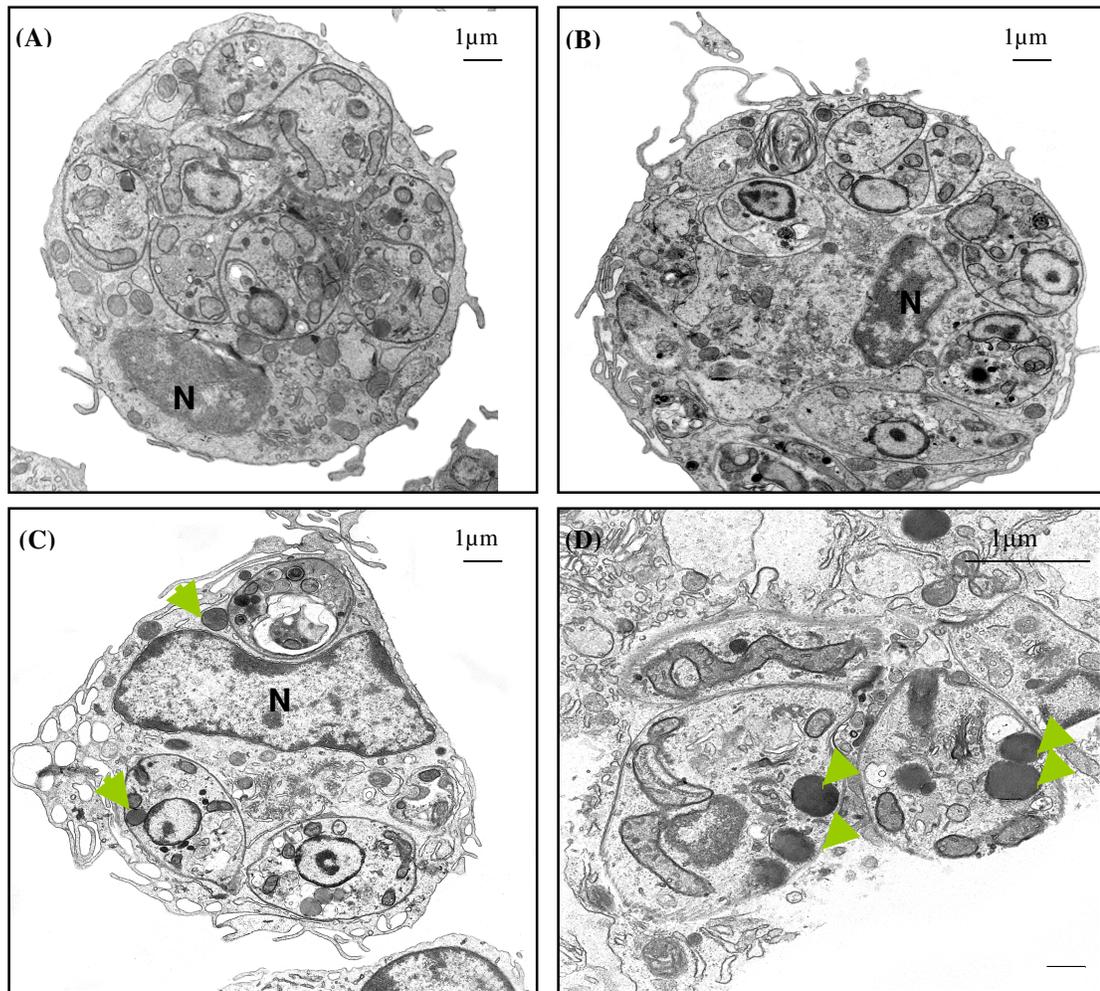
**CIG.**

**GW 9662**

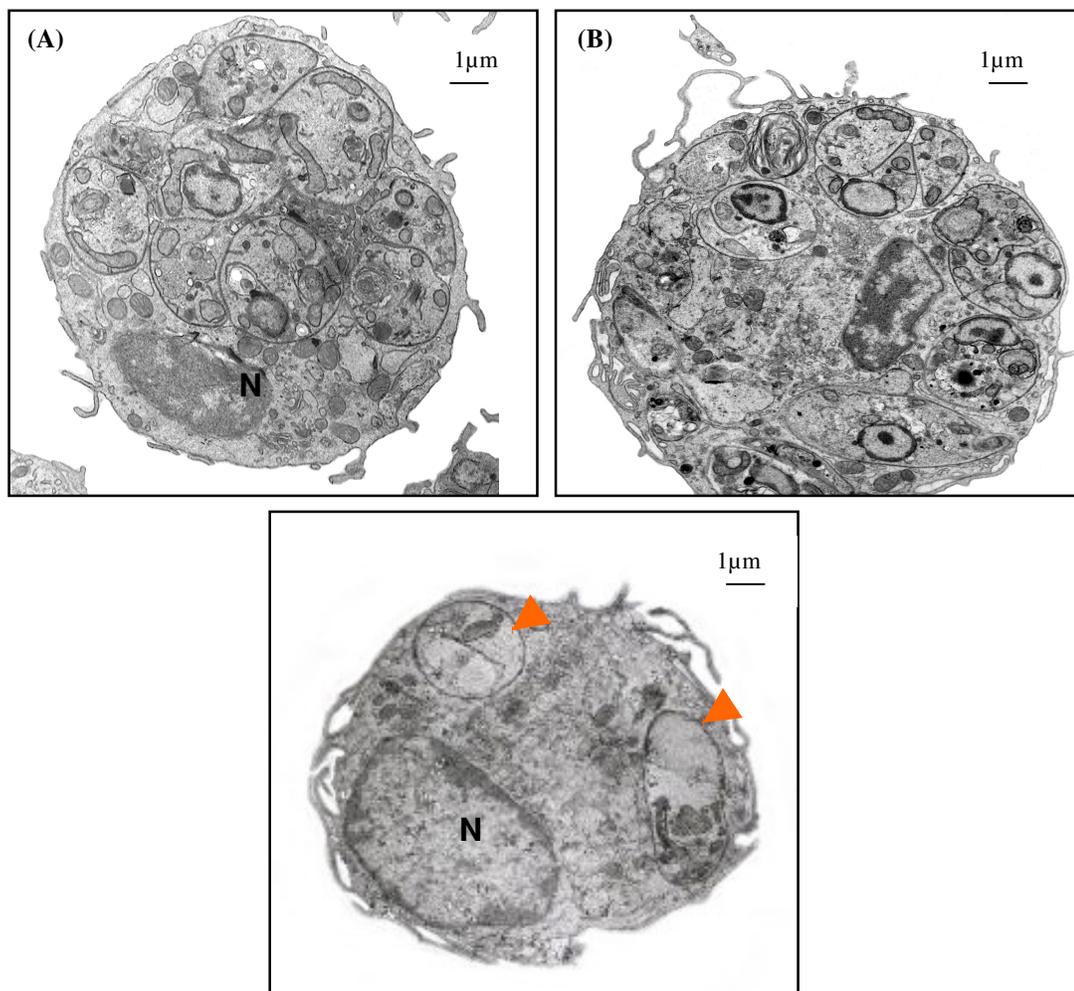


#### **4.10 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR LIGANTES DE PPAR- $\gamma$ NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *L. MAJOR*.**

Após evidenciar a atividade dos ligantes de PPAR- $\gamma$  sobre o repertório de citocinas e mediadores lipídicos envolvidos durante o processo de infecção por *L. major*, foi analisado, através da técnica de microscopia eletrônica, as características morfológicas dos macrófagos tratados com a ciglitazona e GW 9662. Os resultados obtidos evidenciaram a presença de alterações morfológicas nas formas intracelulares. Como indicado na figura 16 a ciglitazona parece induzir a formação de vesículas, provavelmente corpúsculos lipídicos, nas formas intracelulares. Outro aspecto relevante é a ação do GW 9662 sobre o parasita. Na figura 17 é evidenciado um cinetoplasto amorfo além da presença de regiões pouco eletrodensas, indicativo de perda de material citoplasmático.



**Figura 16: A ciglitazona promove alteração na morfologia celular.** Macrófagos peritoniais murinos foram infectados com *L. major* e incubados por 24h com ciglitazona (5 $\mu$ M). Posteriormente o material foi analisado através da técnica de Microscopia Eletrônica. (A) Macrófago infectado com *L. major*) (B) Macrófago infectado e tratado com DMSO (C) Macrófago infectado e tratado com ciglitazona); (D) Macrófago infectado e tratado com GW 9662. (A), (B) e (C) 5000x; (D) 16500x. DMSO (dimetilsulfóxido); N – núcleo; seta verde – corpúsculos lipídicos. As barras indicam 1 $\mu$ m.



**Figura 17: O GW 9662 promove modificações no parasita.** Macrófagos peritoniais murinos foram infectados com *L. major* e tratados com 24h na presença de GW 9662 (5 $\mu$ M). Posteriormente o material foi analisado através da técnica de Microscopia Eletrônica. (A) Macrófago infectado com *L. major*) (B) Macrófago infectado e tratado com DMSO (C) Macrófago infectado e tratado GW 9662. DMSO (dimetilsulfóxido); N – núcleo; seta vermelha – parasitas amorfos. As barras indicam 1 $\mu$ m.

## 5. DISCUSSÃO

O modelo de infecção experimental por *L. major* tem contribuído significativamente para a compreensão da relação parasita-hospedeiro, bem como para elucidação dos mecanismos imunológicos envolvidos nas infecções parasitárias. A resposta imune de diferentes linhagens de camundongos à infecção experimental por *L. major* está vinculada ao paradigma de polarização das células T-*helper*. Neste modelo, a resistência à infecção está baseada na resposta do tipo Th1, caracterizada pela secreção de IFN- $\gamma$ , ativação de macrófagos e produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, os quais promovem a morte do parasita. Por outro lado, a resposta imune do tipo Th2 promove aumento dos níveis de IL-4, IL-13 e IL-10, resultando na proliferação do parasita e progressão da doença (SACKS & NORBEN-TRAUTH, 2002).

Apesar das inúmeras informações obtidas baseando-se no modelo de infecção experimental por *L. major*, não há fármacos eficazes e de reduzida toxicidade disponíveis para o tratamento desta parasitose (CROFT *et al.*, 2006). Assim, faz-se necessário o estudo de novos alvos moleculares a serem empregados no tratamento das leishmanioses. O presente estudo teve por objetivo avaliar o papel do PPAR- $\gamma$  na infecção experimental de macrófagos murinos com *L. major*, visando a compreensão dos fenômenos celulares envolvidos no processo de infecção parasitária, bem como estabelecer uma nova utilização de ligantes de PPAR- $\gamma$  na terapêutica contra leishmaniose. Durante a realização dos experimentos foram utilizados nas culturas de células infectadas, a ciglitazona (agonista de PPAR- $\gamma$ ) pertencente à classe de TZDs, e o GW 9662, um antagonista sintético. De acordo com os dados da literatura, os ligantes de PPAR- $\gamma$  podem modular diversas atividades biológicas, tais como proliferação celular, a  $\beta$ -oxidação de lipídios; o metabolismo de carboidratos, o processo inflamatório e as respostas imunes (CLARK,

2002; CASTRILLO & TONTONNOZ, 2004; GLASS & OGAWA, 2006). Como já evidenciado, o tratamento com pioglitazona (agonista de PPAR- $\gamma$ ) promove o aumento da expressão de IL-4 e redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ ) em modelo de miocardite experimental (HASEGAWA, 2005). Ao contrário, o uso de antagonistas de PPAR- $\gamma$  (BADGE e T0070907) promove o aumento da produção de IFN- $\gamma$  e diferenciação de células Th1, como evidenciado em modelos de encefalomielite experimental (RAIKWAR *et al.*, 2005). Uma vez que os ligantes de PPAR- $\gamma$  parecem influenciar na dicotomia Th1/Th2 nesta dissertação, foi investigado a ação do agonista (ciglitazona) e do antagonista (GW 9662) na infecção experimental com *L. major in vitro*.

A análise da expressão do PPAR- $\gamma$  em macrófagos infectados com *L. major in vitro* demonstrou que a infecção promove aumento na expressão do PPAR- $\gamma$  quando comparado à cultura de macrófagos peritoneais não-infectados. Este dado sugere que a modulação da expressão do PPAR- $\gamma$  através do uso de ligantes (agonistas e antagonistas) constituiria um importante alvo molecular de investigação, podendo alterar o perfil de resposta imune à infecção por *L. major*.

Para investigar a hipótese de que a expressão diferenciada do PPAR- $\gamma$  poderia modular a infecção com *L. major* foram realizados ensaios para avaliação da carga parasitária *in vitro*. Foi observado que o tratamento com GW 9662 reduziu a carga parasitária em relação aos controles não-tratados. Ao contrário, a adição de ciglitazona promoveu aumento da carga parasitária. O antagonista de PPAR- $\gamma$  (GW 9662) promoveu uma discreta redução no percentual de macrófagos infectados e do número de amastigotas por célula. Por outro lado, a ciglitazona promoveu aumento no número de amastigotas e no percentual de macrófagos infectados. Até o momento, não havia estudos relacionando a atividade dos ligantes de PPAR- $\gamma$  no modelo de leishmaniose *in vitro*. Com o objetivo de avaliar se a redução da carga parasitária induzida pelo GW 9662 seria

oriunda de uma atividade citotóxica deste ligante sobre a célula hospedeira, a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi avaliada nos sobrenadantes de culturas tratadas com ciglitazona e GW 9662. Os dados obtidos mostraram que o tratamento com GW 9662 não promoveu alterações celulares capazes de resultar na liberação da LDH, excluindo assim, a possibilidade de morte celular por necrose. Do mesmo modo, a adição de ciglitazona, também, não induziu necrose nos macrófagos.

Após excluir a hipótese de morte celular por uma via necrótica, foi investigada a participação de importantes mediadores celulares imprescindíveis ao fenômeno de resistência à infecção com *L. major*. Sendo NO uma molécula necessária ao controle da proliferação da *L. major* (INIESTA *et al.*, 2001; WEI *et al.*, 1995), foi investigado como os ligantes de PPAR- $\gamma$  poderiam modular a produção deste importante agente microbicida. Observou-se que o antagonista promoveu um aumento na expressão de iNOS e conseqüentemente, da produção do NO. Por outro lado, a ciglitazona, suprimiu a expressão da iNOS, culminando na redução dos níveis de NO em monocamadas de macrófagos infectados estimuladas com LPS. Estes dados estão de acordo com informações da literatura, que mostram que os agonistas de PPAR- $\gamma$ , tais como a 15-d-PGJ<sub>2</sub> e as tiazolidinodionas são capazes de suprimir a produção de NO através da inibição da enzima iNOS em macrófagos murinos ativados com IFN- $\gamma$  e LPS (COLVILLE-NASH *et al.*, 1998; RICOTE *et al.*, 1998). Os resultados apresentados nesta dissertação são os primeiros a relacionar a ação do antagonista de PPAR- $\gamma$  com a expressão de iNOS e liberação de NO

Sabendo-se que a produção de NO pode ser modulada pela ação de citocinas inflamatórias, tais como o TNF- $\alpha$ , avaliou-se a possível participação desta citocina no modelo da infecção com *L. major*. Este mediador é capaz de atuar sinergicamente com outros mediadores inflamatórios, como o IFN- $\gamma$ , na ativação de macrófagos, induzindo a produção de NO, e assim,

controlando a proliferação da *L. major* (GREEN *et al.*, 1990). Os resultados obtidos nesta dissertação evidenciaram que o tratamento com GW 9662 promoveu aumento na produção de TNF- $\alpha$ . Assim, o estímulo à produção do TNF- $\alpha$  mediado pelo antagonista de PPAR- $\gamma$  é capaz de promover a ativação de macrófagos o que resulta no aumento da produção de NO, mediador responsável pela morte de patógenos intracelulares. A ciglitazona, por outro lado, apresentou efeito inibitório sobre a produção de TNF- $\alpha$  mesmo sob estímulo de LPS. O efeito potencializador do antagonista na produção de TNF- $\alpha$  e a atividade supressora do agonista estão de acordo com as informações da literatura. Os agonistas naturais e sintéticos de PPAR- $\gamma$  são capazes de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos murinos, tais como IL-6 e TNF- $\alpha$  (ALLEVA *et al.*, 2002). Outros modelos experimentais também evidenciaram tais efeitos supressores; o TNF- $\alpha$ , um dos mediadores responsáveis pela resistência à insulina, apresenta seu efeito antagonizado pelas TZDs (IWATA *et al.*, 2001). Em doenças autoimunes, também foi evidenciado o efeito supressor da pioglitazona (um fármaco da classe das TZDs) sobre a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (HASEGAWA *et al.*, 2005).

Após avaliar alguns dos possíveis intermediários responsáveis pela redução da carga parasitária, foram analisados outros mediadores de perfil antiinflamatórios, tais como o TGF- $\beta$ , IL-10, PGE<sub>2</sub> e algumas sintases da cascata do AA, elementos que poderiam estar associados ao aumento da carga parasitária evidenciada pelo tratamento com o agonista. O primeiro mediador estudado foi o TGF- $\beta$ , um importante modulador do sistema imune, capaz de inibir a diferenciação e proliferação de células T (GORELIK *et al.*, 2002). Sua participação nos processos de infecção chagásica experimental foi evidenciada por GAZZINELLI e colaboradores (1992) através de estudo demonstrando a ação antiinflamatória desta citocina, resultando na desativação da atividade microbicida do macrófago e, portanto, culminando na proliferação do parasita. Sob tratamento da ciglitazona, os macrófagos infectados apresentaram um aumento

significativo na secreção de TGF- $\beta$ . A elevação dos níveis do TGF- $\beta$  sugere uma atividade moduladora da ciglitazona sobre a produção desta citocina, contribuindo, portanto, para o aumento no número de amastigotas nos macrófagos infectados.

Outra importante citocina com ação antiinflamatória quantificada foi a IL-10. Semelhante ao efeito evidenciado sobre a produção de TGF- $\beta$ , a ciglitazona também promoveu uma elevação dos níveis de IL-10 produzidos pelos macrófagos infectados. Este agonista parece potencializar ou agir sinergicamente com o TGF- $\beta$ , resultando em um aumento, ainda maior, dos níveis de IL-10 no sobrenadante da cultura de macrófagos infectados. Por outro lado, o antagonista, GW 9662, apresentou efeito inibitório sobre a produção desta citocina, mesmo sob incubação simultânea com o TGF- $\beta$ . Estas informações corroboram com as informações descritas na literatura que demonstram a capacidade de agonistas de PPAR- $\gamma$  reduzirem a produção de IL-10 em modelos de colite experimental (RAMAKERS *et al.*, 2007).

Em relação aos prostanóides, investigou-se a participação da enzima COX-2 e PGD sintase, além da quantificação da PGE<sub>2</sub>. Ao avaliar a expressão da enzima COX-2 (uma isoforma da cicloxigenase induzida sob condições inflamatórias) foi mostrado que o GW 9662 atua como um agente supressor da expressão desta enzima. Quando analisada a expressão da PGD sintase, responsável pela produção de 15-d-PGJ<sub>2</sub> (agonista de PPAR- $\gamma$ ), foi verificado um perfil semelhante, ou seja, um efeito inibitório da expressão da PGD sintase, resultante da ação do GW 9662. REILLY e colaboradores (2001) evidenciaram que a rosiglitazona (agonista de PPAR- $\gamma$ ) e a 15-d-PGJ<sub>2</sub> são capazes de bloquear a produção de NO em macrófagos sob estímulo do LPS. Desta maneira, o aumento da síntese de NO observado sob tratamento com GW 9662 poderia ser resultante da ação inibitória sobre a expressão da PGD sintase.

Em relação à PGE<sub>2</sub>, um prostanóide que apresenta um efeito indutor na proliferação de parasitas intracelulares (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000), foi demonstrado que a ciglitazona é

capaz de promover aumento dos níveis de PGE<sub>2</sub>, enquanto o GW 9662 parece não alterar significativamente a síntese deste mediador. Quando sob o estímulo do TGF- $\beta$ , o antagonista (GW 9662) mantém sua ação supressora sobre a produção da PGE<sub>2</sub>, evidenciando, portanto, sua capacidade de modular a síntese de PGE<sub>2</sub> induzida por TGF- $\beta$ . (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000; HIRAGA, 2006). Assim, evidenciamos que o aumento da PGE<sub>2</sub> (nesse contexto apresentando ação antiinflamatória) promovido pela ciglitazona parece justificar o aumento na replicação das formas amastigotas do parasita evidenciado nos experimentos descritos nesta dissertação.

Além da IL-10, TGF- $\beta$  e prostanóides, a proliferação da *Leishmania* dentro dos macrófagos pode ser controlada pela produção da arginina e atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC) (INIESTA *et al.*, 2001). Como já descrito na literatura, a proliferação de *T. cruzi* pode ser exacerbada pela co-incubação de células infectadas com células apoptóticas, resultando no aumento da atividade das enzimas arginase e ODC, e, portanto, dos níveis de poliaminas favorecendo o desenvolvimento do parasita (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). Considerando-se o papel da arginase no fenômeno de proliferação parasitária, foi investigada a participação desta no modelo de leishmaniose experimental *in vitro* sob o tratamento com os ligantes de PPAR- $\gamma$ . Os dados obtidos no *Western Blotting* sugerem que a ciglitazona, ao suprimir a expressão da iNOS, promoveria um desvio na utilização da L-arginina, podendo direcionar à ativação da via arginase/ODC e levar ao aumento da produção de poliaminas. A elevação dos níveis destes compostos favoreceria o crescimento da *L. major* no interior dos macrófagos infectados, fato demonstrado pelo maior percentual de macrófagos infectados e maior número de amastigotas verificado nos macrófagos tratados com ciglitazona. Por outro lado, o GW 9662 mostra-se como um agente supressor da atividade da arginase, mesmo sob o estímulo do TGF- $\beta$ . Ratificando a possível atividade dos ligantes de PPAR- $\gamma$  na via arginase/ODC,

LINSALATA e colaboradores (2006) demonstraram que a expressão de PPAR- $\gamma$  está associada ao aumento da expressão dos níveis de mRNA da ornitina descarboxilase (ODC).

Após evidenciar a elevação dos níveis de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub>, resultante da ação direta dos ligantes de PPAR- $\gamma$  sobre a síntese destes compostos, também foi investigado o envolvimento de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub> como produtos da via de morte por apoptose nas células. O ensaio de TUNEL mostrou que a ciglitazona promoveu um aumento discreto no percentual de macrófagos apoptóticos. Estas informações coincidem com dados prévios da literatura, que demonstraram o efeito apoptótico dos agonistas de PPAR- $\gamma$  (15-d-PGJ<sub>2</sub> e ciglitazona) em linhagens de células T e B (Jurkat e Raji, respectivamente) (KANUNFRE *et al.*, 2004). Após o tratamento com o agonista do PPAR- $\gamma$  as células apoptóticas seriam reconhecidas por outros macrófagos não-apoptóticos levando à produção de TGF- $\beta$  e IL-10; aumento da síntese de poliaminas e, portanto, culminando no aumento da proliferação do parasita. O papel das células apoptóticas na desativação de macrófagos já foi evidenciado em modelos de infecção com *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2006). Ressalta-se que a via de apoptose seria um mecanismo complementar, e não a principal via de produção destes mediadores, uma vez que o percentual de macrófagos apoptóticos foi pouco significativo.

Além das alterações promovidas no perfil da resposta imune à infecção por *L. major*, estudos complementares foram realizados para avaliar a atividade dos ligantes de PPAR- $\gamma$  sobre a morfologia celular. A análise estrutural dos macrófagos evidenciou que o tratamento com a ciglitazona favoreceu a formação de estruturas intracelulares (nos macrófagos e nas formas amastigotas) semelhantes a corpúsculos lipídicos (CLs). A formação dos CLs poderia favorecer a produção de mediadores lipídicos e dessa maneira, auxiliando na imunomodulação de macrófagos, inibindo sua capacidade microbicida e favorecendo o crescimento do parasita. Por outro lado, o tratamento com o antagonista (GW 9662) promoveu alterações morfológicas

significativas no parasita, fato evidenciado pela perda de conteúdo citoplasmático. Este fenômeno poderia levar à morte do parasita, justificando a redução da carga parasitária observada com o tratamento com GW 9662.

É de grande relevância prosseguir com o estudo dos ligantes de PPAR- $\gamma$  sobre a infecção por *L. major*. Nesta dissertação foi demonstrado um perfil imunomodulador dos ligantes de PPAR- $\gamma$  sobre macrófagos infectados. Com o objetivo de ratificar nossos resultados e delinear o mecanismo de ação dos ligantes, mostra-se imprescindível à avaliação de sua atividade destes em modelos *in vivo*. Com base nos resultados aqui apresentados, sugerimos que a modulação da via do PPAR- $\gamma$  pode constituir um novo alvo terapêutico para o tratamento das leishmanioses.

## 6. CONCLUSÕES

- O processo de infecção por *L. major* induz o aumento da expressão do PPAR- $\gamma$ ;
- Os ligantes de PPAR- $\gamma$  exercem efeitos imunomoduladores no modelo de infecção experimental de macrófagos murinos por *L. major*;
- Efeitos evidenciados na cultura celular tratada com GW 9662 (antagonista), promovendo resistência à infecção:

redução da carga parasitária *in vitro*, bem como do percentual de macrófagos infectados e do número de amastigotas por célula;

elevação dos níveis de TNF- $\alpha$  e NO;

aumento da expressão da enzima iNOS;

inibição da expressão das enzimas COX-2 e arginase;

- Atividade da ciglitazona (agonista) na cultura celular favorecendo a susceptibilidade à infecção celular:

aumento da carga parasitária;

aumento dos níveis de TGF- $\beta$ , IL-10 e PGE<sub>2</sub>;

elevação no percentual de células apoptóticas de forma a favorecer o parasita;

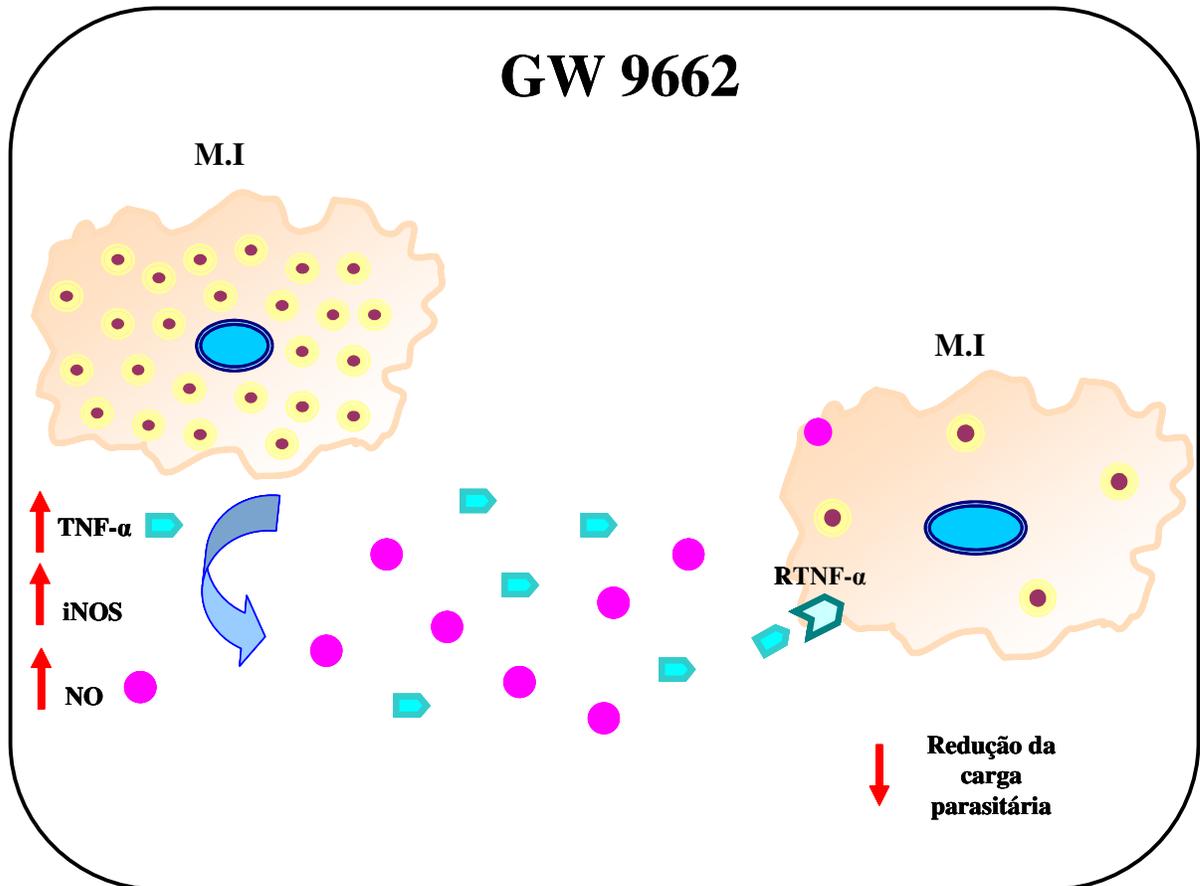
diminuição da expressão da enzima iNOS;

aumento da expressão da enzima arginase;

estímulo à formação de corpúsculos lipídicos nas formas amastigotas;

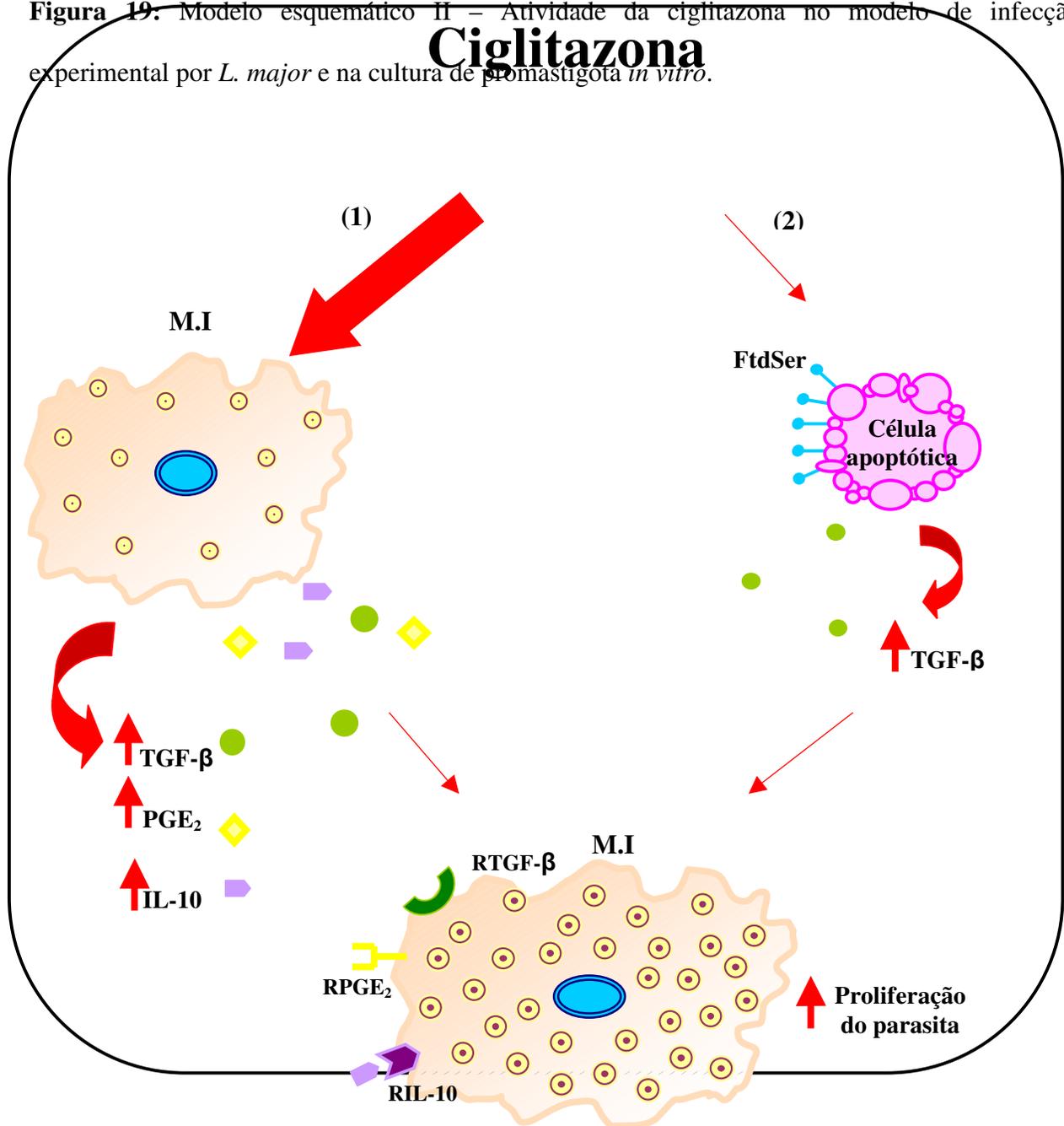
- Nos modelos esquemáticos I e II são descritas, resumidamente, as principais atividades moduladoras exercidas pelos ligantes de PPAR- $\gamma$
- Os resultados obtidos sugerem que o PPAR- $\gamma$  constitui um possível alvo terapêutico para o tratamento das leishmanioses.

**Figura 18:** Modelo esquemático I – Efeito do GW 9662 no modelo de infecção experimental por *L. major* e na cultura de promastigota *in vitro*.



iNOS - Óxido nítrico sintase induzida; NO – Óxido nítrico; RTNF- $\alpha$  – Receptor do Fator de necrose tumoral; TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral; M.I - macrófago infectado com *L. major*.

**Figura 19:** Modelo esquemático II – Atividade da ciglitazona no modelo de infecção experimental por *L. major* e na cultura de promastigota *in vitro*.



**Ftd**

**Ser** – Fosfatidilserina; **RFtdSer** – Receptor de Fosfatidilserina; **TGF-β** – Fator de transformação e crescimento tumoral; **RTGF-β** – Receptor do fator de transformação e crescimento tumoral; **PGE<sub>2</sub>** – Prostaglandina E<sub>2</sub>; **IL-10** – Interleucina 10; **RIL-10** Receptor da interleucina 10; **M.I** - macrófago infectado com *L. major*.(1) Via principal de ação da ciglitazona; (2) Via secundária de ação da ciglitazona.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEVA, D. G., *et al.* Regulation of murine macrophage proinflammatory and anti-inflammatory cytokines by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: counter-regulatory activity by IFN-gamma. **J Leukoc Biol**, 71: 677-85, 2002.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. **Indian J Med Res**, 119: 238-58, 2004.

BEEBE, A. M., *et al.* Serial backcross mapping of multiple loci associated with resistance to Leishmania major in mice. **Immunity**, 6: 551-7, 1997.

BERGER, J., *et al.* Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. **J Biol Chem**, 274: 6718-25, 1999.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Rev Infect Dis**, 10: 560-86, 1988.

BISHOP-BAILEY, D.; WRAY, J. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, 71: 1-22, 2003.

BLACKWELL, J. M. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. **Parasitology**, 112 Suppl: S67-74, 1996.

BLOOM, D., *et al.* Prostaglandin E2 enhancement of interferon-gamma production by antigen-stimulated type 1 helper T cells. **Cell Immunol**, 194: 21-7, 1999.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr Opin Immunol**, 12: 64-76, 2000.

BRAISSANT, O., *et al.* Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. **Endocrinology**, 137: 354-66, 1996.

BROWN, D. M., *et al.* Prostaglandin E2 induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes. **Clin Immunol Immunopathol**, 63: 221-9, 1992.

CASTRILLO, A.; TONTONNOZ, P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 20: 455-80, 2004.

CHATELAIN, R.; MAUZE, S.; COFFMAN, R. L. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. **Parasite Immunol**, 21: 211-8, 1999.

CHATELAIN, R.; VARKILA, K.; COFFMAN, R. L. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. **J Immunol**, 148: 1182-7, 1992.

CHAWLA, A., *et al.* Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. **Science**, 294: 1866-70, 2001.

CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. **Int Rev Immunol**, 17: 1-52, 1998.

CHTANOVA, T., *et al.* Gene microarrays reveal extensive differential gene expression in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> type 1 and type 2 T cells. **J Immunol**, 167: 3057-63, 2001.

CLARK, R. B. The role of PPARs in inflammation and immunity. **J Leukoc Biol**, 71: 388-400, 2002.

COLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends Parasitol**, 21: 244-9, 2005.

COLVILLE-NASH, P. R., *et al.* Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. **J Immunol**, 161: 978-84, 1998.

COOK, A. D.; BRAINE, E. L.; HAMILTON, J. A. The phenotype of inflammatory macrophages is stimulus dependent: implications for the nature of the inflammatory response. **J Immunol**, 171: 4816-23, 2003.

COUTURIER, C., *et al.* Interleukin 1beta induces type II-secreted phospholipase A(2) gene in vascular smooth muscle cells by a nuclear factor kappaB and peroxisome proliferator-activated receptor-mediated process. **J Biol Chem**, 274: 23085-93, 1999.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, 19: 502-8, 2003.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J Med Res**, 123: 399-410, 2006.

CUNARD, R., *et al.* Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. **J Immunol**, 168: 2795-802, 2002.

DA-CRUZ, A. & PIRMEZ, C. In: **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, Editor José Rodrigues Coura – Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp: 697-712, 2005.

DA-SILVA, S. A.; COSTA, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B. The anti-leishmanial effect of Kalanchoe is mediated by nitric oxide intermediates. **Parasitology**, 118 ( Pt 6): 575-82, 1999.

DAYNES, R. A.; JONES, D. C. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, 2: 748-59, 2002.

DE FREITAS, L. A., *et al.* Indomethacin treatment slows disease progression and enhances a Th1 response in susceptible BALB/c mice infected with Leishmania major. **Parasite Immunol**, 21: 273-7, 1999.

DEROUICH-GUERGOUR, D., *et al.* Tumour necrosis factor alpha receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. **Int J Parasitol**, 31: 763-9, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 27: 305-18, 2004.

EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, 240: 889-95, 1988.

FADOK, V. A., *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest**, 101: 890-8, 1998.

FAJAS, L.; FRUCHART, J. C.; AUWERX, J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. **FEBS Lett**, 438: 55-60, 1998.

FOOTE, S. J.; HANDMAN, E. Genetics of murine leishmaniasis. **Brief Funct Genomic Proteomic**, 4: 270-6, 2005.

FORMAN, B. M., *et al.* 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. **Cell**, 83: 803-12, 1995.

FOURNET, A., *et al.* Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. **J Ethnopharmacol**, 37: 159-64, 1992.

FRANKE, E. D., *et al.* Efficacy of 28-day and 40-day regimens of sodium stibogluconate (Pentostam) in the treatment of mucosal leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, 51: 77-82, 1994.

\_\_\_\_\_. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. **Ann Intern Med**, 113: 934-40, 1990.

FREIRE-DE-LIMA, C. G., *et al.* Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, 403: 199-203, 2000.

GARRONE, P., *et al.* Regulatory effects of prostaglandin E2 on the growth and differentiation of human B lymphocytes activated through their CD40 antigen. **J Immunol**, 152: 4282-90, 1994.

GASSER, R. A., JR., *et al.* Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, 18: 83-90, 1994.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**, 119: 493-501, 1992.

GAZZINELLI, R. T., *et al.* The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated

mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol**, 22: 2501-6, 1992.

GHOSH, M., *et al.* Dendritic cell-based immunotherapy combined with antimony-based chemotherapy cures established murine visceral leishmaniasis. **J Immunol**, 170: 5625-9, 2003.

GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, 6: 44-55, 2006.

GOETZL, E. J.; AN, S.; SMITH, W. L. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. **Faseb J**, 9: 1051-8, 1995.

GOMES, N. A., *et al.* TGF-beta mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar. **J Immunol**, 164: 2001-8, 2000.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, 3: 23-35, 2003.

GORELIK, L.; CONSTANT, S.; FLAVELL, R. A. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. **J Exp Med**, 195: 1499-505, 2002.

GOSSET, P., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **Eur J Immunol**, 31: 2857-65, 2001.

GREEN, L. C., *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, 126: 131-8, 1982.

GREEN, S. J., *et al.* Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **J Immunol**, 145: 4290-7, 1990.

GUMY, A.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with Leishmania major and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **Int J Parasitol**, 34: 433-44, 2004.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol Rev**, 14: 229-43, 2001.

HARIZI, H., *et al.* Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. **Cell Immunol**, 209: 19-28, 2001.

HARRIS, S. G., *et al.* Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol**, 23: 144-50, 2002a.

HARRIS, S. G.; PHIPPS, R. P. The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. **Eur J Immunol**, 31: 1098-105, 2001.

\_\_\_\_\_. Prostaglandin D(2), its metabolite 15-d-PGJ(2), and peroxisome proliferator activated receptor-gamma agonists induce apoptosis in transformed, but not normal, human T lineage cells. **Immunology**, 105: 23-34, 2002b.

HASEGAWA, H., *et al.* Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma activator, ameliorates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th1/Th2 balance. **J Mol Cell Cardiol**, 38: 257-65, 2005.

HEINZEL, F. P., *et al.* Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J Exp Med**, 177: 1505-9, 1993.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, 354: 1191-9, 1999a.

\_\_\_\_\_. Miltefosine--the long-awaited therapy for visceral leishmaniasis **N Engl J Med**, 341: 1840-2, 1999b.

HIHI, A. K.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. **Cell Mol Life Sci**, 59: 790-8, 2002.

HILKENS, C. M., *et al.* Modulation of T-cell cytokine secretion by accessory cell-derived products. **Eur Respir J Suppl**, 22: 90s-94s, 1996.

HIRAGA, T., *et al.* Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor-beta enhances bone metastases in breast cancer. **Cancer Res**, 66: 2067-73, 2006.

HOLMGREN, J., *et al.* Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. **Immunol Lett**, 97: 181-8, 2005.

HUANG, J. T., *et al.* Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. **Nature**, 400: 378-82, 1999.

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-l-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages. **J Exp Med**, 193: 777-84, 2001.

ISSEMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, 347: 645-50, 1990.

IWATA, M., *et al.* Pioglitazone ameliorates tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance by a mechanism independent of adipogenic activity of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Diabetes**, 50: 1083-92, 2001.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, 391: 82-6, 1998.

JULIA, V.; RASSOULZADEGAN, M.; GLAICHENHAUS, N. Resistance to Leishmania major induced by tolerance to a single antigen. **Science**, 274: 421-3, 1996.

KABUTUTU, Z., *et al.* Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H2 reductase in Leishmania. **Int J Parasitol**, 33: 221-8, 2003.

KAMANAKA, M., *et al.* Protective role of CD40 in Leishmania major infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. **Immunity**, 4: 275-81, 1996.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J Immunol**, 166: 1141-7, 2001.

KANUNFRE, C. C., *et al.* Ciglitazone and 15d PGJ2 induce apoptosis in Jurkat and Raji cells. **Int Immunopharmacol**, 4: 1171-85, 2004.

KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. Leishmania vaccines: progress and problems. **Parasitology**, 133 Suppl: S87-112, 2006.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, 26: 239-57, 1972.

KERSTEN, S., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. **J Clin Invest**, 103: 1489-98, 1999.

KISHORE, K., *et al.* Vector control in leishmaniasis. **Indian J Med Res**, 123: 467-72, 2006.

\_\_\_\_\_. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. **Nature**, 355: 446-9, 1992a.

\_\_\_\_\_. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**, 358: 771-4, 1992b.

KOPF, M., *et al.* IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. **J Exp Med**, 184: 1127-36, 1996.

KOSKI, C. L., *et al.* Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 80: 3816-20, 1983.

KOTA, B. P.; HUANG, T. H.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacol Res**, 51: 85-94, 2005.

LI, A. C.; PALINSKI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: how their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 46: 1-39, 2006.

LI, J.; HUNTER, C. A.; FARRELL, J. P. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. **J Immunol**, 162: 974-9, 1999.

LI, Y. M., *et al.* Glycation products in aged thioglycollate medium enhance the elicitation of peritoneal macrophages. **J Immunol Methods**, 201: 183-8, 1997.

LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. **Adv Parasitol**, 32: 161-259, 1993.

LIEW, F. Y., *et al.* Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, 69: 570-3, 1990.

LIM, H.; DEY, S. K. A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors. **Endocrinology**, 143: 3207-10, 2002.

LINSALATA, M., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene expressions are significantly correlated in human colorectal cancer. **BMC Cancer**, 6: 191, 2006.

LOPES, M. F., FREIRE- DE-LIMA, C. G., *et al.* The macrophage haunted by cell ghosts: a pathogen grows. **Immunol Today**, 21:10, 489-94, 2000.

MALHERBE, L., *et al.* Selective activation and expansion of high-affinity CD4+ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. **Immunity**, 13: 771-82, 2000.

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

MEIRHAEGHE, A., *et al.* Impact of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 24: 195-9, 2000.

MEYERHOFF, A. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, 28: 42-8; discussion 49-51, 1999.

MITCHELL, G. F., *et al.* Resistance and abrogation of resistance to cutaneous leishmaniasis in reconstituted BALB/c nude mice. **Aust J Exp Biol Med Sci**, 59: 539-54, 1981.

MODOLELL, M., *et al.* Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. **Eur J Immunol**, 25: 1101-4, 1995.

MOHRS, M., *et al.* Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. **J Immunol**, 162: 7302-8, 1999.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, 7: 145-73, 1989.

MULLER, I., *et al.* Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. **Infect Immun**, 61: 3730-8, 1993.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. **J Immunol**, 160: 5347-54, 1998.

MUNDER, M., *et al.* Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **J Immunol**, 163: 3771-7, 1999.

MURRAY, H. W. Progress in the treatment of a neglected infectious disease: visceral leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, 2: 279-92, 2004.

NARUMIYA, S. Prostanoid receptors. Structure, function, and distribution. **Ann N Y Acad Sci**, 744: 126-38, 1994.

NASHLEANAS, M.; SCOTT, P. Activated T cells induce macrophages to produce NO and control *Leishmania major* in the absence of tumor necrosis factor receptor p55. **Infect Immun**, 68: 1428-34, 2000.

NISHIO, T., *et al.* Molecular identification of a rat novel organic anion transporter moat1, which transports prostaglandin D(2), leukotriene C(4), and taurocholate. **Biochem Biophys Res Commun**, 275: 831-8, 2000.

NUNES, M. P., *et al.* CD40 signaling induces reciprocal outcomes in *Leishmania*-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. **Microbes Infect**, 7: 78-85, 2005.

OLIVER, W. R., JR., *et al.* A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98: 5306-11, 2001.

PADILLA, J., *et al.* Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells. **J Immunol**, 165: 6941-8, 2000a.

\_\_\_\_\_. PPAR-gamma-mediated regulation of normal and malignant B lineage cells. **Ann N Y Acad Sci**, 905: 97-109, 2000b.

PADILLA, J.; KAUR, K.; PHIPPS, R. P. Effects of 15-deoxy-delta 12,14-PGJ2 on B lineage cells. **Ann N Y Acad Sci**, 905: 322-5, 2000c.

PETERS-GOLDEN, M., *et al.* Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. **J Immunol**, 174: 589-94, 2005.

PHIPPS, R. P.; STEIN, S. H.; ROPER, R. L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunol Today**, 12: 349-52, 1991.

PHULWANI, N. K., *et al.* 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) and ciglitazone modulate Staphylococcus aureus-dependent astrocyte activation primarily through a PPAR-gamma-independent pathway. **J Neurochem**, 99: 1389-1402, 2006.

PINTO, E. F.; DE MELLO CORTEZIA, M.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma-inducing oral vaccination with Leishmania amazonensis antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, 21: 3534-41, 2003.

PINTO, E. F., *et al.* Intranasal vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishmanial antigen or DNA encoding LACK. **Infect Immun**, 72: 4521-7, 2004.

RAIKWAR, H. P., *et al.* PPARgamma antagonists exacerbate neural antigen-specific Th1 response and experimental allergic encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, 167: 99-107, 2005.

RAMAKERS, J. D., *et al.* The PPARgamma Agonist Rosiglitazone Impairs Colonic Inflammation in Mice with Experimental Colitis. **J Clin Immunol**, 27: 275-83, 2007.

REILLY, C. M., *et al.* Prostaglandin J(2) inhibition of mesangial cell iNOS expression. **Clin Immunol**, 98: 337-45, 2001.

RIBEIRO-GOMES, F. L., *et al.* Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J Immunol**, 172: 4454-62, 2004.

RICOTE, M., *et al.* Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95: 7614-9, 1998.

RITTER, U., *et al.* The control of *Leishmania (Leishmania) major* by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. **Microbes Infect**, 6: 559-65, 2004.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol Today**, 16: 292-7, 2000.

ROBINSON, R. F.; NAHATA, M. C. A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B. **J Clin Pharm Ther**, 24: 249-57, 1999.

ROSSI, A., *et al.* Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I $\kappa$ B kinase. **Nature**, 403: 103-8, 2000.

RUTSCHMAN, R., *et al.* Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. **J Immunol**, 166: 2173-7, 2001.

SACKS, D.; ANDERSON, C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. **Immunol Rev**, 201: 225-38, 2004.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol**, 2: 845-58, 2002.

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

SEREZANI, C. H., *et al.* Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. **J Immunol**, 177: 3201-8, 2006.

SERGHIDES, L.; KAIN, K. C. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor agonists have minimal effects on the interaction of endothelial cells with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Infect Immun**, 73: 1209-13, 2005.

SETOGUCHI, K., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. **J Clin Invest**, 108: 1667-75, 2001.

SKOROKHOD, O. A., *et al.* Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. **J Immunol**, 173: 4066-74, 2004.

SMITH, W. L.; MEADE, E. A.; DEWITT, D. L. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. **Ann N Y Acad Sci**, 714: 136-42, 1994.

STEFANI, M. M.; MULLER, I.; LOUIS, J. A. *Leishmania major*-specific CD8+ T cells are inducers and targets of nitric oxide produced by parasitized macrophages. **Eur J Immunol**, 24: 746-52, 1994.

STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J Exp Med**, 169: 1543-55, 1989.

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

SZABO, S. J., *et al.* Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. **Science**, 295: 338-42, 2002.

TONTONOZ, P., *et al.* PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. **Cell**, 93: 241-52, 1998.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annu Rev Immunol**, 13: 251-76, 1995.

VAIDYA, S., *et al.* 15-Deoxy-Delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> inhibits the beta<sub>2</sub> integrin-dependent oxidative burst: involvement of a mechanism distinct from peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligation. **J Immunol**, 163: 6187-92, 1999.

VAN VAN ZANDBERGEN, G., *et al.* Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103: 13837-42, 2006.

VIANA DA COSTA, A., *et al.* IL-10 leads to a higher parasite persistence in a resistant mouse model of Leishmania major infection. **Parasitol Int**, 51: 367-79, 2002.

VOLL, R. E., *et al.* Immunosuppressive effects of apoptotic cells. **Nature**, 390: 350-1, 1997.

VON STEBUT, E.; UDEY, M. C. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with Leishmania major. **Microbes Infect**, 6: 1102-9, 2004.

WAHLI, W.; BRAISSANT, O.; DESVERGNE, B. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. **Chem Biol**, 2: 261-6, 1995.

WEI, X. Q., *et al.* Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, 375: 408-11, 1995.

WOHLFERT, E. A., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and immunoregulation: enhancement of regulatory T cells through PPARgamma-dependent and -independent mechanisms. **J Immunol**, 178: 4129-35, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2004. Disponível em <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leishdis1.html>

WRIGHT, H. M., *et al.* A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. **J Biol Chem**, 275: 1873-7, 2000.

# 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](#)