

WÂNIA FERRAZ PEREIRA

APOPTOSE DE LINFÓCITOS T E REGULAÇÃO DE
CITOCINAS NA INFECÇÃO POR *Leishmania*
major

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



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2007**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Pereira, Wânia Ferraz.

Apoptose de linfócitos T e regulação de citocinas na infecção por
Leishmania major / Wânia Ferraz Pereira

Pereira – Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF, 2007

104 Págs.

Orientadora: Marcela de Freitas Lopes

Tese (mestrado) – UFRJ/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/Programa de
Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biofísica, 2007.

Referência bibliográficas: f. - .

1. Apoptose. 2. Linfócitos T. 3. *Leishmania major*. 4. Caspase-8. 5. Citocinas

I. Lopes, M. F. Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas. III. Título.

Wânia Ferraz Pereira

APOPTOSE DE LINFÓCITOS T E REGULAÇÃO DE
CITOCINAS NA INFECÇÃO POR *Leishmania*
major

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação do 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
(Biofísica).

Orientadora: Marcela de Freitas Lopes

Rio de Janeiro
2007

Wânia Ferraz Pereira

APOPTOSE DE LINFÓCITOS T E REGULAÇÃO DE
CITOCINAS NA INFECÇÃO POR *Leishmania*
major

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS

Aprovada por:

Dra. Bartira Rossi Bergman

Dra. Fátima da Conceição Silva

Dr. Ulisses Gazos Lopes

Dra. Ana Paula de Araújo Lima (Revisora)

Dra. Marcela de Freitas Lopes (Orientadora)

Rio de Janeiro
10 de agosto de 2007

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia
do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ,
sob a orientação da Dra. Marcela de Freitas Lopes.

Aos meus abençoados pais, Áurea e Geraldo, pelo imenso amor com o qual me criaram, pelo incentivo e apoio incondicionais a todas as minhas decisões e por sempre acreditarem em meu potencial. Ao Wagner, meu irmão, por sábias palavras nos momentos oportunos.

**"O único tirano que aceito neste mundo
é a voz silenciosa dentro de mim,
a consciência." Mahatma Gandhi**

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me possibilitou saúde, capacidade e pessoas maravilhosas em minha vida, indispensáveis para a realização deste trabalho.

À professora Marcela Lopes, pela confiança e orientação, ensinando-me sempre os melhores caminhos.

À Landi Guillermo, pelos inúmeros ensinamentos, paciência e, principalmente, amizade e sábias palavras de conforto nos momentos mais difíceis.

Ao professor George dos Reis, pela oportunidade de estar em seu grupo e por todos os ensinamentos.

À Flávia Ribeiro-Gomes, por toda atenção e auxílio.

À Elisabeth Silva, por me ensinar a trabalhar com todo respeito com os animais e, acima de tudo, pelo carinho com o qual me recebeu.

À Carla Pinheiro, por sempre me auxiliar com os pequeninos, pela grande amizade e companheirismo em todos os momentos.

À Dra. Marise Nunes, por todo o suporte, conselhos e ensinamentos.

À minha primeira mestre, Adriana Azevedo, por acreditar que sou capaz e por sempre me apoiar em minhas decisões.

Aos primos Eduardo, Fernanda e Vinícius por me acolherem em sua casa.

Ao Daniel Gomes, pela amizade e por me ajudar a encontrar meu caminho.

À Camila Rodrigues, Camila Bueno, Ludmila Rodrigues e Renata (“meninas do Aló”), por me acolherem em sua casa.

À Juliana Grechi e Naiara Rust, pelo companheirismo, convivência, apoio e por me agüentarem com todos os meus defeitos.

À Jorgete Logullo pelo carinho e presteza, ao Lindomar Miranda, por toda a assistência bem humorada.

A todos que de uma forma ou de outra sempre me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais da leishmaniose	1
1.2 Resposta imune à infecção por <i>L. major</i>	3
1.3 Regulação da resposta imune na leishmaniose experimental	9
1.4 Mecanismos de apoptose	13
1.5 Outras funções das caspases	16
2- OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos Gerais	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3- MATERIAL E MÉTODOS	21
4- RESULTADOS	29
4.1 Cinética da infecção por <i>Leishmania major</i> em camundongos C57BL/6	29
4.2 Caracterização dos subtipos celulares no baço durante a progressão da infecção	31
4.3 Análise de ativação e morte celular no baço	32
4.4 Cinética da produção de citocinas no baço	33
4.5 Produção de nitrito por esplenócitos	34
4.6 Análise do linfonodo drenante durante a infecção por <i>L. major</i>	35
4.7 Análise de ativação e morte celular no linfonodo drenante	37

4.8 Cinética da produção de citocinas no linfonodo drenante	38
4.9 Morte celular induzida por ativação no baço	39
4.10 Perfil de citocinas no baço após bloqueio dos ligantes de receptores de morte	40
4.11 Morte celular induzida por ativação no linfonodo drenante	42
4.12 Mecanismos de apoptose no linfonodo drenante	43
4.13 Perfil de citocinas no linfonodo drenante após bloqueio dos ligantes indutores de morte	45
4.14 Expressão de citocinas	48
4.15 Análise da inibição da caspase-8 <i>in vivo</i>	57
4.16 A inibição da caspase-8 pela vFLIP aumenta a resistência à infecção <i>L. major</i>	58
4.17 Baixa expansão celular no linfonodo drenante dos camundongos vFLIP	59
4.18 Aumento da morte de células T CD8 ⁺ nos camundongos vFLIP infectados	61
4.19 Aumento da produção de IL-4 e diminuição da produção de IL-2 por células T dos camundongos vFLIP	62
4.20 Viabilidade celular e proliferação celular prejudicadas nos camundongos vFLIP	63
4.21 Viabilidade celular e produção de citocinas no linfonodo drenante	64
4.22 Infecção por <i>L. major</i> promove aumento de macrófagos no baço de camundongos vFLIP infectados	66
4.23 Esplenócitos dos camundongos vFLIP produzem níveis elevados de óxido nítrico	68
5- DISCUSSÃO	69
6- CONCLUSÕES	76
7- CONCLUSÕES GERAIS	77
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CINÉTICA DA LESÃO NA INFECÇÃO POR <i>Leishmania major</i> .	30
FIGURA 2 – SUBPOPULAÇÕES NO BAÇO APÓS INFECÇÃO POR <i>L. major</i> .	31
FIGURA 3 – A INFECÇÃO POR <i>L. major</i> PROMOVE ATIVAÇÃO E MORTE DE CÉLULAS T.	32
FIGURA 4 – PRODUÇÃO DE CITOCINAS DURANTE A INFECÇÃO POR <i>L. major</i> .	33
FIGURA 5 – AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO APÓS A INFECÇÃO POR <i>L. major</i> .	34
FIGURA 6 – SUBPOPULAÇÕES CELULARES NO LINFONODO APÓS A INFECÇÃO POR <i>L. MAJOR</i> .	36
FIGURA 7 – A INFECÇÃO POR <i>L. major</i> PROMOVE ATIVAÇÃO E MORTE DE CÉLULAS T.	37
FIGURA 8 – CITOCINAS NO LINFONODO DRENANTE APÓS INFECÇÃO POR <i>L. major</i>	38
FIGURA 9 – INFECÇÃO POR <i>L. major</i> PROMOVE MORTE CELULAR INDUZIDA POR ATIVAÇÃO	39
FIGURA 10 – PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO BAÇO APÓS INIBIÇÃO COM ANTI-FASL E ANTI-TNF α .	40
FIGURA 11 – PERFIL DE CITOCINAS NO BAÇO APÓS TRATAMENTO COM ANTI-FASL.	41
FIGURA 12 – APOPTOSE NO LINFONODO APÓS INFECÇÃO POR <i>L. major</i> .	42
FIGURA 13 – MECANISMOS DE APOPTOSE NO LINFONODO APÓS INFECÇÃO POR <i>L. major</i> .	44
FIGURA 14 – CITOCINAS NO LINFONODO APÓS INIBIÇÃO DA VIA FAS.	46
FIGURA 15 – CITOCINAS NO LINFONODO APÓS INIBIÇÃO DAS CASPASES 8 E 9.	47
FIGURA 16 – CITOCINAS NO LINFONODO NA PRESENÇA DE IL-4 E	48

IL-12 EXÓGENA.

FIGURA 17 – EFEITO DA IL-4 E IL-12 NAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS.	50
FIGURA 18 – EFEITOS DA IL-4 E IL-12 NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS POR LINFÓCITOS T CD4 E CD8.	51
FIGURA 19 – BLOQUEIO DA CASPASE-8 NÃO PREVINE A MORTE INDUZIDA PELA IL-12.	52
FIGURA 20 – EFEITOS DO BLOQUEIO DA CASPASE-8 NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS.	53
FIGURA 21 – INIBIÇÃO DA CASPASE-8 PREJUDICA AS CÉLULAS PRODUTORAS DE IFN- γ .	54
FIGURA 22 – INIBIÇÃO DA CASPASE-8 DIMINUI A PROPORÇÃO DE CÉLULAS CD8 ⁺ .	55
FIGURA 23 – INIBIÇÃO DA CASPASE-8 AFETA CÉLULAS T PRODUTORAS DE IFN- γ .	56
FIGURA 24 – CAMUNDONGOS EXPRESSANDO O TRANSGENE PARA A PROTEÍNA VIRAL MC159.	57
FIGURA 25 – CAMUNDONGOS ν FLIP SÃO MAIS RESISTENTES A INFECÇÃO POR <i>L. major</i> .	58
FIGURA 26 – ALTERAÇÃO NA CELULARIDADE NO BAÇO E LINFONODOS DE CAMUNDONGOS ν FLIP INFECTADOS COM <i>L. major</i>	59
FIGURA 27 – SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T NOS CAMUNDONGOS ν FLIP INFECTADOS COM <i>L. major</i>	60
FIGURA 28 – APOPTOSE DE CÉLULAS T CD8 ⁺ NOS CAMUNDONGOS ν FLIP INFECTADOS COM <i>L. major</i>	61
FIGURA 29 – CITOCINA NO BAÇO DE CAMUNDONGOS ν FLIP APÓS INFECÇÃO POR <i>L. major</i>	62
FIGURA 30 – VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR DE LINFÓCITOS APÓS INFECÇÃO POR <i>L. major</i>	63
FIGURA 31 – VIABILIDADE E PRODUÇÃO DE CITOCINAS NOS LINFONODOS APÓS INFECÇÃO POR <i>L. major</i>	65
FIGURA 32 – MACRÓFAGOS NA INFECÇÃO POR <i>L. major</i> .	67

FIGURA 33 – PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA INFECÇÃO POR <i>L. major</i> .	68
FIGURA 34 – MECANISMOS REGULATÓRIOS DA INIBIÇÃO DA CASPASE-8 DURANTE A INFECÇÃO POR <i>L. major</i> .	77

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD	7- amino actinomicina D
AICD	morte celular induzida por ativação (do inglês: activation induced cell death)
CED	deficiência na caspase-8
CPM	contagem por minuto
DD	domínio de morte (death domain)
DED	domínio efetor de morte (death effector domain)
DISC	complexo sinalizador indutor de morte (death-inducing signalling complex)
DMSO	dimetilsulfóxido
FADD	domínio de morte associado a Fas (Fas-associated death domain)
FasL	ligante de Fas
FLICE	caspase-8
FSDDC	células dendríticas derivadas de tecido fetal
IFN- γ	interferom gama
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
IL-10 ^{-/-}	IL-10 knockout
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
LACK	receptor homólogo de <i>Leishmania</i> para kinase C ativada
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3 (4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- κ B	fator nuclear κ B
NK	células “natural killer”
NO	óxido nítrico
NOS2	óxido nítrico sintase induzível tipo 2
PCD	morte celular programada (programmed cell death)
PMA	forbol ester forbol 12-miristato 13-acetato
SEM	erro padrão
SFB	soro fetal bovino
T CD4 ⁺	células T CD4 ⁺

T CD8 ⁺	células T CD8 ⁺
TCR	receptor de célula T
TGF- β	fator transformador de crescimento do tipo beta
Th1	linfócito T helper do tipo 1
Th2	linfócito T helper do tipo 2
TMB	3,3',5,5' tetrametilbenzidina
TRADD	domínio de morte associado ao TNFR (TNF-receptor-associated death domain)
TRAF2	fator 2 associado ao receptor TNF
vFLIP	proteína viral inibidora de FLICE
zIETD-fmk	benzyl-oxycarbonyl-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone
zLEHD-fmk	benzyl-oxycarbonyl-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)- fluoromethyl ketone

RESUMO

A resposta protetora à infecção por *Leishmania major* depende da resposta Th1. Nós investigamos a ocorrência de apoptose em linfócitos T no curso da infecção por *L. major* bem como o papel da caspase-8 na apoptose e na produção de citocinas. As variações na celularidade do linfonodo drenante bem como a elevada ativação de células T coincidiram com o desenvolvimento e com a resolução da lesão na pata infectada de camundongos B6. Células T CD4⁺ e T CD8⁺ do linfonodo drenante ou baço apresentaram morte induzida por ativação (AICD) após estimulação *in vitro* com anti-CD3. O tratamento com anti-FasL não inibiu a apoptose, mas promoveu o aumento da produção de IL-4. Por outro lado, a inibição da caspase-8 *in vitro* não bloqueou a apoptose, mas prejudicou a proliferação de células T CD8⁺ e a expressão de IFN- γ tanto pelas células CD4⁺ quanto pelas células T CD8⁺. Para estudar os efeitos da inibição da caspase-8 *in vivo*, utilizamos camundongos transgênicos que expressam a proteína inibidora da caspase-8 FLIP viral em células T. Os camundongos vFLIP desenvolveram lesões semelhantes a seus controles no início da infecção, mas, surpreendentemente, houve diminuição da lesão e da carga parasitária aos 41 dias de infecção. Em comparação com seus controles, observamos menor celularidade no linfonodo drenante e elevada apoptose de células T CD8⁺ no baço dos camundongos vFLIP infectados. Além disso, ocorreu diminuição na produção de IL-2, acompanhada por baixa viabilidade e proliferação de esplenócitos nos camundongos vFLIP infectados. Ao contrário, detectamos elevada produção de IL-4 no linfonodo drenante e baço. Os camundongos vFLIP infectados apresentaram um aumento no número de macrófagos no baço, com maior produção de óxido nítrico por esplenócitos. Portanto, apesar de uma deficiência de resposta de células T durante a infecção, os camundongos vFLIP foram mais resistentes a infecção por *L. major* no ponto analisado, provavelmente devido à ativação da atividade microbicida dos macrófagos.

ABSTRACT

The healing of *Leishmania major* infection depends on the development of Th1 responses. We investigated the mechanisms involved in apoptosis and cytokine production following *Leishmania major* infection. The development of footpad lesions correlated with enlargement of draining lymph nodes and T cell activation. CD4 and CD8 T cells from draining lymph nodes and spleen undergo apoptosis upon stimulation with anti-CD3 *in vitro*. Treatment with anti-FasL did not rescue T cells from death, but increased the production of IL-4 by a T cell subset. Inhibition of caspase-8 *in vitro* did not block induction of apoptosis, but reduced the proportion of CD8 T cells and IFN- γ expression by CD4 and CD8 T cells. To study the effects of blocking caspase-8 *in vivo*, we infected transgenic mice expressing a viral FLIP protein on T cells which inhibits caspase-8 activity. Development of lesion was similar in both vFLIP and WT mice, but at 41 days post infection, vFLIP mice had reduced lesions and parasite loads compared with WT mice. We observed reduced numbers of T cells in draining lymph nodes and increased apoptosis in CD8 T cells in spleens of infected vFLIP mice. In addition, we detected reduced secretion of IL-2, viability and proliferation of splenocytes from infected vFLIP mice. In contrast, we observed increased production of IL-4 by splenocytes and draining lymph node cells. Infected vFLIP mice had elevated numbers of macrophages and increased production of nitric oxide in spleens. Therefore, despite reduced T cell mediated immunity, infected vFLIP mice controlled better infection by *L. major*, possible due to enhanced activation of macrophage killing activity.

1- INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da leishmaniose

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*. Estima-se que esta doença afete cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com mais de dois milhões de novos casos por ano (www.who.int/tdr). Mesmo com este quadro alarmante, é uma doença negligenciada, talvez por sua maior incidência ocorrer em países menos desenvolvidos.

As leishmanioses podem se apresentar sob diferentes formas, dependendo da espécie infectante. A forma cutânea é caracterizada por lesões na pele podendo chegar a úlceras, e pode ser causada pelas espécies *Leishmania major*/ *L. tropica*/ *L. aethiopica* no Mediterrâneo e por *L. amazonensis*/ *L. braziliensis*/ *L. mexicana*/ *L. guyanensis* na América; na leishmaniose visceral, também conhecida como “kalazar”, os órgãos internos são acometidos e há a indução de sintomas como febre, anemia, perda de peso e hepatoesplenomegalia, podendo ser causada por espécies como *L. donovani* e *L. infantum*/ *L. chagasi* no Mediterrâneo e América, respectivamente; na forma muco-cutânea, onde ocorrem lesões destrutivas da mucosa naso-oro-faringeana, sendo causada principalmente pela espécie *L. braziliensis* (Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2000; REY, 2001).

A leishmaniose é transmitida ao homem e a outros animais vertebrados durante o repasto sanguíneo de fêmeas de insetos dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* (dependendo da região) contaminadas, sendo exemplos de reservatórios cães, eqüinos e roedores. As fêmeas contaminadas injetam formas promastigotas metacíclicas juntamente com sua saliva (revisado por ROGERS *et al.*, 2002). Na saliva destes insetos existem substâncias como anticoagulantes, vasodilatadores e moléculas anti-inflamatórias, as quais são indispensáveis

para o sucesso da infecção (revisado por ANDRADE *et al.*, 2007). Foi demonstrado por Lerner *et al* (1991) que o peptídeo vasodilatador maxadilan facilita a alimentação do inseto e exacerba a infecção por *Leishmania major* (MORRIS *et al.*, 2001). As formas promastigotas metacíclicas invadem células do sistema fagocítico como macrófagos e células dendríticas, e se reproduzem em seu fagolisossomo sob a forma de amastigotas. As formas amastigotas são liberadas, podendo contaminar outras células e insetos vetores em uma próxima alimentação, ou até mesmo pela ingestão de células portando tais formas. No intestino destes insetos, o parasito se diferencia rapidamente para a forma não infectante denominada promastigota procíclica, mas que possui capacidade multiplicadora. Estas formas promastigotas migram para a região anterior do intestino e para o aparelho bucal e se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas infectantes.

O modelo de infecção por *Leishmania major* tem sido amplamente utilizado devido à sua marcante polarização de uma resposta protetora (resposta T helper do tipo 1 - Th1) ou de uma resposta não protetora (T helper do tipo 2 - Th2) em diferentes hospedeiros durante o curso da infecção (revisado por SACKS & ANDERSON, 2004). As células Th1 caracterizam-se por produzirem principalmente IFN- γ que é capaz de ativar a atividade microbicida dos macrófagos, ao passo que as células Th2 caracterizam-se pela produção de IL-4, capaz de inibir a atividade microbicida dos macrófagos. A susceptibilidade ou resistência à infecção por *L. major* é determinada pelo balanço de citocinas. Camundongos resistentes como CBA, C57BL/6 e C3H montam uma resposta Th1, caracterizada pela elevada produção de IFN- γ , o que permite o controle do desenvolvimento do parasito e uma doença cutânea autolimitante. Porém, em alguns casos de infecção por cepas mais virulentas de *L. major*, a resposta Th1 não é suficiente para controlar a infecção (ANDERSON *et al.*, 2005). Por outro lado, camundongos susceptíveis, como o BALB/c, desenvolvem uma resposta Th2 na qual há uma grande produção de IL-4, IL-10 e IL-13, resultando numa doença progressiva. Além disto,

diferentes fatores governam resistência *versus* susceptibilidade em outros modelos de infecção por diferentes espécies de *Leishmania spp.* Na infecção por *L. mexicana*, além da IL-4, a IL-13 desempenha um importante papel na infecção crônica, e, apesar de na infecção por *L. donovani* a resposta Th1 ser protetora, ainda é difícil estabelecer a resposta Th2 como a causadora da susceptibilidade, mostrando que diferentes parâmetros controlam a resposta imunológica a diferentes espécies (revisado por McMAHON-PRATT & ALEXANDER., 2004).

1.2 Resposta imune à infecção por *L. major*

O sistema imune inato representa uma primeira barreira aos agentes invasores. Constitui-se de alguns tipos celulares e fatores humorais que reconhecem, inativam ou até mesmo matam estes invasores (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Trata-se de um processo rápido e inespecífico, desta maneira, podendo não ser eficiente na eliminação do agente invasor. Mesmo nestes termos, é o sistema imune inato o responsável por ativar a resposta imune adquirida, quando, por si, não for suficiente para eliminar o agente invasor.

Um importante agente anti-microbica conhecido é o óxido nítrico (NO), produzido principalmente pelos macrófagos. Esta substância é produzida a partir do aminoácido L-arginina, em decorrência da atividade das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) ou óxido nítrico sintase tipo 2 (NOS2) induzidas por IFN- γ (LIEW *et al.*, 1990; revisado em LOUIS *et al.*, 1998; BOGDAN *et al.*, 2000). Wei e colaboradores (1995) demonstraram que camundongos resistentes à infecção por *Leishmania major* tratados com inibidores de iNOS ou deficientes para o gene que a codifica falharam em controlar a infecção. Mesmo após o decréscimo da carga parasitária, macrófagos e células dendríticas continuam a expressar a

iNOS e sua inibição leva a um aumento desta carga parasitária com reaparecimento da lesão (STENGER *et al.*, 1996).

O fator de necrose tumoral (TNF) o qual também induz a produção de NO por macrófagos *in vitro*, e a conseqüente eliminação de formas amastigotas de *L. major* (THEODOS *et al.*, 1991), também está envolvido no controle do infiltrado inflamatório no local de inoculação dos parasitos (CHAKOUR *et al.*, 2003), devido à sua participação na eliminação de linfócitos no infiltrado inflamatório (KANNALY *et al.*, 1999).

Outro tipo celular envolvido na primeira resposta ao parasito é a célula “natural killer” (NK). Alguns trabalhos têm demonstrado seu papel protetor no início da infecção por *L. major*, devido à produção de IFN- γ , citocina importante na diferenciação de células Th1 (SCHARTON & SCOTT, 1993). Por outro lado, vários autores demonstraram que a produção de IFN- γ apenas pelas células T CD4⁺ é suficiente para montar uma resposta protetora (WAKIL *et al.*, 1998), e que camundongos deficientes em células NK ainda produzem altos níveis de IL-12 e de IFN- γ , sendo capazes de resolver a infecção por *L. major* (SATOSKAR *et al.*, 1999).

As células dendríticas desempenham um importante papel na resposta imediata. Von Stebut e colaboradores (1998) demonstraram que a fagocitose de amastigotas de *L. major* promove ativação e maturação de células dendríticas derivadas de tecido fetal (FSDDC), o que não foi observado em macrófagos inflamatórios (BELKAID *et al.*, 1998; VON STEBUT *et al.* 1998). Ao contrário, Reiner e colaboradores (1994) demonstraram que formas amastigotas são capazes de induzir a expressão de mRNA para IL-12 em macrófagos derivados de medula óssea e que, *in vivo*, o surgimento deste transcrito ocorre tardiamente, estando correlacionado com a liberação de amastigotas pelos macrófagos os quais podem ser capturados por outros subtipos celulares e levar a produção de IL-12 (VON STEBUT *et al.*, 1998). Em decorrência de sua ativação, as células dendríticas tornam-se capazes de produzir

IL-12. A produção desta citocina foi observada tanto em FSDDC obtidas de camundongos resistentes quanto com FSDDC obtidas de camundongos susceptíveis a infecção por *L. major* (VON STEBUT *et al* 2000).

Muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de elucidar a causa das diferentes respostas imunológicas, levando à susceptibilidade ou à resistência a uma determinada infecção. Filippi *et al* (2003) demonstraram que a co-cultura de células T CD4⁺ naive com células dendríticas do linfonodo drenante de camundongos susceptíveis infectados leva a produção de citocinas Th2, ao passo que a cultura com células dendríticas obtidas de animais resistentes infectados leva a um perfil Th1, demonstrando que a polarização de células CD4⁺ pode ser devida a um fator intrínseco das células dendríticas. Ao contrário, Von Stebut e colaboradores (2000) demonstraram que a co-cultura de células dendríticas derivadas de tecido fetal de ambos animais com células T CD4⁺ naive singeneicas levam a produção de citocinas Th1, mostrando uma semelhança funcional destas células tanto em camundongos resistentes quanto em camundongos susceptíveis (VON STEBUT *et al.*, 2000).

Sabe-se que a interleucina 12 desempenha um importante papel da diferenciação para o fenótipo Th1 (MATTNER *et al.*, 1997; revisado em LANGRISH *et al.*, 2004). A IL-12 é uma das citocinas responsáveis pela indução da transcrição de IFN- γ pelas células Th1 em desenvolvimento (revisado por MURPHY & REINER, 2002). Heinzl *et al* (1993) demonstraram que o tratamento de animais susceptíveis com IL-12 durante a primeira semana de infecção por *L. major* levou a uma redução na lesão, diminuição na produção de IL-4 e aumento na produção de IFN- γ , tornando-os resistentes a uma re-infecção.

Uma resposta imunológica protetora à infecção por parasitos do gênero *Leishmania* caracteriza-se por uma resposta T helper do tipo 1. Mesmo tendo isto como um paradigma, Anderson e colaboradores (2005) em estudo com uma cepa de *L. major* isolada de pacientes que não alcançaram a cura, observaram que, apesar de uma forte resposta Th1 montada no

início da infecção, camundongos com fenótipo de resistência não foram capazes de resolver a doença, mas tornaram-se resistentes a uma re-infecção.

Embora se saiba que a citocina IL-4 induza perfil Th2, Biedermann *et al* (2001) demonstraram que quando esta citocina é injetada em camundongos susceptíveis à leishmaniose durante o início da ativação das células dendríticas, estas são estimuladas a produzir IL-12, levando a uma resposta Th1. Mas, se os mesmos animais forem tratados tardiamente, no período de ativação das células T CD4⁺, é induzida a diferenciação de células Th2, levando à susceptibilidade. Por outro lado, Lezama-Davila e colaboradores (1992) demonstraram que a administração de IL-4 em camundongos susceptíveis no local da lesão, numa fase tardia e não inicial da infecção por *L. major*, foi capaz de inibir tanto o desenvolvimento da lesão quanto o crescimento do parasito.

A susceptibilidade à infecção por *L. major* é amplamente estudada em camundongos BALB/c. Nestes animais, há uma grande produção de IL-4 no início da infecção, principalmente por células T CD4⁺ com receptor de célula T (TCR) Vβ4Vα8, o qual reconhece com baixa afinidade o antígeno de *Leishmania* LACK (receptor homólogo de *Leishmania* para kinase C ativada) (revisto por SACKS & ANDERSON, 2004). A IL-4 suprime o desenvolvimento de células Th1 produtoras de IFN-γ, necessário para ativar macrófagos infectados levando à destruição dos parasitos, e também atua na inibição da expressão de IL-12Rβ2 (revisto por SACKS & ANDERSON, 2004; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Porém, ainda existem controvérsias sobre o papel desta citocina na susceptibilidade (KOPF *et al.*, 1996; SCOTT *et al.*, 1996; NOBEN-TRAUTH *et al.*, 1999).

Kopf e colaboradores (1996), observaram que camundongos com fenótipo susceptível e deficientes para IL-4 foram capazes de controlar a lesão e produzir altos níveis de IFN-γ após longo período de infecção. Além disto, Leal e colaboradores (1993) e Erb *et al.*, (1996) demonstraram que camundongos com fenótipo resistente, mas que super expressam IL-4,

demonstraram-se susceptíveis à infecção por *L. major*. No primeiro caso, onde utilizaram o transgene sob o controle do promotor de cadeia pesada de imunoglobulina (IgH), os camundongos transgênicos produziram baixos níveis de IFN- γ quando comparado aos seus controles, embora a diferença no desenvolvimento da lesão só tenha aparecido tardiamente (LEAL *et al.*, 1993). Por outro lado, Erb *et al* (1996) utilizando o transgene sob o controle do promotor do complexo de histocompatibilidade de classe I (MHC I), observaram que os camundongos transgênicos apresentaram-se susceptíveis à infecção, embora apresentassem uma resposta Th1. Os autores atribuíram a susceptibilidade destes animais ao fato de que a IL-4 estaria deixando os macrófagos refratários ao IFN- γ , impossibilitando a eliminação dos parasitos (ERB *et al.*, 1996).

Já o estudo com camundongos IL-4^{-/-} e IL-4R α ^{-/-} demonstrou que estes animais são mais resistentes que camundongos BALB/c durante a fase aguda da infecção, porém, na fase crônica, os camundongos IL-4R α ^{-/-} foram mais susceptíveis que os camundongos IL-4^{-/-}, sugerindo uma participação diferencial da IL-13 na resistência em diferentes períodos da infecção, visto esta citocina também sinalizar via IL-4R α (MOHRS *et al.*, 1999). A IL-13, assim como a IL-4, atua inibindo a produção de citocinas inflamatórias (revisito por WYNN, 2003). Por outro lado, Noben-Trauth e colaboradores (1999) demonstraram que camundongos IL-4^{-/-} e IL-4R α ^{-/-} permanecem susceptíveis à infecção por *L. major* apesar de apresentarem baixos níveis de citocinas Th2, mas sem aumentar os níveis de IFN- γ . Neste estudo, diferentes cepas de *L. major* apresentaram comportamentos diferenciados, sendo um fator que deve ser levado em consideração. Vale ressaltar também que, durante a fase inicial da infecção por *L. major*, camundongos de fenótipo resistente (C57BL/6) apresentam níveis similares de IL-4 quando comparado à produção em camundongos BALB/c (fenótipo susceptível), sendo necessário considerar outros fatores que podem atuar na susceptibilidade a esta infecção (SCOTT *et al.*, 1996).

Sabe-se que as células T CD8⁺ desempenham um importante papel na resistência à re-infecção por *L. major* (MULLER, 1992; MULLER *et al.*, 1993; MULLER *et al.*, 1994). A re-infecção de animais que apresentaram cura leva a uma grande produção de IFN- γ por células T CD8⁺ após re-estímulo *in vitro*, quando comparado às células de camundongos imunes não re-estimulados (MULLER *et al.*, 1993). Também foi observada uma grande expansão de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ após a re-infecção dos animais (MULLER *et al.*, 1994).

Porém, ainda existem controvérsias quanto à participação das células T CD8⁺ na infecção primária por *L. major*. Huber *et al* (1998) demonstraram que camundongos com deficiência no gene CD8 α foram capazes de montar uma resposta Th1, mesmo após longo período de infecção. Por outro lado, Belkaid *et al* (2002) demonstraram que camundongos deficientes em células T CD8⁺ falharam em controlar o crescimento do parasito após um baixo inóculo. Em outro trabalho no qual também se destaca o papel das células CD8⁺, Uzonna *et al* (2004), utilizando-se da infecção com baixas doses de *Leishmania*, demonstraram que uma resposta Th2 transitória é montada no início da infecção a qual é revertida pela produção de IFN- γ pelas células CD8⁺. O mesmo efeito pôde ser obtido através da neutralização da IL-4, pela administração de IL-12 (UZONNA *et al.*, 2004) ou pela depleção de células T CD4⁺ (HERATH *et al.*, 2003). Herath e colaboradores (2003) demonstraram que quando se faz uma depleção inicial de células CD4⁺ em camundongos susceptíveis, o animal torna-se capaz de resolver a doença. A ação citotóxica das células T CD8⁺ também foi demonstrada durante a infecção por *L. major* (CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 1994). Conceição-Silva e colaboradores (1994) demonstraram a presença de células T CD8⁺ específicas para antígeno de *Leishmania spp*, originadas de camundongos imunes após re-estimulação *in vitro*, sugerindo que os macrófagos infectados sejam potenciais alvos para as células T CD8⁺ *in vivo*.

1.3 Regulação da resposta imune na leishmaniose experimental

A persistência de patógenos após a cura clínica é uma característica de certos vírus, bactérias e protozoários, o que também é observado nas infecções causadas por *Leishmania spp.* A reativação da doença pode ter conseqüências ainda mais graves do que a doença inicial, sendo necessário esclarecer quais mecanismos permitem a persistência do patógeno.

Belkaid e colaboradores (2001) observaram que camundongos IL-10^{-/-} ou tratados com anti-IL10R alcançaram uma cura estéril, não demonstrando risco de reativação da doença. Este fato pode ser explicado pela forte resposta Th1 montada durante a fase aguda da doença. Estes achados apontam para um importante papel da IL-10 na persistência do parasito e como um potente alvo terapêutico. Também foi demonstrado que a presença de células T regulatórias na infecção por *L. major* é a responsável pela produção de IL-10, o que mantém um número residual de parasitos, fato importante para o estabelecimento de uma memória imunológica (BELKAID *et al.*, 2002).

Anderson e colaboradores (2005) em estudo com uma cepa de *L. major* extraída de lesões humanas (MHOM/SN/74/SD), demonstraram que apesar de uma forte resposta Th1 ter sido montada, houve o desenvolvimento da lesão em camundongos resistentes a outras cepas de *Leishmania major*. Nestes animais, quando o receptor para IL-10 foi bloqueado ou quando as células CD25⁺ foram depletadas, houve uma diminuição na carga parasitária, mas sem alcançar a cura estéril, demonstrando um importante papel da IL-10 na regulação da resposta imune protetora (ANDERSON *et al.*, 2005). Em outro estudo com a mesma cepa de *L. major*, foi observado que as células T CD4⁺ convencionais (CD25⁻Foxp3⁻) são a principal fonte de IL-10 responsável pela imunossupressão na fase crônica da doença (ANDERSON *et al.*, 2007).

A presença de células T regulatórias também foi demonstrada no modelo de infecção por *L. amazonensis*, como sendo capazes de impedir o desenvolvimento da doença, porém, com efeito transitório, pois as células T efetoras gradualmente continuaram a se expandir e a exercer papel patogênico (JI *et al.*, 2005).

Além da regulação da resposta imune através da IL-10, foi demonstrado por Laouar *et al* (2005) que o fator transformador de crescimento do tipo beta (TGF- β) controla a resposta Th1 através da regulação da produção de IFN- γ pelas células NK, mas que não exerce nenhuma função na produção de IL-12 pelas células dendríticas. Também foi descrito por Gorelik *et al* (2002) que, *in vitro*, o TGF- β é capaz de inibir a expressão do fator de transcrição T-bet nas células T. Além disto, o bloqueio da sinalização do TGF- β *in vivo* através da expressão de um receptor dominante negativo em células T permite alta produção de IFN- γ por camundongos susceptíveis quando infectados por *L. major*. Em humanos, Barral e colaboradores (1995) demonstraram a presença de TGF- β em lesões mucocutâneas ativas e também em lesões de outros pacientes no início da leishmaniose.

A apoptose também é um importante mecanismo de regulação da resposta imune associado com imunossupressão e evasão do parasito da resposta imune. Amastigotas de *L. amazonensis* expressam fosfatidilserina (PS) em sua superfície, o que possibilita sua fagocitose por macrófagos sem ativar mecanismos inflamatórios (de FREITAS BALANCO *et al.*, 2001). Wanderley e colaboradores (2006) demonstraram que amastigotas oriundos de camundongos susceptíveis apresentam maiores níveis de PS extracelular quando comparado aos oriundos de camundongos resistentes, sendo os primeiros mais infectivos. Estes resultados indicam um mecanismo favorecedor da sobrevivência do parasito no hospedeiro (WANDERLEY *et al.*, 2006).

A apoptose espontânea de neutrófilos é reduzida quando estas células são incubadas com promastigotas vivos de *L. major*, o que está associado com um decréscimo da atividade da

caspase-3 (AGA *et al.*, 2002). *In vivo*, após três dias de infecção, pôde-se observar neutrófilos não apoptóticos contendo parasitos viáveis. Este atraso na apoptose dos neutrófilos infectados possibilita que macrófagos cheguem ao local da infecção e fagocitem neutrófilos já mortos, porém, com parasitos vivos (AGA *et al.*, 2002). Este mecanismo permite que os macrófagos adquiram parasitos sem a ativação de mecanismos antimicrobicidas – modelo conhecido como “cavalo de Tróia” (ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Akarid e colaboradores (2004) também observaram que a infecção de macrófagos por *L. major* impede a apoptose destas células, através da repressão da liberação do citocromo c pela mitocôndria. Esta inibição da apoptose foi observada tanto em macrófagos de camundongos resistentes quanto em macrófagos de camundongos susceptíveis (AKARID *et al.*, 2004).

A presença de células apoptóticas também tem sido relatada em úlceras cutâneas na leishmaniose (BERTHO *et al.*, 2000; EIDSMO *et al.*, 2005). A análise da lesão de indivíduos na fase aguda da infecção causada por *L. braziliensis* demonstrou um maior número de células T CD8⁺ apoptóticas quando comparado às células T CD4⁺; no período de cura espontânea, esta proporção foi invertida (BERTHO *et al.*, 2000). Estes resultados sugerem um comprometimento da resposta imune durante a fase aguda da infecção, devido ao menor número de células T CD8⁺, ou à presença destes linfócitos apoptóticos na lesão. Por outro lado, Eidsmo e colaboradores (2005) demonstraram que macrófagos e linfócitos T na lesão causada por *L. major* expressam ligante de Fas (FasL), principalmente na infecção aguda, levando à morte de queratinócitos expressando Fas, o que pode favorecer a ulceração local. O re-estímulo de células mononucleares periféricas de pacientes com parasitos vivos levou a um aumento da expressão de Fas em células T CD4⁺ e T CD8⁺ bem como na secreção de FasL solúvel (EIDSMO *et al.*, 2005). Estas células provavelmente sofrem apoptose via Fas-FasL no local da infecção, o que explica a presença de células T apoptóticas nas lesões.

Durante a infecção experimental por *L. donovani*, foi demonstrado que células CD4⁺ de camundongos susceptíveis, mas não de camundongos resistentes, sofrem apoptose *in vitro* quando re-estimuladas (morte celular induzida por ativação – do inglês “Activated Induced Cell Death – AICD”), concomitante com uma drástica diminuição na produção de IL-2 e IFN- γ (DAS *et al.*, 1999). Potestio e colaboradores (2004) observaram um grande número de células T CD4⁺ sofrendo apoptose durante a fase aguda da infecção por *L. donovani* em humanos. O re-estímulo das células Th1 destes pacientes com antígeno de *Leishmania spp* levou a um aumento na morte destas células (AICD), o que não aconteceu com as células Th2. Este quadro levou a uma menor produção de IFN- γ *in vitro* por células isoladas durante a fase aguda da infecção (POTESTIO *et al.*, 2004).

Em estudo com células mononucleares periféricas de pacientes com leishmaniose visceral, Potestio e colaboradores (2004) demonstraram que, durante a fase aguda da infecção, linfócitos Th1 re-estimulados por antígeno de *Leishmania spp* aumentam a expressão de Fas e FasL. Neste sistema, ocorre um aumento de células Th1 apoptóticas, o que sugere morte induzida pela via Fas-FasL (POTESTIO *et al.*, 2004).

Camundongos deficientes em FasL (B6-gld) mostraram-se mais susceptíveis à infecção por *L. donovani* apesar de um aumento significativo de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ na fase tardia da infecção. (ALEXANDER *et al.*, 2001). Além disto, Huang e colaboradores (1998), demonstraram que camundongos deficientes em Fas (MRL-lpr) são altamente susceptíveis à infecção por *L. major*, apesar da indução de uma forte resposta Th1. Em outro estudo realizado por Conceição-Silva *et al* (1998), foi demonstrado que camundongos deficientes em Fas (B6-lpr) ou FasL (B6 ou C3H-gld) eram incapazes de conter o desenvolvimento da lesão devido ao acúmulo de macrófagos impossibilitados de sofrer morte via Fas-FasL. Estes resultados foram corroborados por Chakour *et al* (2003), que demonstraram que a adição de FasL à cultura de macrófagos de camundongos B6-gld, após

tratamento com IFN- γ , levou a uma diminuição na carga parasitária. Estes trabalhos sugerem que o acúmulo de macrófagos impossibilitados de sofrer apoptose são o principal fator de susceptibilidade.

Em contrapartida, foi demonstrado por Ribeiro-Gomes e colaboradores (2005) que camundongos deficientes em FasL (BALB-gld) são mais resistentes à infecção por *L. major* quando comparado aos camundongos FasL competentes. Neste modelo, o atraso da apoptose de neutrófilos em camundongos FasL deficientes, bem como sua retirada do sistema por macrófagos são os responsáveis pelo efeito protetor (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2005). Em camundongos BALB/c, os neutrófilos apoptóticos contribuem para o crescimento de amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos, enquanto que em camundongos C57BL/6, os neutrófilos apoptóticos ativam os macrófagos a matarem o parasito (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004).

1.4 Mecanismos de apoptose

A apoptose consiste em uma morte celular programada de caráter fisiológico, responsável por manter a homeostase do organismo. Este termo foi primeiramente utilizado por Kerr e colaboradores em 1972, como um tipo de morte celular que não induz inflamação. Caracteriza-se por uma redução no tamanho celular, condensação da cromatina acompanhada de fragmentação nuclear, alteração na permeabilidade da membrana plasmática, degradação do citoesqueleto e fragmentação da célula em corpos apoptóticos (revisado por KERR *et al.*, 1993).

Os linfócitos T apresentam pelo menos duas vias de morte: uma morte ativa, induzida pela persistência do antígeno (AICD) e uma morte passiva (ou morte por negligência), a qual ocorre no final da resposta ao patógeno, devido a uma total eliminação ou diminuição do

mesmo e também devido à ausência de fatores de crescimento (LENARDO, 1996; VAN PARIJIS & ABBAS, 1996). Inicialmente, a IL-2 atua como um fator de crescimento linfocitário, mas, no final da resposta, torna as células T mais sensíveis à apoptose induzida por ativação (LENARDO, 1991).

In vitro, o co-estímulo por CD28 aumenta a taxa de sobrevivência de células T, pelo aumento da produção de IL-2 e da expressão de Bcl-xL (BOISE *et al.*, 1995). Porém, este aumento na expressão de Bcl-xL está correlacionado com resgate de alguns tipos de morte celular programada (PCD), mas não com o resgate da AICD (VAN PARIJIS *et al.*, 1996).

Muitos mecanismos de apoptose culminam com a ativação de caspases. As caspases são uma família de cisteíno-proteases as quais são sintetizadas como precursores inativos denominados pro-caspases. Elas contêm em seu sítio ativo um resíduo de cisteína e processam seu substrato após um resíduo de ácido aspártico (revisado por CURTIN & COTTER, 2003). As caspases podem ser classificadas em caspases iniciadoras ou efetoras, dependendo do seu papel durante a apoptose. As caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) detectam sinais de apoptose e processam as caspases efetoras. As caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7), por sua vez, degradam alvos como enzimas reparadoras de DNA, proteínas do citoesqueleto e proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular (revisado em THOMÉ & TSCHOPP, 2001; CURTIN & COTTER, 2003).

Foram descritas duas principais vias de ativação de caspases durante a apoptose. A via exógena é mediada por receptores de morte, como membros da superfamília do receptor de TNF. A via endógena é mediada pela mitocôndria. Na via mitocondrial, estímulos como radiação ultravioleta, estaurosporina e superexpressão de Bax, levam a uma alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial externa, possibilitando a liberação do citocromo c para o citoplasma (GREEN & REED, 1998). No citoplasma, o citocromo c liga-se à proteína Apaf-1 e à procaspase-9, formando um complexo denominado apoptossoma (GREEN &

KROEMER, 1998). Após a formação deste complexo, a caspase-9 é ativada, permitindo a ativação da caspase-3 e culminando com apoptose (SALEH *et al.*, 1999).

Os receptores de morte pertencem a uma família de receptores envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose. Estes receptores possuem um domínio extracelular com dois a quatro resíduos de cisteína e, alguns deles, um domínio de morte (DD – death domain) intracelular o qual se liga a proteínas adaptadoras e inicia a apoptose (revisado em CURTIN & COTTER, 2003). Pelo menos seis membros destes receptores foram descritos: TNFR1 (p55 ou CD120a), Fas (CD95/Apo1), DR3 (TRAMP/Apo3), DR4 (TRAILR1/Apo2), DR5 (TRAILR2/TRICK2) e DR6. Cada receptor liga-se ao seu ligante, como por exemplo, ligante de Fas (FasL) se liga ao Fas, TNF- α e linfotóxina α se ligam ao TNFR1, TRAIL se liga aos receptores DR4 e DR5 (revisado em CURTIN & COTTER, 2003).

A trimerização dos receptores de morte leva à associação de várias proteínas formando um complexo sinalizador indutor de morte (DISC). Neste complexo, o receptor Fas utiliza-se de uma molécula adaptadora denominada FADD (Fas associated death domain) a qual faz uma ligação homotípica de seu DD com o DD do receptor Fas. FADD também possui um domínio efetor de morte (DED) o qual recruta, por ligação homotípica, pro-caspase-8 (também chamada de FLICE). Dentro do DISC, a pro-caspase-8 é proteoliticamente ativada, liberando caspase-8 ativa. A caspase-8 ativa processa a pro-caspase-3 resultando em sua ativação, completando a cascata de ativação da apoptose (revisado em KRAMER, 2000; WAJANT 2002). Já o TNFR1 liga-se à proteína adaptadora TRADD (TNF-receptor-associated death domain) que não possui DD. Ela então se liga ao FADD, permitindo o recrutamento da pro-caspase-8, culminando com a apoptose (revisado em CHEN & GOEDDEL, 2002).

Uma família de proteínas que possuem DED foi descrita como potentes inibidores da caspase-8. Estas proteínas são constituintes de uma família de Herpesvírus, como herpesvírus equino, herpesvírus humano 8 associado ao Sarcoma de Kaposi, e do vírus *Molluscum*

contagiosum (revisto por TSCHOPP *et al.*, 1998). Estas proteínas foram denominadas de proteínas virais inibidoras de FLICE (vFLIP). Elas podem se ligar ao DED do FADD ou à caspase-8, impedindo a formação de homodímeros e sua ativação.

Uma proteína humana homóloga a vFLIP foi descrita, sendo denominada cFLIP (também conhecida como FLAME-1, I-FLICE, Casper, CASH, MRIT, CLARP ou usurpina) (revisto por THOMÉ & TSCHOPP, 2001). A nível protéico, duas formas endógenas foram encontradas, uma forma curta (cFLIP_s) e uma forma longa (cFLIP_L) (revisto por KRUEGER *et al.*, 2001). A forma longa é estruturalmente semelhante à caspase-8, com dois DED e um domínio “caspase-like”. Porém cFLIP_L não possui em seu sítio ativo um resíduo de cisteína, não possuindo atividade catalítica (THOME & TSCHOPP, 2001). Já o cFLIP_s assemelha-se ao vFLIP.

Muitos trabalhos apontam cFLIP como uma proteína anti-apoptótica, outros, como favorecedora deste processo. Tanto a forma longa quanto a forma curta do cFLIP podem ser recrutadas ao DISC e formar heterodímeros com a caspase-8. Foi demonstrado que a formação do heterodímero caspase-8-cFLIP_L permite o processamento desta última em uma subunidade p43, a qual permanece ligada ao DISC. Ocorre também o processamento parcial da pro-caspase-8, porém, a subunidade p43 cFLIP que permanece no DISC inibe o recrutamento de outras pro-caspases-8, impedindo a liberação da caspase-8 ativa (SCAFFIDI *et al.*, 1999). Por outro lado, foi observado que a cFLIP_s bloqueia totalmente o processamento da pro-caspase-8, impedindo a apoptose (KRUEGER *et al.*, 2001).

1.5 Outras funções das caspases

O papel das caspases na apoptose tem sido amplamente estudado, mas pouco se sabe sobre seu envolvimento em outras funções, como progressão do ciclo celular, no

desenvolvimento da resposta imune e até mesmo na sobrevivência da célula (revisado por SIEGEL, 2006). Muitos trabalhos apontam para a caspase-8 como a principal caspase envolvida nestes últimos processos (revisado por BARNHART & PETER, 2002).

Após a ativação de seu TCR, pode-se observar que ocorre ativação de caspases em células T. O tratamento desta cultura de células com o inibidor geral de caspases reduziu sua proliferação, sugerindo a participação de caspases no ciclo celular (ALAN *et al.*, 1999).

O tratamento de células T de humanos com inibidor específico para a caspase-8 ou com um inibidor geral das caspases bloqueou a proliferação destas células. Neste modelo, pode-se observar a clivagem da caspase-8 após estímulo com anti-CD3 (KENNEDY *et al.*, 1999).

Foi descrito um grupo de pacientes com uma grave deficiência funcional na caspase-8 (CED), a qual se manifesta em homozigose (CHUN *et al.*, 2002). No entanto, camundongos deficientes em caspase-8 são inviáveis. Uma possível explicação para esta contradição pode ser a presença da caspase-10 em humanos, homóloga à caspase-8, a qual não é encontrada em camundongos (revisado por BARNHART & PETER, 2002). Ao contrário da linfoproliferação encontrada em indivíduos com deficiência na sinalização via Fas (doença denominada de ALPS – Síndrome Autoimune Linfoproliferativa), os indivíduos com deficiência funcional na caspase-8 apresentam deficiência na ativação linfocitária, levando a um quadro de imunodeficiência (revisado por TANG, KAWADLER & YANG, 2005). Nestes indivíduos, a produção de IL-2 assim como a expressão de seu receptor CD25 é deficiente (CHUN *et al.*, 2002).

O fator nuclear κ B (NF- κ B) é responsável pela transcrição dos genes que codificam para IL-2 e para seu receptor, CD25, dentre outros. Leucócitos do sangue periférico de humanos ativados na presença de um inibidor geral de caspases não apresentaram translocação do NF- κ B para o núcleo, o que não ocorreu também em uma linhagem de células T deficientes em caspase-8 após estímulo de seu receptor (TCR) (SU *et al.*, 2005). Nos leucócitos do sangue

periférico de indivíduos CED também não houve a translocação do NF- κ B para o núcleo após a ativação do TCR, assim como também não ocorreu após a ativação de células B e de células NK (SU *et al.*, 2005). Estes resultados demonstram uma importante ligação entre atividade da caspase-8 e a ativação do NF- κ B.

A importância da caspase-8 na ativação do NF- κ B também foi demonstrada por Dohrman e colaboradores (2005). Com a utilização de camundongos transgênicos para cFLIP_L em linfócitos T, foi demonstrado que cFLIP_L é um importante substrato para a caspase-8, através do qual moléculas sinalizadoras como Raf-1, RIP e TRAF-2 são recrutadas e, por fim, ativam NF- κ B. Neste trabalho, a atividade do NF- κ B também foi diminuída após a inibição das caspases (DOHRMAN *et al.*, 2005). Além disto, as células T transgênicas apresentavam alta produção de IL-2 bem como elevada expressão de CD25 em sua superfície, compatível com uma superativação do NF- κ B.

Camundongos deficientes de caspase-8 em células T demonstraram um menor número destas células na periferia e uma menor ativação das mesmas após estímulo *in vitro*. (SALMENA *et al.*, 2003). Após imunização destes camundongos com vírus da coriomeningite linfocitária não se pôde observar a expansão de células T CD8⁺ bem como o acúmulo de células de memória, o que demonstra um importante papel da caspase-8 na imunidade anti-viral mediada por linfócitos T CD8⁺ (SALMENA *et al.*, 2003).

Utilizando-se de camundongos transgênicos os quais expressam v-FLIP em células T, Wu e colaboradores (2004) demonstraram que estes animais eram resistentes à apoptose mediada por Fas, mas a sobrevivência dessas células após a ativação estava prejudicada, embora apresentassem parâmetros de ativação. Foi encontrada uma deficiência na manutenção no número de células T CD8⁺ de memória nos camundongos transgênicos, as quais também eram incapazes de produzir IFN- γ (WU *et al.*, 2004). Estes resultados apontam para um importante papel das caspases na geração e manutenção de células T de memória.

Em modelo experimental de infecção por *Trypanosoma cruzi*, Silva e colaboradores (2005) detectaram uma maior atividade de caspase-8 em células T de camundongos infectados quando comparado com os normais, o que levou a AICD. A inibição da caspase-8 *in vivo* através da expressão de vFLIP em células T ou através da injeção de um inibidor específico para caspase-8 (zIETD) levou ao aumento na parasitemia e uma redução no número de células CD4⁺ e CD8⁺ (SILVA *et al.*, 2005). Apesar da geração de células T ativadas, não houve acúmulo de células T de memória nos camundongos transgênicos para vFLIP ou nos tratados com inibidor de caspase-8 (SILVA *et al.*, 2005).

Camundongos transgênicos para vFLIP e os tratados com inibidor de caspase-8 apresentaram baixa ativação do NF-κB, bem como baixa produção de IL-2 e elevada produção de IL-4 e IL-10. Estes resultados demonstram que a caspase-8, além de ser importante na geração da memória imunológica, contribui para uma resposta protetora contra parasitos intracelulares (WU *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005).

Visto o papel das caspases na regulação da apoptose e na produção de citocinas não ser bem conhecido, o presente trabalho visa investigá-los em um modelo experimental de infecção por *Leishmania major* onde o papel de citocinas na imunidade ao parasito é bem definido.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- 1- Estudar os mecanismos de apoptose e a regulação da produção de citocinas em linfócitos T na infecção murina por *Leishmania major*.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Estudar os mecanismos de apoptose em células T de camundongos C57BL/6 infectados por *L. major*.
- 2- Estudar, *in vitro*, se o bloqueio da caspase-8 afeta a produção de citocinas por células T de animais infectados com *L. major*.
- 3- Estudar a infecção por *L. major* em camundongos transgênicos que expressam a proteína viral MC159, inibidora da caspase-8, quanto ao desenvolvimento da lesão, carga parasitária, produção de citocinas, ativação e apoptose de linfócitos T.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados com camundongos C57BL/6 fêmeas, com 7 a 9 semanas de idade, fornecidos pelo Laboratório de Animais Transgênicos (LAT) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Também foram realizados experimentos com animais transgênicos denominados v-FLIP com 7-8 meses de idade, os quais expressam a proteína viral (MC159) sob controle do promotor CD2, interferindo na função da caspase-8 apenas em células T. Estes animais e seus controles foram cedidos pelo Dr. Richard M. Siegel do National Institute of Health (NIH) e se reproduziram no LAT da UFRJ.

3.2 Parasitos

A cepa de *Leishmania major* LV 39 (MRHO/Sv/59/P) foi mantida, *in vivo*, em camundongos BALB/c. Formas amastigotas foram isoladas do linfonodo poplíteo destes animais e mantidas em cultura com meio Schneider's suplementado com 2 % de urina humana, 2 mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco) a 28°C para a diferenciação em promastigota metacíclica.

3.3 Infecção

Para a infecção, promastigotas na fase estacionária foram quantificadas em câmara de Neubauer e lavadas 3 vezes com Hank's. Os camundongos foram infectados por via subcutânea no coxim plantar esquerdo da pata posterior com um inóculo de 3×10^6 parasitos em 30 μ l de Hank's, no qual 85-90% dos parasitos se encontravam sob a forma promastigota metacíclica.

3.4 Lesão

O desenvolvimento da lesão foi acompanhado durante a infecção através da medição do edema na pata duas vezes na semana. Para isto, foi utilizado medidor de espessura Mitutoyo (Kawasaki – Japão). A medida é expressa em média com erro padrão, do Δ obtido (Δ = leitura da espessura do dia avaliado - leitura obtida no dia da infecção). Como controle, a pata direita não infectada também foi avaliada.

3.5 Eutanásia dos animais

Para o experimento, os animais sofreram eutanásia em câmara de CO₂ de acordo com as normas institucionais.

3.6 Obtenção de células

O linfonodo drenante (linfonodo poplíteo) foi retirado e macerado com meio DMEM (Gibco-BRL, Life Technologies Inc, NY, USA), suplementado com 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 10 µg/ml de gentamicina, 50 µM 2-β mercaptoetanol e 10 mM Hepes para a obtenção das células.

Os esplenócitos foram obtidos através da maceração do baço em meio DMEM suplementado seguido de depleção de hemácias com tampão de lise ACK (135 mM de NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃, 1 mM de EDTA). Em alguns experimentos, esta suspensão de células passou por um processo de enriquecimento de células T através da passagem por uma coluna de lã de nylon. Após uma hora de incubação em estufa de CO₂, as células T foram eluídas através da lavagem com Hank's 10% SFB.

3.7 Cultura de células para a quantificação de citocinas

Para dosar citocinas, esplenócitos (3×10^6 /poço) ou células T do baço ou células do linfonodo drenante (1×10^6 /poço) de camundongos normais e infectados foram cultivados em duplicatas em placa de 48 poços com meio DMEM suplementado e adicionado com 10% de soro (meio completo). Após 24h de cultura, a 37°C em estufa de CO₂ a 7% com meio apenas ou com 10 µg/ml de anti-CD3 preso à placa, os sobrenadantes foram coletados e congelados para posterior avaliação. No experimento com camundongos transgênicos, $2,5 \times 10^5$ esplenócitos/poço ou 2×10^5 células T do baço ou células do linfonodo drenante dos camundongos transgênicos e seus controles foram cultivados em triplicatas em placa de 96 poços com meio ou estimuladas com 10 µg/ml de anti-CD3 preso à placa. Após 48 h, os sobrenadantes foram coletados e congelados para posterior avaliação.

3.8 Citometria de fluxo

3.8.1 Detecção de moléculas de superfície

Células do baço, do linfonodo drenante ou de cultura dos mesmos foram quantificadas por contagem em câmara de Neubauer ou em contador automático de partículas. A seguir, as células foram distribuídas a 10^6 células/tubo e incubadas por 20 min a 4°C com anticorpo monoclonal bloqueador da porção Fc de imunoglobulinas (anti-CD16/CD32). Em seguida, estas células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD19, CD3, CD4, CD8 e Mac-1 para a detecção dos subtipos celulares e também com anti-CD44 para a determinação de ativação celular (todos da BD Pharmingem - numa concentração 1 µg para cada 10^6 células) acoplados a diferentes fluorocromos (APC, PE, FITC) por subsequentes 20 min a 4°C. As células foram lavadas com tampão de citometria (PBS; SFB 3%; azida 0,02%) e 10^4 células foram adquiridas pelo citômetro de fluxo (FACSCalibur system) utilizando o

programa Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A análise foi realizada no programa FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, USA).

3.8.2 Detecção de apoptose

Para a detecção da apoptose, foram adicionados 0,25 $\mu\text{g}/10^6$ células de 7-amino actinomicina D (7-AAD) no ato da leitura pelo citômetro de fluxo. Neste método, as células 7-AAD negativas são consideradas células viáveis. Uma outra maneira utilizada para detectar a apoptose foi a utilização de um “kit” de marcação por Anexina V FITC (R&D Systems), a qual se liga à fosfatidilserina exposta na superfície de células apoptóticas. Para tal, as células foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos em tampão de anexina rico em cálcio.

Foram adquiridas 10^4 células pelo citômetro de fluxo utilizando o programa Cell Quest. A análise foi realizada no programa FlowJo.

3.9 Bloqueio da apoptose *in vitro*

Células do linfonodo drenante ou células T do baço de camundongos normais e infectados (1×10^6 células/ 0,5 ml meio) foram cultivadas em duplicatas em placa de 48 poços com meio completo apenas ou estimuladas com 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anti-CD3 e mantidas a 37°C em estufa de CO₂ a 7%. Foram usados diferentes inibidores de apoptose: as células foram cultivadas com 40 μM de zIETD (benzyl-oxycarbonyl-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone - inibidor da caspase- 8, Enzyme Systems Products), 40 μM de zLEHD (benzyl-oxycarbonyl-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)- fluoromethyl ketone - inibidor da caspase- 9, Enzyme Systems Products) ou com 0,4% de dimetil sulfóxido (DMSO) como controle. Para a inibição da apoptose mediada via receptores de morte, foram utilizados anticorpos anti-FasL (clone MFL3), anti-TNF- α (cloneG281-2626) ou com isotipo controle IgG (clone A19-3 – BD

Pharmingem) na concentração de 10 µg/ ml. Após 24 h de cultura os sobrenadantes foram coletados e congelados, até o momento de uso, para a detecção de citocinas. As células cultivadas foram imediatamente processadas para citometria de fluxo conforme já descrito.

3.10 Determinação da produção de citocinas

Todos os sobrenadantes recolhidos foram mantidos a -20°C até o momento de uso. Para a quantificação das citocinas produzidas (IL-2, IL-4, IL-10 e IFN-γ) foi utilizado o método de ELISA “sandwich”, através de um KIT da BD Pharmingem, contendo dois anticorpos monoclonais específicos para a citocina, sendo um deles biotinizado. A reação foi revelada através da utilização da enzima peroxidase conjugada a avidina (BD OptEIA™), utilizando como substrato 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB – BD OptEIA™). Para a confecção da curva padrão, foram utilizadas concentrações conhecidas de citocinas recombinantes. A leitura das amostras foi feita por absorvância em 450 nm através de um leitor de microplacas (Microplate Reader – VERSA Max – Molecular Devices).

3.11 Avaliação da expressão de citocinas por citometria de fluxo

Células do linfonodo drenante (1×10^6 /poço), obtidas através de um *pool* de gânglios, foram cultivadas em duplicatas em placa de 48 poços, contendo 0,5 ml de meio completo e estimuladas com 10 µg/ml de anti-CD3 preso à placa. A esta cultura, foram adicionados 40 µM de zIETD ou 0,4% de DMSO, na presença de 1 ng/ml de IL-4, 1 ng/ml ou 5 ng/ml de IL-12 ou sem citocina. Após 72 h de cultura, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de citocinas e o mesmo volume repostado com meio completo apenas ou meio completo contendo 10 ng/ml de PMA (forbol ester forbol 12-miristato 13-acetato - Sigma) e 0,5 µg/ml de inonomicina (Sigma). Após 1 h, as células foram tratadas com 10 µg/ml de brefeldina durante 3 h. Estas células foram então contadas e submetidas à citometria de fluxo para a detecção dos

subtipos celulares CD4 e CD8. Foi feita também uma detecção intracelular das citocinas IL-4, IL-10 ou IFN- γ . Após a detecção de moléculas de superfície, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e permeabilizadas com tampão saponina 0,5%. Anticorpos anti-IFN- γ , anti-IL-4 ou anti-IL-10 acoplados a diferentes fluoróforos foram então adicionados. As células foram lavadas em tampão de citometria e avaliadas no citômetro de fluxo como descrito anteriormente.

3.12 Determinação da produção de nitrito

Os sobrenadantes coletados das culturas de esplenócitos foram utilizados para a determinação da produção de nitrito. A estes, foi adicionado Reativo de Griess (DING *et al.*, 1988), numa proporção de 1:1. Foi feito também uma curva com concentrações conhecidas de nitrito para a comparação dos resultados. As amostras foram lidas por um leitor no comprimento de onda de 540 nm (Microplate Reader – VERSA Max – Molecular Devices).

3.13 Ensaio de viabilidade celular

Células T do baço ou células do linfonodo drenante de camundongos transgênicos e seus controles (2×10^5 /poço) foram cultivadas em placas de 96 poços com meio de cultura apenas ou estimuladas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3. Após 48h, esta cultura foi incubada por mais 4 h com 5 mg/ml de 3 (4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Após este tempo foi adicionado 100 μl de SDS. No dia seguinte, a absorbância da amostra foi detectada no comprimento de onda de 570 nm em um leitor (Microplate Reader – VERSA Max – Molecular Devices).

3.14 Ensaio de proliferação celular

Células esplênicas de camundongos transgênicos e seus controles ($2,5 \times 10^5$ /poço) foram cultivadas com meio ou estimuladas com $10 \mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 por 48 h. Foi adicionado a esta cultura $1 \mu\text{Ci}$ de timidina tritiada (^3H -metil-timidina). Após 24 h, as células foram coletadas em papel de filtro de fibra de vidro por meio de coletor semi-automatizado. A incorporação de timidina ao DNA da célula foi determinada através de espectroscopia de cintilação líquida (Beckman Coulter – LS6500 – Multi-Purpose Scintillation Counter). Os resultados foram expressos como média das leituras em contagem por minuto (cpm).

3.15 Determinação da carga parasitária

Os linfonodos drenantes dos camundongos transgênicos e seus controles foram retirados e macerados em meio Schneider's em placa de petri com membrana. Deste homogenato foi feita uma diluição seriada em placa de 24 poços com meio Schneider's completo a qual foi mantida a 28°C . Após 72 h de cultura foi feita uma avaliação de parasitos viáveis na maior diluição realizada, através da contagem em câmara de Neubauer.

3.16 Extração de DNA e PCR

Para a determinação da presença do transgene viral MC159 (vFLIP), realizamos um ensaio de Polymerase Chain Reaction (PCR). Um pequeno fragmento da extremidade da cauda dos animais foi extraído e tratado com uma solução de extração de DNA (REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, este extrato foi aquecido por 3 minutos a 95°C e posteriormente neutralizado com uma solução do kit. O DNA purificado foi armazenado a 20°C até o momento de uso.

No momento da realização do PCR, $4 \mu\text{l}$ do DNA purificado foi adicionado a $10 \mu\text{l}$ de REDEExtract-N-Amp (contendo oligonucleotídeos, Taq polimerase), $1 \mu\text{l}$ de cada par de

primers (vFLIP: Reverse – CGG AAT TCT CAA GTC GTT TGC TCG GGG CT; Forward – GAC TAC GCA TCC GAC TCC AAG GAG GTC CCT AGC e β -globina: Reverse – CCT TGA GGC TGT CCA AGT GAT TCA GGC CAT CG; Forward – CCA ATC TGC TCA CAC AGG ATA GAG AGG GCA GG) e 2 μ l de água livre de DNase. Após a amplificação em um termociclador (5 ciclos de 2 minutos, onde a cada ciclo ocorre a diminuição da temperatura de anelamento em 2°C (“Touch Down”), a qual é iniciada em 65°C até alcançar a temperatura de 55°C para os demais ciclos. O primeiro ciclo se inicia a 94°C por 30 seg para o processo de desnaturação, 30 segundos a 65°C para o processo de anelamento e 1:00 min a 72°C para a fase de extensão. Alcançada a temperatura de 55°C para o anelamento, ocorrem outros 30 ciclos de 2 minutos, sendo 30 seg a 94°C na fase de desnaturação, 30 segundos a 55°C para o processo de anelamento e 1:00 min a 72°C para a fase de extensão – Applied Biosystems – Gene Amp – PCR System 2400), as amostras foram aplicadas em um gel de agarose a 3% e excitadas a 100 Volts.

3.17 Análises estatísticas

Todos os resultados são expressos em média e erro padrão da média, e seu grau de significância foi obtido utilizando-se o teste estatístico t de student, considerando $p < 0,05$ como significativo. Nos experimentos *in vivo*, o número de animais utilizados (N) foi indicado nas legendas das figuras. Para os experimentos *in vitro* foram mostrados os resultados representativos de dois ou três experimentos diferentes, cada um com determinação em duplicatas ou triplicatas.

4- RESULTADOS

4.1 Cinética da infecção por *Leishmania major* em camundongos C57BL/6

Para estudar a ocorrência de apoptose de linfócitos na infecção por *L. major*, realizamos primeiramente o acompanhamento da lesão produzida, bem como da celularidade em órgãos importantes na execução da resposta imune, como baço e o linfonodo drenante (linfonodo poplíteo).

Para tal, camundongos C57BL/6 foram infectados com 3×10^6 promastigotas de *L. major* por via subcutânea no coxim plantar esquerdo. O desenvolvimento da lesão foi acompanhado através da medição da enduração na pata duas vezes por semana (Figura 1 A).

De acordo com o desenvolvimento da lesão, foram escolhidos pontos chaves para nosso estudo: 15 dias após a infecção, onde ocorre o surgimento da enduração; 43 dias após a infecção, ponto próximo a maior enduração observada e 92 dias, quando a lesão já começou a regredir (Figura 1 A).

O número de células esplênicas não aumentou durante a infecção por *L. major* (Figura 1 B). Por outro lado, houve um significativo aumento no número absoluto de células no linfonodo drenante aos 15, 43 e 92 dias após a infecção (Figura 1 C).

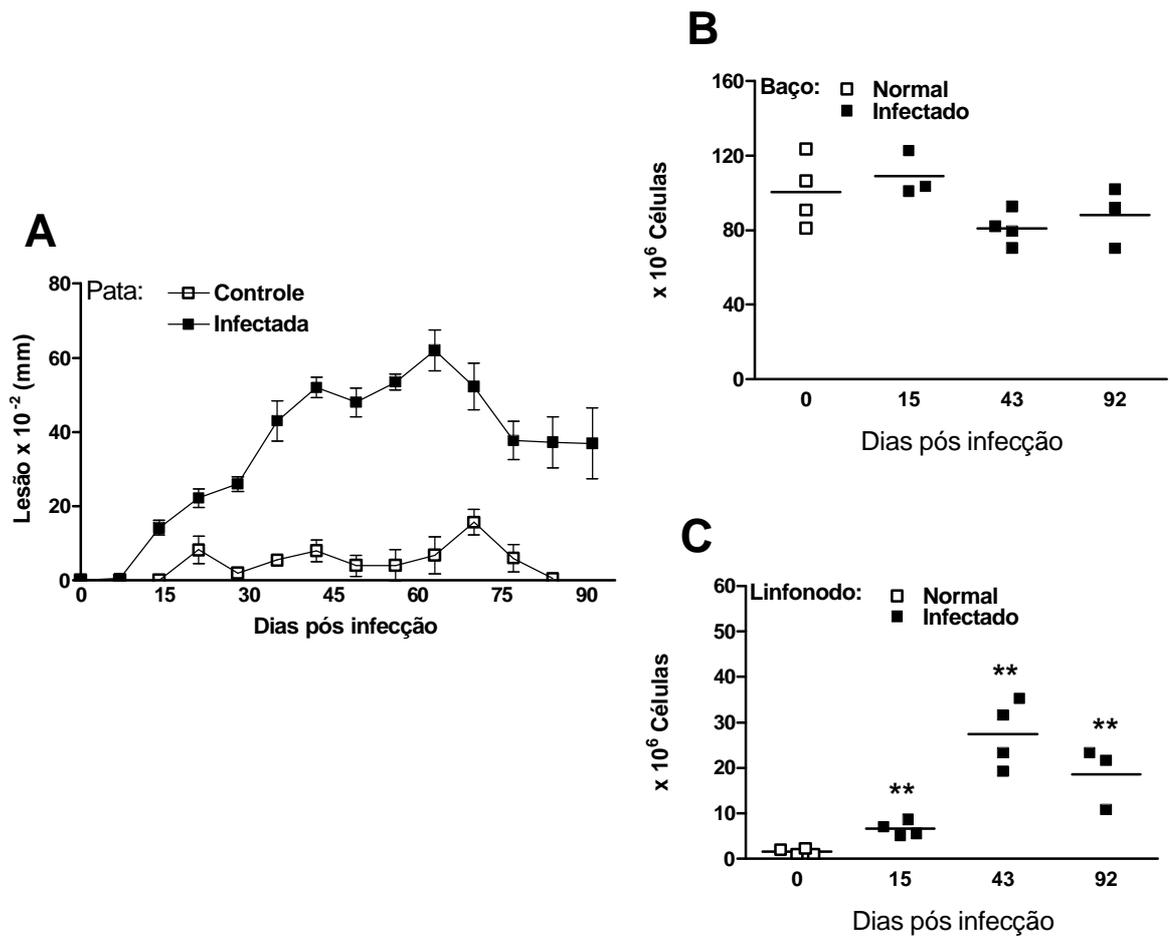


FIGURA 1 – CINÉTICA DA LESÃO NA INFECÇÃO POR *Leishmania major*. Camundongos C57BL/6 foram infectados por via subcutânea no coxim plantar esquerdo com 3×10^6 promastigotas. (A) Acompanhamento do desenvolvimento da lesão. Edema ocasionado pela infecção foi medido duas vezes na semana através de um medidor de espessura. Células esplênicas (B) e células do linfonodo poplíteo (C) de camundongos normais e infectados foram quantificadas através de um contador automático. Média e SEM estão representados. Na figura 1A, n=4 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas por (**) para $p < 0,01$ em relação ao animal normal em C.

4.2 Caracterização dos subtipos celulares no baço durante a progressão da infecção

Para a identificação dos subtipos celulares no baço, a suspensão de células foi tratada com diferentes anticorpos de superfície acoplados a fluorocromos e analisada por citometria de fluxo. Em especial, as células CD8⁺ tiveram sua proporção aumentada nos dias 43 e 92 após infecção (Figura 2 B), enquanto as proporções de células T CD4⁺, células B e macrófagos permaneceram constantes (Figura 2 A, C e D respectivamente). Em consequência, a relação de células CD8:CD4 apresentou-se aumentada aos 43 dpi (1:1) quando comparada à proporção observada nos camundongos normais (0,6:1). Aos 92 dpi, a relação CD8:CD4 foi (0,7:1).

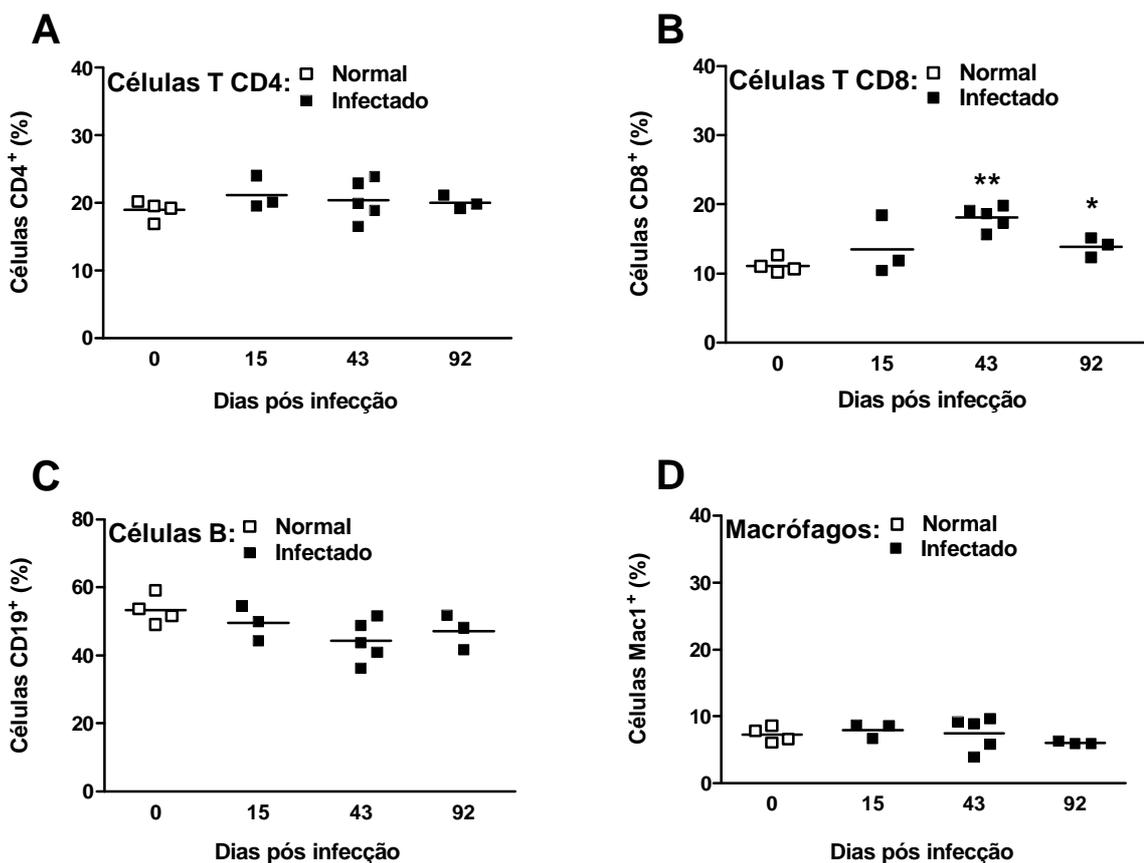


FIGURA 2 – SUBPOPULAÇÕES NO BAÇO APÓS INFECCÃO POR *L. major*. O baço dos animais normais e infectados foram tratados com tampão de lise para a eliminação de hemácias. Em seguida, as células foram tratadas com anticorpos acoplados à diferentes fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo. (A) Porcentagem de células CD4⁺; (B) Células CD8⁺; (C) Células CD19⁺; (D) Células Mac1⁺. Diferenças significativas indicadas por (*) para $p < 0,05$ e (**) para $p < 0,01$ em relação ao animal normal.

4.3 Análise de ativação e morte celular no baço

Células esplênicas totais foram incubadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 para a determinação dos subtipos de células T, com anti-CD44 para a detecção de ativação celular, e com 7-AAD para a determinação de morte celular. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Figura 3 A e B) tiveram um significativo aumento no padrão de ativação aos 43 dpi quando comparado às células de camundongos normais. No entanto, as células T CD4⁺ também tiveram um significativo aumento na proporção de morte aos 43 e 92 dpi quando comparado às células de camundongos normais (Figura 3 C), enquanto a apoptose das células T CD8⁺ teve um aumento gradual durante o curso da infecção (Figura 3 D).

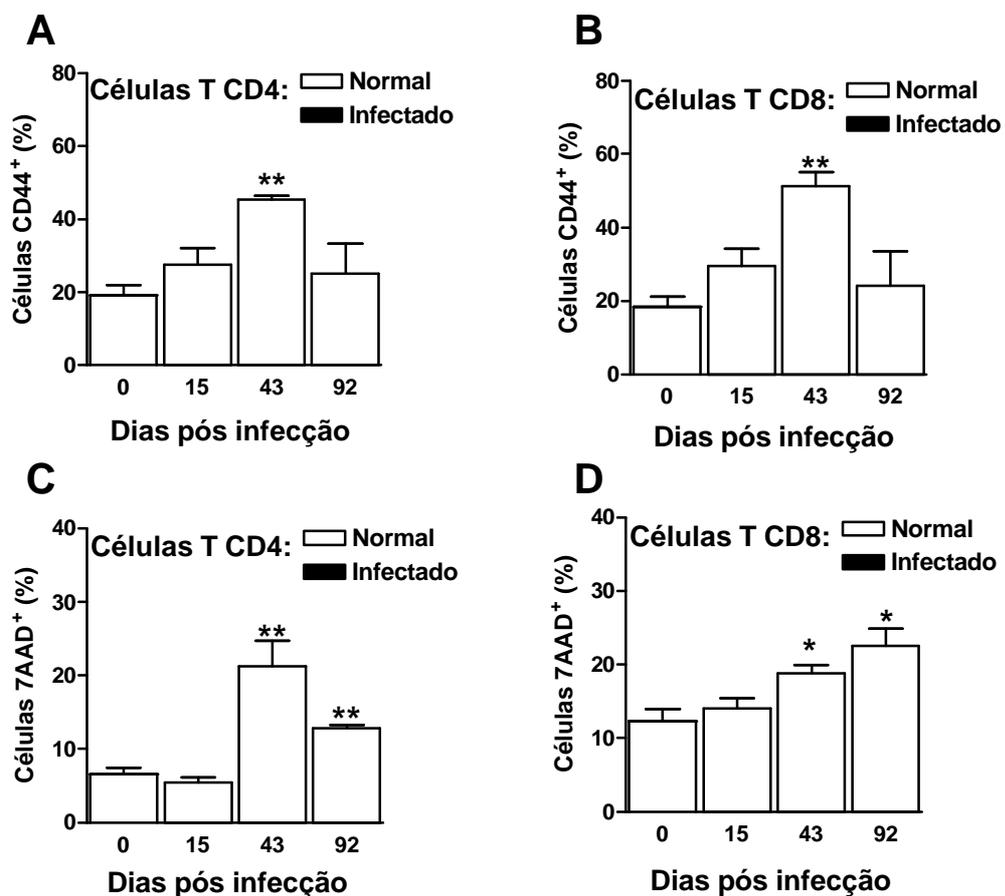


FIGURA 3 – A INFECÇÃO POR *L. major* PROMOVE ATIVAÇÃO E MORTE DE CÉLULAS T. Células esplênicas totais de camundongos normais e infectados foram avaliadas por citometria de fluxo quanto ao padrão de ativação através da expressão de CD44. Para a detecção de apoptose, foi feita marcação com 7-AAD. A proporção de células T CD4⁺ (A) e T CD8⁺(B) ativadas está indicada através da alta expressão de CD44. Apoptose de células T CD4⁺ (C) e T CD8⁺ (D) indicada pela marcação com 7-AAD. Média e SEM estão representados. N=3-5 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas por (*) para p< 0,05 e (**) para p< 0,01 em relação ao animal normal.

4.4 Cinética da produção de citocinas no baço

Células totais do baço (3×10^6 /poço) de camundongos normais e infectados foram cultivadas com meio ou na presença de anti-CD3. Após 24h de cultura, os sobrenadantes foram coletados e testados para a presença de citocinas, através do método de ELISA. Após re-estímulo, esplenócitos de camundongos normais e infectados produziram IL-2, IFN- γ e IL-10 em todos os tempos investigados (Figura 4 A, B e D). A produção de IL-4 não aumentou nos tempos analisados (Figura 4 C). A produção de IL-10 após re-estímulo aumentou aos 15 e 43 dpi quando comparada à produção pelo animal normal (Figura 4 D). Em contraste, pode-se observar uma diminuição da IL-2 aos 43 dpi quando comparado aos 15 dpi (Figura 4 A).

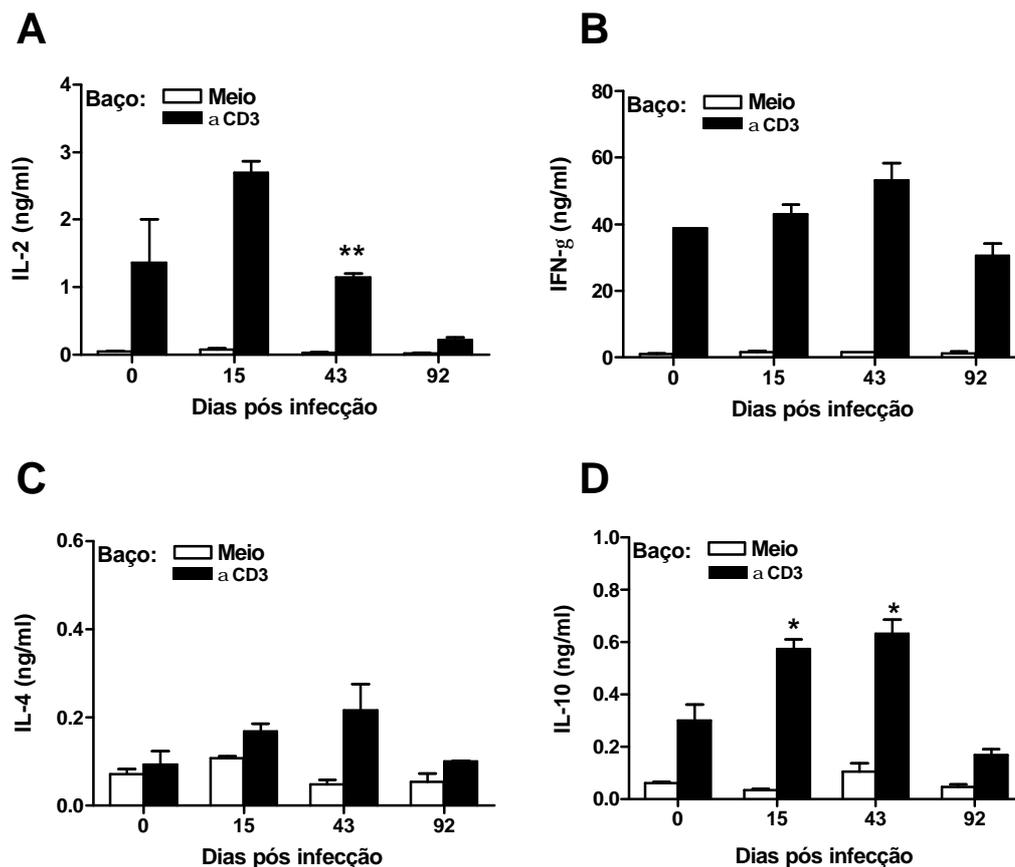


FIGURA 4 – PRODUÇÃO DE CITOCINAS DURANTE A INFEÇÃO POR *L. major*. Esplenócitos de camundongos normais e infectados foram cultivados com meio ou estimulados com anti-CD3. Após 24 h, os sobrenadantes foram coletados e testados para a presença de citocinas por ELISA. Média e SEM estão representados. N=2-4 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas por (*) para $p < 0,05$ em relação ao animal normal e (**) para $p < 0,01$ em relação ao dia 15.

4.5 Produção de nitrito por esplenócitos

Para a quantificação de nitrito, 3×10^6 esplenócitos/poço de camundongos normais e infectados nos tempos indicados foram cultivados na presença de meio ou anti-CD3. Após 24h, os sobrenadantes foram coletados e analisados pelo método de Griess. A figura 5 mostra que, aos 43 dpi, houve um aumento da produção de nitrito após estímulo com anti-CD3.

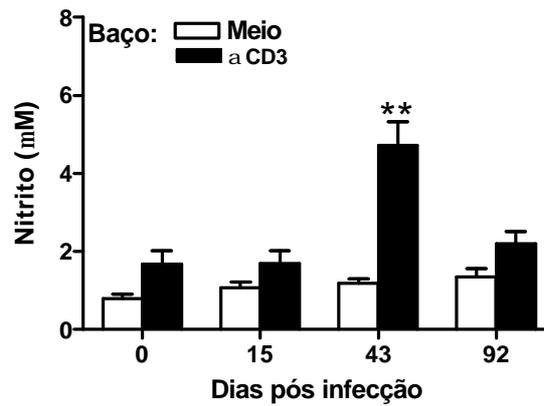


FIGURA 5 – AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO APÓS A INFECÇÃO POR *L. major*. Esplenócitos de camundongos normais e infectados foram cultivados com meio ou estimulados com anti-CD3. Após 24 h, os sobrenadantes foram testados para a presença de nitrito pelo método de Griess. Média e SEM estão representados. N=2-4 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas (**) para $p < 0,01$ em relação ao animal normal.

4.6 Análise do linfonodo drenante durante a infecção por *L. major*

O linfonodo drenante (linfonodo poplíteo) também foi analisado devido à sua grande importância para o estabelecimento da resposta imune. Para a identificação dos subtipos celulares, as células do linfonodo drenante foram processadas para citometria de fluxo, através da detecção por diferentes fluorocromos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19 e anti-Mac1. Podemos observar na Figura 6 A que existe uma redução na porcentagem de células CD4⁺ nos dias avaliados quando comparado aos camundongos normais. Aos 92 dpi, observa-se também uma redução de células CD8⁺ (Figura 6 B). Mais uma vez, observamos o aumento na relação de células CD8:CD4 aos 43 dpi (1,35:1) quando comparada ao apresentado no camundongo normal (1:1). Observamos também um aumento progressivo de células B após a infecção (Figura 6 C). Nenhuma alteração foi observada na proporção de macrófagos no curso da infecção (Figura 6D).

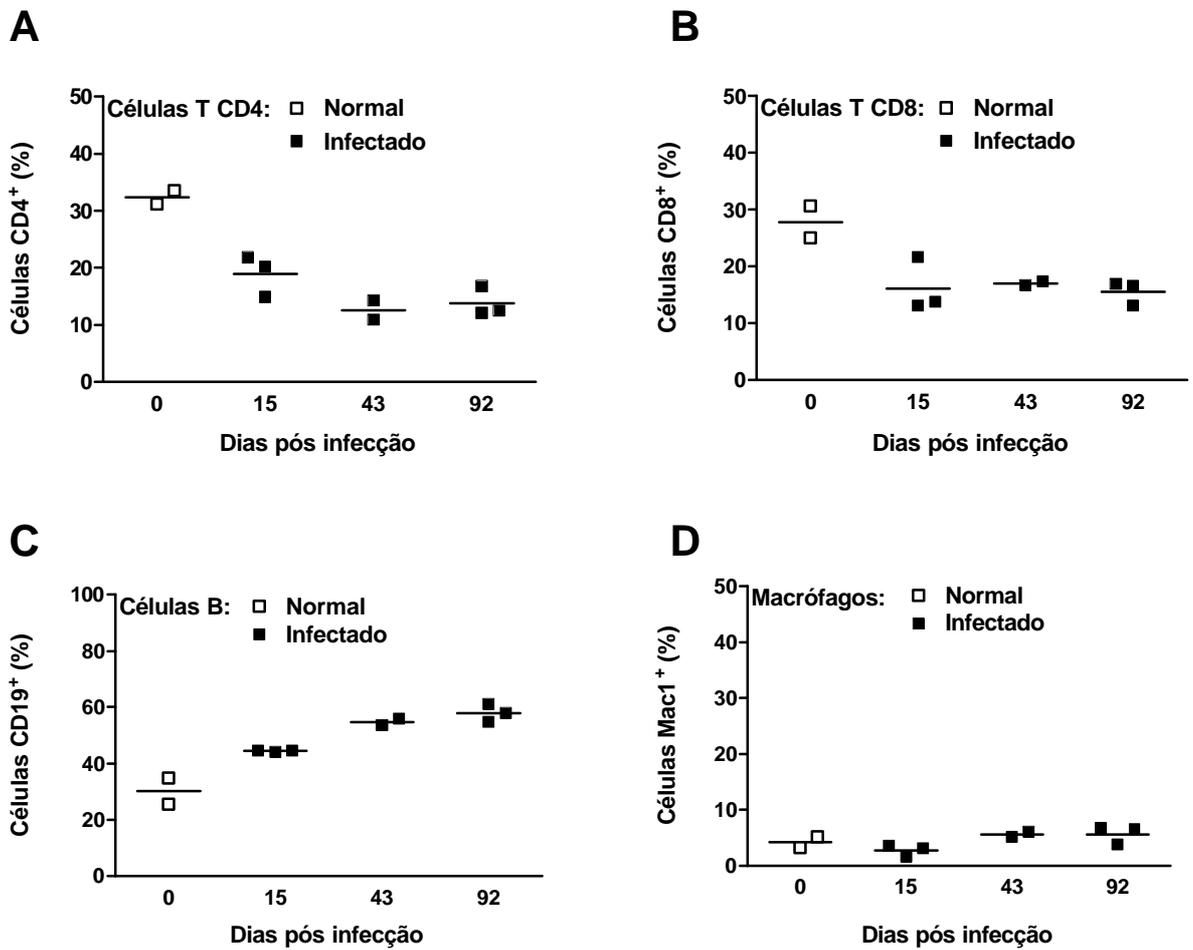


FIGURA 6 – SUBPOPULAÇÕES CELULARES NO LINFONODO APÓS A INFECCÃO POR *L. major*. Células do linfonodo drenante (poplíteo) de camundongos normais e com diferentes dias de infecção foram processadas para citometria de fluxo com diferentes fluorocromos. Proporção de células CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), CD19⁺ (C) e Mac-1⁺ (D). Média está representada.

4.7 Análise de ativação e morte celular no linfonodo drenante

Células do linfonodo poplíteo foram incubadas com anti-CD4 e anti-CD8 para a determinação dos subtipos de células T, com anti-CD44 para a detecção de ativação celular, e com 7-AAD para a determinação de morte. Podemos observar um aumento, porém não significativo, na proporção de células CD4⁺ (Figura 7 A) e células CD8⁺ (Figura 7 B) ativadas aos 43 dpi. Aos 43 e 92 dpi podemos observar um aumento na morte de células CD4⁺ e CD8⁺ (Figura 7 C e D).

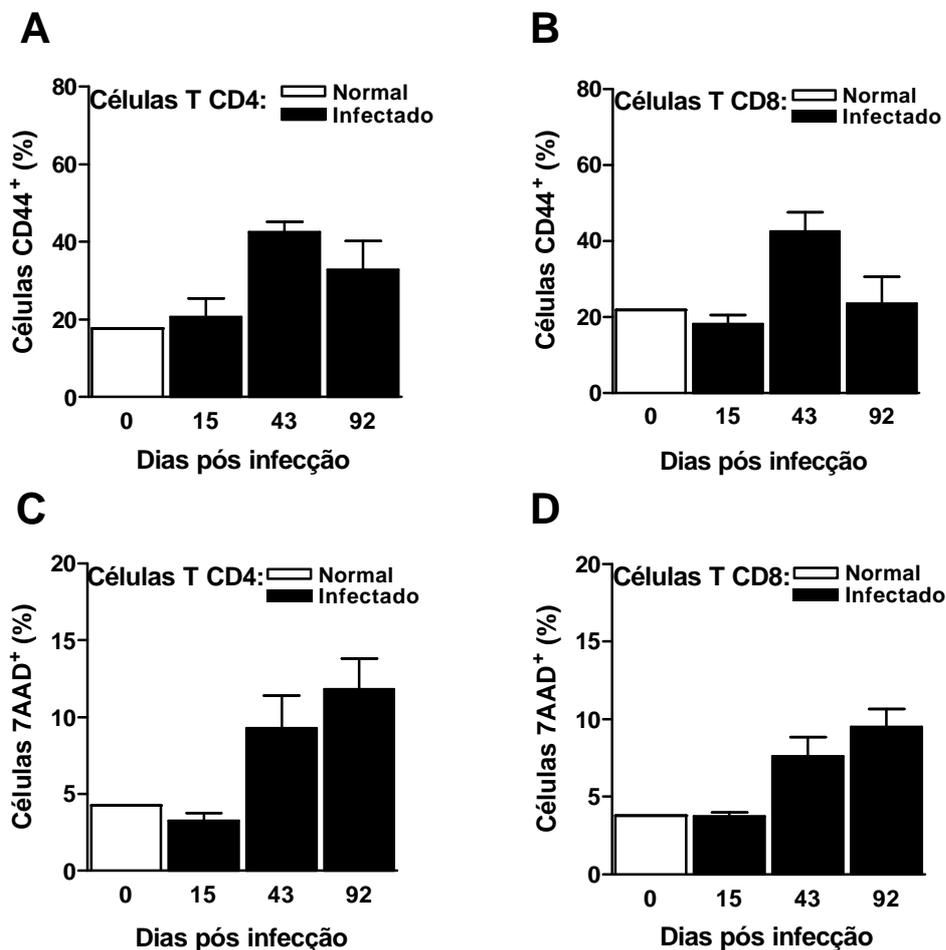


FIGURA 7 – A INFECCÃO POR *L. major* PROMOVE ATIVAÇÃO E MORTE DE CÉLULAS T. Células do linfonodo drenante de camundongos normais e infectados foram avaliadas por citometria de fluxo quanto ao padrão de ativação através da alta expressão de CD44. Células T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B) ativadas. Para a detecção de apoptose, foi realizada marcação com 7-AAD. Células T CD4⁺ (C) e T CD8⁺ (D) apoptóticas. Média e SEM estão representados. N=2-3 animais/grupo. A barra branca representa os resultados obtidos com o pool de linfonodos de camundongos normais.

4.8 Cinética da produção de citocinas no linfonodo drenante

Células do linfonodo poplíteo de camundongos normais e infectados foram cultivadas com meio ou em meio na presença de anti-CD3. Após 24h de cultura, os sobrenadantes foram coletados e testados para a presença de citocinas através do método ELISA. Durante o curso da infecção por *L. major* pudemos detectar a presença de IL-2 (Figura 8 A), IFN- γ (Figura 8 B) e IL-10 (Figura 8 D). Por outro lado, a produção de IL-4 não foi detectada em nenhum dos tempos analisados (Figura 8 C).

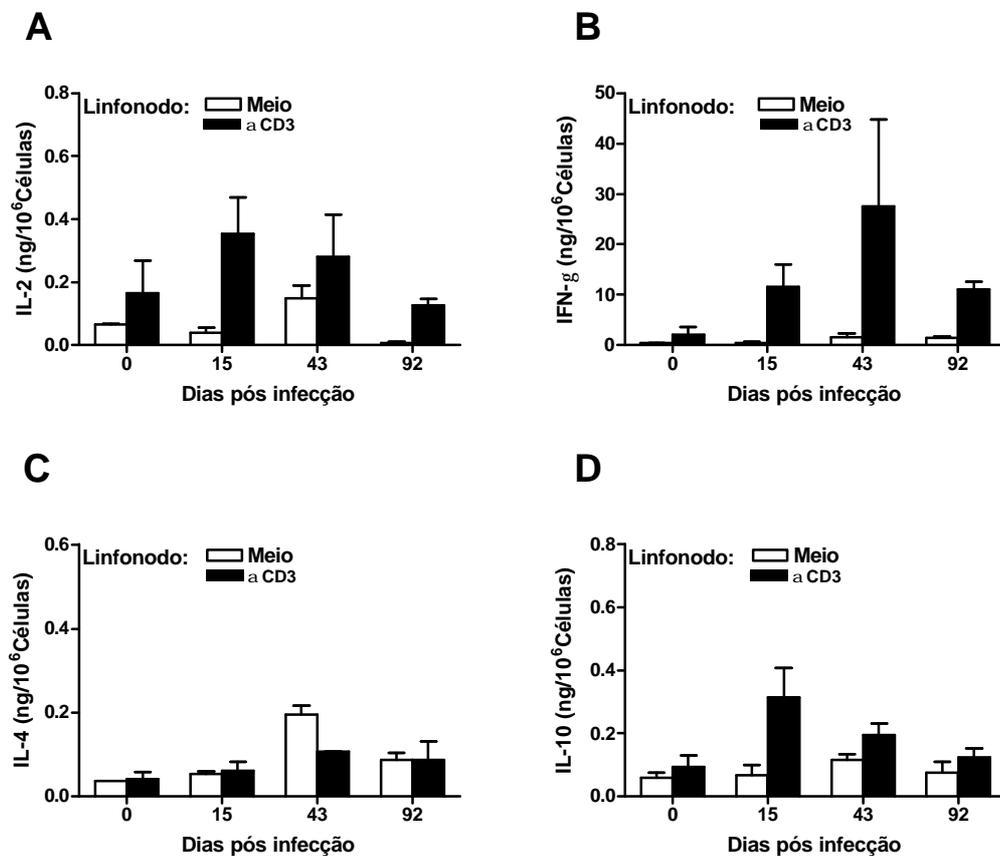


FIGURA 8 – CITOCINAS NO LINFONODO DRENANTE APÓS INFECCÃO POR *L. major*. Células do linfonodo drenante (poplíteo) de camundongos normais e infectados foram cultivadas com meio ou anti-CD3. Após 24 h, os sobrenadantes foram testados para a presença de IL-2 (A), IFN- γ (B), IL-4 (C) e IL-10 (D) por ELISA. Média e SEM estão representados. N=2-3 animais/grupo.

4.9 Morte celular induzida por ativação no baço

Para estudar os mecanismos de morte de células $CD4^+$ e $CD8^+$ no baço de camundongos infectados, tentamos diminuir a morte bloqueando os ligantes dos receptores de morte, como FasL e $TNF-\alpha$ *in vitro*. Para isto, células T do baço de camundongos infectados foram cultivadas na presença de meio apenas ou estimuladas com anti-CD3 e tratadas com anti-FasL, anti- $TNF\alpha$ e isotipo controle dos ligantes de receptores de morte (IgG). Após 24 h de cultura, estas células foram incubadas com anti-CD4, anti-CD8 e com 7-AAD para a detecção da apoptose. Aos 43 dpi, foi detectada AICD tanto nas células $CD4^+$ (Figura 9 C) quanto nas células $CD8^+$ (Figura 9 D). O tratamento com anti-FasL não inibiu a AICD de células T no baço aos 43 dpi (Figura 9 A-D).

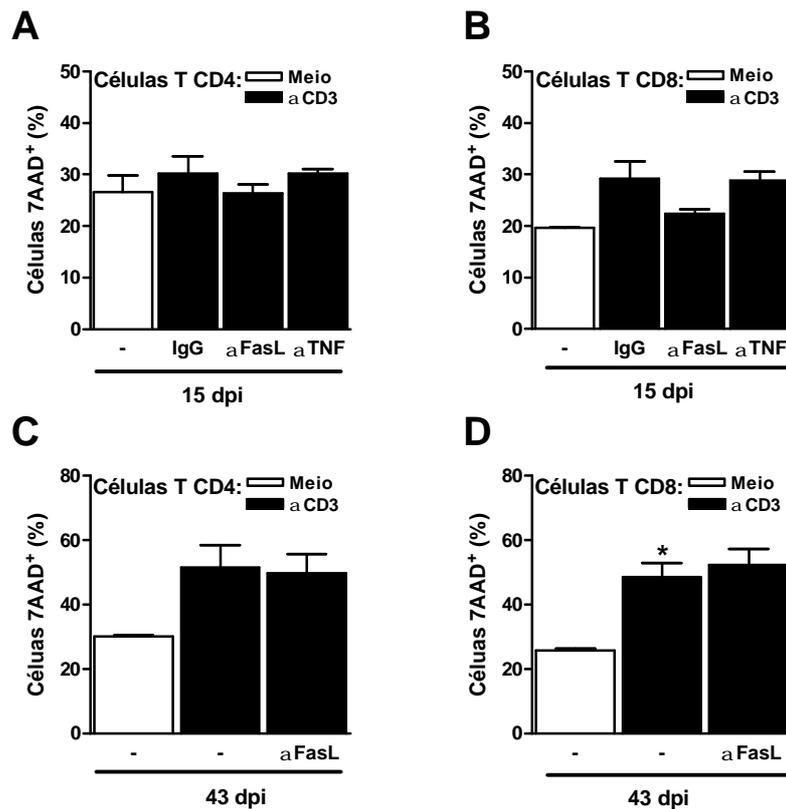


FIGURA 9 – INFECCÃO POR *L. major* PROMOVE MORTE CELULAR INDUZIDA POR ATIVAÇÃO. Células T foram cultivadas na presença de meio ou anti-CD3 e tratadas com anti-FasL, anti- $TNF\alpha$ e com isotipo controle IgG. Após 24 h de cultura, as células foram coletadas e incubadas com fluorocromos anti-CD4 e anti-CD8 e também com 7-AAD para a detecção da apoptose. Porcentagem de células T $CD4^+$ (A) e T $CD8^+$ (B) apoptóticas aos 15 dpi. Porcentagem de células T $CD4^+$ (C) e T $CD8^+$ (D) apoptóticas aos 43 dpi. Média e SEM estão representados. Cultura de células realizada em duplicatas. Diferenças significativas indicadas por (*) para $p < 0,05$ em relação à cultura não estimulada.

4.10 Perfil de citocinas no baço após bloqueio dos ligantes de receptores de morte

Verificamos também se o tratamento com anti-FasL e com anti-TNF provocaram alterações no perfil de produção de citocinas. Os sobrenadantes das culturas com os inibidores foram coletados e testados para a produção de citocinas pelo método de ELISA. A figura 10 relata o perfil de citocinas com os inibidores aos 15 dpi. O tratamento com anti-FasL levou a uma sutil redução na produção de IL-2 (Figura 10 A), enquanto promoveu um pequeno aumento na produção de IL-10 (Figura 10 D). Nenhuma alteração foi observada na produção de IFN- γ e não houve indução da produção de IL-4 após ativação (Figuras 10 C e D respectivamente).

Aos 43 dpi, o re-estímulo com anti-CD3 levou a um aumento na produção de todas as citocinas (Figura 11, A-D). Além disso, o tratamento com anti-FasL levou a um pequeno aumento na produção de IL-4 (Figura 11 C).

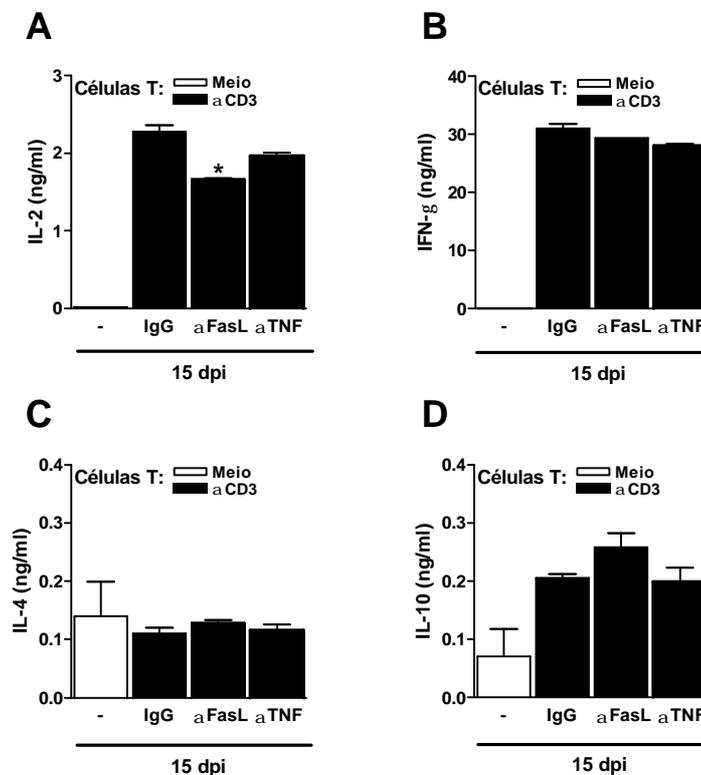


FIGURA 10 – PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO BAÇO APÓS INIBIÇÃO COM ANTI-FASL E ANTI-TNF α . Células T do baço de camundongos com 15 dias de infecção foram cultivadas com meio ou ativadas com anti-CD3 na presença de anti-FasL, anti-TNF, IgG. Após 24 h de cultura, os sobrenadantes foram testados para IL-2 (A), IFN- γ (B), IL-4 (C), IL-10 (D). Média e SEM estão representados. Cultura de células realizada em duplicatas.

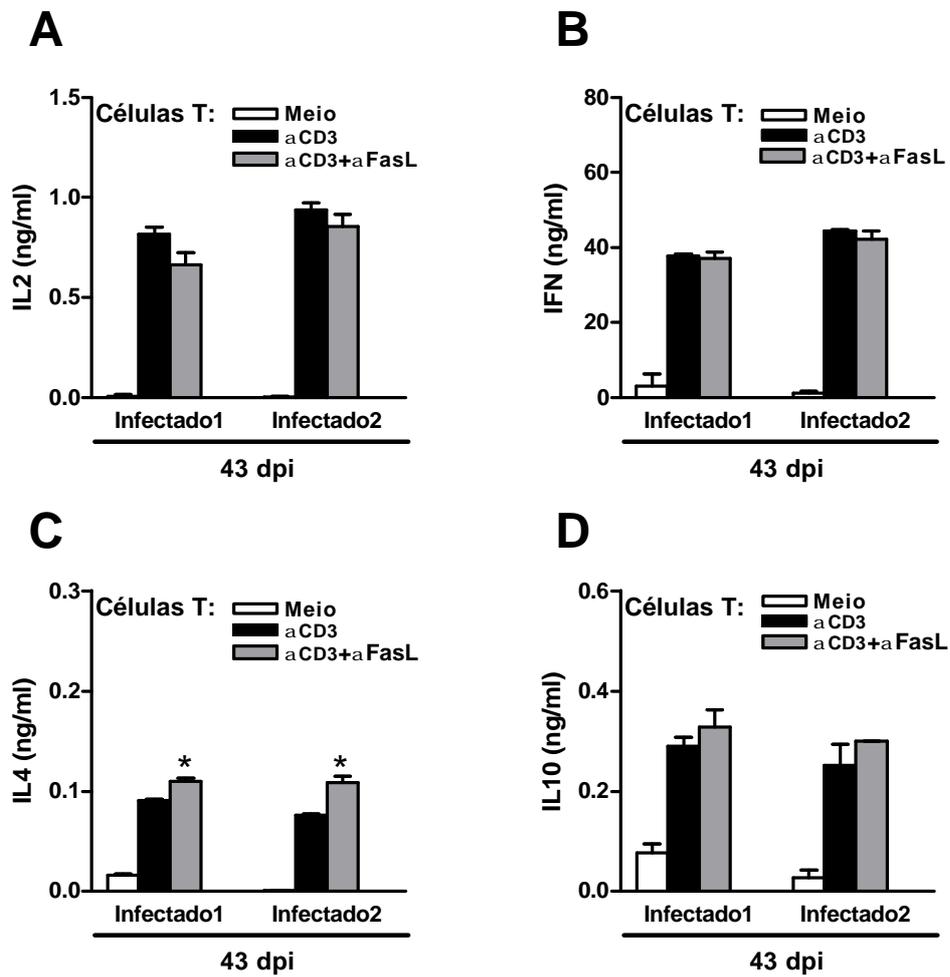


FIGURA 11 – PERFIL DE CITOCINAS NO BAÇO APÓS TRATAMENTO COM ANTI-FASL. Células T do baço de camundongos com 43 dias de infecção foram cultivadas com meio ou ativadas com anti-CD3 na presença ou ausência de anti-FasL. Após 24 h de cultura, os sobrenadantes foram testados para IL-2 (A), IFN- γ (B), IL-4 (C), IL-10 (D). Média e SEM estão representados. Cultura de células realizada em duplicatas. Diferenças significativas indicadas por (*) para $p < 0,05$ em relação à cultura com anti-CD3.

4.11 Morte celular induzida por ativação no linfonodo drenante

Para verificar a ocorrência de AICD em células do linfonodo poplíteo, células deste linfonodo de camundongos normais e infectados foram cultivadas na presença de meio ou anti-CD3. Após 24 h, estas células foram marcadas com anti-CD4, anti-CD8 bem como com 7-AAD para a detecção da apoptose. Em contraste com células T de camundongos normais, as células T CD4⁺ (Figura 12 A) e T CD8⁺ (Figura 12 B) de camundongos infectados (15 dpi) apresentaram AICD. A AICD também foi observada em células T CD4⁺ e T CD8⁺ aos 43 dpi (Figura 12 C e D).

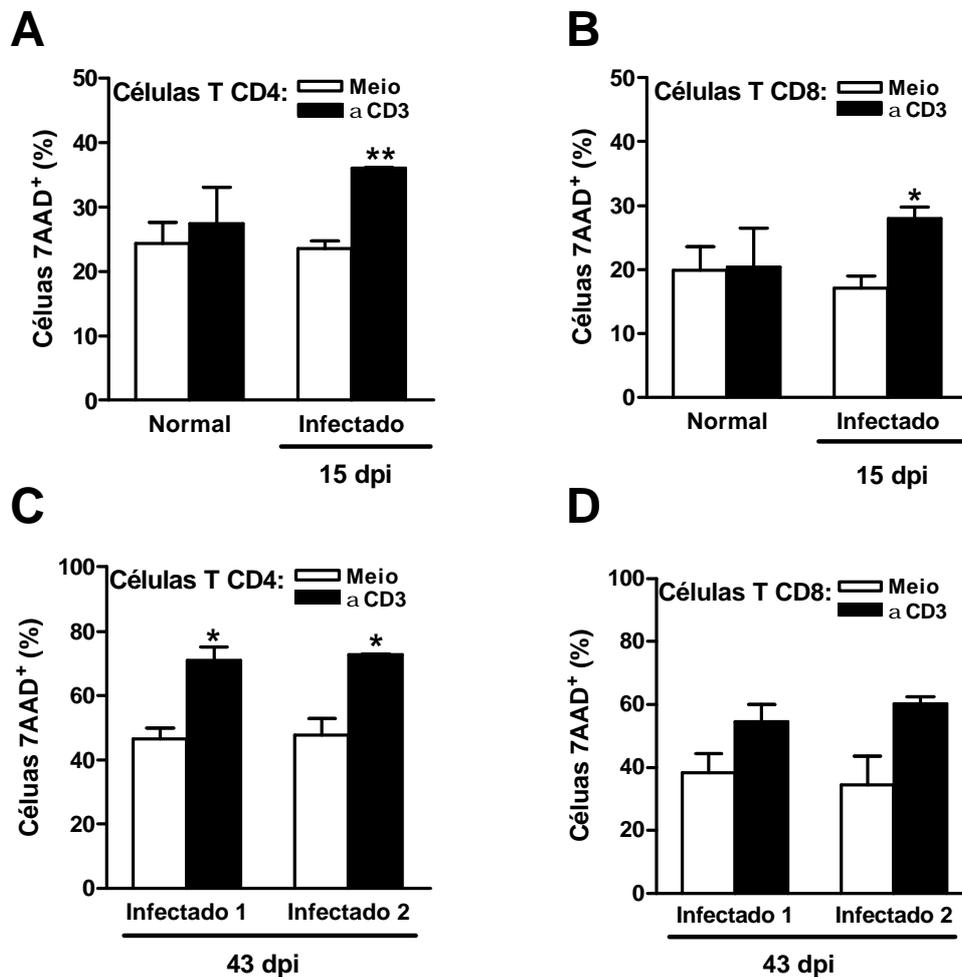


FIGURA 12 – APOPTOSE NO LINFONODO APÓS INFEÇÃO POR *L. major*. Células do linfonodo drenante de camundongos normais e infectados foram cultivadas na presença de meio ou anti-CD3. Após 24 h, as células foram coletadas e incubadas com fluorocromos anti-CD4 e CD8 e também com 7-AAD para a detecção da apoptose. Porcentagem de células T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B) apoptóticas aos 15 dpi. Porcentagem de células T CD4⁺ (C) e T CD8⁺ (D) apoptóticas aos 43 dpi. Média e SEM estão representados. Diferenças significativas indicadas por (*) para $p < 0,05$ e por (**) para $p < 0,01$ em relação à cultura não estimulada.

4.12 Mecanismos de apoptose no linfonodo drenante

Para estudar os mecanismos de AICD no linfonodo drenante, tentamos inibir a apoptose induzida pela via Fas e via caspases 8 e 9. Para isto, células do linfonodo drenante foram cultivadas com meio ou ativadas com anti-CD3 e tratadas com anti-FasL, isotipo controle (IgG), DMSO (diluyente dos inibidores de caspases), IETD (inibidor de caspase-8), e LEHD (inibidor de caspase-9). Após 24 h de cultura, estas células foram marcadas para CD4, CD8 e Anexina V para a detecção da apoptose. Em contraste com células T CD4 de animais normais, detectamos a AICD em células CD4⁺ de camundongos infectados aos 15 dpi (Figura 13 A e C). Enquanto a apoptose diminui em células T CD8⁺ dos animais normais (Figura 13 B), após a ativação ocorre aumento da apoptose de células T CD8⁺ dos animais infectados (Figura 13 B e D). No entanto, os inibidores de FasL, caspase-8 e caspase-9 não bloquearam a AICD de células T (Figura 13 A-D).

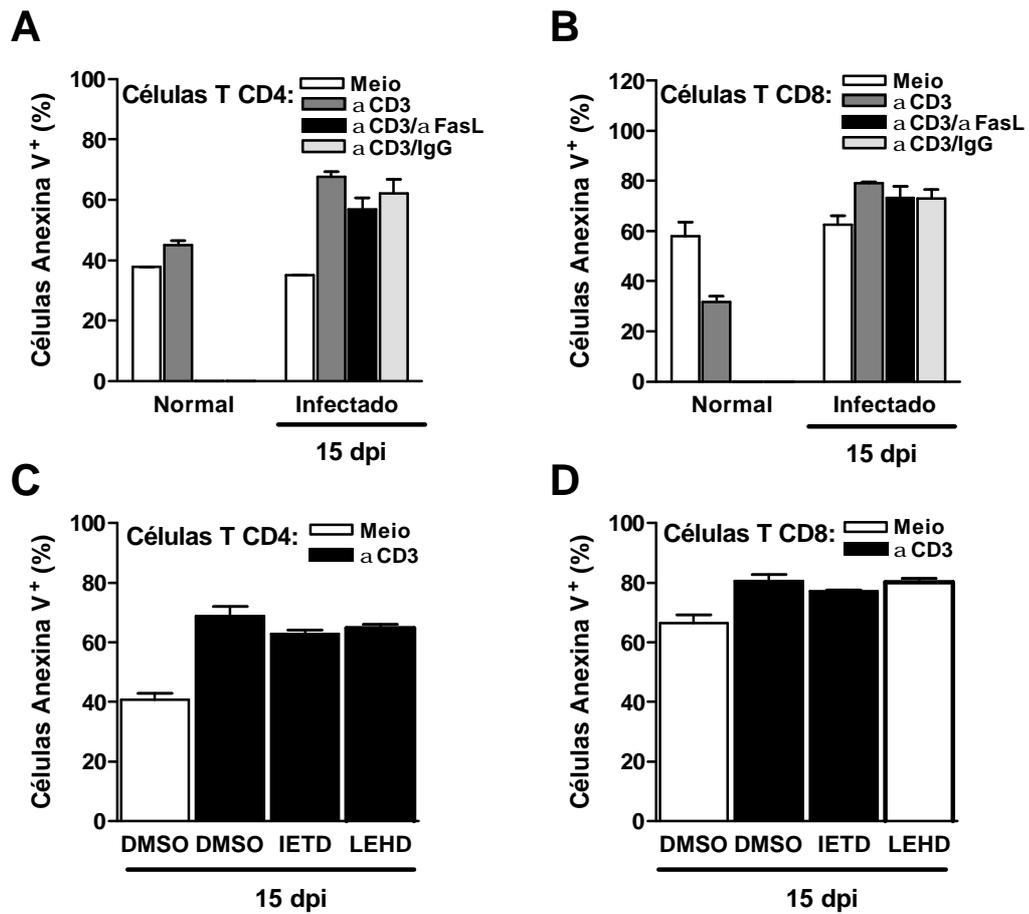


FIGURA 13 – MECANISMOS DE APOPTOSE NO LINFONODO APÓS INFECÇÃO POR *L. major*. Células do linfonodo drenante de camundongos normais e infectados (15 dpi) foram cultivadas na presença de meio ou anti-CD3 e tratadas com anti-FasL e com isotipo controle IgG (A e B), ou com IETD, LEHD ou DMSO (C e D). Após 24 h de cultura, as células foram coletadas e marcadas com fluorocromos anti-CD4 e anti-CD8 e também com Annexina V⁺ para a detecção da apoptose. Porcentagem de células T CD4⁺ (A e C) e T CD8⁺ (B e D) apoptóticas. Média e SEM estão representados. Determinações em duplicatas.

4.13 Perfil de citocinas no linfonodo drenante após bloqueio dos ligantes indutores de morte

A figura 14 nos apresenta o perfil de citocinas de dois animais infectados, produzidas após tratamento com anti-FasL *in vitro*. Após 24 h de cultura, os sobrenadantes foram coletados e testados pelo método ELISA. Não foram observadas alterações nos níveis de IL-2 (Figura 14 A), IFN- γ (Figura 14 B) e de IL-10 (Figura 14 C). Não houve produção de IL-4 (não mostrado).

Também foram dosadas as citocinas após a cultura de 24 h com os inibidores de caspase-8 (zIETD) e caspase-9 (zLEHD) (Figura 15). O tratamento com zIETD levou a uma diminuição na produção de IL-2 (Figura 15 A) e de IFN- γ (Figura 15 B) pelas células de camundongos normais. Nenhum dos tratamentos utilizados exerceu influência na produção de citocinas pelas células de camundongos infectados.

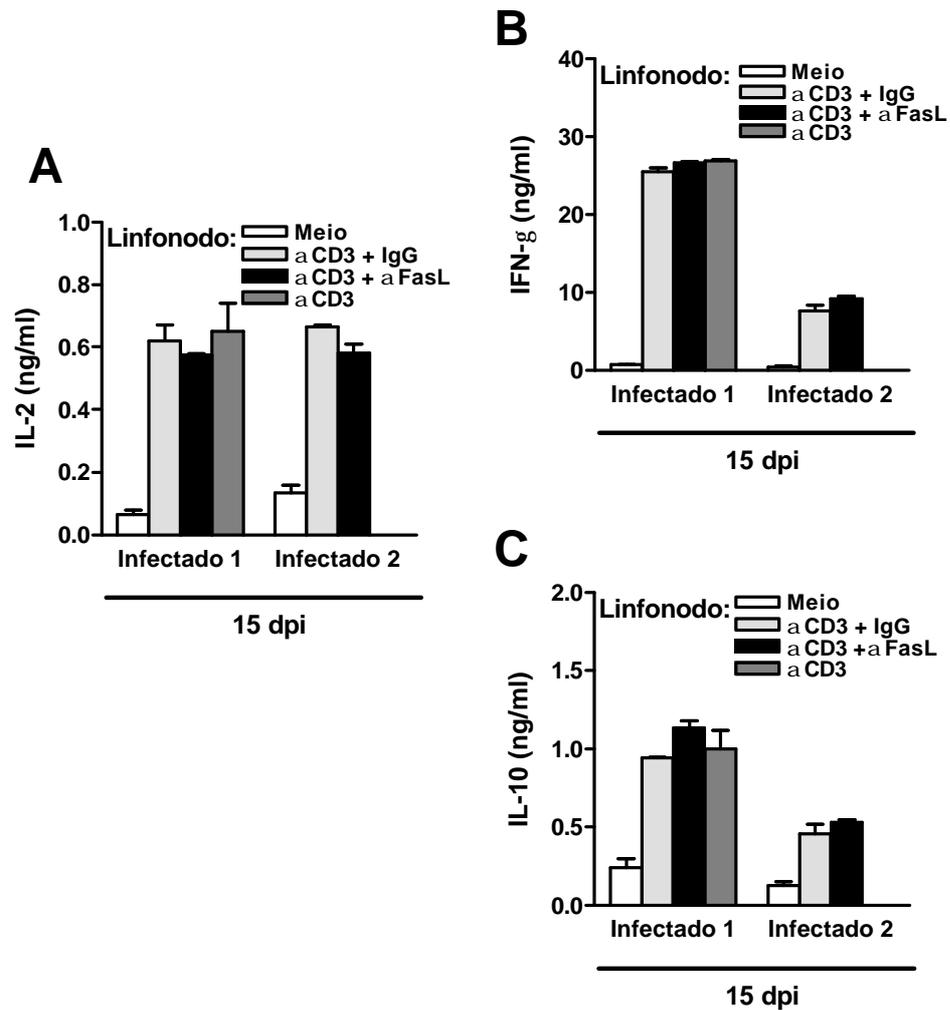


FIGURA 14 – CITOCINAS NO LINFONODO APÓS INIBIÇÃO DA VIA FAS. Células do linfonodo drenante de camundongos infectados (15 dpi) foram cultivadas na presença de meio ou ativadas com anti-CD3 e tratadas com anti-FasL ou com isotipo controle IgG. Após 24 h de cultura, os sobrenadantes foram testados para IL-2 (A), IFN- γ (B) e IL-10 (C). Média e SEM estão representados. Cultura de células realizada em duplicatas.

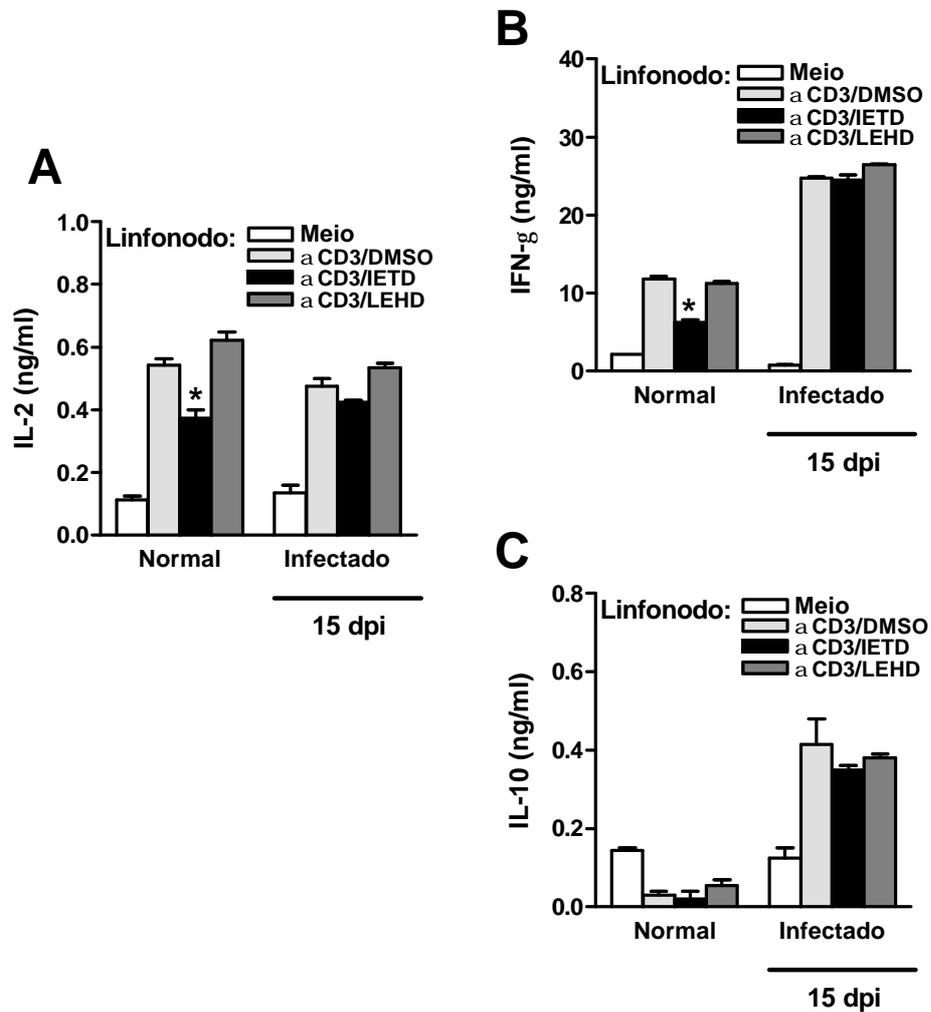


FIGURA 15 – CITOCINAS NO LINFONODO APÓS INIBIÇÃO DAS CASPASES 8 E 9. Células do linfonodo drenante de camundongos normais e infectados (15 dpi) foram cultivadas na presença de meio ou ativadas com anti-CD3 e tratadas com IETD, LEHD ou DMSO. Após 24 h de cultura, os sobrenadantes foram testados para IL-2 (A), IFN- γ (B) e IL-10 (C). Média e SEM estão representados. Cultura de células realizada em duplicatas. Diferenças significativas indicadas por (*) para $p < 0,05$ em relação à cultura com DMSO.

4.14 Expressão de citocinas

Para estudar o desenvolvimento da resposta de células Th1 e Th2, procuramos manipular as condições de diferenciação de células T *in vitro*. Para isto, células do linfonodo drenante foram cultivadas na presença de anti-CD3 com IL-4, IL-12 ou sem citocina. Após 72 h, os sobrenadantes foram coletados e testados para a presença de citocinas. A figura 16 apresenta dois experimentos realizados independentemente (no experimento 1 foi utilizado 1 ng/ml de IL-12; no experimento 2, 5 ng/ml). No experimento 2, a cultura com IL-12 levou a um aumento na produção de IL-2 (Figura 16 A). Em contrapartida, a IL-12 levou a uma redução na produção de IFN- γ (Figura 16 B, experimento 2), na produção de IL-4 (Figura 16 C, experimento 1) e também a uma redução na produção de IL-10 (Figura 16 D). O tratamento com IL-4 não modificou o perfil de citocinas secretados.

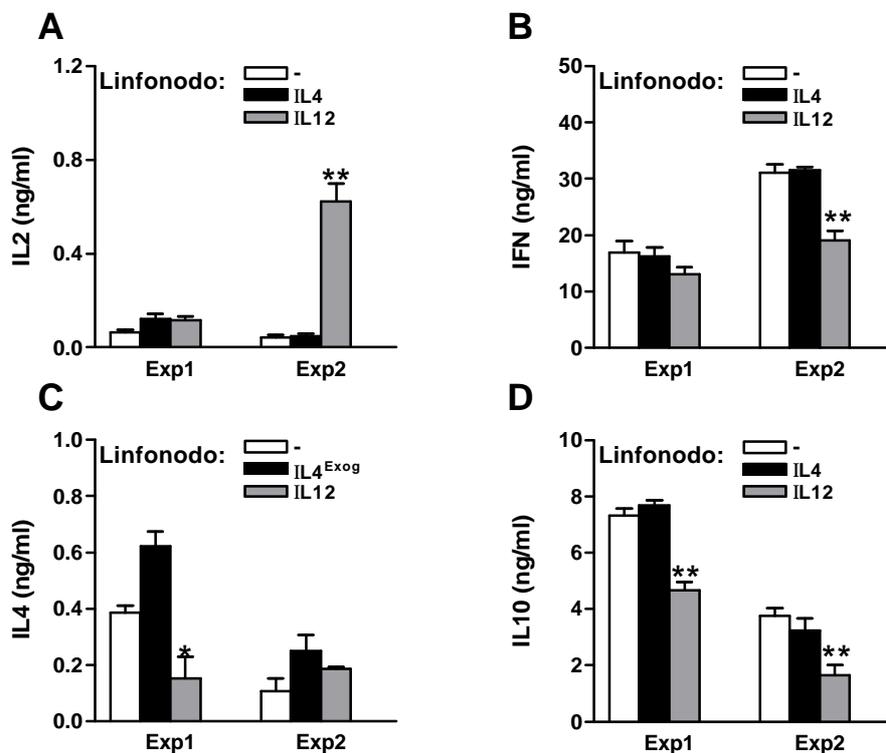


FIGURA 16 – CITOCINAS NO LINFONODO NA PRESENÇA DE IL-4 E IL-12 EXÓGENA. Células do linfonodo drenante de camundongos infectados foram estimuladas com anti-CD3 na presença de IL-4, IL-12 (1 ng/ml ou 5 ng/ml nos experimentos 1 e 2 respectivamente) ou sem citocina. Após 72 h de cultura, os sobrenadantes foram testados para IL-2 (A), IFN- γ (B), IL-4 (C) e IL-10 (D). Média e SEM estão representados. Cultura de células realizada em triplicatas (exp 1) ou quadruplicatas (exp2). Diferenças significativas indicadas por (*) para $p < 0,05$ e (**) para $p < 0,01$ em relação à cultura sem citocina.

Para observar o efeito dos tratamentos em subtipos celulares, as culturas foram tratadas com PMA e ionomicina por mais 3 h. Brefeldina foi adicionada às culturas para prevenir a secreção de citocinas. Em seguida, as células foram quantificadas por meio de um contador de partículas automático e processadas para citometria de fluxo com anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-IFN- γ e anti-IL-10. Independentemente da cultura ser re-estimulada com PMA e ionomicina, a presença de IL-12 diminuiu o número total de células, sendo que os demais tratamentos não as alteraram (Figura 17 A). A proporção de células CD8⁺ apresentou uma pequena diminuição após o tratamento com IL-12 (Figura 16 B), enquanto que a proporção de células CD4⁺ manteve-se inalterada (Figura 17 C). A porcentagem de células IFN- γ ⁺ foi drasticamente reduzida após cultura com IL-12 (Figura 17 D). Estes resultados sugerem que a IL-12 prejudica a viabilidade das células. Já a cultura com IL-4 promoveu um aumento na proporção de células IL-10⁺ (Figura 17 E). Na ausência de citocina externa prevalece um perfil Th1 (Figura 17 D e E), enquanto que a cultura com a adição de IL-4 demonstra um perfil misto de citocinas (IFN- γ e IL-10) (Figura 17 D e E).

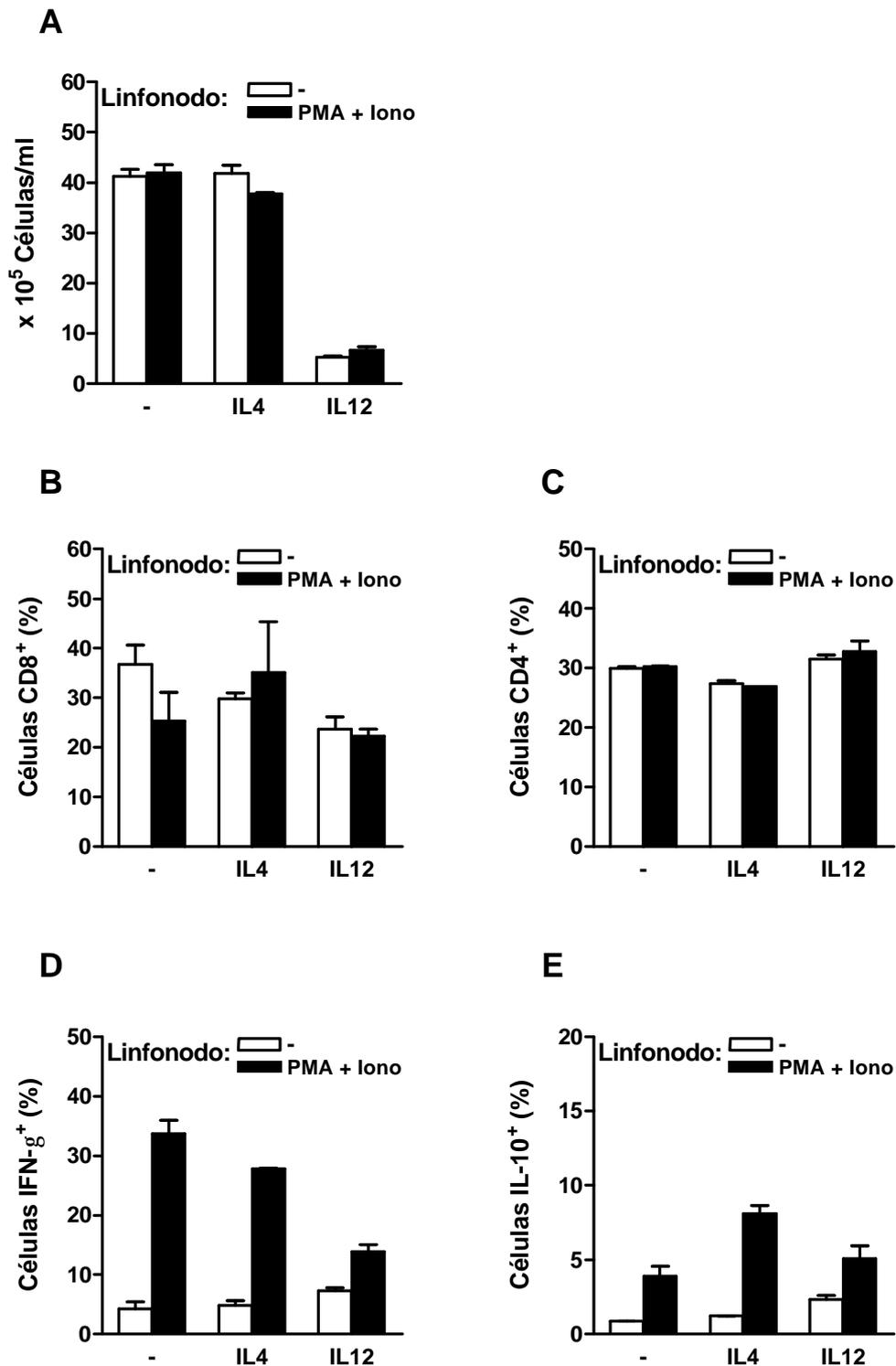


FIGURA 17 – EFEITO DA IL-4 E IL-12 NAS SUBPOPLAÇÕES DE LINFÓCITOS. Células do linfonodo drenante de camundongos infectados foram estimuladas com anti-CD3 na presença de IL-4, IL-12 ou sem citocina. Após 72 h de cultura, as células foram re-estimuladas ou não com PMA e ionomicina na presença de brefeldina. As células foram quantificadas (A) e processadas para citometria de fluxo. Em (B), porcentagem de células CD8⁺, (C) Células CD4⁺, (D) Células IFN- γ ⁺, (E) Células IL-10⁺. Média e SEM estão representados. Cultura de células realizada em duplicatas.

A cultura com IL-12 diminuiu a proporção de células CD8⁺ produtoras de IFN- γ (Figura 18 A). A adição de IL-4 favoreceu a sobrevivência das células CD4⁺ produtoras de IL-4 e de IL-10 (Figura 18 C e D respectivamente).

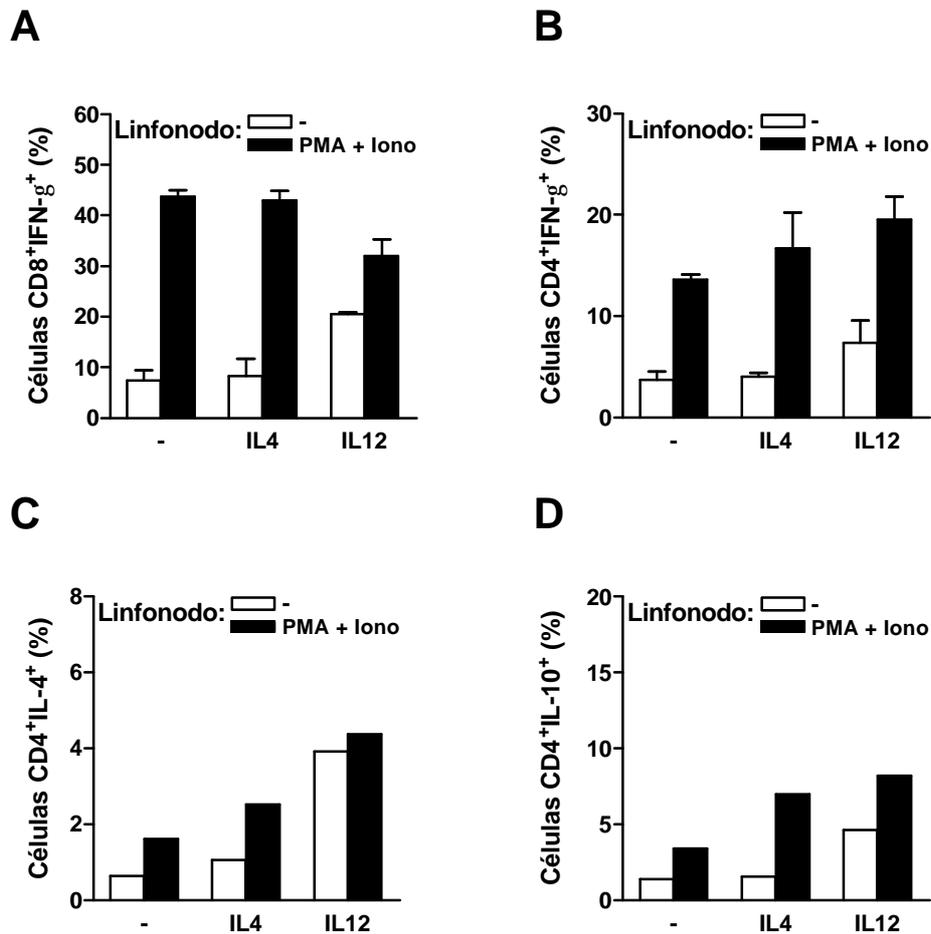


FIGURA 18 – EFEITOS DA IL-4 E IL-12 NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS POR LINFÓCITOS T CD4 E CD8. Células do linfonodo drenante de camundongos infectados foram estimuladas com anti-CD3 na presença de IL-4, IL-12 ou sem citocina. Após 72 h de cultura, as células foram reestimuladas ou não com PMA e ionomicina na presença de brefeldina. As células foram quantificadas e processadas para citometria de fluxo. (A) Porcentagem de células CD8⁺IFN- γ ⁺, (B) Células CD4⁺IFN- γ ⁺, (C) Células CD4⁺IL-4⁺, (D) Células CD4⁺IL-10⁺. Média e SEM estão representados. Cultura de células realizada em duplicatas, mas coradas com diferentes combinações de fluorocromos.

Visto o papel prejudicial da IL-12 sobre as células neste sistema, investigamos se a inibição da caspase-8 poderia salvá-las da morte. Células do linfonodo drenante foram cultivadas com anti-CD3, na presença de zIETD ou DMSO. Após 72 h de cultura, as células foram tratadas com PMA e ionomicina por mais 3 h e quantificadas através de um contador de partículas automático. A figura 20 ilustra dois experimentos realizados independentemente. Nos dois experimentos realizados, a inibição da caspase-8 não contribuiu para o resgate da morte causada pela IL-12 (Figura 19 A e B).

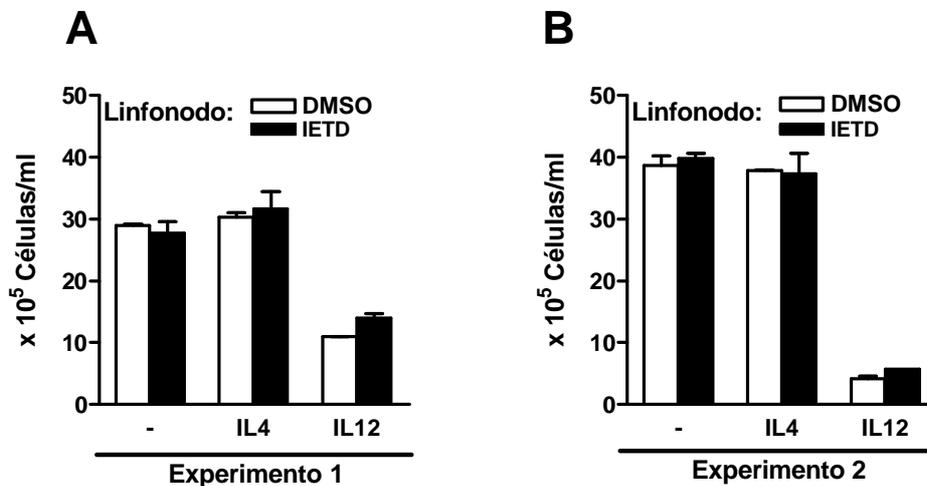


FIGURA 19 – BLOQUEIO DA CASPASE-8 NÃO PREVINE A MORTE INDUZIDA PELA IL-12. Células do linfonodo drenante de camundongos infectados foram estimuladas com anti-CD3 na presença de IL-4 ou sem citocina, tratadas com IETD ou DMSO. Após 72 h de cultura, as células foram re-estimuladas com PMA e ionomicina na presença de brefeldina. As células foram quantificadas em um contador de partículas automático. A e B, número absoluto de células obtido de duplicatas, em dois experimentos independentes. Média e SEM estão representados.

A seguir, investigamos se a caspase-8 é capaz de influenciar na diferenciação de células T. Para isto, células do linfonodo drenante foram cultivadas na presença de anti-CD3, com inibidor de caspase-8 (zIETD) ou com diluente controle DMSO. Após 72 h de cultura, os sobrenadantes foram coletados e testados para a produção de citocinas. A figura 20 ilustra dois experimentos realizados independentemente. A inibição da caspase-8 parece prejudicar a produção de IFN- γ na presença de IL-4 (Figura 20 A e B). Em contrapartida, a inibição da caspase-8 não alterou a produção de IL-10 (Figura 20 C e D).

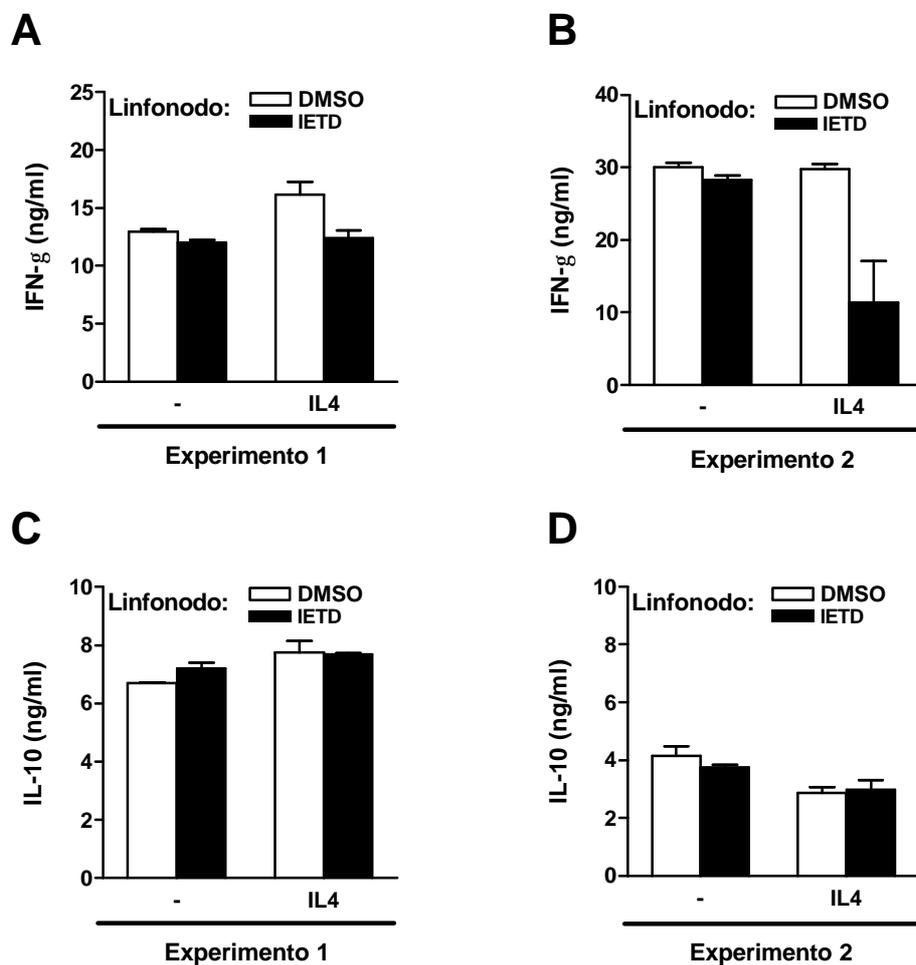


FIGURA 20 – EFEITOS DO BLOQUEIO DA CASPASE-8 NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS. Células do linfonodo drenante de camundongos infectados foram estimuladas com anti-CD3 na presença de IL-4 ou sem citocina, tratadas com IETD ou DMSO. Após 72 h de cultura, os sobrenadantes foram testados para IFN- γ (A e B) e para IL-10 (C e D) por ELISA. Média e SEM estão representados. Resultados de dois experimentos independentes. Cultura de células realizada em duplicatas.

Em seguida, as células foram re-estimuladas com PMA e ionomicina para o estudo das citocinas intracelulares IFN- γ e IL-10. Em dois experimentos realizados independentemente, a inibição da caspase-8 diminuiu o percentual de células produtoras de IFN- γ (Figura 21 A), independente da presença de IL-4. No entanto, o bloqueio da caspase-8 não alterou a proporção de células produtoras de IL-10 (Figura 21 B).

A inibição da caspase-8 afetou principalmente a proporção de células CD8⁺ (Figura 22 A). A proporção de células CD4⁺ não sofreu nenhuma alteração (Figura 22 B).

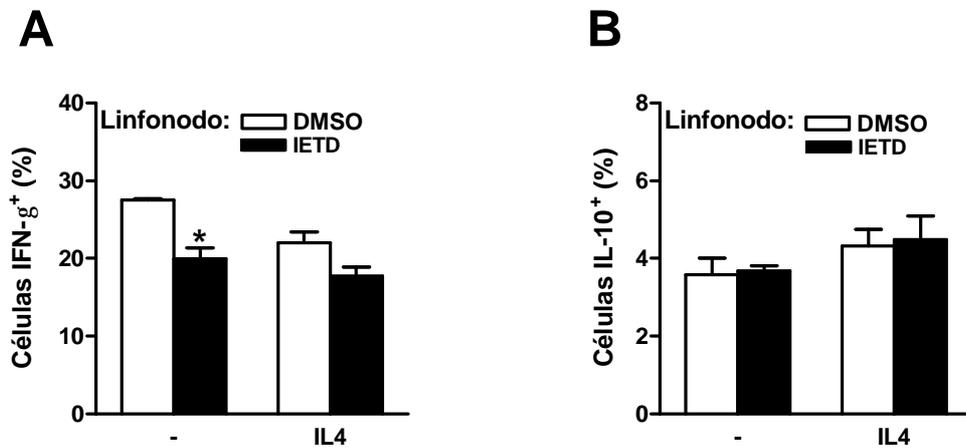


FIGURA 21 – INIBIÇÃO DA CASPASE-8 PREJUDICA AS CÉLULAS PRODUTORAS DE IFN- γ . Células do linfonodo drenante foram cultivadas na presença de anti-CD3, IL-4 ou sem citocina e tratadas com IETD ou DMSO. Após 72 h, estas células foram re-estimuladas com PMA e ionomicina na presença de brefeldina e processadas para citometria de fluxo. Porcentagem de células IFN- γ ⁺(A), porcentagem de células IL-10⁺ (B). Média e SEM estão representados. Culturas realizadas em duplicatas. Diferenças significativas indicadas por (*) para $p < 0,05$ em relação à cultura com DMSO.

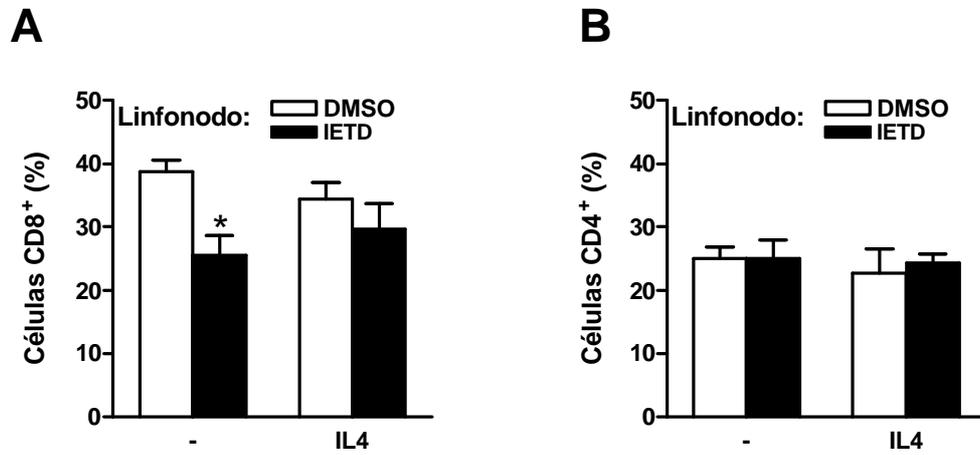


FIGURA 22 – INIBIÇÃO DA CASPASE-8 DIMINUI A PROPORÇÃO DE CÉLULAS CD8⁺. Células do linfonodo drenante foram cultivadas na presença de anti-CD3, IL-4 ou sem citocina e tratadas com IETD ou DMSO. Após 72 h, estas células foram re-estimuladas com PMA e ionomicina na presença de brefeldina e processadas para citometria de fluxo. (A) Porcentagem de células CD8⁺, (B) Porcentagem de células CD4⁺. Média e SEM estão representados. Cultura realizada em triplicatas. Culturas realizadas em duplicatas. Diferenças significativas indicadas por (*) para $p < 0,05$ em relação à cultura com DMSO.

Identificamos, então, qual subtipo de célula T está sendo prejudicado na produção de IFN- γ devido à inibição da caspase-8. Para isto, realizamos detecção de moléculas de superfície com anti-CD4 e anti-CD8 bem como uma marcação intracelular com anti-IFN- γ . Nos dois experimentos realizados, tanto as células CD8⁺ como as células CD4⁺ produtoras de IFN- γ foram prejudicadas com a inibição da caspase-8 (Figura 23 A-B).

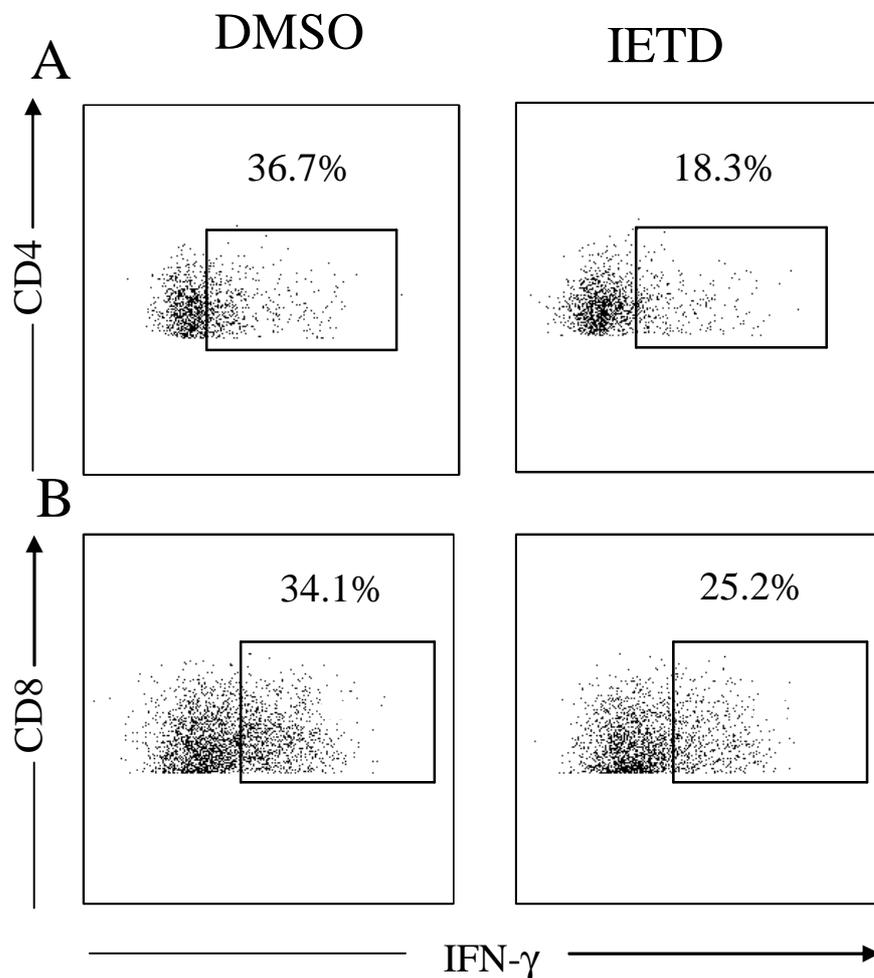


FIGURA 23 – INIBIÇÃO DA CASPASE-8 AFETA CÉLULAS T PRODUTORAS DE IFN- γ . Células do linfonodo drenante foram cultivadas na presença de anti-CD3 e tratadas com IETD ou DMSO por 72 h. A seguir, as células foram re-estimuladas com PMA e ionomicina na presença de brefeldina. Citometria de fluxo foi utilizada para a identificação das subpopulações de células T. (A, B) Dot plot apresentando células T tratadas com DMSO (painel da esquerda) ou tratadas com IETD (painel da direita). Os números são referentes ao percentual de células IFN- γ ⁺ entre as células T CD4⁺ (A) ou T CD8⁺ (B).

4.15 Análise da inibição da caspase-8 *in vivo*

Devido aos efeitos observados no bloqueio da caspase-8 *in vitro*, decidimos estudar o impacto de seu bloqueio *in vivo*. Para isto, utilizamos camundongos transgênicos os quais expressam a proteína viral MC159 (vFLIP), em células T. Esta proteína interfere na função da caspase-8 em células T.

A figura 24 mostra um gel de agarose e evidencia a presença do transgene que codifica a proteína viral (Tg – 800bp) nos camundongos transgênicos (colunas B, C e D), mas não no pool de DNA dos camundongos controles (coluna E). Todos os camundongos testados expressam o gene para a proteína β -globina (β g – 500bp) usada como controle do PCR.

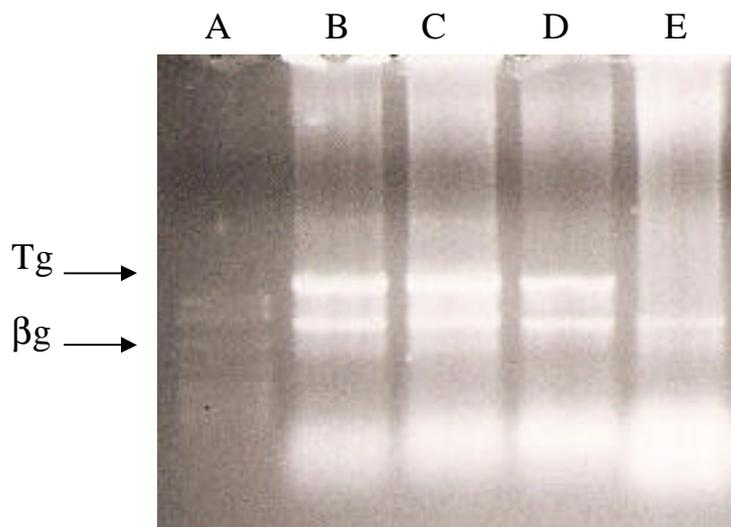


FIGURA 24 – CAMUNDONGOS EXPRESSANDO O TRANSGENE PARA A PROTEÍNA VIRAL MC159. Gel de agarose a 3%. Linha A – Marcadores de DNA. Linhas B, C e D – Camundongos expressando o transgene para a proteína viral MC159 (800bp). Linha E – Pool de camundongos controles. Todos os camundongos expressam gene para a proteína controle β globina (500bp).

4.16 A inibição da caspase-8 pela vFLIP aumenta a resistência à infecção *L. major*

Para o estudo da inibição da caspase-8 *in vivo*, 4 camundongos transgênicos e 4 camundongos controles foram infectados com 3×10^6 promastigotas de *L. major* no coxim plantar esquerdo. Os experimentos foram realizados 41 dias após a infecção.

Os camundongos transgênicos e seus controles desenvolveram lesões semelhantes após a infecção por *L. major*. No entanto, aos 40 dpi, os camundongos v-FLIP apresentavam lesão significativamente menor que os camundongos selvagens (Figura 25 A e B). Além disso, estes camundongos v-FLIP possuíam carga parasitária no linfonodo drenante significativamente reduzida quando comparados aos selvagens (Figura 25 B).

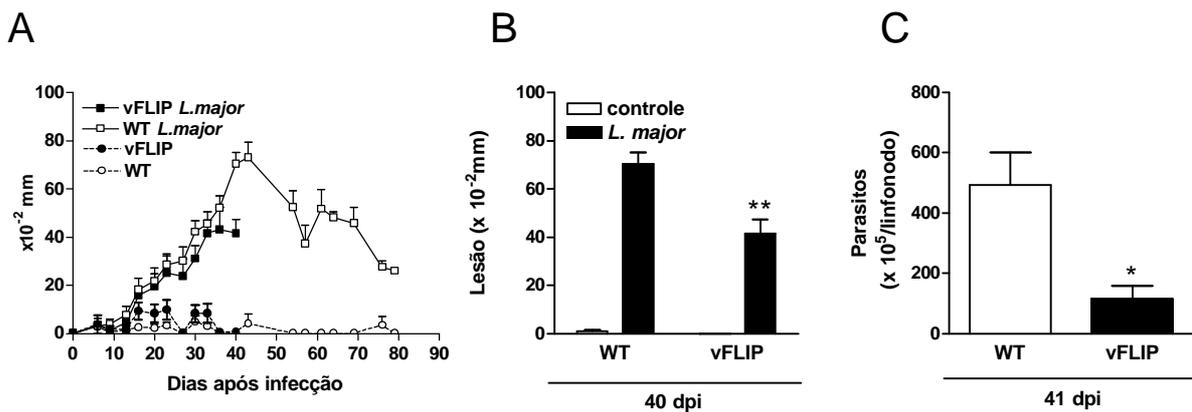


FIGURA 25 – CAMUNDONGOS v-FLIP SÃO MAIS RESISTENTES A INFECÇÃO POR *L. major*. Camundongos transgênicos e seus controles foram infectados no coxim plantar esquerdo com 3×10^6 promastigotas. Medida da pata direita não infectada é indicada como controle. (A e B) Camundongos v-FLIP apresentaram menor desenvolvimento da lesão (40 dpi). (C) Após 41 dias de infecção, menor carga parasitária foi encontrada nos linfonodos dos camundongos v-FLIP. Média e SEM estão representados. N=4 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas por (*) para $p < 0,05$ e (**) para $p < 0,01$ entre camundongos WT e vFLIP infectados.

4.17 Baixa expansão celular no linfonodo drenante dos camundongos vFLIP

A análise da resposta imune nestes camundongos foi realizada no baço e no linfonodo drenante (linfonodo poplíteo). Primeiramente, realizamos uma contagem de células viáveis destes órgãos linfóides.

Os camundongos v-FLIP infectados apresentaram um número de células significativamente maior no baço quando comparado aos seus controles (Figura 26 A). Inversamente, observamos um menor número de células no linfonodo drenante dos camundongos v-FLIP comparado aos camundongos controles (Figura 26 B). Camundongos v-FLIP apresentaram um número significativamente reduzido de células T CD4⁺ (Figura 27 A) como também de células T CD8⁺ (Figura 27 B) no linfonodo drenante quando comparados aos camundongos controles. A maior diferença ocorreu no número de células T CD8⁺ (Figura 27 B). Em consequência, os camundongos vFLIP apresentaram uma relação CD8:CD4 de 1:1, reduzida em comparação com os camundongos controles infectados (1,7:1).

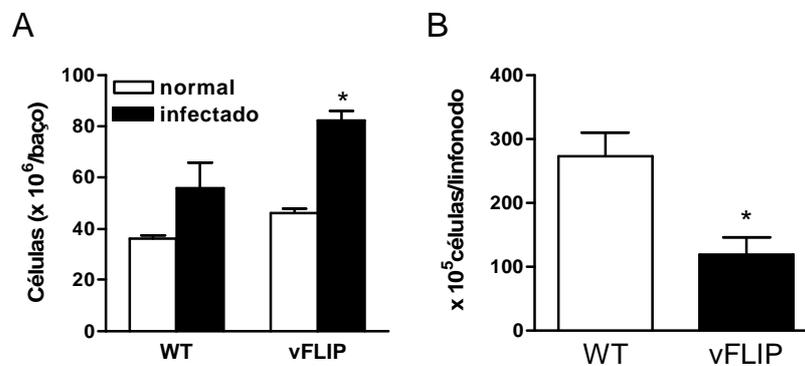


FIGURA 26 – ALTERAÇÃO NA CELULARIDADE NO BAÇO E LINFONODOS DE CAMUNDONGOS vFLIP INFECTADOS COM *L major*. Células do baço e linfonodo drenante de camundongos controles e transgênicos normais ou infectados foram coletadas e quantificadas após 41 dias de infecção. (A) Camundongos v-FLIP infectados apresentaram significante aumento no número de esplenócitos quando comparado aos controles. (B) Camundongos v-FLIP apresentaram número reduzido de células no linfonodo drenante. Média e SEM estão representados. N=4 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas por (*) para $p < 0,05$ entre camundongos WT e vFLIP infectados.

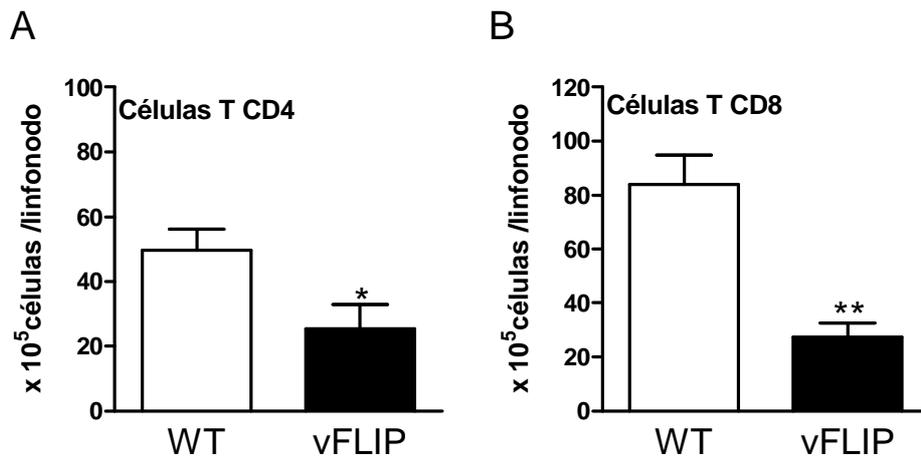


FIGURA 27 – SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T NOS CAMAUNDONGOS vFLIP INFECTADOS COM *L. major*. Células do linfonodo drenante dos camundongos transgênico v-FLIP e seus controles infectados com *L. major* foram coletadas e quantificadas 41 dpi. Citometria de fluxo foi utilizada para a determinação dos subtipos de células T. (A) Células T CD4⁺, (B) células T CD8⁺. Média e SEM estão representados. N=4 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas por (*) para $p < 0,05$ e (**) para $p < 0,01$ entre camundongos WT e vFLIP infectados.

4.18 Aumento da morte de células T CD8⁺ nos camundongos vFLIP infectados

Ao contrário do encontrado no linfonodo drenante (Figura 27), não ocorreu diferença significativa no número de células T CD4⁺ (Figura 28 A) e de células CD8⁺ (Figura 28 B) no baço de camundongos vFLIP e controles infectados. Também não observamos diferença no número de células B (não mostrado).

Avaliamos também a porcentagem de células T CD4⁺ e de células T CD8⁺ apoptóticas no baço. Os camundongos v-FLIP e seus controles apresentaram níveis similares de células T CD4⁺ apoptóticas (Figura 28 C). Ao contrário, os camundongos v-FLIP infectados apresentaram maior proporção de células T CD8⁺ apoptóticas (Figura 28 D).

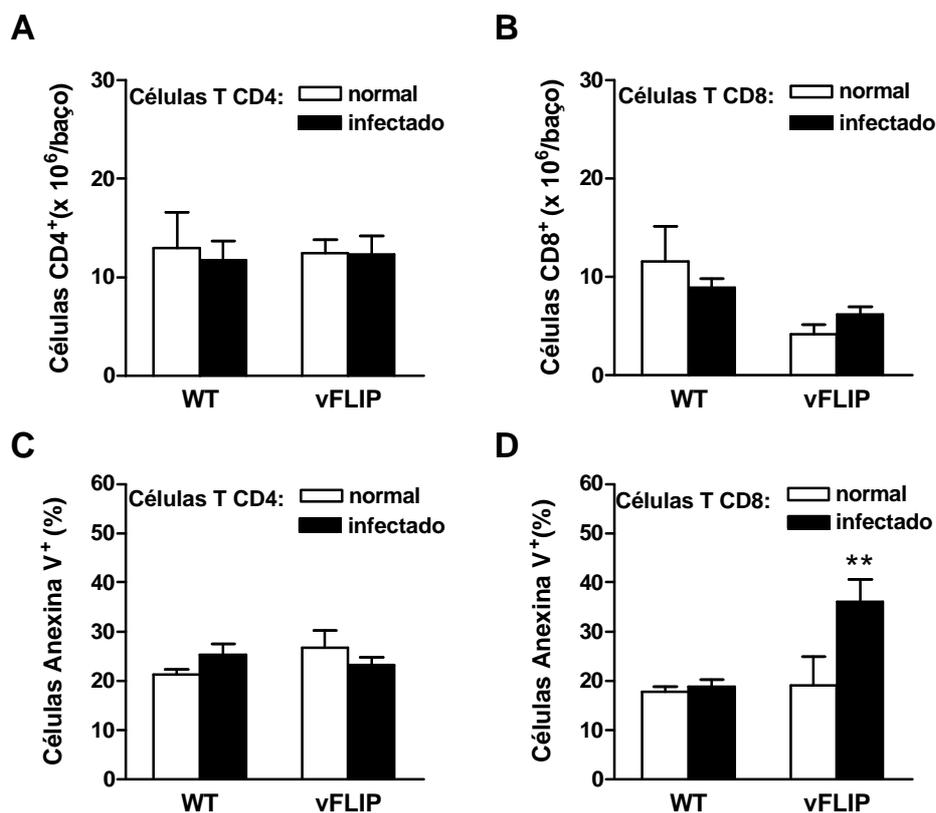


FIGURA 28 – APOPTOSE DE CÉLULAS T CD8⁺ NOS CAMUNDONGOS vFLIP INFECTADOS COM *L. major*. Células do baço de camundongos transgênicos e controles, normais ou infectados, foram coletadas e quantificadas 41 dpi. Citometria de fluxo foi utilizada para a determinação dos subtipos de células T bem como para a avaliação da apoptose através da marcação por anexina V. (A) células T CD4⁺, (B) células T CD8⁺, (C) Porcentagem de células T CD4⁺ apoptóticas, (D) Porcentagem de células T CD8⁺ apoptóticas. Média e SEM estão representados. N=4 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas por (**) para p < 0,01 entre camundongos WT e vFLIP infectados.

4.19 Aumento da produção de IL-4 e diminuição da produção de IL-2 por células T dos camundongos vFLIP

Para estudar o perfil de resposta imune nos camundongos vFLIP, realizamos uma cultura de células T do baço de camundongos transgênicos e controles infectados. Foram plaqueadas 2×10^5 células/poço na presença de meio ou anti-CD3. Após 48 h, os sobrenadantes foram coletados e testados para a presença de citocinas.

Os camundongos v-FLIP infectados apresentaram níveis similares de IFN- γ (Figura 29 B) e de IL-10 (Figura 29 D) em relação aos dos camundongos controles infectados. Em contrapartida, os camundongos v-FLIP apresentaram baixos níveis de IL-2 após estímulo com anti-CD3 (Figura 29 A) comparado ao observado nos camundongos controles, porém, exibiram uma elevada produção de IL-4 (Figura 29 C).

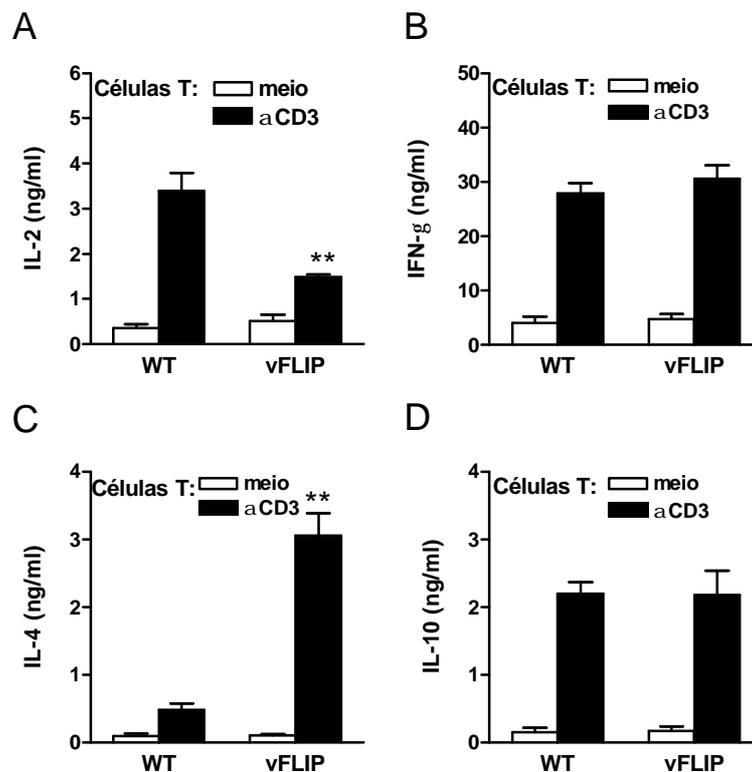


FIGURA 29 – CITOCINA NO BAÇO DE CAMUNDONGOS vFLIP APÓS INFECÇÃO POR *L. major*. Células T do baço de camundongos transgênicos e controles infectados por *L. major* (41 dpi) foram cultivadas na presença de meio ou anti-CD3. Após 48 h, os sobrenadantes foram testados para a produção de citocinas pelo método de ELISA. (A) IL-2, (B) IFN- γ , (C) IL-4, (D) IL-10. Média e SEM estão representados. N=4 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas (**) para $p < 0,01$ entre camundongos WT e vFLIP.

4.20 Viabilidade celular e proliferação celular prejudicadas nos camundongos vFLIP

Também realizamos ensaios de viabilidade e proliferação celular. Para o ensaio de viabilidade celular, utilizamos cultura de células T do baço (2×10^5 células/poço) dos camundongos transgênicos e controles após 48 h de incubação com meio ou anti-CD3 e ensaiamos pelo método MTT. Para o ensaio de proliferação celular, utilizamos células esplênicas totais ($2,5 \times 10^5$ células/poço) cultivadas com meio ou anti-CD3 por 48 h. A análise foi feita pelo método de incorporação de timidina.

Após estímulo com anti-CD3, observamos uma menor viabilidade nas células T dos camundongos v-FLIP quando comparado com os controles (Figura 30 A). Compatível com os baixos níveis de IL-2 produzidos por células T dos camundongos v-FLIP, estes esplenócitos também apresentaram significativa redução na proliferação celular após estímulo com anti-CD3 quando comparado ao observado nos camundongos controle (Figura 30 B).

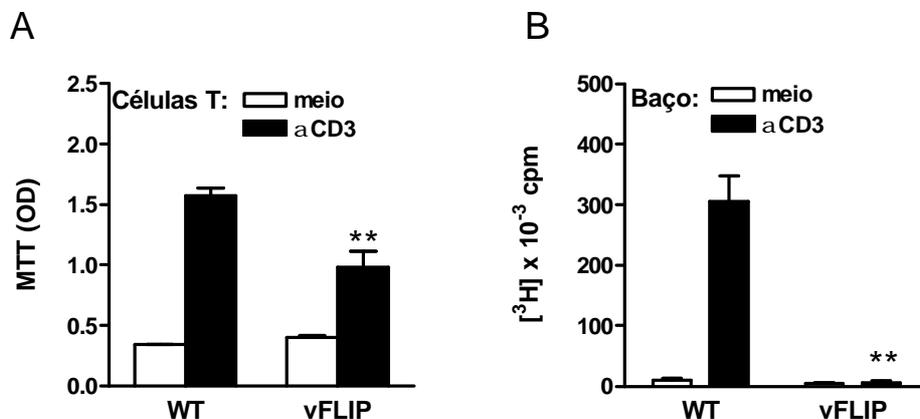


FIGURA 30 – VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR DE LINFÓCITOS APÓS INFECÇÃO POR *L. major*. Após 48 h de cultura na presença de meio ou anti-CD3, células T do baço de camundongos transgênicos e controles infectados por *L. major* (41 dpi) foram utilizadas para a determinação de viabilidade celular por MTT (A), ou esplenócitos totais para a determinação de proliferação celular com timidina radioativa. Média e SEM estão representados. N=4 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas por (**) para $p < 0,01$ entre camundongos WT e vFLIP.

4.21 Viabilidade celular e produção de citocinas no linfonodo drenante

Para dosar as citocinas produzidas por células do linfonodo drenante, células totais do gânglio (2×10^5 células/poço) de camundongos v-FLIP e seus controles foram cultivadas na presença de meio ou estimuladas com anti-CD3. Após 48 h, os sobrenadantes foram coletados para o teste de ELISA e também foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método MTT.

Conforme mostrado na figura 31 A, não observamos diferença na viabilidade entre células dos camundongos v-FLIP e seus controles, porém, células do linfonodo drenante dos camundongos v-FLIP tiveram elevada produção de IL-4 após re-estímulo com anti-CD3 quando comparado aos controles (Figura 31 D). Não foi observada nenhuma diferença nos níveis de IL-2 (Figura 31 B), IFN- γ (Figura 31 C) e IL-10 (Figura 31 E) entre os camundongos vFLIP e seus controles.

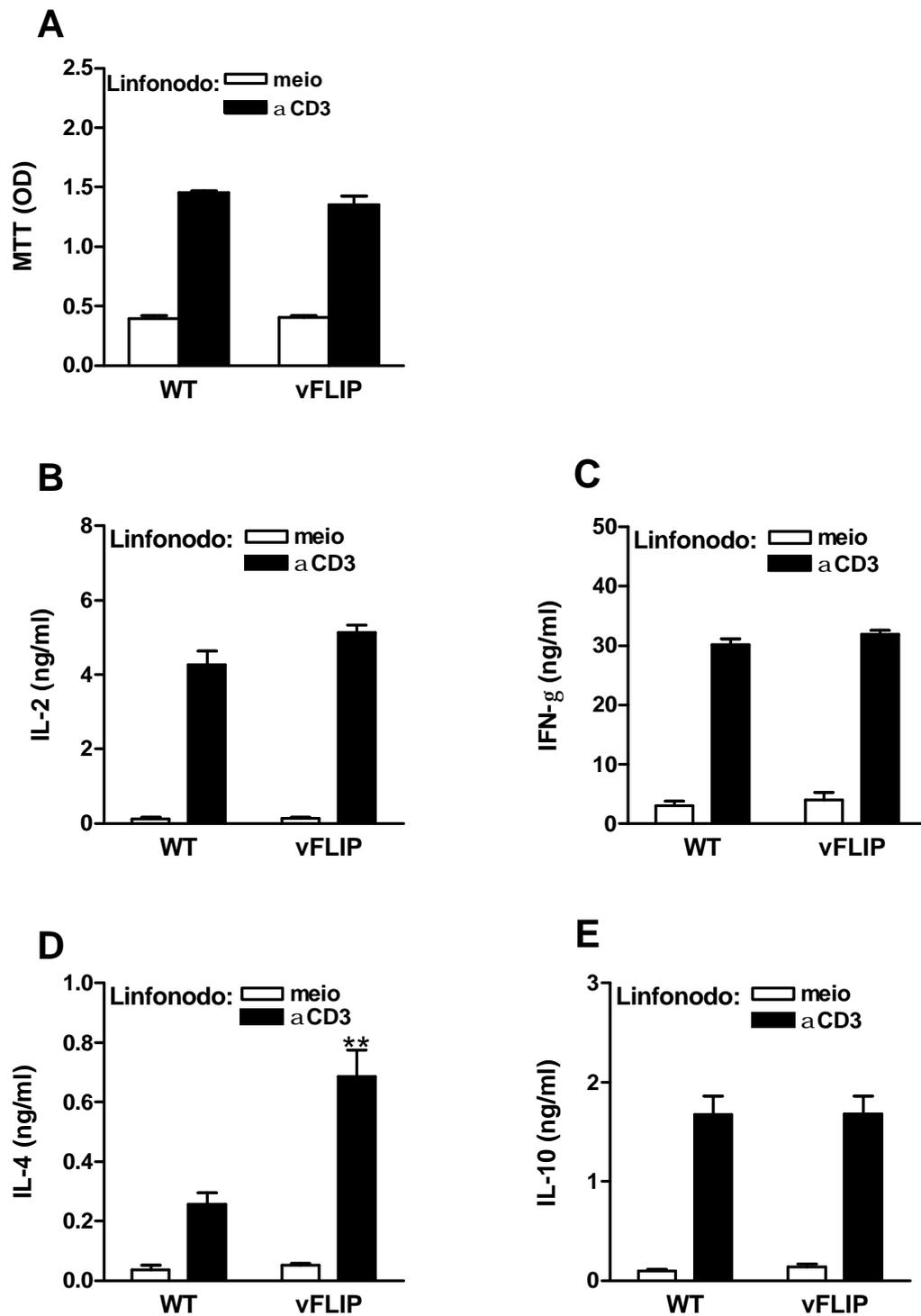


FIGURA 31 – VIABILIDADE E PRODUÇÃO DE CITOCINAS NOS LINFONODOS APÓS INFECÇÃO POR *L. major*. Células do linfonodo drenante de camundongos transgênicos e controles infectados com *L. major* (41 dpi) foram cultivadas na presença de meio ou anti-CD3. Após 48 h, estas células foram testadas para viabilidade celular com MTT (A) e os sobrenadantes foram avaliados para a detecção de IL-2 (B), IFN- γ (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) por ELISA. Média e SEM estão representados. N=4 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas por (**) para $p < 0,01$ entre camundongos WT e vFLIP.

4.22 Infecção por *L. major* promove aumento de macrófagos no baço de camundongos vFLIP infectados

Apesar dos camundongos transgênicos apresentarem menor número de linfócitos nos linfonodos e alta produção de IL-4, eles demonstraram maior resistência à infecção por *L. major*. Sendo assim, investigamos o papel dos macrófagos na defesa a infecção. O baço dos camundongos transgênicos e controles, normais e infectados foram processado para citometria de fluxo.

Conforme mostrado na figura 32 A, os camundongos v-FLIPs infectados apresentaram um aumento de células com maior tamanho e granulosidade comparado aos transgênicos normais e aos controles infectados. Na figura 32 B, podemos observar um significativo aumento na proporção de macrófagos no baço dos camundongos transgênicos. O número absoluto de macrófagos no baço dos camundongos transgênicos também se apresentou elevado quando comparado ao camundongo controle (Figura 32 C). Isto indica que o aumento no número de macrófagos não é característica do camundongo v-FLIP, e sim da infecção por *L. major* nestes animais.

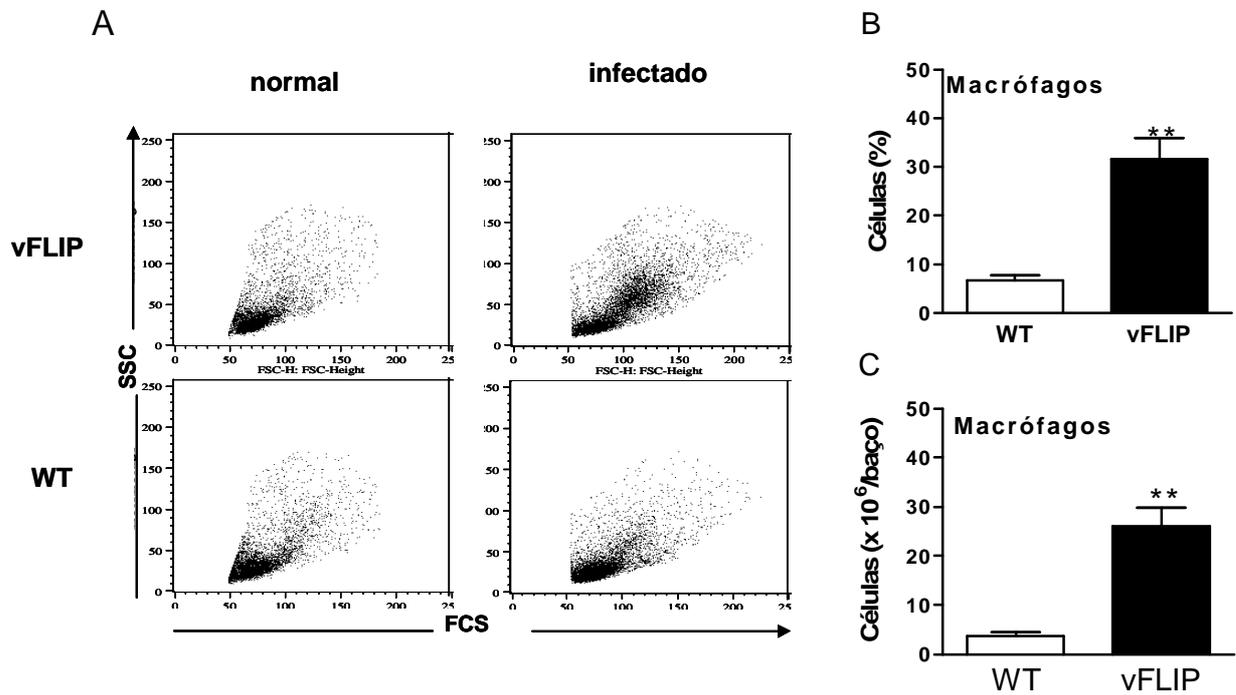


FIGURA 32 – MACRÓFAGOS NA INFECÇÃO POR *L. major*. Esplenócitos de camundongos transgênicos e controles, normais ou infectados com *L. major* (41 dpi) foram analisados por citometria de fluxo. (A) Dot plot mostrando tamanho (FCS) x granulosidade (SSC). Esplenócitos foram quantificados e avaliados por citometria de fluxo com anti-Mac1 para a identificação de macrófagos. (B) Porcentagem de macrófagos, (C) Número absoluto de macrófagos, N=4 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas por (**) para $p < 0,01$ entre camundongos WT e vFLIP.

4.23 Esplenócitos dos camundongos vFLIP produzem níveis elevados de óxido nítrico

Para verificar a produção de nitrito, esplenócitos foram cultivados com meio ou estimulados com anti-CD3. Após 48 h, os sobrenadantes foram coletados e testados para a presença de nitrito segundo método de Griess.

Conforme mostrado na figura 33, esplenócitos re-estimulados dos camundongos v-FLIP tiveram elevada produção de nitrito quando comparado aos controles.

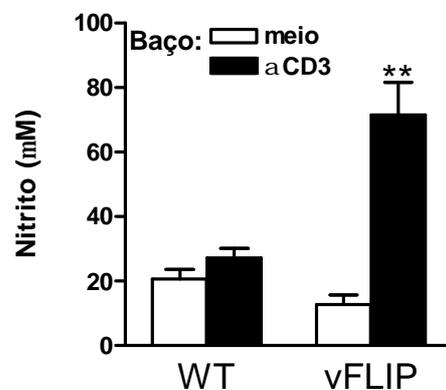


FIGURA 33 – PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA INFECÇÃO POR *L. major*. Esplenócitos de camundongos transgênicos e seus controles infectados por *L. major* (41 dpi) foram cultivados na presença de meio ou estimulados com anti-CD3. Após 48 h de cultura, os sobrenadantes foram testados para a presença de nitrito pelo método de Griess. Média e SEM estão representados. N=4 animais/grupo. Diferenças significativas indicadas por (**) para $p < 0,01$ entre camundongos WT e vFLIP.

5- DISCUSSÃO

Linfócitos T são as principais células na resposta a infecções por *Leishmania spp.* Uma resposta imune protetora à infecção por *L. major* é dependente de uma resposta Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ , enquanto que a resposta Th2, caracterizada por altos níveis de IL-4 e IL-10, leva a um quadro de susceptibilidade. Para estudar a apoptose de linfócitos T na infecção causada por *Leishmania major*, infectamos camundongos C57BL/6 com a cepa LV39 deste parasito.

As variações na celularidade do linfonodo drenante acompanham o desenvolvimento e regressão da lesão na pata infectada (Figura 1). Apesar de não ter ocorrido aumento da celularidade no baço, a relação entre células T CD8⁺ e T CD4⁺ aumentou durante a infecção, indicando uma expansão das células T CD8⁺ (Figura 2). Além disto, o aumento na taxa de apoptose de células T CD4⁺ aos 43 dpi também pode ter contribuído para o aumento da relação CD8:CD4 (Figura 3). Importante notar também a grande redução na produção de IL-2 aos 43 dpi (Figura 4), o que pode estar correlacionado com a apoptose de células T CD4⁺ neste mesmo período. A maior produção de nitrito (Figura 5) ocorreu concomitante à maior produção de IL-10 e IFN- γ , à menor produção de IL-2 no baço e a níveis indetectáveis de IL-4.

A redução na porcentagem de células T no linfonodo drenante pode ser devida à maior expansão de células B. A hipertrofia do linfonodo coincide com altas taxas de ativação de células T (Figura 7), acompanhando o desenvolvimento da lesão. Importante observar, o aumento nas taxas de apoptose e diminuição da ativação de células T ocorrem concomitante à diminuição da lesão (Figura 7). Embora tenhamos observado esta diferença nos padrões de ativação no curso da infecção, não observamos diferenças importantes no padrão de produção de citocinas (Figura 8).

A morte celular induzida por ativação (AICD) já foi relatada em modelos de infecção por *Leishmania donovani* (DAS *et al.*, 1999). Em nosso modelo, também pudemos observar AICD nas células T do baço (Figura 9), porém, esta morte não pôde ser inibida com o tratamento com anti-FasL e anti-TNF- α , embora alguns trabalhos sugiram morte via Fas-FasL em células Th1 de pacientes com leishmaniose visceral (POTESTIO *et al.*, 2004). Em contrapartida, o tratamento com anti-FasL levou a um aumento na produção de IL-4 e IL-10 (Figura 10 e 11), o que sugere que pequenas subpopulações podem estar sendo reguladas pela via Fas/FasL. Muitos trabalhos mostram que as células Th1, mas não as células Th2, sofrem AICD mediada pela via Fas-FasL (RAMSDELL *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1997; VARADHACHARY *et al.*, 1999). Desta maneira, alguns autores demonstraram que camundongos B6-gld (ALEXANDER *et al.*, 2001) e camundongos lpr (HUANG *et al.*, 1998) apresentam aumento da resposta Th1 após a infecção por *Leishmania spp.* Por outro lado, a via Fas induz a morte de células Th2 na infecção por *Trypanosoma cruzi* (LOPES *et al.*, 1999; GUILLERMO *et al.*, 2007). Camundongos deficientes de FasL tiveram aumento de citocinas Th2 após infecção por *T. cruzi* (LOPES *et al.*, 1999). De maneira semelhante, o bloqueio da via Fas *in vitro* em células de camundongos infectados por *T. cruzi* bem como o tratamento *in vivo* de camundongos infectados levou ao aumento da secreção de IL-4 e IL-10 (GUILLERMO *et al.*, 2007).

No linfonodo drenante, também observamos AICD entre células T em diferentes tempos analisados (Figura 12). Mais uma vez, a tentativa da inibição da via Fas/FasL bem como a inibição das caspases 8 e 9 não puderam resgatar estas células da AICD (Figura 13). Em contrapartida, Mukherjee e colaboradores (2006) descreveram apoptose de linfócitos T do linfonodo drenante de camundongos infectados com *L. donovani*, a qual pôde ser inibida com inibidor de fosfatases. Esta via culmina com a ativação da caspase-9, mas, no nosso modelo, a inibição desta caspase não foi capaz de resgatar as células da morte. É importante ressaltar

que estes modelos de infecções por *Leishmania* nos quais foram estudadas algumas vias de apoptose (DAS *et al.*, 1999; ALEXANDER *et al.*, 2001; POTESIO *et al.*, 2004; MUKHERJEE *et al.*, 2006) diferem completamente do nosso modelo de estudo, o que torna difícil uma comparação. Por outro lado, Desbarats e colaboradores (2000) sugeriram que a morte via Fas-FasL ocorre durante a infecção por *L. major*. No nosso modelo de infecção por *L. major* os linfócitos estão sofrendo apoptose por uma via que não pôde ser identificada no presente estudo. Trabalhos mais recentes têm demonstrado uma outra via importante de apoptose em células T (GORAK-STOLINSKA *et al.*, 2001; BIDÈRE *et al.*, 2002; DEVADAS *et al.*, 2006). Células T CD8⁺ de humanos sofrem apoptose mediada por granzima B após estimulação de seu TCR (GORAK-STOLINSKA *et al.*, 2001; BIDÈRE *et al.*, 2002), ao passo que células Th2 de camundongos também morrem por esta via após estímulo *in vitro* (DEVADAS *et al.*, 2006). A granzima B é uma serino protease que pode alcançar células-alvo pela via da perforina mediada por células T CD8⁺ como também por meio de células NK. Uma vez no citosol das células alvo, esta serino protease pode clivar a caspase-3 culminando com a apoptose, ou atuar diretamente em alvos, como BID e ICAD, danificando o DNA da célula (revisto por LIEBERMAM., 2003). Interessante observar é que células que possuem grânulos contendo granzima B podem liberá-la diretamente em seu citosol, o que exclui a participação de células citotóxicas nesta via de apoptose (DEVADAS *et al.*, 2006).

Embora a inibição da caspase-8 não tenha inibido a apoptose ou modificado a produção de citocinas por células de animais infectados, ocorreu a diminuição de IL-2 e IFN- γ (Figura 15) pelas células de camundongos normais. Os efeitos do bloqueio da caspase-8 em células T de animais normais sugerem que este tratamento poderia influenciar o desenvolvimento da resposta imune nas fases iniciais da infecção. Para testar esta hipótese, fizemos uma tentativa de manipular a diferenciação de células T de camundongos infectados

por *L. major* *in vitro* após 15 dias de infecção. A presença de IL-12 na cultura diminuiu o número de células, principalmente as células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ (Figuras 17 e 18), enquanto que a IL-4 favoreceu a sobrevivência das células produtoras de IL-10 e IL-4.

A inibição da caspase-8 não contribuiu para o resgate da morte causada pela IL-12 (Figura 19), porém, continuamos a investigar se a caspase-8 poderia estar influenciando na diferenciação de células T. A inibição da caspase-8 reduziu a secreção de IFN- γ na presença de IL-4 (Figura 20) e também prejudicou a proporção de células expressando IFN- γ intracelularmente, porém, não alterou a proporção de células produtoras de IL-10 e IL-4 (Figura 21). Conforme demonstrado por Silva e colaboradores (2005), o tratamento de células de camundongos normais e infectados com *Trypanosoma cruzi* com o inibidor de caspase-8 zIETD inibiu parcialmente a degradação do I κ B e a do NF- κ B para o núcleo. Alguns trabalhos têm apontado para a família NF- κ B/Rel como um importante fator na resposta Th1 (SICA *et al.*, 1997; ARONICA *et al.*, 1999; CORN *et al.*, 2003). Corn e colaboradores (2003) observaram que camundongos que expressam I κ B transgênico apresentavam uma menor proporção de células CD4⁺IFN- γ ⁺. Além disto, ao inibir o NF- κ B *in vitro*, observaram uma diminuição da translocação do dímero p50:p65 para o núcleo paralelo a uma diminuição na produção de IFN- γ (CORN *et al.*, 2003). A inibição do NF- κ B após a polarização de células T também diminuiu a produção de IFN- γ , sugerindo uma participação do NF- κ B na regulação da produção de IFN- γ por células Th1 diferenciadas (CORN *et al.*, 2003). De acordo com estas informações, nossos resultados demonstraram que a inibição da caspase-8 afetou tanto a proporção de células CD8⁺ quanto de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ (Figura 23), o que sugere uma participação do NF- κ B na produção desta citocina neste sistema, provavelmente através de sua sub-unidade p65 (SILVA *et al.*, 2005).

A inibição da caspase-8 afetou a proporção de células CD8⁺, mas não alterou a proporção de células CD4⁺ (Figura 22). Dados semelhantes a estes foram observados por Wu

e colaboradores (2004), os quais observaram que o bloqueio da caspase-8 pela proteína FLIP viral prejudica o acúmulo de células T CD8⁺.

Visto os efeitos causados pelo bloqueio da caspase-8 *in vitro*, decidimos estudar o impacto de seu bloqueio *in vivo*. Para isto, utilizamos camundongos transgênicos (vFLIP), os quais expressam a proteína viral MC159, que atua inibindo a caspase-8 em células T.

Os camundongos vFLIP foram mais resistentes à infecção no ponto analisado quando comparado aos seus controles, visto apresentarem menor lesão após 40 dias de infecção e menor carga parasitária (Figura 25). No entanto, os camundongos vFLIP apresentaram um reduzido número de células no linfonodo drenante, com significativa redução no número de células T CD4⁺ e CD8⁺, sendo mais pronunciado entre as células T CD8⁺ (Figura 27) o que resultou numa menor relação entre células CD8:CD4 nos camundongos vFLIP quando comparado aos seus controles. Estes resultados são semelhantes aos relatados por Silva e colaboradores (2005), onde observaram menor expansão de células T em camundongos vFLIP. Nestes camundongos, também não foi observado o acúmulo de células T CD8⁺ de memória na infecção pelo vírus da coriomeningite linfocitária, (WU *et al*, 2004), sugerindo um importante papel da caspase-8 ativa na manutenção destas células. Em modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi*, Silva e colaboradores (2005) demonstraram que a inibição da caspase-8 através da expressão da vFLIP ou através de um inibidor específico da caspase-8 resultaram num déficit de células T de memória. Também foi demonstrado por Salmena e colaboradores (2003) que camundongos deficientes de caspase-8 em células T tiveram expansão e acúmulo de células T CD8⁺ de memória prejudicadas após infecção pelo vírus da coriomeningite linfocitária.

Por outro lado, o número total de células no baço dos camundongos vFLIP infectados foi significativamente maior quando comparado aos seus controles (Figura 26), embora não apresentassem diferenças significativas no número de células T CD4⁺ e T CD8⁺

(Figura 28) ou B (não mostrado). Apesar disto, os camundongos vFLIP infectados apresentaram uma elevada taxa na morte de células T CD8⁺ quando comparado aos seus controles. A elevada taxa de apoptose entre as células T CD8⁺ também foi relatada no modelo de infecção por *T. cruzi* em camundongos vFLIP (SILVA *et al.*, 2005).

Compatível com a baixa expansão celular, células T do baço dos camundongos vFLIP infectados com *L. major* apresentaram baixa produção de IL-2, porém, tiveram elevada produção de IL-4 quando comparado aos seus controles (Figura 29). Além disto, células dos camundongos vFLIP tiveram baixa viabilidade e proliferação quando comparado aos seus controles (Figura 30). Baixa produção de IL-2 também foi demonstrada por Silva e colaboradores (2005) após a inibição da caspase-8 *in vitro*, como também por células T caspase-8^{-/-} (SALMENA *et al.*, 2003). Uma menor ativação do NF-κB (fator de transcrição relacionado à produção de IL-2) foi observada em células T ativadas e tratadas com o inibidor da caspase-8, o que também foi observado em células T dos camundongos vFLIP (SILVA *et al.*, 2005). Além disto, proliferação e produção de IL-2 por células T de humanos após estímulo com anti-CD3 foram impedidas após tratamento com inibidor de caspase-8 (KENNEDY *et al.*, 1999). Em pacientes que possuem deficiência funcional na caspase-8 também foi observada deficiência na ativação linfocitária, levando a um quadro de imunodeficiência (CHUN *et al.*, 2002).

Assim como no baço (Figura 29), células do linfonodo drenante de camundongos vFLIP tiveram elevada produção de IL-4, porém, não observamos diferença na viabilidade destas células quando comparadas às células do linfonodo drenante de seus controles (Figura 31). A inibição da caspase-8 pela proteína FLIP viral ou através do tratamento com ZIETD levaram ao aumento da produção de IL-4 e IL-10 em camundongos infectados por *T. cruzi* (SILVA *et al.*, 2005). Apesar de conflitantes com outros trabalhos (RAMSDELL *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1997; VARADHACHARY *et al.*, 1999), nossos estudos apontam para a

participação da caspase-8 bem como da via Fas-FasL na apoptose de células produtoras de IL-4 e IL-10. Porém, a proteção de células Th2 da apoptose não afetou a resolução da infecção causada por *L. major*.

Curiosamente, os camundongos vFLIP infectados apresentaram maior número de macrófagos no baço (Figura 32) quando comparado aos seus controles e também aos transgênicos não-infectados, e também apresentaram elevada produção de óxido nítrico após re-estímulo *in vitro* (Figura 33). Esta elevada produção de nitrito por macrófagos do baço de camundongos transgênicos pode estar relacionada ao maior número destas células quando comparado ao observado no baço de seus controles. Por outro lado, também pode estar relacionada a maior ativação destes macrófagos, visto a elevada produção de IL-4 neste ambiente, citocina esta que age sinergicamente com IFN- γ na ativação de macrófagos através da via de produção de óxido nítrico (BELOSEVIC *et al.*, 1988; BOGDAN *et al.*, 1991; STENGER *et al.*, 1991). Estes autores demonstraram que a co-cultura de macrófagos infectados com amastigotas de *L. major* e tratados com IFN- γ têm sua atividade microbicida aumentada após tratamento com IL-4. Lezama-Davila e colaboradores (1992) também demonstraram que a injeção de IL-4 na lesão de camundongos infectados por *L. major* em um período avançado da infecção promove a diminuição da lesão e carga parasitária nestes animais. Carter *et al* (1989) também demonstraram que o tratamento com IL-4 em camundongos susceptíveis à infecção por *L. major* tornam-os mais resistentes, além de conferir memória imunológica (CARTER *et al.*, 1989). Nosso trabalho, juntamente com estes, apontam para um efeito benéfico da IL-4 numa fase tardia da infecção por *L. major*, onde a resposta Th1 já estabelecida é favorecida pelo sinergismo da IL-4 com o IFN- γ , aumentando a atividade microbicida dos macrófagos.

CONCLUSÕES

Na infecção por *Leishmania major* em camundongos C57BL/6:

- 1- A maior parte da apoptose observada em linfócitos T não é mediada pela via Fas, caspase-8 ou 9;
- 2- A caspase-8 ativa é importante para células produtoras de IFN- γ ;
- 3- A inibição caspase-8 *in vivo* reduz a resposta imune mediada por células T;
- 4- O aumento da IL-4 nos camundongos vFLIP não contribui para susceptibilidade/desenvolvimento da lesão;
- 5- Camundongos transgênicos vFLIP são mais resistentes à infecção por *L. major* que seus controles;
- 6- O aumento no número macrófagos no baço e a produção de óxido nítrico podem estar relacionados com a resistência observada nos camundongos vFLIP.

7- CONCLUSÕES GERAIS

No início da infecção, a inibição da caspase-8 diminui a produção de IFN- γ mas não influencia na produção de IL-4 e IL-10. No entanto, a supressão da resposta CD8⁺IFN⁺ poderia favorecer a resposta Th2 (baseado nos efeitos observados por Uzonna *et al.*, 2004). Tardiamente, a inibição da caspase-8 através da proteína viral vFLIP favorece a produção de IL-4, que, atuando juntamente com o IFN- γ , aumenta a atividade microbicida dos macrófagos levando a eliminação do parasita *Leishmania major* (Figura 34).

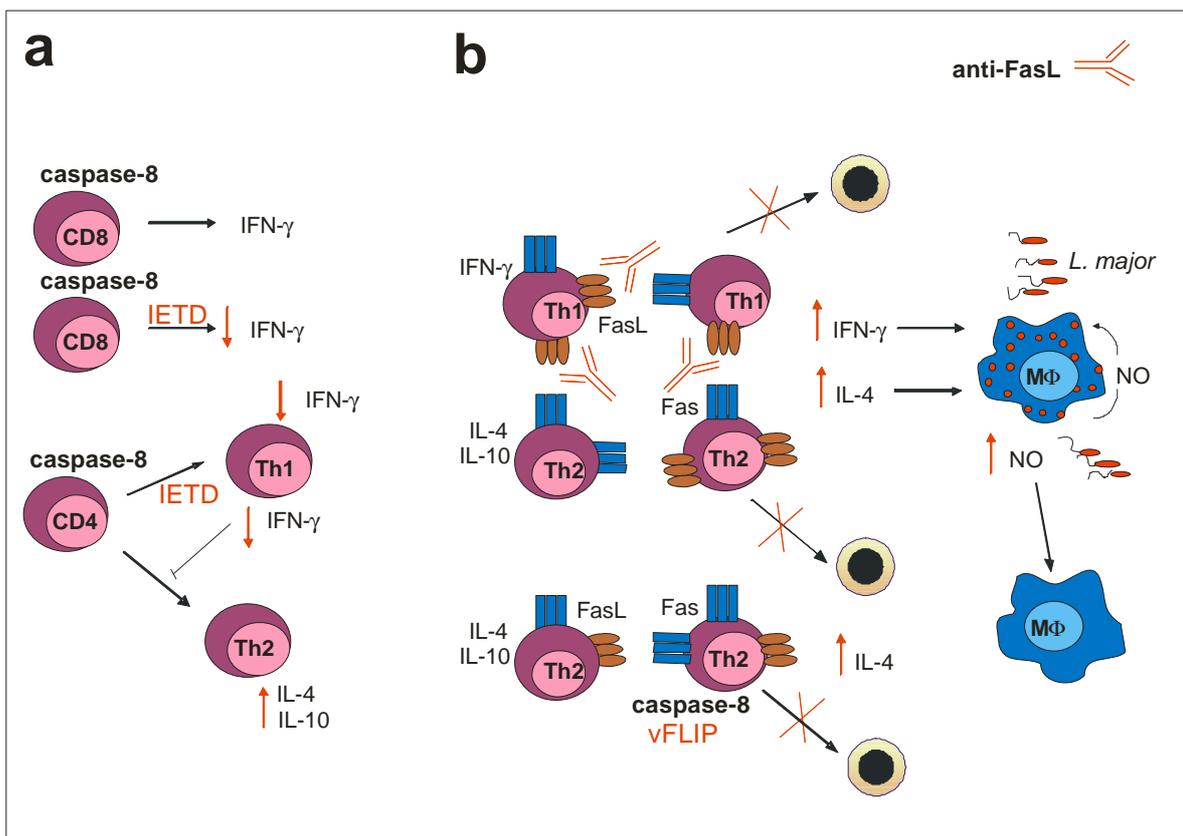


FIGURA 34 – MECANISMOS REGULATÓRIOS DA INIBIÇÃO DA CASPASE-8 DURANTE A INFECÇÃO POR *L. major*. (A) Início da infecção. (B) Fase tardia da infecção.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. In: Saunders (Ed.). **Cellular and Molecular Immunology**, 2003.

AGA, E., KATSCHINSKI, D. M., VAN ZANDBERGEN, G., LAUFS, H., HANSEN, B., MULLER, K., SOLBACH, W. & LASKAY, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **J Immunol**, v.169, n.2, Jul 15, p.898-905. 2002.

AKARID, K., ARNOULT, D., MICIC-POLIANSKI, J., SIF, J., ESTAQUIER, J. & AMEISEN, J. C. *Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. **J Leukoc Biol**, v.76, n.1, Jul, p.95-103. 2004.

ALAM, A., COHEN, L. Y., AOUAD, S. e SEKALY, R. P. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. **J Exp Med**, v.190, n.12, Dec 20, p.1879-90. 1999.

ALEXANDER, C. E., KAYE, P. M. & ENGWERDA, C. R. CD95 is required for the early control of parasite burden in the liver of *Leishmania donovani*-infected mice. **Eur J Immunol**, v.31, n.4, Apr, p.1199-210. 2001.

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

ANDERSON, C. F., M. OUKKA, V. J. KUCHROO e D. SACKS. CD4+CD25-Foxp3- Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med**, v.204, n.2, Feb 19, p.285-97. 2007.

ANDERSON, C. F., S. MENDEZ e D. L. SACKS. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **J Immunol**, v.174, n.5, Mar 1, p.2934-41. 2005.

ANDRADE, B. B., DE OLIVEIRA, C. I., BRODSKYN, C. I., BARRAL, A. & BARRAL-NETTO, M. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scand J Immunol**, v.66, n.2-3, Aug-Sep, p.122-7. 2007.

ARONICA, M. A., MORA, A. L., MITCHELL, D. B., FINN, P. W., JOHNSON, J. E., SHELLER, J. R. & BOOTHBY, M. R. Preferential role for NF-kappa B/Rel signaling in the type 1 but not type 2 T cell-dependent immune response in vivo. **J Immunol**, v.163, n.9, Nov 1, p.5116-24. 1999.

ARTIS, D., L. M. JOHNSON, K. JOYCE, C. SARIS, A. VILLARINO, C. A. HUNTER e P. SCOTT. Cutting edge: early IL-4 production governs the requirement for IL-27-WSX-1 signaling in the development of protective Th1 cytokine responses following *Leishmania major* infection. **J Immunol**, v.172, n.8, Apr 15, p.4672-5. 2004.

BARNHART, B. C. e M. E. PETER. Two faces of caspase-8. **Nat Immunol**, v.3, n.10, Oct, p.896-8. 2002.

BELKAID, Y., B. BUTCHER e D. L. SACKS. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. **Eur J Immunol**, v.28, n.4, Apr, p.1389-400. 1998.

BELKAID, Y., C. A. PICCIRILLO, S. MENDEZ, E. M. SHEVACH e D. L. SACKS. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v.420, n.6915, Dec 5, p.502-7. 2002.

BELKAID, Y., E. VON STEBUT, S. MENDEZ, R. LIRA, E. CALER, S. BERTHOLET, M. C. UDEY e D. SACKS. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **J Immunol**, v.168, n.8, Apr 15, p.3992-4000. 2002.

BELKAID, Y., K. F. HOFFMANN, S. MENDEZ, S. KAMHAWI, M. C. UDEY, T. A. WYNN e D. L. SACKS. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J Exp Med**, v.194, n.10, Nov 19, p.1497-506. 2001.

BELOSEVIC, M., DAVIS, C. E., MELTZER, M. S. & NACY, C. A. Regulation of activated macrophage antimicrobial activities. Identification of lymphokines that cooperate with IFN-gamma for induction of resistance to infection. **J Immunol**, v.141, n.3, Aug 1, p.890-6. 1988.

BERTHO, A. L., SANTIAGO, M. A., DA-CRUZ, A. M. & COUTINHO, S. G. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v.33, n.3, Mar, p.317-25. 2000.

BIEDERMANN, T., S. ZIMMERMANN, H. HIMMELRICH, A. GUMY, O. EGETER, A. K. SAKRAUSKI, I. SEEGMULLER, H. VOIGT, P. LAUNOIS, A. D. LEVINE, H. WAGNER, K. HEEG, J. A. LOUIS e M. ROCKEN. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. **Nat Immunol**, v.2, n.11, Nov, p.1054-60. 2001.

BOGDAN, C., M. ROLLINGHOFF e A. DIEFENBACH. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol Rev**, v.173, Feb, p.17-26. 2000.

BOGDAN, C., STENGER, S., ROLLINGHOFF, M. & SOLBACH, W. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. Interleukin 4 synergizes with interferon-gamma to activate murine macrophages for killing of *Leishmania major* amastigotes. **Eur J Immunol**, v.21, n.2, Feb, p.327-33. 1991.

BOISE, L. H., A. J. MINN, P. J. NOEL, C. H. JUNE, M. A. ACCAVITTI, T. LINDSTEN e C. B. THOMPSON. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. **Immunity**, v.3, n.1, Jul, p.87-98. 1995.

CARTER, K. C., GALLAGHER, G., BAILLIE, A. J. & ALEXANDER, J. The induction of protective immunity to *Leishmania major* in the BALB/c mouse by interleukin 4 treatment. **Eur J Immunol**, v.19, n.4, Apr, p.779-82. 1989.

CHAKOUR, R., R. GULER, M. BUGNON, C. ALLENBACH, I. GARCIA, J. MAUEL, J. LOUIS e F. TACCHINI-COTTIER. Both the Fas ligand and inducible nitric oxide synthase

are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with *Leishmania major* whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal. **Infect Immun**, v.71, n.9, Sep, p.5287-95. 2003.

CHUN, H. J., ZHENG, L., AHMAD, M., WANG, J., SPEIRS, C. K., SIEGEL, R. M., DALE, J. K., PUCK, J., DAVIS, J., HALL, C. G., SKODA-SMITH, S., ATKINSON, T. P., STRAUS, S. E. e LENARDO, M. J. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. **Nature**, v.419, n.6905, Sep 26, p.395-9. 2002.

CONCEICAO-SILVA, F., M. HAHNE, M. SCHROTER, J. LOUIS e J. TSCHOPP. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. **Eur J Immunol**, v.28, n.1, Jan, p.237-45. 1998.

CURTIN, J. F. e T. G. COTTER. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. **Cell Signal**, v.15, n.11, Nov, p.983-92. 2003.

DA CONCEICAO-SILVA, F., PERLAZA, B. L., LOUIS, J. A. & ROMERO, P. *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ cytotoxic T cell responses. **Eur J Immunol**, v.24, n.11, Nov, p.2813-7. 1994.

DAS, G., H. VOHRA, K. RAO, B. SAHA e G. C. MISHRA. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. **Scand J Immunol**, v.49, n.3, Mar, p.307-10. 1999.

DE FREITAS BALANCO, J. M., MOREIRA, M. E., BONOMO, A., BOZZA, P. T., AMARANTE-MENDES, G., PIRMEZ, C. & BARCINSKI, M. A. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr Biol**, v.11, n.23, Nov 27, p.1870-3. 2001.

DESBARATS, J., J. E. STONE, L. LIN, Z. F. ZAKERI, G. S. DAVIS, L. M. PFEIFFER, R. G. TITUS e M. K. NEWELL. Rapid early onset lymphocyte cell death in mice resistant, but not susceptible to *Leishmania major* infection. **Apoptosis**, v.5, n.2, Apr, p.189-96. 2000.

DEVADAS, S., DAS, J., LIU, C., ZHANG, L., ROBERTS, A. I., PAN, Z., MOORE, P. A., DAS, G. & SHI, Y. Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. **Immunity**, v.25, n.2, Aug, p.237-47. 2006.

DING, A. H., C. F. NATHAN e D. J. STUEHR. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol**, v.141, n.7, Oct 1, p.2407-12. 1988.

DOHRMAN, A., KATAOKA, T., CUENIN, S., RUSSELL, J. Q., TSCHOPP, J. e BUDD, R. C. Cellular FLIP (long form) regulates CD8+ T cell activation through caspase-8-dependent NF-kappa B activation. **J Immunol**, v.174, n.9, May 1, p.5270-8. 2005.

EIDSMO, L., NYLEN, S., KHAMESIPOUR, A., HEDBLAD, M. A., CHIODI, F. & AKUFFO, H. The contribution of the Fas/FasL apoptotic pathway in ulcer formation during

Leishmania major-induced cutaneous Leishmaniasis. **Am J Pathol**, v.166, n.4, Apr, p.1099-108. 2005.

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

FILIPPI, C., S. HUGUES, J. CAZARETH, V. JULIA, N. GLAICHENHAUS e S. UGOLINI. CD4+ T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells. **J Exp Med**, v.198, n.2, Jul 21, p.201-9. 2003.

FUNASA, F. N. D. S.-M. D. S.-. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde. 2000. 62 p.

GORAK-STOLINSKA, P., TRUMAN, J. P., KEMENY, D. M. & NOBLE, A. Activation-induced cell death of human T-cell subsets is mediated by Fas and granzyme B but is independent of TNF-alpha. **J Leukoc Biol**, v.70, n.5, Nov, p.756-66. 2001.

GORELIK, L., S. CONSTANT e R. A. FLAVELL. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. **J Exp Med**, v.195, n.11, Jun 3, p.1499-505. 2002.

GREEN, D. e G. KROEMER. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? **Trends Cell Biol**, v.8, n.7, Jul, p.267-71. 1998.

GREEN, D. R. e J. C. REED. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v.281, n.5381, Aug 28, p.1309-12. 1998.

GUILLERMO, L. V., SILVA, E. M., RIBEIRO-GOMES, F. L., DE MEIS, J., PEREIRA, W. F., YAGITA, H., DOSREIS, G. A. e LOPES, M. F. The Fas death pathway controls coordinated expansions of Type 1 CD8 and Type 2 CD4 T cells in Trypanosoma cruzi infection. **J Leukoc Biol**, Jan 29. 2007.

HEINZEL, F. P., D. S. SCHOENHAUT, R. M. RERKO, L. E. ROSSER e M. K. GATELY. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J Exp Med**, v.177, n.5, May 1, p.1505-9. 1993.

HERATH, S., P. KROPF e I. MULLER. Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. **Parasite Immunol**, v.25, n.11-12, Nov-Dec, p.559-67. 2003.

HUANG, F. P., D. XU, E. O. ESFANDIARI, W. SANDS, X. Q. WEI e F. Y. LIEW. Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. **J Immunol**, v.160, n.9, May 1, p.4143-7. 1998.

HUBER, M., E. TIMMS, T. W. MAK, M. ROLLINGHOFF e M. LOHOFF. Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. **Infect Immun**, v.66, n.8, Aug, p.3968-70. 1998.

- JI, J., J. MASTERSON, J. SUN e L. SOONG. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. **J Immunol**, v.174, n.11, Jun 1, p.7147-53. 2005.
- KANALY, S. T., NASHLEANAS, M., HONDOWICZ, B. & SCOTT, P. TNF receptor p55 is required for elimination of inflammatory cells following control of intracellular pathogens. **J Immunol**, v.163, n.7, Oct 1, p.3883-9. 1999.
- KENNEDY, N. J., T. KATAOKA, J. TSCHOPP e R. C. BUDD. Caspase activation is required for T cell proliferation. **J Exp Med**, v.190, n.12, Dec 20, p.1891-6. 1999.
- KERR, J. F. R. 1993. Definition of apoptosis and overview of its incidence, **p. 1-15**. In M. Lavin, and D. Watters (ed), *Programmed cell death – The cellular and molecular biology of apoptosis*. Harwood Academic Publishers, Brisbane.
- KERR, J. F., A. H. WYLLIE e A. R. CURRIE. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v.26, n.4, Aug, p.239-57. 1972.
- KOPF, M., BROMBACHER, F., KOHLER, G., KIENZLE, G., WIDMANN, K. H., LEFRANG, K., HUMBORG, C., LEDERMANN, B. & SOLBACH, W. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. **J Exp Med**, v.184, n.3, Sep 1, p.1127-36. 1996.
- KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, v.407, n.6805, Oct 12, p.789-95. 2000.
- KRUEGER, A., I. SCHMITZ, S. BAUMANN, P. H. KRAMMER e S. KIRCHHOFF. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. **J Biol Chem**, v.276, n.23, Jun 8, p.20633-40. 2001.
- LANGRISH, C. L., B. S. MCKENZIE, N. J. WILSON, R. DE WAAL MALEFYT, R. A. KASTELEIN e D. J. CUA. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. **Immunol Rev**, v.202, Dec, p.96-105. 2004.
- LAOUAR, Y., F. S. SUTTERWALA, L. GORELIK e R. A. FLAVELL. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. **Nat Immunol**, v.6, n.6, Jun, p.600-7. 2005.
- LEAL, L. M., MOSS, D. W., KUHN, R., MULLER, W. & LIEW, F. Y. Interleukin-4 transgenic mice of resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection. **Eur J Immunol**, v.23, n.2, Feb, p.566-9. 1993.
- LENARDO, M. J. Fas and the art of lymphocyte maintenance. **J Exp Med**, v.183, n.3, Mar 1, p.721-4. 1996.
- LENARDO, M. J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. **Nature**, v.353, n.6347, Oct 31, p.858-61. 1991.

- LERNER, E. A., RIBEIRO, J. M., NELSON, R. J. & LERNER, M. R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **J Biol Chem**, v.266, n.17, Jun 15, p.11234-6. 1991.
- LEZAMA-DAVILA, C. M., WILLIAMS, D. M., GALLAGHER, G. & ALEXANDER, J. Cytokine control of *Leishmania* infection in the BALB/c mouse: enhancement and inhibition of parasite growth by local administration of IL-2 or IL-4 is species and time dependent. **Parasite Immunol**, v.14, n.1, Jan, p.37-48. 1992.
- LOPES, M. F., NUNES, M. P., HENRIQUES-PONS, A., GIESE, N., MORSE, H. C., 3RD, DAVIDSON, W. F., ARAUJO-JORGE, T. C. e DOSREIS, G. A. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient *gld* mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. **Eur J Immunol**, v.29, n.1, Jan, p.81-9. 1999.
- LOUIS, J., H. HIMMELRICH, C. PARRA-LOPEZ, F. TACCHINI-COTTIER e P. LAUNOIS. Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. **Curr Opin Immunol**, v.10, n.4, Aug, p.459-64. 1998.
- MATTNER, F., K. DI PADOVA e G. ALBER. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. **Infect Immun**, v.65, n.11, Nov, p.4378-83. 1997.
- MOHRS, M., LEDERMANN, B., KOHLER, G., DORFMULLER, A., GESSNER, A. & BROMBACHER, F. 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**, v.162, n.12, Jun 15, p.7302-8. 1999.
- MORRIS, R. V., SHOEMAKER, C. B., DAVID, J. R., LANZARO, G. C. & TITUS, R. G. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. **J Immunol**, v.167, n.9, Nov 1, p.5226-30. 2001.
- MUKHERJEE, P., SEN, P. C. & GHOSE, A. C. Lymph node cells from BALB/c mice with chronic visceral leishmaniasis exhibiting cellular anergy and apoptosis: Involvement of Ser/Thr phosphatase. **Apoptosis**, v.11, n.11, Nov, p.2013-29. 2006.
- MULLER, I. Role of T cell subsets during the recall of immunologic memory to *Leishmania major*. **Eur J Immunol**, v.22, n.12, Dec, p.3063-9. 1992.
- MULLER, I., P. KROPF, J. A. LOUIS e G. MILON. Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. **Infect Immun**, v.62, n.6, Jun, p.2575-81. 1994.
- MULLER, I., P. KROPF, R. J. ETGES e J. A. LOUIS. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. **Infect Immun**, v.61, n.9, Sep, p.3730-8. 1993.
- MURPHY, K. M. & REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.12, Dec, p.933-44. 2002.

NOBEN-TRAUTH, N., PAUL, W. E. & SACKS, D. L. IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. **J Immunol**, v.162, n.10, May 15, p.6132-40. 1999.

POTESTIO, M., D'AGOSTINO, P., ROMANO, G. C., MILANO, S., FERLAZZO, V., AQUINO, A., DI BELLA, G., CARUSO, R., GAMBINO, G., VITALE, G., MANSUETO, S. & CILLARI, E. CD4+ CCR5+ and CD4+ CCR3+ lymphocyte subset and monocyte apoptosis in patients with acute visceral leishmaniasis. **Immunology**, v.113, n.2, Oct, p.260-8. 2004.

RAMSDELL, F., SEAMAN, M. S., MILLER, R. E., PICHA, K. S., KENNEDY, M. K. e LYNCH, D. H. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. **Int Immunol**, v.6, n.10, Oct, p.1545-53. 1994.

REINER, S. L., S. ZHENG, Z. E. WANG, L. STOWRING e R. M. LOCKSLEY. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. **J Exp Med**, v.179, n.2, Feb 1, p.447-56. 1994.

REY, L. In: Guanabara Koogan S.A (Ed.). **Parasitologia**. Rio de Janeiro, 2001, p.827.

RIBEIRO-GOMES, F. L., MONIZ-DE-SOUZA, M. C., BORGES, V. M., NUNES, M. P., MANTUANO-BARRADAS, M., D'AVILA, H., BOZZA, P. T., CALICH, V. L. & DOSREIS, G. A. Turnover of neutrophils mediated by Fas ligand drives *Leishmania major* infection. **J Infect Dis**, v.192, n.6, Sep 15, p.1127-34. 2005.

RIBEIRO-GOMES, F. L., OTERO, A. C., GOMES, N. A., MONIZ-DE-SOUZA, M. C., CYSNE-FINKELSTEIN, L., ARNHOLDT, A. C., CALICH, V. L., COUTINHO, S. G., LOPES, M. F. & DOSREIS, G. A. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J Immunol**, v.172, n.7, Apr 1, p.4454-62. 2004.

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

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

SALEH, A., S. M. SRINIVASULA, S. ACHARYA, R. FISHEL e E. S. ALNEMRI. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. **J Biol Chem**, v.274, n.25, Jun 18, p.17941-5. 1999.

SALMENA, L., B. LEMMERS, A. HAKEM, E. MATYSIAK-ZABLOCKI, K. MURAKAMI, P. Y. AU, D. M. BERRY, L. TAMBLYN, A. SHEHABELDIN, E. MIGON, A. WAKEHAM, D. BOUCHARD, W. C. YEH, J. C. MCGLADE, P. S. OHASHI e R. HAKEM. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. **Genes Dev**, v.17, n.7, Apr 1, p.883-95. 2003.

SATOSKAR, A. R., L. M. STAMM, X. ZHANG, A. A. SATOSKAR, M. OKANO, C. TERHORST, J. R. DAVID e B. WANG. Mice lacking NK cells develop an efficient Th1 response and control cutaneous *Leishmania major* infection. **J Immunol**, v.162, n.11, Jun 1, p.6747-54. 1999.

SCAFFIDI, C., I. SCHMITZ, P. H. KRAMMER e M. E. PETER. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. **J Biol Chem**, v.274, n.3, Jan 15, p.1541-8. 1999.

SCHARTON, T. M. e P. SCOTT. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J Exp Med**, v.178, n.2, Aug 1, p.567-77. 1993.

SCHWERK, C. e K. SCHULZE-OSTHOFF. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. **Biochem Pharmacol**, v.66, n.8, Oct 15, p.1453-8. 2003.

SCOTT, P., EATON, A., GAUSE, W. C., DI ZHOU, X. & HONOWICZ, B. Early IL-4 production does not predict susceptibility to *Leishmania major*. **Exp Parasitol**, v.84, n.2, Nov, p.178-87. 1996.

SICA, A., DORMAN, L., VIGGIANO, V., CIPPITELLI, M., GHOSH, P., RICE, N. & YOUNG, H. A. Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. **J Biol Chem**, v.272, n.48, Nov 28, p.30412-20. 1997.

SIEGEL, R. M. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. **Nat Rev Immunol**, v.6, n.4, Apr, p.308-17. 2006.

SILVA, E. M., GUILLERMO, L. V., RIBEIRO-GOMES, F. L., DE MEIS, J., NUNES, M. P., SENRA, J. F., SOARES, M. B., DOSREIS, G. A. e LOPES, M. F. Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. **Eur J Immunol**, v.37, n.3, Feb 13, p.738-746. 2007.

SILVA, E. M., L. V. GUILLERMO, F. L. RIBEIRO-GOMES, J. DE MEIS, R. M. PEREIRA, Z. WU, T. C. CALEGARI-SILVA, S. H. SEABRA, U. G. LOPES, R. M. SIEGEL, G. A. DOSREIS e M. F. LOPES. Caspase-8 activity prevents type 2 cytokine responses and is required for protective T cell-mediated immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v.174, n.10, May 15, p.6314-21. 2005.

STENGER, S., N. DONHAUSER, H. THURING, M. ROLLINGHOFF e C. BOGDAN. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **J Exp Med**, v.183, n.4, Apr 1, p.1501-14. 1996.

STENGER, S., SOLBACH, W., ROLLINGHOFF, M. & BOGDAN, C. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. II. Endogenous tumor necrosis factor-alpha production by macrophages is induced by the synergistic action of interferon (IFN)-gamma and interleukin (IL) 4 and accounts for the antiparasitic effect mediated by IFN-gamma and IL 4. **Eur J Immunol**, v.21, n.7, Jul, p.1669-75. 1991.

SU, H., N. BIDERE, L. ZHENG, A. CUBRE, K. SAKAI, J. DALE, L. SALMENA, R. HAKEM, S. STRAUS e M. LENARDO. Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. **Science**, v.307, n.5714, Mar 4, p.1465-8. 2005.

TANG, J., H. KAWADLER e X. YANG. Lymphocyte life and death: the caspase-8 connection. **Cancer Biol Ther**, v.4, n.7, Jul, p.700-2. 2005.

THEODOS, C. M., L. POVINELLI, R. MOLINA, B. SHERRY e R. G. TITUS. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. **Infect Immun**, v.59, n.8, Aug, p.2839-42. 1991.

THOME, M. e J. TSCHOPP. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. **Nat Rev Immunol**, v.1, n.1, Oct, p.50-8. 2001.

TSCHOPP, J., M. IRMLER e M. THOME. Inhibition of fas death signals by FLIPs. **Curr Opin Immunol**, v.10, n.5, Oct, p.552-8. 1998.

UZONNA, J. E., K. L. JOYCE e P. SCOTT. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. **J Exp Med**, v.199, n.11, Jun 7, p.1559-66. 2004.

VAN PARIJS, L. e A. K. ABBAS. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. **Curr Opin Immunol**, v.8, n.3, Jun, p.355-61. 1996.

VAN PARIJS, L., A. IBRAGHIMOV e A. K. ABBAS. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. **Immunity**, v.4, n.3, Mar, p.321-8. 1996.

VAN ZANDBERGEN, G., KLINGER, M., MUELLER, A., DANNENBERG, S., GEBERT, A., SOLBACH, W. & LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J Immunol**, v.173, n.11, Dec 1, p.6521-5. 2004.

VARADHACHARY, A. S., PETER, M. E., PERDOW, S. N., KRAMMER, P. H. e SALGAME, P. Selective up-regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activity in Th2 cells inhibits caspase-8 cleavage at the death-inducing complex: a mechanism for Th2 resistance from Fas-mediated apoptosis. **J Immunol**, v.163, n.9, Nov 1, p.4772-9. 1999.

VON STEBUT, E., Y. BELKAID, B. V. NGUYEN, M. CUSHING, D. L. SACKS e M. C. UDEY. *Leishmania major*-infected murine langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous leishmaniasis. **Eur J Immunol**, v.30, n.12, Dec, p.3498-506. 2000.

VON STEBUT, E., Y. BELKAID, T. JAKOB, D. L. SACKS e M. C. UDEY. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. **J Exp Med**, v.188, n.8, Oct 19, p.1547-52. 1998.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**, v.296, n.5573, May 31, p.1635-6. 2002.

WAKIL, A. E., Z. E. WANG, J. C. RYAN, D. J. FOWELL e R. M. LOCKSLEY. Interferon gamma derived from CD4(+) T cells is sufficient to mediate T helper cell type 1 development. **J Exp Med**, v.188, n.9, Nov 2, p.1651-6. 1998.

WANDERLEY, J. L., MOREIRA, M. E., BENJAMIN, A., BONOMO, A. C. & BARCINSKI, M. A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. **J Immunol**, v.176, n.3, Feb 1, p.1834-9. 2006.

WEI, X. Q., I. G. CHARLES, A. SMITH, J. URE, G. J. FENG, F. P. HUANG, D. XU, W. MULLER, S. MONCADA e F. Y. LIEW. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v.375, n.6530, Jun 1, p.408-11. 1995.

World Health Organization,2002. Disponível em: <http://www.who.int/tdr>. Acesso em janeiro de 2006.

WU, Z., M. ROBERTS, M. PORTER, F. WALKER, E. J. WHERRY, J. KELLY, M. GADINA, E. M. SILVA, G. A. DOSREIS, M. F. LOPES, J. O'SHEA, W. J. LEONARD, R. AHMED e R. M. SIEGEL. Viral FLIP impairs survival of activated T cells and generation of CD8+ T cell memory. **J Immunol**, v.172, n.10, May 15, p.6313-23. 2004.

WYNN, T. A. IL-13 effector functions. **Annu Rev Immunol**, v.21, p.425-56. 2003.

ZERMATI, Y., GARRIDO, C., AMSELLEM, S., FISHELSON, S., BOUSCARY, D., VALENSI, F., VARET, B., SOLARY, E. e HERMINE, O. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. **J Exp Med**, v.193, n.2, Jan 15, p.247-54. 2001.

ZHANG, X., BRUNNER, T., CARTER, L., DUTTON, R. W., ROGERS, P., BRADLEY, L., SATO, T., REED, J. C., GREEN, D. e SWAIN, S. L. Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. **J Exp Med**, v.185, n.10, May 19, p.1837-49. 1997.

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](#)