

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia**

**O papel do superóxido na infecção por *Leishmania
amazonensis***

Belo Horizonte – MG

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Juan Pereira de Macêdo

**O papel do superóxido na infecção por *Leishmania*
*amazonensis***

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: LEDA QUERCIA VIEIRA

Belo Horizonte – MG
2010



Universidade Federal de Minas Gerais -
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JUAN PEREIRA DE MACEDO. Aos dezesseis dias do mês de abril de 2010 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “O papel do superóxido na infecção por *Leishmania amazonensis*” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão Profa. Leda Quercia Vieira da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Maria de Fátima Martins Horta da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dra. Vanessa Pinho da Silva da Universidade Federal de Minas, aprovado; Dra. Leda Quercia Vieira, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo tratar a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de abril de 2010.

Dra. Vanessa Pinho da Silva – UFMG

Prof. Paulo Sérgio Lacerda Beirão
 Coordenador "pro tempore" do Curso
 de Pós Graduação em
 Bioquímica - Imunologia
 ICB - UFMG

Dra. Maria de Fátima Martins Horta – UFMG

Dra. Leda Quercia Vieira – orientadora - UFMG

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia – ICB/UFMG e obteve auxílio dos seguintes órgãos financiadores:

- FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais**
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior**
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

Dedico essa obra aos meus pais, Laury e Lourdinha, por tornarem possível cada acontecimento brilhante em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço imensamente à Leda, minha orientadora, por permitir que um singelo aluno de ciências biológicas em seu terceiro dia de aula na faculdade tenha a oportunidade de fazer iniciação científica em seu laboratório mesmo sem conhecimentos em imunologia. Desde então, Leda demonstrou total apoio em minhas decisões ligadas a carreira e também nos mais variados contratempos durante a execução dos projetos. Hoje eu sinto que mais importante do que chefe, ela foi amiga durante minha trajetória científica e sempre incentivou o crescimento de seus alunos, acreditando no potencial e esforço desses. Em consequência ao seu comportamento espontâneo e alegre dentro do lab, incomum para um professor universitário, proporcionou muitos momentos bons tanto no laboratório quanto em nossos inúmeros encontros fora do ambiente de trabalho.

Ao Wagner Tafuri por nos ajudar com a parte das histologias e abrir as portas de seu laboratório e proporcionar ótimas discussões auxiliando também na captura de todo o material fotográfico, não só apresentados nesse trabalho, mas nos diversos congressos em que participei.

À Luciana Andrade por me ensinar a trabalhar com tripomastigotas de *T. cruzi* em um outro projeto durante minha iniciação e pelas diversas discussões ocasionais que realizamos.

Ao Beirão e Jader por hospedarem nossas células em sua estufa de CO₂ por um longo tempo.

Sou extremamente grato por ter a oportunidade de ser “cria” de Claudinha e desfrutar de todo o seu conhecimento técnico e teórico durante a iniciação científica, me ensinando a ser independente, conciso e claro no planejamento

de novos experimentos. Realmente foi uma aluna de doutorado extremamente competente e uma amiga que gostaria de ter sempre por perto.

E também ao Helton por todas as discussões e ensinamentos que me proporcionou e pelo exemplo que foi para todos no lab.

Ao pessoal do LAGI novo mundo, Matheus, Louisa, Magda, Daniel, Waldionê, Caio bigode, Lili, Paulet, Gala Garcia, Leo barba e Lara, obrigado a todos por fazer do laboratório um ambiente alegre e pelos bate-papos descontraídos durante o horário de almoço e finais de semana não esquecerei da amizade desfrutada por todos esses anos.

Ao pessoal do LAGI velho mundo Sônia, Taia, Denise, Lucas, Fernandinha Ferraz, Mateus Romero, Camila, Leandro Lemos, pelos bons momentos e amizade criada.

Ao Marcelo dentista, varejista de material de informática, obrigado por todos os ensinamentos na área, principalmente pelos softwares fornecidos.

Aos dentistas do Lab, Ricardo, Warley, Lucinana e Viviane que nos trazem uma outra abordagem da imunologia.

Ao Jamil, pela sua boa vontade de trabalhar e pelo socorro em incontáveis momentos.

À Turma de bases pelos momentos de descontração mesmo em tempos de bases.

Aos demais colegas do ICB que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Aos familiares,

muitas são as pessoas envolvidas em nossas vidas capazes de influenciar nossas escolhas, mas não tantas o fazem ao ponto de “calibrá-las” e facilitar o alcance de nossos objetivos por mais audaciosos que estes sejam. Duas grandes pessoas em especial exerceram esse papel e me fizeram crer que sem o apoio delas, muito mais tortuoso seria o caminho até chegar aos meus

objetivos. São elas: Laury Vanderlei de Macêdo e Maria de Lourdes Pereira que batalharam avidamente para munir os filhos de bons princípios e conhecimento para buscarem na vida o que eles próprios não puderam ter. Sou infinitamente grato pai e mãe, vocês foram pais exemplares e abriram mão de muitas coisas para que seus filhos pudessem ter o que precisam. Obrigado!

Aos meus irmãos, Junior e Neider, que amo infinitamente e sei que sempre estarão ao meu lado.

À Lud, namorada e amiga, por todo o amor e bem estar que você me proporciona.

Resumo

A produção de superóxido é um mecanismo essencial para o combate aos microorganismos por células do sistema imune de mamíferos, contudo, poucos trabalhos exploraram o seu papel na imunidade à leishmaniose cutânea. Por outro lado, o óxido nítrico é uma molécula-chave para a resistência contra infecções por *Leishmania spp.* Baseado nisso, decidimos avaliar o papel do superóxido na imunidade de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*, utilizando camundongos *knockouts* para NADPH oxidase ($\text{phox}^{-/-}$) e para óxido nítrico sintase indutível ($\text{iNOS}^{-/-}$). De acordo com nossos dados, camundongos $\text{iNOS}^{-/-}$ desenvolveram tanto lesões quanto parasitismo maiores do que camundongos $\text{phox}^{-/-}$ e selvagens. Ambos, $\text{phox}^{-/-}$ e selvagem, apresentaram carga parasitária similares no sítio da infecção e no linfonodo drenante com quatro, seis, oito ou dez semanas de infecção, porém o desenvolvimento da lesão em camundongos $\text{phox}^{-/-}$ foi maior no início da infecção. Por outro lado, após sete semanas de infecção as medidas das lesões são significativamente inferiores às de camundongos selvagens. Não foram encontradas diferenças na produção de $\text{IFN-}\gamma$ e IL-10 no sítio de infecção e linfonodo drenante. Através de dosagem de nitrito no soro, detectamos uma pequena redução de nitrito em animais $\text{phox}^{-/-}$ com quatro semanas de infecção. Infecções *in vitro* revelaram que macrófagos de camundongos $\text{phox}^{-/-}$, apesar de produzirem quantidades similares de NO^* , não aumentam a atividade leishmanicida como ocorre em macrófagos selvagens, o que pode significar um papel citotóxico dependente de peroxinitrito. O nosso estudo propõe um efeito imunoregulador de ROS e, baseado nos experimentos *in vitro*, mostra a importância de superóxido como uma molécula efetora na imunidade frente a infecção por *L. amazonensis*.

Abstract

The production of superoxide is an essential process in microorganism killing by mammalian host cells; however little has been done on the role of this molecule in cutaneous leishmaniasis. On the other hand, nitric oxide is known as a key radical for the resistance against *Leishmania spp.* Taking such information into account, we decided to evaluate the role of superoxide in C57BL/6 mice infected with *Leishmania amazonensis*, using both NADPH oxidase (phox) knockout mice and inducible nitric oxide synthase (iNOS) knockout mice. Our data show that iNOS^{-/-} mice developed larger lesion and higher parasite load compared with other groups. Wild-type and phox^{-/-} mice present similar parasite load in the site of infection and draining lymph nodes after four, six, eight or ten weeks post infection. Conversely, the lesion sizes of phox^{-/-} mice during the first six weeks post infection were higher and decreased rapidly thereafter compared to wild-type. No difference between phox^{-/-} and wild-type was found in footpad histopathological analysis, neither the production of IFN- γ and IL-10 at lesion site and draining lymph node. The concentration of nitrite and nitrate in the serum was slightly higher in phox^{-/-} mice four weeks post infection. *In vitro* infection of macrophage showed that phox^{-/-} mice cells produce similar amounts of NO[•] in culture but did not reduce the parasite load inside cells when activated with IFN- γ , as occurred in wild-type macrophages. Furthermore, *L. amazonensis*-stimulated macrophages produced higher levels of ROS compared to *L. major*. Our data suggest the participation of peroxynitrite as an effector molecule against *L. amazonensis* and based on *in vivo* infection suggest an immune signaling of ROS during infection with *L. amazonensis*.

INTRODUÇÃO.....	13
Resposta imune frente à infecção por <i>Leishmania amazonensis</i>	15
Ativação de macrófagos	19
Espécies reativas de nitrogênio e oxigênio.....	20
Objetivo geral.....	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS	38
Lesão induzida por <i>L. amazonensis</i> em camundongos $phox^{-/-}$ apresentam medidas superiores às obtidas em camundongos selvagens, porém inferiores às lesões de camundongos $iNOS^{-/-}$	38
A análise histológica apresenta também um quadro semelhante de infecção em ambas as linhagens.....	42
Produção de citocinas	44
Papel do óxido nítrico <i>in vivo</i>	46
Mesmo com a produção de NO^{\bullet} não alterada, macrófagos de camundongos $phox^{-/-}$ não são capazes de exterminar parasitos.....	50
<i>Leishmania amazonensis</i> parece induzir maiores quantidades de ROS em infecção <i>in vitro</i> de macrófagos	52
DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS	65

Lista de abreviaturas

AP-1	Activator Protein-1
ERK	Extra Cellular Signal-regulated Kinase
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide
FcR	Fc Receptor
IFN	Interferon
IFNGR	IFN- γ Receptor
IL	Interleucina
IRAK	IL-1 Receptor-Associated Kinase
IRF	IFN Related Factor
IRSE	IFN-Stimulated Response Element
JAK	Janus Tyrosine Kinase
LACK	<i>Leishmania</i> homolog for receptor for Activated C Kinase
LPS	Lipopolissacarídeo
MAP	Mitogen Activated protein
MCP	Monocyte Chemotatic Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MPO	Myeloperoxidase
MyD88	Myeloid Differentiation primary response protein 88
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (forma reduzida)
NADH	Nicotidamide Adenine Dinucleotide (forma reduzida)
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NO \cdot	Nitric Oxide
NOS	Nitric Oxide Synthase
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive oxygen Species
STAT	Signal Trasducers and Activators of the Transcription
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor

Introdução

A leishmaniose cutânea americana é uma doença grave distribuída por quase todos os países da América Latina e é causada pelo parasito do gênero *Leishmania* e apresenta variações no quadro de infecção dependendo da espécie (Silveira *et al.*, 2004). O parasito apresenta duas formas, uma forma alongada e com flagelo externo, as promastigotas, que se desenvolvem no tubo digestivo do inseto flebotomíneo, e uma forma arredondada e sem flagelo externo, as amastigotas, que são intracelulares obrigatórias do sistema fagocitário no hospedeiro vertebrado, ambas as formas se dividem por fissão binária (Pearson *et al.*, 1983b).

O ciclo da doença se inicia quando a fêmea do inseto flebotomíneo se alimenta de sangue infectado com amastigotas. No intestino do inseto, os parasitas se diferenciam em promastigotas e migram para a porção anterior do tubo digestivo, onde se apresentam na forma promastigota metacíclica (Pearson *et al.*, 1983b), nessa transformação existe uma expressão bem aumentada de fatores de virulência como a proteína de superfície lipofosfoglicano (LPG) e a metaloprotease gp63 (Fong and Chang, 1982). Ao sugar sangue de um vertebrado, o vetor permite que o parasito infecte um novo hospedeiro. As promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células de defesa formando assim o fagossomo, que posteriormente se funde com o lisossomo e forma o fagolisossomo. É no interior desse vacúolo que o parasito se diferencia em amastigotas e se reproduz (isso acontece principalmente em macrófagos), rompendo a membrana e extravasando para o fluido extra-celular, onde é fagocitado por outros macrófagos repetindo o ciclo de re-infecção (Burchmore and Barrett, 2001).

O estudo dos mecanismos de defesa das leishmanioses se mostrou de extrema importância para a imunologia, pois através desse foi possível identificar diversas características do sistema imune de mamíferos na infecção por vários outros patógenos. A contribuição maior foi dada pelo parasito da

espécie *L. major*, que é amplamente estudada em laboratório, por apresentar um valioso modelo de polarização da resposta imune. Um perfil de resistência está associado à resposta Th1 do hospedeiro, claramente demonstrado em animais da linhagem C57BL/6, e o perfil de suscetibilidade associado à resposta Th2, presente em animais da linhagem BALB/c (Heinzel *et al.*, 1989; Chatelain *et al.*, 1992; Afonso and Scott, 1993; Leal *et al.*, 1993; Sypek *et al.*, 1993). Diferente da *Leishmania major*, as infecções realizadas com *Leishmania amazonensis* não estabeleceram modelos de suscetibilidade e resistência. A resposta imune induzida por uma infecção com *L. amazonensis* se mostra bastante diferente da resposta provocada pelo agente da leishmaniose cutânea do velho mundo, *L. major*. Nesta, a maioria das linhagens de camundongos apresentam resistência ao parasito, enquanto em *L. amazonensis*, a grande maioria desenvolve um quadro crônico (Afonso and Scott, 1993; Gomes *et al.*, 2003), o qual será discutido abaixo. Além disso, existe uma grande diferença em fatores imunogenéticos e de virulência entre a *L. amazonensis* e *L. major*. Por exemplo, o lipofosfoglicano (LPG) foi identificado como um fator de virulência para *L. major* (Späth *et al.*, 2000), mas não para *L. amazonensis* (Ilg, 2000), diferente de gp63 que se trata de um fator de virulência vital para as promastigotas metacíclicas de *L. major* e *L. amazonensis* (Seay *et al.*, 1996; Joshi *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 2002). E ainda, o antígeno de *Leishmania* homólogo à proteína C quinase ativada (LACK) promove a produção de IL-4 através da ativação de células T $V\beta 4^+V\alpha 8^+CD4^+$ (Julia *et al.*, 1996) e é crítico para a suscetibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. major*. Na infecção por *L. amazonensis* ocorre a mesma produção de IL-4 dependente de LACK, porém a suscetibilidade ao parasito é independente do IL-4 induzido por LACK (Torretera *et al.*, 2001). Pode-se supor que moléculas adicionais do parasito contribuem para o desenvolvimento da patogênese em BALB/c durante a infecção cutânea causada por *L. amazonensis*, como por exemplo, cisteína protease B semelhante a catepsina L (enzimas CPB) (Alexander *et al.*, 1998; de Araújo Soares *et al.*, 2003; Denise *et al.*, 2003).

A distância filogenética entre os subgêneros *L. mexicana* e *L. major* é idêntica à distância entre *L. mexicana* ou *L. major* e *L. donovani*, que causa leishmaniose visceral (Croan *et al.*, 1997; Stevens *et al.*, 2001). Assim, as espécies que causam leishmaniose cutânea são tão diferentes umas das outras quanto o são das espécies que causam leishmaniose visceral. Tal divergência justifica uma busca por melhores conhecimentos sobre a imunopatogênia de espécies de *Leishmania* do novo mundo, que em sua maioria, diferem das oriundas do velho mundo. Dessa forma, como nosso estudo se concentra em desvendar características imunológicas induzidas pela infecção por *L. amazonensis*, discutiremos um pouco mais sobre a resposta imune induzida por esse parasito.

Resposta imune frente à infecção por *Leishmania amazonensis*

A *Leishmania amazonensis*, pertencente ao complexo mexicana, tem sido identificada em pacientes com formas clínicas diversas, incluindo leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose visceral em países da América do Sul (Almeida *et al.*, 1996; Silveira *et al.*, 2005). Em geral, a infecção de camundongos com *L. amazonensis* leva a um quadro crônico de infecção sem cura, o que tem dificultado avanços maiores no estudo de fatores que geram um fenótipo resistente ou suscetível a esse parasito (Blackwell, 1996). Por outro lado, na infecção por *L. major*, temos uma dicotomia bem estabelecida em modelos murinos na qual camundongo C57BL/6 é resistente à infecção e camundongos BALB/c são suscetíveis (Alexander *et al.*, 1999). À suscetibilidade associou-se uma resposta Th2 (com produção de IL-4 e IL-13), enquanto uma resposta Th1 (com produção de IFN- γ) medeia a resistência à *L. major* (Rogers *et al.*, 2002).

A citocina IL-4, foi rapidamente associada com a suscetibilidade à infecção por *L. major*, (Chatelain *et al.*, 1992; Kopf *et al.*, 1996), porém outros trabalhos demonstravam que a suscetibilidade não era dependente apenas de

IL-4, pois camundongos IL-4^{-/-} não se mostravam resistentes ao parasito (Noben-Trauth *et al.*, 1996; Kropf *et al.*, 1997). Um estudo esclarecedor demonstrou que a falta de IL-4 poderia induzir IL-13 por um mecanismo de compensação (Matthews *et al.*, 2000), porém os receptores de ambas as citocinas dividem a subunidade IL-4R α (Noben-Trauth *et al.*, 1999). Dessa forma, a partir do silenciamento dessa subunidade foi possível inibir o efeito de IL-4 e IL-13 e gerar um camundongo resistente a *L. major*. O mesmo trabalho demonstrou que a super-expressão de IL-13 em camundongos C57BL/6 induziu maiores lesões e parasitismo na infecção por *L. major* (Matthews *et al.*, 2000). Similarmente, o tratamento de camundongos IL-4^{-/-} com anti-CTLA-4, uma molécula co-estimulatória, provoca a produção de níveis elevados de IL-13 e a consequente exacerbação da infecção (Heinzel and Maier, 1999). E ainda, camundongos BALB/c tratados com IL-12 recombinante desenvolvem lesão menor e parasitismo brando (Heinzel *et al.*, 1993), sintomas correlacionados ao aumento da produção de IFN- γ e decorrente resistência ao parasita (Sypek *et al.*, 1993) ambos característicos de uma resposta Th1. Entretanto, camundongos BALB/c deficientes de IL-4R α apesar de resistentes à infecção por *L. major*, apresentam um quadro de infecção aumentado em relação aos camundongos C57BL/6 selvagens (Mohrs *et al.*, 2000). Dessa forma, outros mecanismos diferentes de IL-4 e IL-13 são capazes de contribuir para a suscetibilidade de camundongos BALB/c à *L. major*. A IL-10 parece ser um desses mecanismos (Kane and Mosser, 2001; Noben-Trauth *et al.*, 2003). Essa citocina parece também permitir a persistência do parasito em camundongos C57BL/6 e, por isto, permitir a imunidade concomitante (Belkaid *et al.*, 2002). Assim, apesar de muitos mecanismos estarem esclarecidos, ainda restam algumas dúvidas em relação à suscetibilidade à leishmaniose cutânea.

Já durante infecções experimentais com *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6 ou C57BL/10, a presença de baixos níveis de IFN- γ e IL-4 (Afonso and Scott, 1993; Jones *et al.*, 2000) está relacionada, em parte, com alterações das células T CD4⁺ (Soong *et al.*, 1997). Soong e colaboradores (1997), demonstraram que camundongos deficientes de MHC II funcional

apresentavam lesão e parasitismo menores em relação ao camundongo selvagens, e ainda, tanto camundongos nude quanto camundongos *knockout* para o gene *rag2*, ambos com o desenvolvimento de linfócitos T comprometido, não desenvolvem lesão até a vigésima semana de infecção por *L. amazonensis*. Assim, a baixa produção de IFN- γ devido a redução da população de células T CD4⁺ interfere drasticamente na patogênese da doença (Soong *et al.*, 1997). Um outro exemplo da ligação entre as células T CD4⁺ com a suscetibilidade à *L. amazonensis* é a diminuição na expressão da cadeia β 2 do receptor para IL-12 (IL-12R β 2) pelas células T CD4⁺, tanto de camundongos selvagens quanto de camundongos IL-4^{-/-} e a baixa resposta à administração exógena de IL-12 (Jones *et al.*, 2000) ou IFN- γ (Barral-Netto *et al.*, 1996) nas infecções causadas por *L. amazonensis*. A evidência de que um mecanismo independente de IL-4 seja responsável pela resposta reduzida à IL-12 e consequente baixa produção de IFN- γ demonstra que o desenvolvimento do estado crônico da infecção por *L. amazonensis* é associado à ausência de uma resposta Th1 onde, de fato, uma resposta Th2 não é dominante (Kaye *et al.*, 1991; Afonso and Scott, 1993; Jones *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002).

Dentre as citocinas características de uma resposta Th1, o IFN- γ é considerado a citocina central para a indução de resistência à leishmaniose e é capaz de induzir uma resposta Th1 já nas primeiras semanas de infecção (Scott, 1991). O IFN- γ é considerado uma das mais potentes citocinas ativadoras do sistema imune. Ele possui um amplo espectro de ação na ativação de macrófagos, células NK, linfócitos T e B, e age até mesmo em células epiteliais e fibroblastos. Sua forma biologicamente ativa constitui-se de uma proteína homodimérica em que cada cadeia pesa 17 kDa, com o produto final atingindo 50 kDa devido a padrões de glicosilação durante o processo de maturação (Kelker *et al.*, 1984). A proteína madura interage com seu receptor específico (IFN- γ R) que é um heterodímero constituído de duas cadeias, a IFNGR1 ou cadeia α e a IFNGR2 ou a cadeia β , esta interação se dá na superfície da célula (Bach *et al.*, 1997). É interessante observar que nenhuma das duas cadeias de IFNGR possui atividade sinalizadora intrínseca (atividade de quinase ou

fosfatase), necessitando de associação de adaptadores para transdução dos sinais externos. A subunidade IFNGR1, por exemplo, possui sítios de ligação para a Jak1 e Stat1 enquanto a subunidade IFNGR2 apresenta sítio de ligação para Jak2 (Bach *et al.*, 1997). A ligação do receptor de interferon- γ com a citocina causa uma mudança conformacional do complexo que induz a autofosforilação de uma quinase presente na porção citoplasmática da subunidade IFNGR2 do receptor, a Jak2. Com isso, ocorre a transfosforilação de Jak1, uma quinase presente na subunidade IFNGR1, pela Jak2. A enzima Jak1 ativada fosforila resíduos de tirosina presente na posição 440 em cada uma das subunidades IFNGR1 para a formação de sítios adjacentes e conseqüente ancoramento do sítio SH2 de Stat1. O homodímero de Stat1 é formado através da fosforilação do resíduo de tirosina na posição 701 na cauda C-terminal de cada proteína Stat1 recrutada, assim o complexo formado naturalmente se desprende do receptor de IFN- γ e transloca-se para o núcleo. No núcleo, o homodímero Stat1 se liga ao promotor GAS (IFN-activation site) para induzir ou suprimir os genes regulados por IFN- γ . Um dos genes induzidos é o de IRF-1, um fator de transcrição capaz de se ligar ao promotor ISRE (IFN-estimated response element) responsável pela expressão de diversos genes regulados por IFN- γ , como por exemplo iNOS (Schroder *et al.*, 2004).

O IFN- γ confere resistência à infecção (Heinzel *et al.*, 1989), pois é essencial para a produção de óxido nítrico por macrófagos (Green *et al.*, 1990a). O óxido nítrico (NO \cdot) é a molécula efetora da morte dos parasitos *in vitro* (Green *et al.*, 1990b; Liew *et al.*, 1990a) e *in vivo* (Stenger *et al.*, 1996; Diefenbach *et al.*, 1998). A produção de TNF- α também está relacionada com o efeito protetor a leishmaniose cutânea (Liew *et al.*, 1990b; Vieira *et al.*, 1996) e age sinergicamente com o IFN- γ na produção de NO \cdot (Green *et al.*, 1990a; Nathan and Hibbs, 1991; Vieira *et al.*, 1996). Camundongos C57BL/6 deficientes em IFN- γ apresentam maior lesão e permissividade quando infectados com *L. amazonensis*, devido à redução dos níveis de TNF- α e IL-12 e leve aumento de IL-4 (Pinheiro and Rossi-Bergmann, 2007). Com isso altos níveis de IFN- γ são necessários para a imunidade contra *L. amazonensis*, pois esta citocina estimula

macrófagos a produzir quantidades consideráveis de TNF- α e produção de NO \cdot (Gomes *et al.*, 2003). As células NK também possuem grande função na liberação de IFN- γ (Trinchieri *et al.*, 1984). Essa citocina modula a atividade citotóxica células NK, ativadas com IL-2, e promove a lise de parasitos e células hospedeiras infectadas com *L. amazonensis* *in vitro* e *in vivo* (Aranha *et al.*, 2005). Outro fator importante para a promoção e desenvolvimento de uma resposta adquirida adequada contra infecções causadas por parasitos do complexo mexicana é a produção de anticorpos. A partir da utilização de camundongos BALB/c que não produzem células B, foi demonstrado que na ausência dessas proteínas a patogenia da infecção por *L. amazonensis* é fortemente reduzida, e a produção de anticorpos se mostra associada com uma melhor indução à fagocitose por meio do receptor Fc e otimiza a apresentação de antígenos (Kima *et al.*, 2000).

Ativação de macrófagos

Por serem as principais células hospedeiras da *Leishmania*, os macrófagos possuem papel central tanto no início da infecção quanto na imunidade efetora contra o parasito, portanto, devemos considerar algumas características sobre a ativação dessas células pela *Leishmania major*, já que a infecção por esse parasito é melhor estudada. Igualmente ao modelo *in vivo*, IFN- γ exerce um papel central na estimulação de fatores microbicidas em infecções *in vitro* de macrófagos induzindo a produção de NO \cdot (Murray *et al.*, 1982; Green *et al.*, 1990a; Green *et al.*, 1990b; Kane and Mosser, 2001). A principal citocina indutora de IFN- γ é a IL-12, uma proteína heterodimérica produzida por monócitos, macrófagos, células B e células dendríticas que estimula a resposta Th1 e a ativação de células NK, principais produtoras de IFN- γ (Kobayashi *et al.*, 1989; Wolf *et al.*, 1991). A exposição de macrófagos a *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium tuberculosis* estimula grandes quantidades de IL-12 *in vitro*, por outro lado, a exposição de

macrófagos à *Leishmania major* não induz a produção dessa citocina. A *Leishmania* apresenta um efeito inibitório sobre a produção de IFN- γ , que conseqüentemente induz a baixa ativação de macrófagos, assim, ocorre a exacerbação da infecção em seus primeiros dias (Reiner *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2005). Além da redução de produção de IL-12, também foi detectada uma inibição parcial de IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e iNOS por meio da via de ativação dependente de IL-12 e estimulação da liberação de IL-10 e MCP-1 (Carrera *et al.*, 1996). Em contrapartida, temos um aumento da produção de citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β que não só inibem os mecanismos efetores dependentes de IFN- γ (Oswald *et al.*, 1992; Vieth *et al.*, 1994; Kane and Mosser, 2001) como promovem o crescimento de amastigotas de *L. major* dentro de macrófagos (Iniesta *et al.*, 2001; Iniesta *et al.*, 2002). Similarmente, em infecções de macrófagos com *L. amazonensis* ocorre a indução da produção de TGF- β e esse é visto como um mecanismo de escape da *Leishmania* das ações microbicidas de macrófagos (Barral-Netto *et al.*, 1992).

Espécies reativas de nitrogênio e oxigênio

Apesar dos mecanismos leishmanicidas potentes dos macrófagos, a *Leishmania* pode infectar e se multiplicar nestas células. Vários mecanismos podem explicar a resistência da *L. amazonensis* aos mecanismos microbicidas de macrófagos, mesmo em um ambiente potencialmente citotóxico, alguns deles são: a inibição de proteases dentro do fagossomo; inibição do estresse oxidativo; redução da expressão de MHC de classe II, inibição do processamento de antígenos e sua apresentação (Bogdan and Röllinghoff, 1998). Um outro importante fator para a sobrevivência do parasito é a inibição da síntese de NO^{*} por macrófagos infectados com *L. amazonensis* diretamente através da supressão da atividade da iNOS sem alteração da mensagem do RNA (Balestieri *et al.*, 2002) ou indiretamente pela baixa produção de TNF- α (Gomes *et al.*, 2003) ou ainda pela produção aumentada de citocinas anti-

inflamatórias, entre as quais destacam-se a IL-10 e TGF- β (Wanderley *et al.*, 2006).

Porém, a contribuição de outras pesquisas tem ampliado um pouco mais o conhecimento da patogênese da infecção por *L. amazonensis*, a qual não é exclusivamente atribuída à alteração da resposta imune celular adquirida, pois, de fato, existem elementos da resposta imune inata que modulam a permissividade a esse parasito.

O controle de parasitos do gênero *Leishmania* depende da atividade da iNOS, isso foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* por meio da utilização de inibidores não-selectivos para as óxido nítrico sintases (NOSs) (Liew *et al.*, 1990a; Evans *et al.*, 1993), por meio do tratamento de camundongos com inibidores que possuem relativa especificidade à iNOS (Stenger *et al.*, 1995), através do uso de *knockouts* para a enzima iNOS e a perda completa da atividade dessa enzima (Diefenbach *et al.*, 1998), ou a partir da utilização de camundongos com a enzima iNOS mutante, que confere uma capacidade parcial de síntese de NO[•] (Wei *et al.*, 1995). Dentre os modelos acima, a persistência da lesão e do parasito no sítio de infecção ocorreram em animais tratados constantemente com o inibidor seletivo de iNOS e também em animais *knockouts* para o gene de iNOS sendo caracterizada uma infecção crônica com alto parasitismo. O trabalho de Stenger e colaboradores (1996) demonstrou, que a atividade da iNOS não foi necessária apenas para a fase aguda da infecção por *L. major*, mas também para o controle de parasitos persistentes no sítio da infecção e linfonodo durante a fase crônica (Stenger *et al.*, 1996). Portanto, uma resposta adequada para a retenção do crescimento de parasitos deve ter a presença de NO[•], assim como de seus indutores cujo principal é a citocina IFN- γ .

O NO[•] gerado pela iNOS é tido por muitos autores como o principal mecanismo microbicida ou microbiostático induzido pelo IFN- γ (Karupiah *et al.*, 1993; Green *et al.*, 1994; Chakravorty and Hensel, 2003). Já foi demonstrado que a ação do NO[•] ou de seus intermediários é importante tanto para o combate a bactérias (Green SJ *et al.*, 1994) quanto a vírus (Karupiah *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1995), protozoários e helmintos (Brunet, 2001). O óxido nítrico exerce o

seu efeito citotóxico danificando a estrutura de várias enzimas envolvidas na cadeia respiratória e pode afetar o ciclo de Krebs inativando, por exemplo, a aconitase (Chakravortty and Hensel, 2003). Além disso, as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são capazes de formar adutos de NO no DNA causando dano oxidativo e interferindo na capacidade funcional e replicativa da célula-alvo (Bogdan, 2001; Chakravortty and Hensel, 2003).

Outras citocinas que podem modular a produção de NO[•] são os IFNs do tipo I. Bogdan C. e colaboradores (2000) demonstraram em seus experimentos que quando se inibe IFN- γ e analisa a presença de iNOS no sítio de infecção por *L. major*, não se encontra um aumento significativo dessa enzima. Por outro lado, quando se inibe o IFN do tipo I (IFN- α/β) antes da inoculação de *Leishmanias*, após um dia de infecção não se detecta mais células positivas para iNOS no sítio de infecção (Bogdan *et al.*, 2000). Também já foi demonstrado que macrófagos *in vitro* infectados com *L. major* produzem IFN do tipo 1 (Diefenbach *et al.*, 1998). Portanto, existe uma relação direta entre o aumento de IFN do tipo I e a indução de NO[•] na fase aguda da infecção, e ainda, essa produção *in vitro* ocorre apenas quando há sinergismo entre IFN α/β com LPS (Ding *et al.*, 1988) ou com *L. major* (Diefenbach *et al.*, 1998). Em contrapartida, o pré-tratamento de macrófagos com IFN- α/β antagoniza o efeito de IFN- γ sobre a indução do NF- κ B e conseqüente indução de NO[•]. Assim, o IFN do tipo I pode modular positiva ou negativamente a produção de NO[•] dependendo de quando esse interage com o macrófago e do estímulo (*L. major*, LPS ou IFN- γ) (Bogdan *et al.*, 2000).

Como já relatado, camundongos iNOS^{-/-} não são capazes de controlar *L. major* e desenvolvem um quadro crônico na infecção por esse parasito (Diefenbach *et al.*, 1998). Contudo, acredita-se que a visceralização do parasito não está associada com a falta do efeito citotóxico protagonizado pelo NO[•]. De acordo com Bogdan C. e colaboradores (2000), no primeiro dia de infecção por *L. major*, inicialmente ocorre uma produção de IFN- α/β que induz a expressão de iNOS e conseqüente liberação de NO[•]. O óxido nítrico, por sua vez, sinaliza para o aumento da produção do IFN- γ que, por algum mecanismo ainda não

esclarecido, causa a retenção de células infectadas no sítio da infecção, evitando seu contato com outros órgãos nas primeiras horas de infecção (Diefenbach *et al.*, 1998). Com esse exemplo, fica claro que a função do óxido nítrico não se resume apenas a uma ação citotóxica, mas também de modulação da resposta imune alterando o balanço de citocinas. De uma forma geral, os RNS também exercem função modulatória inibindo proteínas G (Lander *et al.*, 1997), ativando ou inibindo quinases (Diefenbach *et al.*, 1998), caspases (Mannick *et al.*, 1999), metaloproteases (Zhang *et al.*, 2000), fatores de transcrição (Hierholzer *et al.*, 1998) e DNA metiltransferase (Hmadcha *et al.*, 1999), inibindo a proliferação de linfócitos, alterando a produção de prostaglandinas e citocinas (Marnett *et al.*, 2000) e induzindo ou não apoptose (Brüne *et al.*, 1998). Todas essas funções comprovam a não redundância de iNOS que pode ser observada em camundongos iNOS^{-/-} sujeitos a infecções induzidas por *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, vírus Ectromelia e Coxsackie B3, pois, nesses modelos, a resposta com altos níveis de NO^{*} é crucial para a cura (Nathan, 1997).

As espécies reativas de oxigênio (ROS, em inglês) têm como precursor o superóxido, que é produzido pela enzima NADPH oxidase de fagócitos (phox, em inglês) e é de suma importância para respostas efetoras no sistema imune, pois a perda da atividade dessa enzima provoca uma susceptibilidade grande a muitos patógenos como *S. aureus*, *Aspergillus*, *Burkholderia* e *Listeria monocytogenes* (Dinauer *et al.*, 1997; Segal *et al.*, 2000), caracterizando o quadro da doença granulomatosa crônica tanto em humanos quanto em camundongos.

A enzima é composta de várias subunidades, sendo que duas delas (gp91^{phox} e p22^{phox}) estão na membrana plasmática, formando o flavocitocromo b₅₅₈. As outras subunidades (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} e rac1/2) estão localizadas no citoplasma e se unem ao complexo ligado à membrana para formar a enzima ativa (Shatwell and Segal, 1996). Durante a fagocitose, o reconhecimento de padrões moleculares é feito pelos TLRs, esses estimulam a atividade de p38 MAP quinase via MyD88 que leva à fosforilação da subunidade citoplasmática

p47^{phox}, que por sua vez expõe seu sítio de ligação à p22^{phox}. Dessa forma, a exposição do sítio de ligação permite o recrutamento de p47^{phox} para se ligar ao citocromo b₅₅₈ (formado por gp91^{phox}-p22^{phox}) (Laroux *et al.*, 2005). Esse passo é fundamental para o ancoramento de p67^{phox} ao complexo p47^{phox}-p22^{phox}-gp91^{phox} (Leto *et al.*, 1994), e apenas após a interação com a proteína rac, p67^{phox} expõe o sítio de ligação com a subunidade gp91^{phox}, ativando assim a produção de superóxido (Mizrahi *et al.*, 2006). Ainda não é muito claro o papel de p40^{phox}. Essa subunidade protéica é essencial para a produção de superóxido, já que em sua ausência não se tem o quadro da doença granulomatosa. Alguns pesquisadores afirmam que a p40^{phox} é responsável por potencializar a produção de ROS. De fato, os melhores modelos sugerem que a gp91^{phox} tenha sua atividade catalítica modulada pelas demais proteínas, principalmente p47^{phox}, p67^{phox}, p22^{phox} e rac e que a principal função desses elementos reguladores seja a prevenção da produção desordenada e excessiva de ROS, que poderia ser extremamente danosa ao hospedeiro (Babior, 2004). O IFN- γ induz a síntese das cadeias gp91^{phox} e p67^{phox}, enquanto os demais componentes da NADPH oxidase são considerados de expressão constitutiva (Schroder *et al.*, 2004).

A gp91^{phox} é essencial para o funcionamento da NADPH oxidase, é justamente nessa subunidade que está ligado o acceptor de elétrons flavina adenina dinucleotídeo (FAD), junto à cauda citoplasmática da proteína (figura 1) (Han and Lee, 2000). Na porção da gp91^{phox} associada com a membrana se encontra um par de grupos heme que possuem o potencial redox muito baixo, pois esses se encontram hexacoordenados, ou seja, com todas as coordenadas eletrônicas ocupadas (Fujii *et al.*, 1995; Fujii *et al.*, 1999), por isso ainda restam dúvidas com relação à participação dos agrupamentos heme na transferência de elétrons provenientes do NADPH para o oxigênio molecular, gerando o superóxido. Mas a maioria dos pesquisadores acredita que tanto o FAD quanto os grupos heme presentes em gp91^{phox} participam ativamente dessa transferência (Babior, 2004). Embora a enzima possa utilizar do NADH como doador de elétrons, em ambientes biológicos isso não ocorre devido à

preferência da enzima por NADPH, esse é um dos fatores que limitam sua atividade (Doussiere *et al.*, 1993).

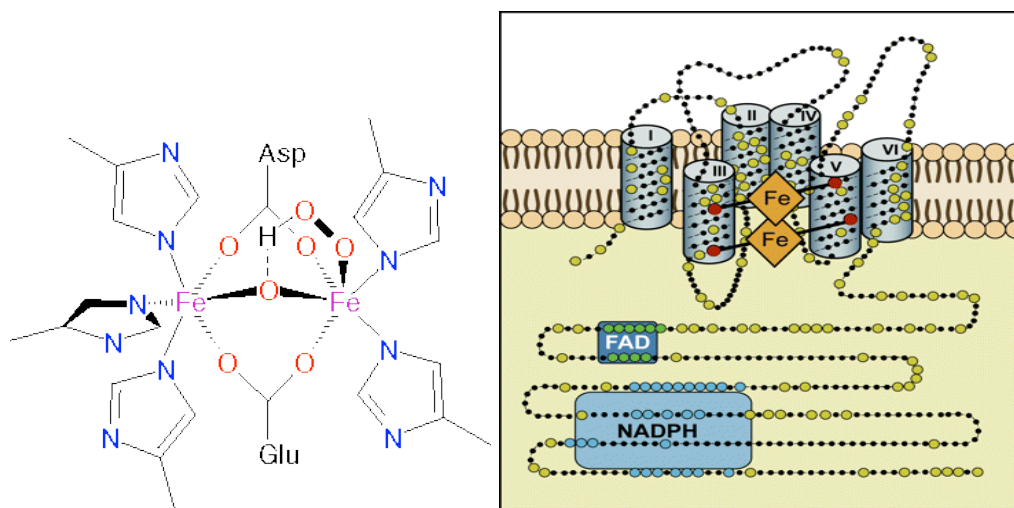
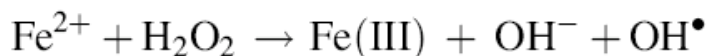


Figura 1: Parte de uma hemoproteína ilustrando dois grupos heme hexacoordenados (A) e esquema de uma gp91^{phox} junto a membrana plasmática. A cauda citoplasmática apresenta um grupo FAD ligado e possui o sítio de ligação para a NADPH (B). A ilustração foi retirada de <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/HAEMERYTHRIN.html> (esquerda) e Bedard K e Krause K, *Physiol Ver* 87:245-313,2007 (direita).

O superóxido é relativamente pouco reativo quando liberado no meio extracelular, porém quando gerado em ambiente intracelular ele exerce toxicidade inativando enzimas importantes com centro Fe-S. Simultaneamente, o íon Fe²⁺ liberado pode reagir com o peróxido de hidrogênio (mecanismos de Fenton, reação abaixo) e produzir OH[•] que é biologicamente mais nocivo (Halliwell, 2006).



Contudo, por apresentar carga negativa, o superóxido é incapaz de atravessar membranas biológicas. Dessa forma, a maior parte dos efeitos citotóxicos vistos na presença de superóxido é por meio de outras ROS como O₃, HOCl, HOBr, ONOO⁻, NO₂[•], CO₃^{•-}, H₂O₂, OH[•], etc., (Halliwell, 2006). Dentre as moléculas

citadas, o H_2O_2 se destaca por ser formado pela ação da superóxido dismutase (SOD) a partir de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e, diferente deste, essa molécula atravessa a membrana do patógeno com facilidade e pode participar do extermínio gerando OH^{\cdot} intracelular através da reação de Fenton (Repine *et al.*, 1981; Gutteridge and Halliwell, 1992), assim a própria danificação de enzimas com centro Fe-S aumenta a toxicidade de H_2O_2 por liberar Fe^{2+} . Por outro lado, a morte de microorganismos por meio da conversão de H_2O_2 em OH^{\cdot} dentro do fagossomo (fora da membrana do patógeno) é improvável, pois, por ser extremamente reativa, essa molécula liberada no fagossomo pode reagir com muitos compostos, e se mesmo assim alguma delas atingir a parede celular de bactérias, por exemplo, causará danos irrelevantes. Em neutrófilos, para reduzir o dano causado pelo OH^{\cdot} em moléculas próprias, a célula utiliza a lactoferrina, uma proteína que se liga ao íon ferro e evita a geração de OH^{\cdot} pelo mecanismo de Fenton (Gutteridge and Halliwell, 1992; Segal, 2005).

Outro processo que se destaca é a reação entre NO^{\cdot} e $\text{O}_2^{\cdot-}$, formando ONOO^- que, em pH fisiológico e concentrações altas de CO_2 , como nos tecidos, pode formar, dentre outros, os radicais NO_2^{\cdot} e $\text{CO}_3^{\cdot-}$ com alto potencial de causar danos em microorganismos e em células hospedeiras (Alvarez and Radi, 2003). No entanto, as células de mamíferos parecem estar preparadas para tal agressão utilizando de diversas estratégias antioxidantes (Evans and Halliwell, 2001). Assim, visto que a geração de camundongos duplo *knockouts* para ambas, iNOS e NADPH oxidase, se dá apenas em ambiente livre de germes (Gyurko *et al.*, 2003) ou em condições especiais (sob efeito de um coquetel de antibióticos) (Murray *et al.*, 2006), o benefício que esse mecanismo celular apresenta sem dúvida supera o mal provocado pelas oxidações de biomoléculas próprias.

Quando se trata de neutrófilos, um mecanismo microbicida importante é a formação de ácido hipocloroso (HOCl) pela myeloperoxidase (MPO). Essa enzima compreende 2 a 5% de todas as proteínas da célula e através da fusão de grânulos citoplasmáticos com o fagossomo pode promover a morte de micróbios (Winterbourn, 2002). A enzima gera HOCl a partir de H_2O_2 e Cl^- ,

portanto alterações na capacidade de produção de superóxido possivelmente acarreta em menor atividade de MPO.

No presente estudo, procuramos esclarecer o papel do mecanismo efetor representado pelas espécies reativas de oxigênio na imunidade frente a infecção por *Leishmania amazonensis* que aparentemente não possui apenas o papel efetor, mas também de modulação, como mostrado nos resultados a seguir.

Objetivo geral

Estudar o papel das espécies reativas de oxigênio na imunidade em modelo murino por meio de infecções de camundongos e de macrófagos peritoneais com *Leishmania amazonensis*.

Objetivos específicos:

1. Comparar o curso de infecção e parasitismo de camundongos C57BL/6, $\text{phox}^{-/-}$ e $\text{iNOS}^{-/-}$ infectados com *L. amazonensis*;
2. Avaliar o efeito do inibidor da enzima iNOS sobre o curso de infecção e parasitismo de camundongos C57BL/6 e $\text{phox}^{-/-}$ infectados com *L. amazonensis*;
3. Comparar a produção de nitrito no soro de animais infectados tratados ou não com inibidor de iNOS;
4. Estabelecer relações entre a produção de citocinas no linfonodo drenante e sítio de infecção de camundongos C57BL/6 e $\text{phox}^{-/-}$;
5. Comparar dados histológicos do sítio de infecção de camundongos C57BL/6 e $\text{phox}^{-/-}$;
6. Determinar o efeito da deleção de phox em infecções *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos $\text{phox}^{-/-}$ e comparar com a infecção de macrófagos selvagens e $\text{iNOS}^{-/-}$;
7. Quantificar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos do item anterior e comparar com as células das demais linhagens;
8. Comparar a produção de ROS por macrófagos peritoneais induzida por Zymosan, *L. amazonensis* e *L. major*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos tipo selvagem (+/+) e camundongos *knockout* nos quais o gene de interesse foi deletado por recombinação homóloga. São eles: camundongos *knockout* para o gene da enzima óxido nítrico sintase indutível ($iNOS^{-/-}$, **B6.129P2-Nos2tm1Lau/J**) e camundongos *knockout* para o gene da subunidade gp91 do complexo enzimático NADPH oxidase de fagócitos ($phox^{-/-}$ **B6.129S6-cybbtm1Din/J**). Esses camundongos foram obtidos da Jackson Laboratories (Glensville, NJ, EUA) e mantidos em nosso laboratório.

As colônias de camundongos foram mantidas em microisoladores dotados de filtros, com cama, comida e água estéreis, em estantes com ventilação forçada. Os controles utilizados foram camundongos C57BL/6 fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais experimentais foram mantidos com barreiras ambientais sob condições de temperatura e fotoperíodo controladas. Esses animais foram mantidos em gaiolas convencionais no biotério experimental do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia e receberam ração e água a vontade. Foram utilizados camundongos com idade entre 4 e 12 semanas.

Parasitas

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania major* (WHO MHOM/IL/80/Friedlin) foram cultivadas em Grace's Insect Medium (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado (SBF) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), 100 U de penicilina por mL e 100 µg de estreptomicina por mL (Gibco BLR Life Technologies). As culturas foram mantidas em estufa BOD a 25°C e

repicadas a cada dois ou três dias, até no máximo 10 repiques. Após a décima passagem, os parasitos foram novamente isolados das patas de camundongos BALB/c infectados. Para o isolamento das culturas, os animais foram anestesiados com 100 µL de solução anestésica contendo cloridrato de ketamina (Vertbrands, Jacareí, SP, Brasil) a 15 mg/mL e cloridrato de xilazina (Vertbrands) a 5 mg/mL, e tiveram suas patas higienizadas com álcool. Em seguida, com o auxílio de uma seringa contendo uma agulha de calibre 26 G½, as patas foram puncionadas, e o conteúdo da seringa foi transferido para o primeiro poço de uma placa de 96 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) contendo 200 µL de meio de Grace completo. Posteriormente, foram transferidos 50 µL do conteúdo do primeiro poço para o segundo poço e deste para o terceiro, e assim sucessivamente. A placa foi, então, selada e mantida em estufa BOD a 25°C. Após 4 a 7 dias, formas promastigotas de *Leishmania* foram recuperadas da placa e mantidas em garrafas de cultura de 25 cm³ (TPP).

Na infecção *in vivo*, foram utilizadas 1×10^6 formas promastigotas metacíclicas, com quatro dias de cultura. As promastigotas metacíclicas foram obtidas por separação de parasitos da fase estacionária (4 a 5 dias de cultura) através de gradiente de densidade como descrito anteriormente (Späth and Beverley, 2001). Em síntese, as culturas de *Leishmania* em fase estacionária foram centrifugadas a $2.000 \times g$ a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento recuperado em 2 mL de salina tamponada com fosfato a 10 mM, pH 7,3 (PBS), e transferido para um tubo contendo gradiente de Ficoll (Ficoll[®] 400, Sigma-Aldrich Co.), o qual é composto por uma fase de Ficoll 20% e uma fase de Ficoll 10%. Este material foi centrifugado a $1.250 \times g$ por 10 minutos a 4°C, e a fase contendo as formas metacíclicas foi coletada, e lavada duas vezes com PBS antes de ser usada para a infecção. Os parasitos foram concentrados por centrifugação ($2000 \times g$ por 15 min). Uma alíquota foi retirada e diluída em formol tamponado e o número de parasitas foi estimado por contagem em câmara de Neubauer. A concentração foi acertada em 1×10^6 parasitos por 40 µL de PBS. As duas patas traseiras dos camundongos foram infectadas.

O antígeno de *Leishmania amazonensis* foi obtido a partir de promastigotas metacíclicas da fase estacionária lavadas duas vezes em PBS. Para cultura de células e ELISA, os parasitos foram ressuspensos em PBS e submetidos a sete ciclos de congelamento e descongelamento. A concentração de proteína do antígeno foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) e a concentração final foi ajustada a 1 mg/mL. Alíquotas foram estocadas a -70°C antes do seu uso.

Na infecção *in vitro*, o procedimento de preparação dos parasitos foi o mesmo, exceto pela concentração final de parasitos, pois o ajuste é feito em um parasito por macrófago.

Infecções subcutâneas e acompanhamento

Os camundongos foram inoculados subcutaneamente com 40 µl de PBS contendo 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na pata direita. O tamanho da lesão foi monitorado semanalmente e os resultados foram expressos como a diferença de espessura entre a pata infectada (esquerda) e a pata não infectada (direita), esse valor, expresso em milímetros, que chamamos de lesão.

A lesão induzida na pata desses camundongos foi acompanhada semanalmente, com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo Co., Kawasaki, Kanagawa, Japão). O desenvolvimento da lesão foi acompanhado até o tempo de 10 semanas de infecção.

No tratamento *in vivo* com o inibidor de iNOS, aminoguanidina (Sigma-Aldrich Co.), esse composto foi adicionado na água dos animais a uma concentração de 1%.

Quantificação de parasitos em tecidos

A quantificação de parasitos foi feita por diluições sucessivas a partir de patas, linfonodo, baço e fígado de camundongos experimentais. Primeiramente os órgãos foram pesados (no caso do fígado) e, em seguida, macerados em um

homogeneizador de tecidos estéril. A pata, o linfonodo e baço foram inteiramente macerados. O homogenato foi centrifugado a 140 x g por 1 minuto e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Esse sobrenadante foi centrifugado a 2000 x g por 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em meio de Grace completo (Sigma-Aldrich Co.) em um volume de 10 µL/mg de tecido. Em uma placa estéril de poliestireno com 96 poços e fundo chato (TPP), foram colocados 150 µL/poço de meio de Grace completo, exceto na primeira coluna de poços, onde foi colocada 200 µL da suspensão do órgão macerado. Em seguida, foram feitas diluições sucessivas 1:4 de maneira que cada amostra ocupe duas linhas da placa, ou seja, cada amostra é diluída em 24 poços, tomando-se o cuidado de trocar o conjunto de ponteiros da pipeta multicanal a cada diluição para evitar o arraste de parasitas e o conseqüente aumento artificial dos resultados. As placas foram mantidas a 25°C em estufa BOD e a leitura dos resultados foi feita de 7-10 dias após o início da cultura. O resultado expresso é a média do logaritmo negativo do título de parasitas (Vieira *et al.*, 1996).

Análise histopatológica

Lesões infectadas com *L. amazonensis* foram removidas e coletadas 6 ou 10 semanas após a infecção, fixadas em formalina tamponada com fosfato a 10% pH 7,2, desidratadas, e posteriormente os diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes histológicos seriados de 5 µm de espessura em micrótomo de rotação SPENCER (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), os quais foram montados em lâminas e corados segundo as técnicas de Hematoxilina-Eosina. As análises histológicas foram desenvolvidas sob microscopia de luz usando de 100 a 400 vezes de aumento.

Extração de citocinas do tecido

Nos tempos indicados, as patas dos animais infectados e não infectados foram retiradas e congeladas a -70°C para posterior dosagem de citocinas. Após

o descongelamento dos tecidos, as patas foram pesadas e foi adicionada solução para extração de citocinas (0,4 M de NaCl, 0,05% Tween 20, 5% de soro albumina bovina (BSA), 0,1 mM de fluoreto de fenil-metil-sulfonila, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) e 20 unidade inibitória de calicreína (KIU) de aprotinina em 100 mL de PBS) na proporção de 10 µL de solução para 1 mg de tecido. O tecido foi, então, macerado com homogeneizador elétrico e centrifugado a 10.000 x *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, e congelado a -70°C até a realização do ensaio de imunoenzimático (ELISA).

Produção de citocinas por células do linfonodo

As células do linfonodo de animais infectados foram extraídas a partir da maceração desse órgão formando uma suspensão celular. Brevemente, as células foram lavadas e ressuspensas a uma concentração de 5x10⁶ células/mL de RPMI 1640 (Gibco), contendo 10% de soro bovino fetal (Nutricell, Campinas, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Sigma), 0,1% de solução de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Co.) a 0,05 M, 100 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Gibco). Em seguida as células foram plaqueadas 1 mL/poço em placas de 24 poços (Costar, New York, NY, USA). As células foram estimuladas com 50 µg/mL de antígeno de *L. amazonensis* (Ag). O sobrenadante da cultura foi coletado após 24h para dosagem de TNF-α ou 72h para a detecção de IFN-γ e IL-10 por ELISA (abaixo).

Os sobrenadantes foram diluídos quatro vezes e testado para cada citocina. As dosagens de TNF-α e IL-10 foram feitas a partir da utilização de kits (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) exclusivos para a detecção dessas citocinas e o procedimento foi feito exatamente como recomenda o fabricante.

A detecção de IFN-γ foi realizada como descrito a seguir. As placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL a 2 µg/mL do anticorpo de captura anti-IFN_γ murino (R4-6A2) (BD Pharmingen) e incubadas por 18 horas a 4°C. No dia seguinte, foi feito o bloqueio da placa com PBS com 5% de soro fetal bovino

(Nutricell) por 1h. Passado esse tempo, as placas foram lavadas cinco vezes com uma solução de PBS + Tween a 0,05% e as amostras, depois de diluídas 1:4, foram distribuídas na placa. O padrão foi colocado a uma concentração de 1 µg/mL em duplicata e diluído (1:2) nos poços subsequentes para montagem da curva, logo após, as placas foram incubadas por 2h a 37°C. As placas foram lavadas com PBS/Tween 0,05% cinco vezes e adicionou-se anticorpos anti-IFN-γ policlonais feito em coelho gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luís Carlos Crocco (UFOP), incubou-se por 1h a 37°C. Depois de lavadas 5 vezes com PBS/Tween 0,05%, foram adicionados anticorpos anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase e logo após incubado por 1h a 37°C. Após novo ciclo de lavagem, adicionou-se a solução substrato de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benz-tiazolino sulfônico) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, EUA) 0,05% em tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH, 4,0) acrescido de H₂O₂ a 0,005%. Após acompanhar o aparecimento de cor, a reação foi parada com a utilização de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich Co.) a 1%. As placas foram lidas em um comprimento de onda de 405 nm com um leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Infecção *in vitro*

Os camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de 2 mL de caldo tioglicolato 3% (contendo 1% de Agar, Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil) estéril para a retirada dos macrófagos inflamatórios. Três dias depois, os animais foram sacrificados por decapitação e tiveram a cavidade peritoneal lavada com 10 mL de PBS gelado. O aspirado foi centrifugado a 350 x g por 10 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) completo, contendo 10% de soro bovino fetal (Nutricell), 2 mM de L-glutamina (Sigma), 0,1% de solução de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Co.) a 0,05 M, 100 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Gibco). Em seguida, retirou-se uma pequena alíquota das células e diluiu-se 100 vezes em meio RPMI 1640 incompleto. A contagem foi feita em câmara de Neubauer

usando-se o teste de exclusão por azul de trypan. A concentração das células foi acertada em 2×10^5 células/mL com meio RPMI 1640 completo. Em placas de 24 poços de fundo chato (TPP) foram colocadas lamínulas redondas com 13 mm de diâmetro estéreis e, em seguida, foi colocado 1 mL da suspensão de células por poço. A placa foi deixada em estufa umidificada a 37°C, com 5% de CO₂ entre 12-18h, para que as células aderissem às lamínulas. No dia seguinte, os poços foram lavados com RPMI 1640 a 37°C para remover as células que não aderiram. Completou-se o volume do poço com 1 mL de RPMI 1640 completo novo. Em seguida, cada poço recebeu formas promastigotas de *L. major* ou *L. amazonensis*, numa multiplicidade de infecção de 1 parasita/célula. As placas de cultura foram deixadas em estufa de CO₂ umidificada a 37°C por 72 horas. Após esse tempo, as lamínulas foram removidas dos poços, fixadas com metanol e coradas com o kit de coloração hematológica Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil). Em seguida, as lamínulas foram afixadas em lâminas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) e contadas em microscópio óptico. Foram contadas no mínimo 300 células por lamínula e estipulado o número de amastigotas.

Dosagem de nitrito

A quantidade de nitrito foi estimada a partir de soro de camundongos *phox^{-/-}* ou WT infectados com *L. amazonensis* ou sobrenadantes de macrófagos infectados *in vitro* através da realização do método de Griess (Green *et al.*, 1982). Para o ensaio com soro, foram distribuídas na placa de 96 poços (TPP) 25 µL de cada amostra em duplicata, o branco, que corresponde a 25 µL de PBS, o padrão nitrito, que corresponde a 50 mM de nitrito em duplicata, e o padrão nitrato, 25 µL de nitrato a 1 mM. Os padrões foram diluídos 1:2 em PBS nos poços subsequentes pelo menos 7 vezes para montar a curva. Logo após, 25 µL de uma solução coquetel que consiste em 500 µL de NADPH tetrasodium salt (Merk) a 5 mg/mL em água mili Q estéril, 500 µL de tampão KH₂PO₄ a 0,5 M e pH 7,5, 500 µL de água mili Q estéril e 1U de nitrato redutase (Sigma-Aldrich

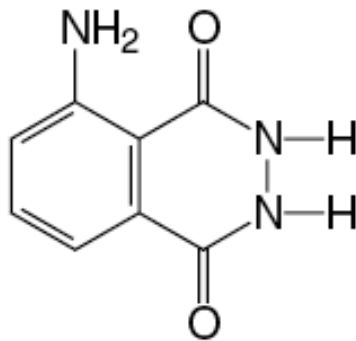
Co.) em água mili Q estéril, foi adicionada em todos os poços, exceto no padrão nitrito. A placa foi incubada a 37°C por 6h e logo após foi acrescentado em cada poço 50 µL de solução de Griess, consiste na mistura entre solução de sulfanilamina 1% (sigma-Aldrich Co.) e solução de naphthylethylenodiamida 0,1% (Sigma-Aldrich Co.) ambas diluídas em ácido fosfórico 2,5% (F Maia, Cutia, SP, Brasil). Após 10 minutos no escuro, as placas foram lidas em espectrofotômetro com um comprimento de 540 nm.

Para as dosagens em sobrenadante, as amostras foram colocadas em uma placa de 96 poços (TPP), 50 µL de amostra/poço. O padrão de nitrito (250 mM) foi adicionado em duplicata e diluído 1:2 nos poços posteriores em meio RPMI. O branco consiste apenas de RPMI completo. Logo após adicionou-se 100 µL de solução de Griess sobre as amostras, o padrão e o branco. A placa foi mantida no escuro por 10 minutos e lida a uma O.D. de 540 nm em espectrofotômetro.

Produção *in vitro* de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para estabelecer o efeito indutor de ROS em fagócitos de camundongos por contato com *Leishmanias* vivas (formas totais), utilizamos a técnica de quimioluminescência de cultura de macrófagos em tempo real. Os macrófagos inflamatórios dos camundongos foram retirados e contados da mesma forma que os usados na infecção *in vitro*. Em seguida, a concentração de células foi acertada para 1×10^6 células/100 µL. Nesse ensaio, foram usadas placas de 96 poços opacas (NUNC, Rochester, NY, EUA). Em cada poço foram colocadas 1×10^6 células. Os estímulos foram: promastigotas de *L. major* ou *L. amazonensis* numa multiplicidade de infecção (Moinova and Mulcahy) de 10 parasitas por célula e Zymosan A (Sigma-Aldrich Co.) numa proporção de 10 partículas por célula. Em cada poço foi adicionado o luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) (Sigma-Aldrich Co.) numa concentração de 0,05 mM, que reage com os ROS e produz luz. A placa foi colocada num luminômetro (Packard,

Waltham, MA, EUA), que mede a intensidade da luz produzida. A produção de ROS foi medida por duas horas, em intervalos de dois minutos entre cada medição. A detecção de radicais de oxigênio é feita pela reação do luminol com as espécies reativas de oxigênio produzindo luz. Em um primeiro passo, o luminol (figura abaixo) é reduzido por moléculas reativas, como OH^\bullet , H_2O_2 ou ONOO^- , que atacam sua ligação dinitrogênica adicionando mais dois oxigênios a um dos anéis, e depois é capaz de combinar com o O_2^\bullet e produzir luz (Faulkner and Fridovich, 1993). Essa forma de radiação é captada pelo luminômetro e representada como unidades relativas de luz (RLU, em inglês) por segundo.



Representação estrutural do luminol, composto usado como detector de superóxido.

Luminol

Resultados

Lesão induzida por *L. amazonensis* em camundongos $phox^{-/-}$ são maiores do que às obtidas em camundongos selvagens, porém inferiores às lesões de camundongos $iNOS^{-/-}$.

Para avaliar o quadro crônico causado por *L. amazonensis* em camundongos deficientes em *phox*, camundongos selvagens (WT), $phox^{-/-}$ e $iNOS^{-/-}$ foram infectados com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na pata e o desenvolvimento da lesão monitorado semanalmente. Os dados mostram a relevância dos radicais de oxigênio no controle das lesões desde as primeiras semanas após a inoculação, pois o grupo $phox^{-/-}$ manteve lesões com medidas superiores aos animais selvagens a partir da quarta semana em diante (0,74 mm e 0,41 mm na quarta semana), o que não ocorre com *L. major* (Santiago, 2006). Já nos camundongos $iNOS^{-/-}$, a lesão começa a apresentar diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo selvagem a partir da quinta semana de infecção, chegando a ultrapassar a medida de 3 mm na sétima semana de infecção (figura 1A). A carga parasitária dos camundongos $iNOS^{-/-}$ após sete semanas de infecção também aumenta consideravelmente na pata e linfonodo (figura 1B), enquanto camundongos $phox^{-/-}$ não apresentam diferenças nos sítios analisados comparado ao grupo selvagem.

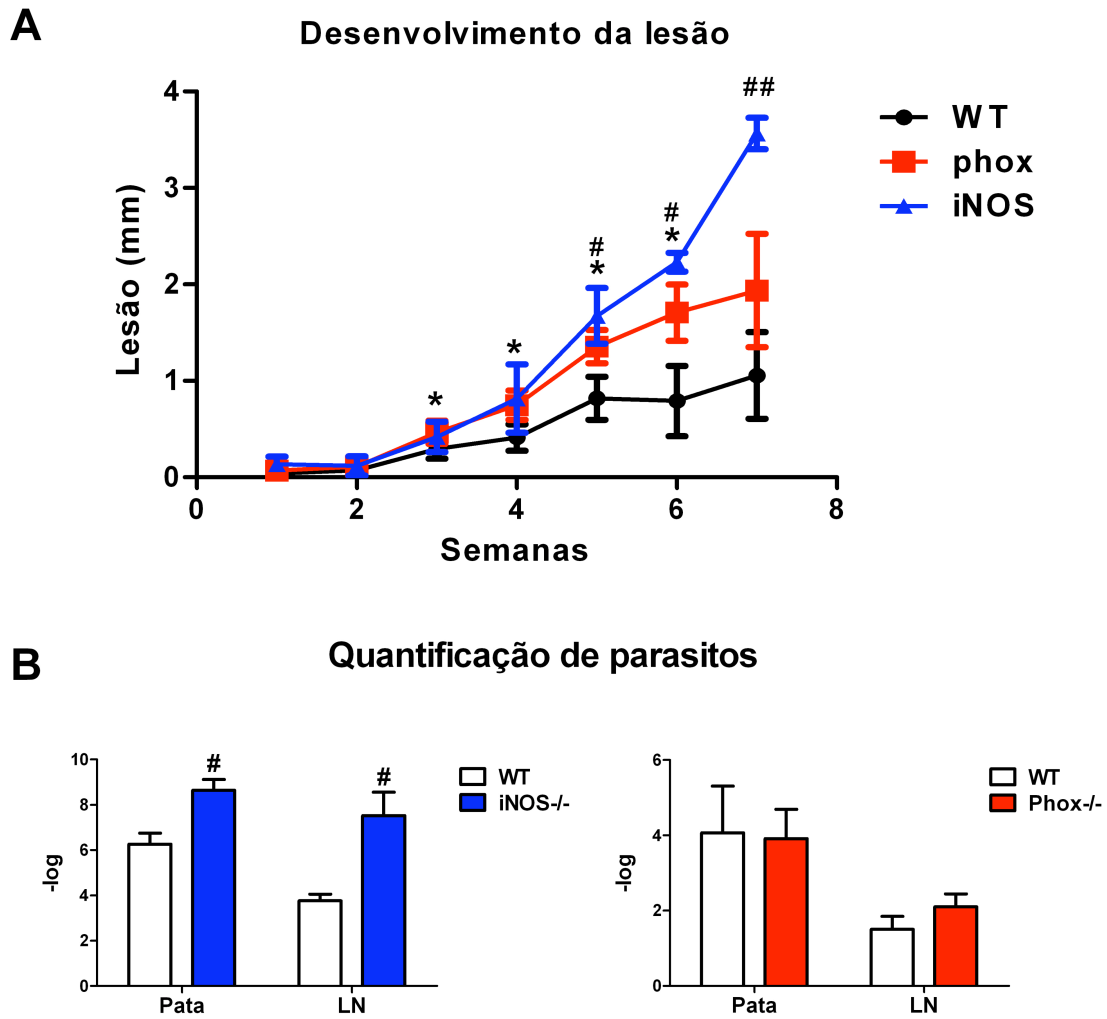


Figura 2: (A) Desenvolvimento da lesão na pata de camundongos WT, *phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-} causada por promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (10^6). O tamanho da lesão das patas infectadas foi monitorado ao longo do tempo, o eixo Y expressa a diferença entre a espessura das patas infectadas e as patas não infectadas. (B) Estimativa do número de parasitos após sete semanas de infecção por diluição sucessiva do macerado da pata e linfonodo desses camundongos. Análise estatística feita por teste *t* de Student onde *= $P < 0,05$ entre *phox* e WT, #= $P < 0,05$ entre *iNOS* e WT e ##= $P < 0,05$ comparado aos demais grupos. Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos separadamente com sete camundongos por grupo.

Porém, quando acompanhamos as infecções por um período maior, as lesões dos camundongos $phox^{-/-}$ diferem ainda mais das lesões que se formam em animais selvagens. Camundongos $phox^{-/-}$ desenvolvem lesões rapidamente com pico em torno da sétima semana de infecção (1,81 mm) com queda acentuada nas semanas subseqüentes até o nível de 0,85 mm após 10 semanas de infecção, enquanto em camundongos selvagens a lesão apresenta pico com nove semanas e uma queda menos acentuada (figura 2A). Apesar de toda essa variação no curso de infecção em animais deficientes em $phox$, a carga parasitária no sítio de infecção e linfonodo poplíteo após 4, 6, 8 e 10 semanas de infecção foi semelhante (figura 2B), o mesmo ocorreu no fígado e baço (dados não mostrados). Assumiremos como os pontos de análise os tempos de 6 e 10 semanas, pois apresentam diferenças maiores nas medidas das lesões entre os grupos e, ainda, temos a inversão do fenótipo observado, no qual, os camundongos $phox^{-/-}$ estão com maiores lesões 6 semanas após a infecção, mas após 10 semanas estão com medidas das lesões menores que o selvagem.

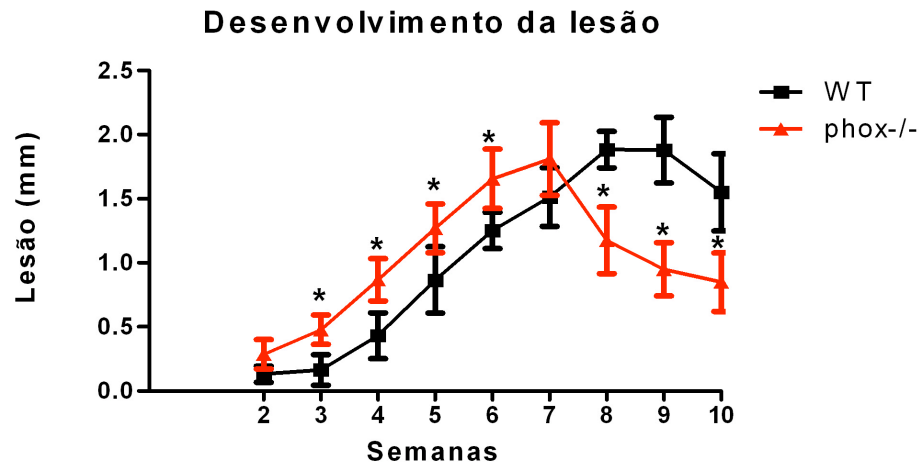
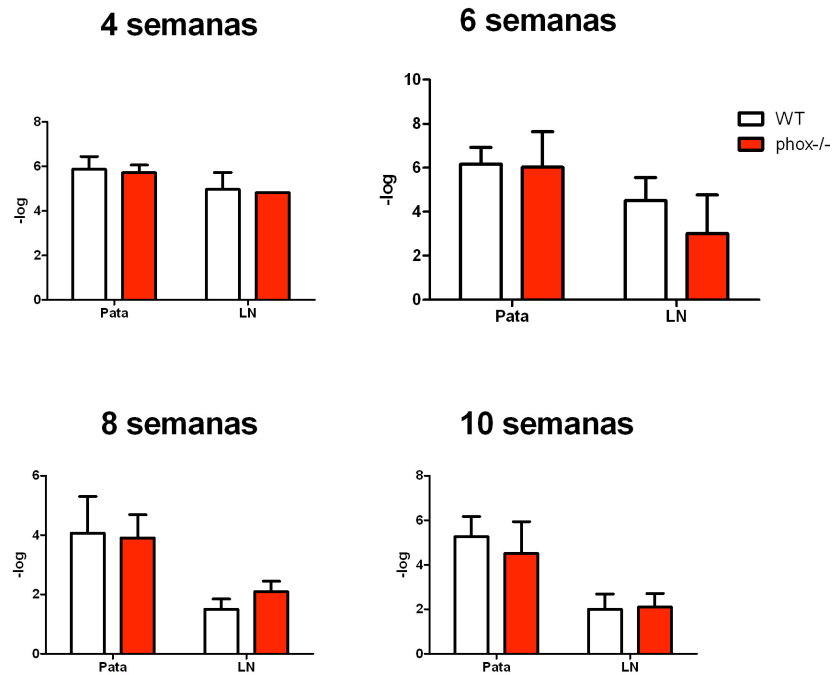
A**B**

Figura 3: A) Desenvolvimento da lesão de camundongos WT e $phox^{-/-}$ durante 10 semanas de infecção na pata por promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (10^6). O tamanho da lesão das patas infectadas foi monitorado ao longo do tempo, o eixo Y expressa a diferença entre a espessura das patas infectadas e as patas não infectadas. Os valores são as médias \pm desvio padrão do tamanho da lesão dos camundongos. B) Quantificação de parasitas por diluição sucessiva do macerado da pata e linfonodo drenante desses camundongos. Análise estatística feita por teste *t* de Student onde $*=P<0,05$ comparado aos demais grupos. Em (A) o resultado é representativo de três experimentos desenvolvidos separadamente com sete camundongos por grupo. Em (B) são dados representativos de dois experimentos ou mais com pelo menos cinco camundongos por grupo.

A análise histológica apresenta também um quadro semelhante de infecção em ambas as linhagens.

Uma vez que as características morfológicas do tecido são de fundamental importância para o diagnóstico mais preciso do quadro de infecção em que os camundongos se encontram, foram feitos cortes histológicos das patas e linfonodos poplíteos dos animais em experimentação. Esses cortes foram analisados em microscópio óptico e o que se pode observar é a semelhança do quadro patogênico característico da infecção com *L. amazonensis* com macrófagos intensamente vacuolizados dando a o aspecto de célula em “anel de sinete”, na qual o núcleo se encontra deslocado para a periferia. Outro aspecto característico de uma infecção por *L. amazonensis* é a inflamação crônica e difusa por todas as camadas da derme com presença de áreas de necrose de coloração acidófila quando coradas por Hematoxilina-Eosina (figura 4).

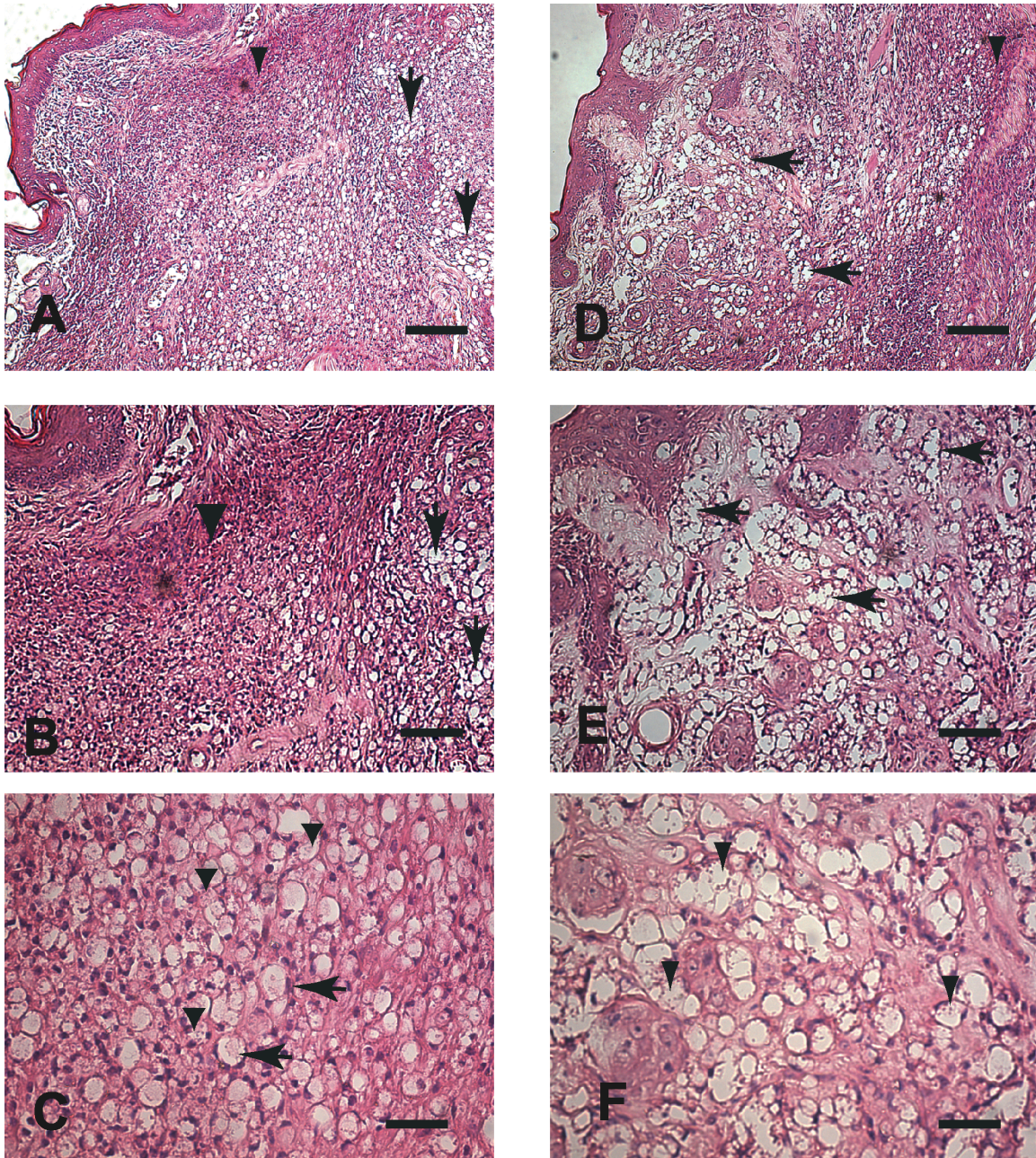


Figura 4: Fragmento de pele da pata de camundongos WT (A, B e C) e *phox*^{-/-} (D, E e F): (A) Fotomicrofotografia panorâmica evidenciando intenso infiltrado inflamatório crônico e difuso atingindo todas as camadas da derme. Presença de área de necrose de coloração acidófila (cabeça de seta) e células de aspecto vacuolizado (setas). (B e C) Detalhes da figura anterior evidenciando a área de necrose (cabeça de seta) e as células de aspecto vacuolizado caracterizado por citoplasma amplo e hipocorado (setas) e em (C), por vezes dando a célula o aspecto de célula em “anel de sinete” (núcleo rechaçado para a periferia) (setas). Presença de grande número de formas amastigotas no interior dessas células vacuolizadas (macrófagos) (cabeças de seta). (D) Fotomicrofotografia panorâmica evidenciando intenso infiltrado inflamatório crônico e difuso atingindo todas as camadas da derme. Presença de áreas de necrose de aspecto acidófilo (cabeça de seta) e inúmeras células de aspecto vacuolizado (setas). (E e F) Detalhes da figura anterior evidenciando células de aspecto vacuolizado (macrófagos) caracterizada por citoplasma amplo hipocorado (setas) e em (F), parasitadas por formas amastigotas de *Leishmania* (cabeça de seta). Hematoxilina-Eosina, Barras= 64 μ m (A e D), 32 μ m (B e E) e 16 μ m (C e F).

Produção de citocinas

Como demonstrado, camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* produzem pouco interferon- γ (Afonso and Scott, 1993; Jones *et al.*, 2000). Além disto, a IL-10 promove o controle da reação inflamatória e, conseqüentemente, do tamanho da lesão, mas também permite a persistência do parasito, durante a infecção por *L. major* (Belkaid *et al.*, 2001). Dessa forma, avaliamos a produção dessas citocinas tanto no sítio de infecção quanto nos linfonodos poplíteos dos camundongos a fim de detectar uma possível variação no perfil de citocinas na resposta contra *L. amazonensis* causada pela ausência da enzima NADPH oxidase. Foram feitas dosagens de IFN- γ , IL-10 e TNF- α a partir do sobrenadante de células presentes no linfonodo desses animais mantidas em cultura por 24h (TNF- α - não mostrado) ou 72h (IFN- γ e IL-10) e também dosagens de IFN- γ e IL-10 na pata desses animais por meio da extração de citocinas *in situ*. Os dados nos sugerem que não há diferença na produção de IFN- γ e IL-10 pelos linfócitos desses animais sob o estímulo de antígeno de *L. amazonensis* 6 e 10 semanas após a infecção. Os níveis de TNF- α também foram iguais seis semanas após a infecção (não mostrados).

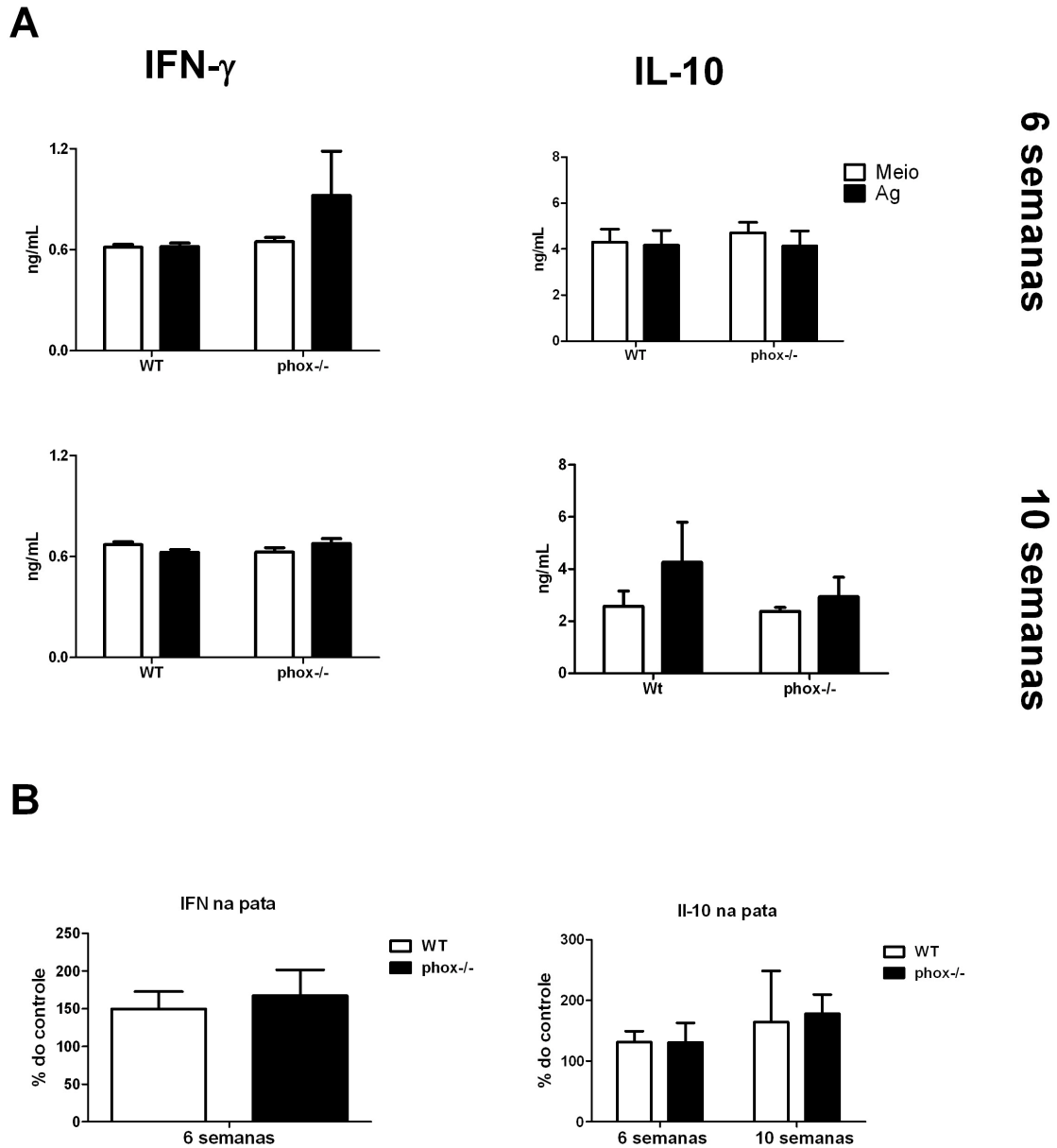


Figura 5: A) Detecção por ELISA de IFN- γ e IL-10 no sobrenadante de cultura de linfócitos presentes no linfonodo drenante de camundongos WT e phox^{-/-} infectados com *L. amazonensis*. A quantidade de citocinas foi estimada a partir do sobrenadante de 72h cultura de linfócitos expostos ou não à antígeno de *L. amazonensis* (Ag). Figura representativa de um de dois experimentos com cinco camundongos por grupo cada. Os valores são as médias \pm desvio padrão. B) Estimativa de produção de IFN e IL-10 por dosagem *in situ*. As patas foram maceradas e exposta a uma solução de extração de citocinas como descrito nos materiais e métodos. Os valores estão expressos em porcentagem dos valores obtidos pela pata não infectada (controle) e são correspondentes a um experimento com cinco animais por grupo. Teste estatístico feito por teste *t* de Student.

Papel do óxido nítrico *in vivo*

Como já relatado, o NO^{\bullet} liberado como mecanismo efetor em um ambiente de inflamação tem grandes chances de reagir com o superóxido, pois possui alta afinidade com essa molécula, e com isso, formar o peroxinitrito (Beckman *et al.*, 1990). Em um ambiente de inflamação como o induzido pela infecção com *L. amazonensis*, forma-se muito óxido nítrico em resposta ao parasito. Esse, por sua vez, após algumas formas intermediárias se converte em nitrato ou nitrito e pode ser detectado por ensaios colorimétricos (Green *et al.*, 1982). Assim, para saber se na ausência de superóxido proveniente de fagócitos e infecção com *L. amazonensis* a produção de nitrato e nitrito pode ser elevada, realizamos dosagens de nitrito no soro de camundongos selvagens e $\text{phox}^{-/-}$ infectados após quatro, seis, oito e dez semanas. Como se pode observar na tabela 1, não foram encontradas diferenças entre os grupos nos tempos de oito e dez semanas. Por outro lado, após quatro semanas de infecção, surpreendentemente, os camundongos $\text{phox}^{-/-}$ apresentaram concentrações reduzidas de nitrito no soro. Talvez, de alguma forma, a produção de superóxido e conseqüente produção de ROS induza a formação de RNS que levariam ao aumento das concentrações de nitrito em ambientes biológicos em alguns estágios da infecção. Ao mesmo tempo, muitos processos biológicos acarretam na formação de nitrato ou nitrito, por exemplo, proteínas provenientes da dieta.

Produção de nitrito

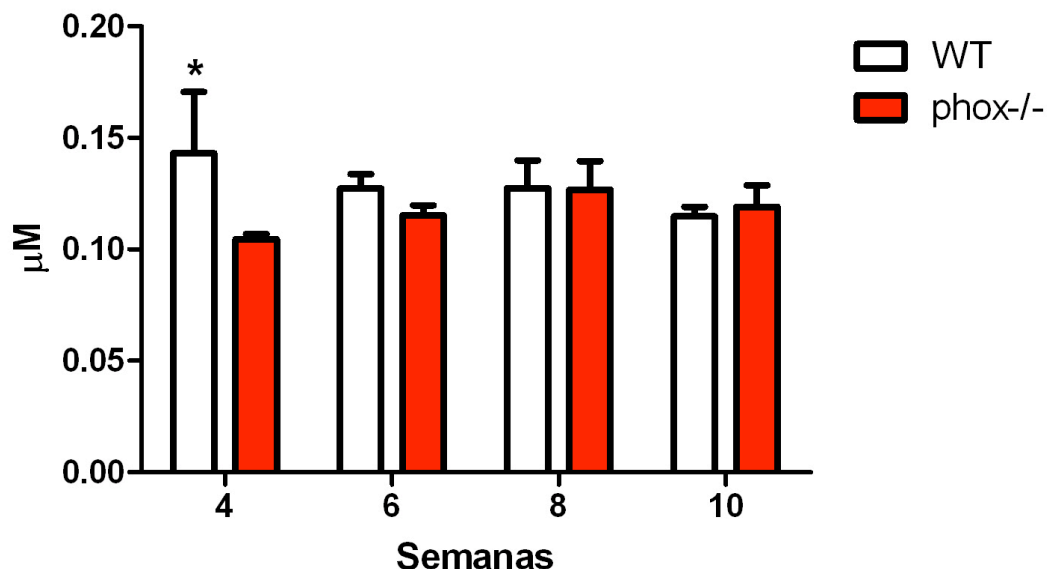
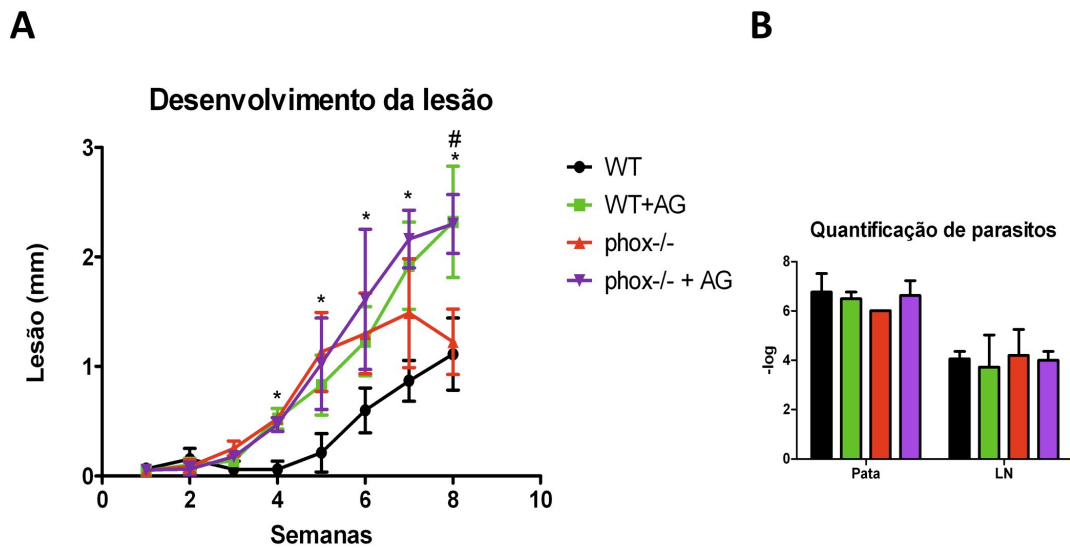


Figura 6: Quantidade de nitrito no soro de animais WT e phox^{-/-} sacrificados 4, 6, 8 e 10 semanas após a infecção por *L. amazonensis*. A detecção de nitrito é feita após a conversão de todo o nitrato presente no soro dos camundongos em nitrito por meio da nitrato redutase como descrito nos materiais e métodos. Resultado representativo de 3 experimentos com pelo menos 5 animais por grupo cada, exceto no tempo de quatro semanas que foi realizado apenas uma vez com cinco camundongos. * indica P < 0,05. Análise estatística feita por teste *t* de Student.

Para avaliar o efeito da inibição da via de produção de NO[•] em camundongos phox^{-/-}, utilizamos um composto análogo à arginina, aminoguanidina, capaz de inibir competitivamente a atividade de iNOS, mais presente em fagócitos regulada por citocinas inflamatórias, sem afetar a atividade de eNOS ou nNOS (Griffiths *et al.*, 1993; Misko *et al.*, 1993). Assim, temos o bloqueio da produção tanto de NO[•] pela iNOS (inibição competitiva), quanto de superóxido, pela NADPH oxidase (phox^{-/-}). O tratamento com o inibidor provocou um aumento de 50% na lesão de camundongos phox^{-/-} induzida por *L. amazonensis*, mas quando comparado com o curso de infecção de camundongos WT tratados com aminoguanidina, não se pode notar diferenças estatisticamente significativas, o mesmo ocorre com o título de

parasitos na pata e no linfonodo drenante representado na figura 7B. Portanto, o efeito visto sobre a deleção de NADPH oxidase fica imperceptível na presença do inibidor de iNOS não apresentando evidente fenótipo nos parâmetros avaliados.

Por meio da dosagem indireta de NO^{\bullet} no soro desses animais (figura 7C) constatamos que, mais uma vez os grupos WT e $\text{phox}^{-/-}$ não apresentaram diferenças nas quantidades de nitrito com oito semanas de infecção. O tratamento de camundongos WT com aminoguanidina não alterou a concentração de nitrito no soro, contudo, menores concentrações de nitrito foram detectadas no soro de camundongos $\text{phox}^{-/-}$, o que mostra mais um indício de que o superóxido exerce influência nas concentrações de NO^{\bullet} ou de moléculas intermediárias presentes em seu subsequente metabolismo em nitrato ou nitrito.



C

Dosagem de nitrito no soro		
Linhagem	NO ₂ ⁻ (μM)	Teste t (P)**
WT	0,132 ± 0,0098	-
phox ^{-/-}	0,133 ± 0,0065	-
WT + AG	0,116 ± 0,0075	0,09
phox ^{-/-} + AG	0,09 ± 0,02	0,02

Figura 7: A) Desenvolvimento da lesão de camundongos WT e phox^{-/-} tratados ou não com aminoguanidina (AG) 1% na água dos animais e infectados com promastigotas metacíclicas *L. amazonensis* (10⁶). O tamanho da lesão das patas infectadas foi monitorado ao longo do tempo, o eixo Y expressa a diferença entre a espessura das patas infectadas e as patas não infectadas. B) Quantificação de parasitas por diluição sucessiva do macerado da pata e linfonodo drenante desses camundongos após oito semanas de infecção. Os valores são as médias ± desvio padrão do tamanho da lesão dos camundongos. Resultado representativo de três experimentos com pelo menos cinco animais por grupo. C) Dosagem de NO₂⁻ no soro de camundongos WT e phox^{-/-} tratados ou não com aminoguanidina (AG) após oito semanas de infecção. Dados representativos de dois experimentos com 5 animais por grupo. *Indica P<0,05 entre o grupo WT sem tratamento e o tratado. #Indica P<0,05 entre o grupo phox^{-/-} sem tratamento e o tratado. **Indica o valor de P em relação ao grupo não tratado. Análise estatística feita por teste t de Student.

Mesmo com a produção de NO[•] não alterada, macrófagos de camundongos phox^{-/-} não são capazes de exterminar parasitos.

Nos experimentos de Green e colaboradores (1990a) com macrófagos peritoneais, descobriu-se que essas células infectadas com *L. major* e incubadas na presença apenas de IFN- γ possuem a atividade leishmanicida aumentada (Green *et al.*, 1990a). Baseado nesses dados publicados, avaliamos a atividade leishmanicida de macrófagos peritoneais provenientes de camundongos WT, phox^{-/-} e iNOS^{-/-} infectados por promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major*. Sendo assim, a ativação de macrófagos por IFN- γ foi suficiente para aumentar a taxa de eliminação de *L. amazonensis* em mais de 50% quando esses fagócitos de camundongos selvagens são expostos a formas metacíclicas do parasito (figura 8A). Já na infecção de macrófagos iNOS^{-/-}, a quantidade de amastigotas dentro dos macrófagos cresceu consideravelmente após as 72h de cultura em relação às células selvagens, além disso, a ativação com o IFN- γ não foi suficiente para controlar o crescimento dos parasitos (figura 8), possivelmente pela falta do NO[•]. Porém, nas células de camundongos phox^{-/-} não ocorre o aumento de amastigotas, mas a incubação com IFN- γ não provoca maior eficiência na eliminação do parasito mesmo em quantidades similares de NO[•] (figura 8B), em torno de 50 μ M de nitrito. É possível que a falta de superóxido anule a formação de peroxinitrito, que pode agir como molécula efetora chave para a redução da carga parasitária de macrófagos. Outro fator que se deve notar é o efeito leishmaniostático que o NO[•] possui, já que na presença desse não há crescimento de amastigotas. Nesse experimento, a infecção por *L. major* é usada como controle de ativação do macrófago na infecção *in vitro* demonstrada anteriormente (Green *et al.*, 1990a). Outro ponto importante é a maior infectividade da *L. amazonensis* em macrófagos de camundongos quando comparada com a *L. major*, chegando a 391 amastigotas/300 macrófagos de WT sem estímulo, em relação às 138 amastigotas de *L. major* nas células do mesmo animal (figura 8).

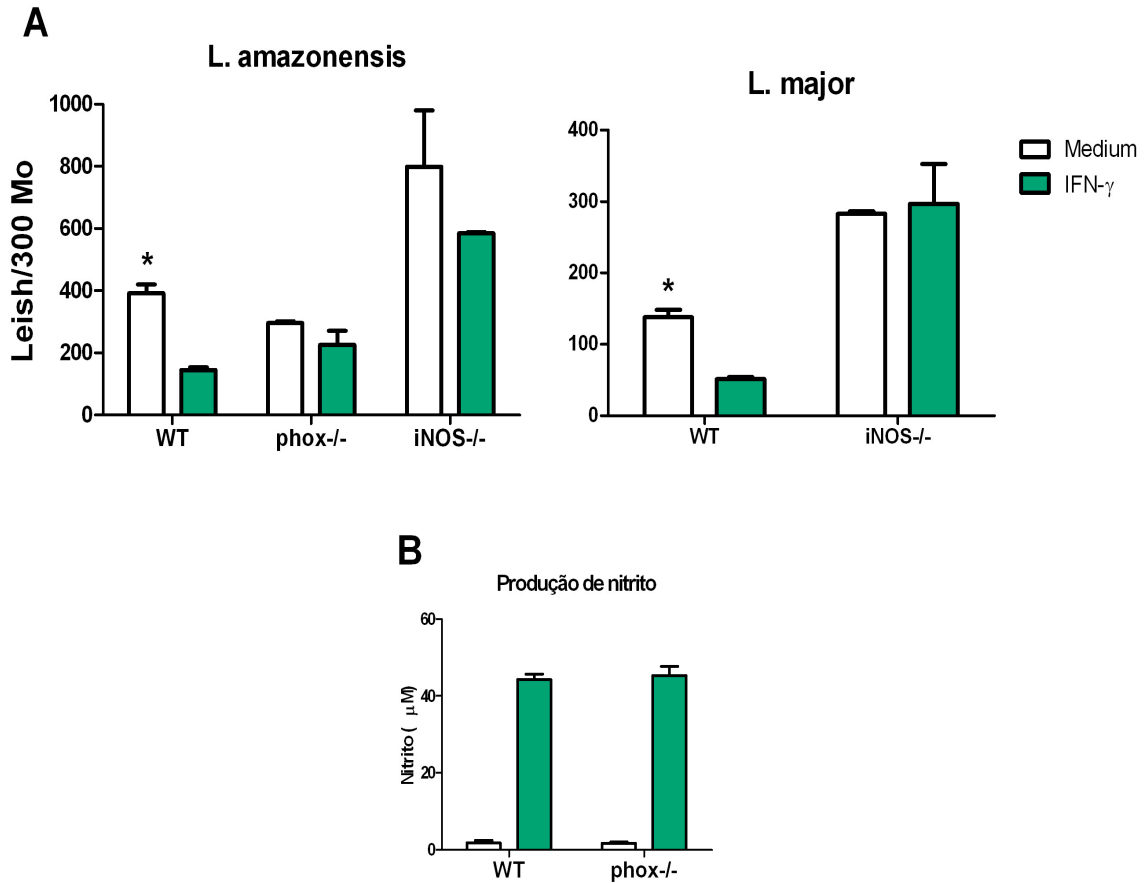


Figura 8: Infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos WT, phox^{-/-} e iNOS^{-/-} previamente tratados ou não com IFN- γ com promastigotas metacíclicas. A) Contagem de amastigotas de *L. amazonensis* (PH8) e *L. major* (FN) por microscopia óptica. Os resultados são expressos em número de amastigotas para cada 300 macrófagos (leish/300 Mo). B) Detecção de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. amazonensis* após 72h de incubação.* representa P<0,05 entre o grupo tratado e não tratado e ** representa P<0,05 entre a linhagem *knockout* e WT. Análise estatística feita por teste *t* de Student. Em A figura representativa de um de dois experimentos com resultados similares feitos com a mistura macrófagos de pelo menos três camundongos por grupo. Em B, figura representativa de um de 4 experimentos com a mistura de macrófagos de 3 camundongos por grupo.

***Leishmania amazonensis* parece induzir maiores quantidades de ROS em infecção *in vitro* de macrófagos**

Dessa forma, 1×10^6 macrófagos de camundongos WT, $\text{phox}^{-/-}$ ou $\text{iNOS}^{-/-}$ foram estimulados com 1×10^7 promastigotas de *L. major* ou *L. amazonensis*, Zymosan (fragmento particulado de *Sacharomyces cerevisiae* indutor de fagocitose e liberação de ROS) ou sem estímulo. O animal $\text{iNOS}^{-/-}$, como já esperado, alcança níveis superiores de produção de radicais de oxigênio com ou sem estímulos (figura 10A, B, C e D), pois não há presença de NO^{\bullet} no sistema para seqüestrar moléculas de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Macrófagos de animais selvagens apresentaram uma discreta produção em relação ao $\text{iNOS}^{-/-}$ principalmente no estímulo com o controle positivo Zymosan (figura 10B). Nota-se que essa produção na presença de *L. amazonensis* é maior que na presença de *L. major* (figura 10D e C, respectivamente). E evidentemente, macrófagos $\text{phox}^{-/-}$ não apresentam produção de ROS. A figura 10E representa os dados mostrados na figura 10A, B, C e D, porém expressos de acordo com área sobre a curva formada pela cinética de produção.

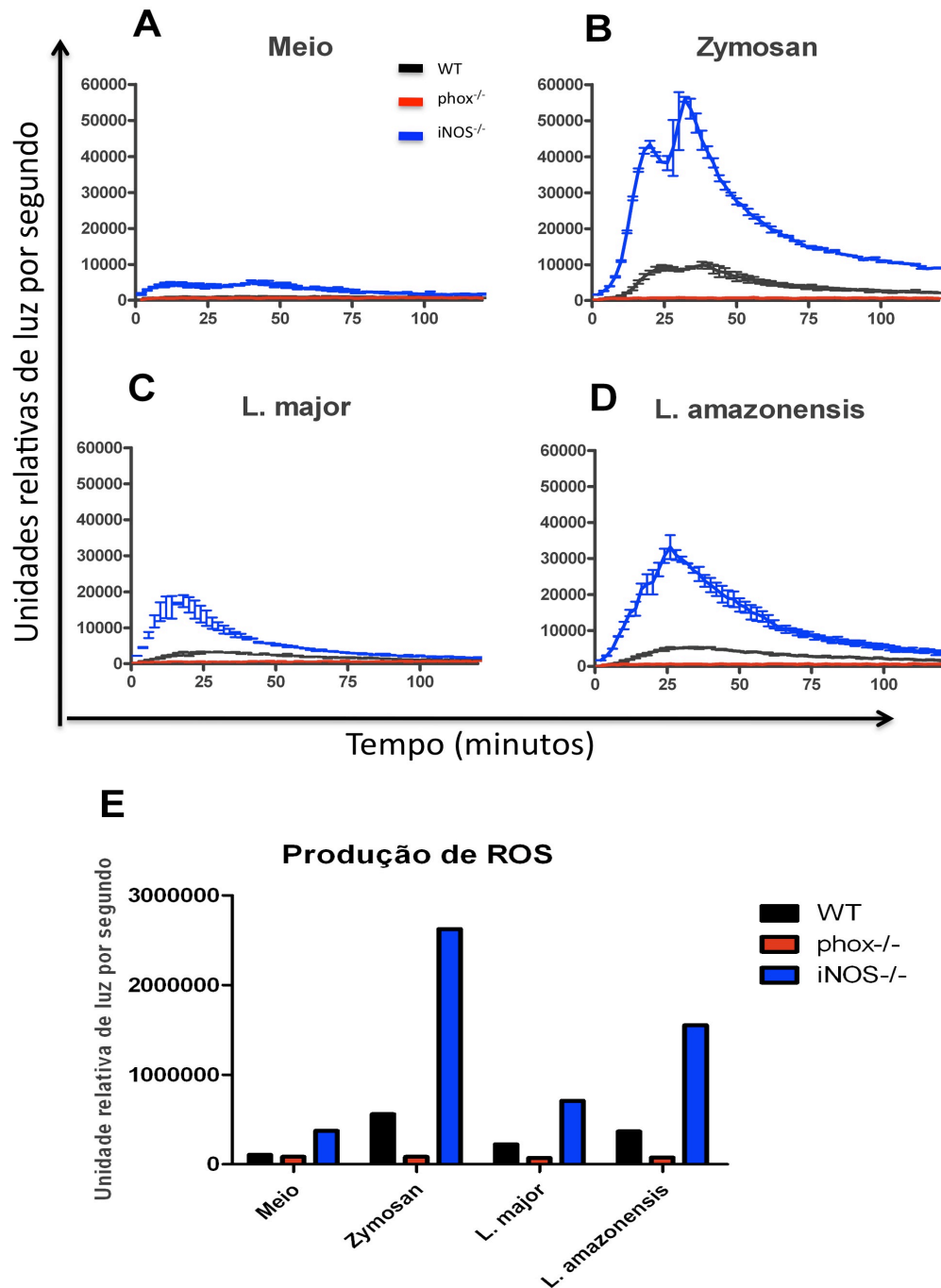


Figura 10: Produção de ROS por macrófagos peritoneais de camundongos WT, phox^{-/-} e iNOS^{-/-} (1×10^6 por poço) sem estímulo (A), ou estimulados com Zymosan (B), *L. major* (C) ou *L. amazonensis* (D) (1×10^7 , formas totais). Representação em gráficos de barras da produção de ROS considerando a área abaixo das curvas em A, B, C e D. A reação das ROS com o luminol é capaz de gerar fótons, sendo essa luz detectada pelo luminômetro e quantificada em unidades relativas de luz por segundo. Figura representativa de um conjunto de dois experimentos com resultados semelhantes no qual se utilizou uma mistura de células de pelo menos três animais por grupo.

Discussão

Estudos realizados por nosso grupo abordaram a importância dos mecanismos de resistência independentes de óxido nítrico e induzidos por IFN- γ em *L. major* e *T. cruzi* (Santiago *et al.*, 2005; Santiago, 2006). Nesses trabalhos, a principal evidência de uma estratégia efetora diferente de NO \cdot e induzida por IFN- γ na infecção por *L. major* foi descrita a partir da infecção de camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ e iNOS $^{-/-}$. Por intermédio desse experimento, pode-se perceber que os camundongos C57BL/6 desenvolvem uma lesão que se cura espontaneamente cerca de 9 semanas após a infecção. Por outro lado, os camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ produzem uma lesão que não se cura e acabam morrendo por conta da infecção. Já os animais iNOS $^{-/-}$ produzem uma lesão considerável, que não se cura, mas não morrem por consequência da infecção (Santiago, 2006). Como já havia alguns trabalhos associando a produção de ROS com a resposta efetora contra infecções parasitárias em uma série de modelos (Murray *et al.*, 1985; Golenser *et al.*, 1992; Murray and Nathan, 1999; Aline *et al.*, 2002) esse seria o próximo passo dos estudos com *L. major* dentro do nosso laboratório. Dessa forma, foi mostrado pelo nosso grupo que nas infecções com *L. major*, as ROS estariam envolvidas apenas no controle brando da visceralização de parasitos no fígado (Santiago, 2006) e que os camundongos phox $^{-/-}$ não apresentaram diferenças nos outros parâmetros analisados comparado com os animais selvagens.

Iniciamos então o estudo de mecanismos efetores dependentes de superóxido no desafio de camundongos com *Leishmania amazonensis* que, como já mencionado, apresenta muitas características diferentes de *L. major*. Por meio de infecções de camundongos *knockouts* para uma das duas enzimas phox ou iNOS foi possível avaliar a eficiência de cada mecanismo efetor em estabilizar a lesão de camundongos C57BL/6, já que não se trata de um modelo resistente à infecção. Como já mostrado em outros trabalhos, o NO \cdot é o principal mecanismo efetor para eliminação de parasitos do gênero *Leishmania* (Green *et*

al., 1990a; Liew *et al.*, 1990a; Wei *et al.*, 1995; Stenger *et al.*, 1996; Murray and Nathan, 1999). De acordo com a figura 2A e B, podemos notar a exacerbação da lesão e do número de parasitos na pata e linfonodo drenante causada pela deficiência na produção de NO^{*} por fagócitos. Por outro lado, não ocorreram diferenças na carga parasitária presente na pata e linfonodo dos camundongos *phox*^{-/-}. Porém foi possível perceber a relevância da produção de superóxido na infecção através do perfil da lesão induzida na pata desses animais (figura 3A). A produção de superóxido apresenta um papel maior na modulação do infiltrado inflamatório do que o papel citotóxico, pois nos diversos desafios realizados para o desenvolvimento desse trabalho, não observamos diferenças em relação ao número de parasitos no sítio da infecção e linfonodo (figura 3B), apesar das medidas das lesões de camundongos *phox*^{-/-} sempre crescerem precocemente em relação ao selvagem. Isso sugere que na ausência de ROS induzida por fagócitos a sinalização para a inflamação é aumentada.

Outro ponto que evidencia a regulação diferenciada da inflamação causada pela infecção por *L. amazonensis* seria a queda acentuada no tamanho da lesão observada a partir da sétima até a décima semana de infecção (figura 3A). Para investigar se há correlação com um aumento da sinalização antiinflamatória avaliamos a produção de IL-10 com seis e dez semanas de infecção (figura 5A e B), porém, não houve indício algum do mecanismo de regulação ser devido a diferenças na liberação dessa citocina. O mesmo ocorre com a liberação de IFN- γ e TNF- α , citocinas associadas com a ativação de mecanismos efetores de fagócitos. É necessário investigar mais detalhadamente os fatores modulatórios como as quimiocinas e citocinas sujeitas a regulação por sinais particulares a esse modelo, como por exemplo a IL-1 β que pode sofrer influência pela quantidade de ROS liberada (Bonizzi *et al.*, 2000). Assim teríamos um indício mais claro dos fatores responsáveis pela inflamação peculiar vista em camundongos *phox*^{-/-} sujeitos a infecção por *L. amazonensis*.

Uma possível explicação para o diferente desenvolvimento da lesão em camundongos *phox*^{-/-} seria a modulação que as ROS exercem sobre o NF- κ B, um fator de transcrição ligado à expressão de proteínas com funções diversas

(Gloire *et al.*, 2006). Como já discutido, o H_2O_2 , por ser capaz de atravessar membranas, é um provável protagonista do efeito citotóxico e de sinalização que a produção de superóxido *in vivo* acarreta, pois por ação da SOD ocorre a dismutação do superóxido em H_2O_2 , que está presente em grandes quantidades na inflamação (Blake *et al.*, 1987; Gloire *et al.*, 2006; Halliwell and M. C. Gutteridge, 2006). Por isso a grande maioria dos estudos se concentra na ativação de NF- κ B por H_2O_2 (Legrand-Poels *et al.*, 1990; Schreck *et al.*, 1991; Li and Karin, 1999), embora existam evidências de outras ROS atuarem sobre esse fator de transcrição, alguns com mais clareza, como o oxigênio singlete (1O_2) (Hampton *et al.*, 1998), outros com dados ainda controversos como o ácido hipocloroso (HOCl) (Schoonbroodt *et al.*, 1997; Barua *et al.*, 2001) e o peroxinitrito (ONOO $^-$) (Biswas and Lopes de Faria, 2005; Park *et al.*, 2005). Portanto, o efeito de H_2O_2 como regulador de NF- κ B é o mais bem aceito até o presente momento, mas é dependente do tipo celular. Por exemplo, em estudo de super-expressão de catalase em células de rim de macaco (COS-1) o H_2O_2 não induziu NF- κ B em via dependente de TNF- α (Schreck *et al.*, 1991), já em células JB6 da epiderme de camundongos a super-expressão de catalase inibiu a ativação de NF- κ B por H_2O_2 , mas na presença de inibidor de catalase ocorreu o restabelecimento da ativação de NF- κ B (Schmidt *et al.*, 1995).

O NF- κ B foi o primeiro fator de transcrição sensível às ROS descrito (Schreck *et al.*, 1991), hoje alguns avanços ocorreram no conhecimento das sinalizações moduladas por ROS e sabemos que, as células T são frequentemente expostas às ROS durante uma resposta inflamatória. Estima-se que essa exposição seja na ordem de 10-100 μ M de H_2O_2 em ambiente de inflamação. Dependendo das concentrações em que as ROS são produzidas, um sistema redox-sensível diferente pode ser ativado e desencadear respostas biológicas distintas. Produzidas em baixas concentrações, as ROS induzem a ação de Nrf-2, um fator de transcrição sensível às variações oxidativas da célula associado à regulação de genes que codificam proteínas antioxidantes como enzimas da síntese de glutatona (Wild *et al.*, 1998; Moinova and Mulcahy, 1999), tioredoxina-1 (Kim *et al.*, 2003), heme oxigenase-1 (Inamdar *et al.*, 1996),

glutationa peroxidase, glutationa dissulfato redutase (Kwak *et al.*, 2003), dentre outras. Uma quantidade intermediária de ROS estimula a resposta inflamatória através da ativação de NF- κ B e AP-1 (Schreck *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1995), e altas concentrações de ROS induzem a formação de poros na membrana de mitocôndrias e desacopla a transferência de elétrons resultando assim em apoptose ou necrose (Halliwell and M. C. Gutteridge, 2006). Assim, se considerarmos camundongos *phox^{-/-}*, por não apresentarem altas concentrações de ROS, como um sistema biológico sob concentrações médias ou baixas de ROS, podemos criar duas hipóteses: 1) a ativação de NF- κ B levaria à produção de citocinas e quimiocinas que modulam a inflamação (Baeuerle and Henkel, 1994); 2) o aumento de agentes antioxidantes como glutationa redutase (GSH) induzido por Nrf-2 e a conseqüente baixa na ativação de NF- κ B devido à diminuição de ROS e com isso a baixa transcrição de citocinas induzidas por esse fator. Finalmente, apenas com a realização de novos experimentos avaliando a ativação desse componente em células do sistema imune sob efeito da estimulação por *L. amazonensis* esclareceria o possível papel do NF- κ B na modulação da inflamação nas condições estudadas neste trabalho.

No intuito de simularmos uma resposta imunológica sem a produção de superóxido e com quantidades reduzidas de óxido nítrico, utilizamos uma substância análoga à arginina, a aminoguanidina, que é um inibidor competitivo da iNOS, no tratamento de camundongos *phox^{-/-}* infectados com *L. amazonensis* (figura 7A, B e C). De modo inesperado, não obtivemos diferenças em números de parasitos no sítio de infecção e linfonodo drenante de camundongos *phox^{-/-}* tratados e selvagens tratados. Esses dados sugerem que ROS não assumem um papel citotóxico frente ao desafio por *L. amazonensis* no modelo *in vivo*. Porém, os resultados se mostram divergentes aos obtidos com o camundongo *iNOS^{-/-}*, que apresentou exacerbação tanto da lesão quanto do parasitismo (figura 2A e B). De fato, sabemos que a inibição provocada pela aminoguanidina pode ocorrer de forma parcial e talvez para esse modelo, embora a concentração utilizada seja suficiente para elevar as medidas das lesões de

camundongos selvagens tratados (1% na água), deveríamos utilizar uma dosagem maior de inibidor para verificar o aumento no número de parasitos.

Diferente dos resultados vistos na infecção *in vivo*, nossos dados *in vitro* sugerem uma importância citotóxica da formação do superóxido pela NADPH oxidase de fagócitos em infecções por *L. amazonensis*. Essa ideia fica clara ao analisarmos as infecções *in vitro* realizadas com macrófagos peritoneais de camundongos selvagens e *phox^{-/-}*. Embora sejam capazes de produzir quantidades semelhantes de NO^{*}, os macrófagos *phox^{-/-}*, quando ativados, não aumentam o extermínio de amastigotas de *L. amazonensis*, como ocorre com macrófagos selvagens (figura 8A e B). Esse resultado indica uma ação citotóxica mediada por ROS e, apesar da ausência de experimentos caracterizando qual espécie estaria envolvida, podemos supor a participação do peróxido de hidrogênio e a participação do peroxinitrito como molécula citotóxica.

A suscetibilidade de parasitos do gênero *Leishmania* ao peróxido de hidrogênio já foi demonstrada primeiramente por Murray e colaboradores (1981). Algumas evidências surgiram posteriormente com o trabalho de Da Silva e colaboradores (1989), que demonstrava que formas amastigotas de *L. donovani* e formas metacíclicas de *L. major* apresentam sobrevida aumentada na infecção de macrófagos e induzem baixa produção de radicais de oxigênio comparado com infecções por parasitos na fase logarítmica (Da Silva *et al.*, 1989). Essa habilidade de amastigotas foi atribuída aos altos índices de glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase apresentados por essas formas (Murray, 1982; Pearson *et al.*, 1983a) em relação às promastigotas. Porém, outros estudos reportaram que, na ausência de radicais de oxigênio, ainda sim havia a morte de *Leishmania spp.* por meio da ativação de outro mecanismo efetor (Murray and Cartelli, 1983; Scott *et al.*, 1985). Esse mecanismo é o óxido nítrico, que posteriormente foi caracterizado e descrito como o principal agente leishmanicida de macrófagos (Green *et al.*, 1990a; Liew *et al.*, 1990a). Dessa forma a maioria das espécies de *Leishmania* se mostrou suscetível principalmente ao NO^{*} sendo as ROS pouco relevantes para algumas espécies de *Leishmania*, como *L. major* (Scott *et al.*, 1985; Blos *et al.*, 2003; Santiago,

2006). Muito pouco se sabe sobre o papel dessas espécies de moléculas na infecção por *L. amazonensis*.

Quando se analisa a infecção em macrófagos de camundongos iNOS^{-/-}, temos um aumento considerável da carga parasitária desses macrófagos, comprovando a importância crucial dessa molécula para impedir o crescimento do parasito (figura 8A). Outros autores demonstraram que na presença do inibidor de ERK, uma MAP quinase utilizada pela *Leishmania* para favorecer a infecção (Feng *et al.*, 1999; Mathur *et al.*, 2004), macrófagos ativados apresentavam uma taxa de infecção menor e, por meio do uso de inibidor para NO[•] ou de SOD permeável, ficou claro que essa redução do parasitismo causada pelo inibidor de ERK era dependente tanto de óxido nítrico quanto de superóxido (Mukbel *et al.*, 2007), o que sugere uma manipulação das concentrações de ERK ativo pelo parasito favorecendo sua sobrevivência. Por outro lado, de acordo com os dados extraídos dos experimentos de quimioluminescência apresentados nesse trabalho, devemos notar a produção exacerbada de ROS por macrófagos oriundos de camundongos iNOS^{-/-} (figura 10) e que, apesar de intensa produção no contato com promastigotas de *L. amazonensis* em relação aos macrófagos selvagens, a permissividade ao parasito nas infecções *in vitro* (figura 8A) e *in vivo* (figura 2B) é grande, sugerindo que ROS apresente baixo efeito citotóxico sobre o parasito na ausência de NO[•]. Essa produção de altos níveis de ROS se dá por um mecanismo de compensação à falta de NO[•] como molécula efetora em infecções (Santiago, 2006), ou seja, em uma tentativa de resolver a infecção, produz-se mais ROS para combater patógenos. Outro ponto responsável pelo aumento da detecção de ROS no ensaio de quimioluminescência é a falta do NO[•] (iNOS^{-/-}) como um acceptor de superóxido em ambiente de inflamação, assim bastante superóxido é formado, mas a taxa de degradação espontânea ou por dismutase enzimática não acompanha a taxa de produção dessa molécula. Finalmente, essa alta permissividade pode ser associada à falta do peroxinitrito (ONOO⁻), molécula que apresenta efeito citotóxico à *L. amazonensis*, contrapondo o efeito mais citostático do NO[•] sobre esse tripanosomatídeo

(Linares *et al.*, 2001), o que justifica a persistência do parasito mesmo em altas concentrações de ROS. Juntos, os dados *in vitro* levantados em nosso trabalho sugerem a participação do peroxinitrito como um possível agente citotóxico de grande relevância na eliminação de amastigotas de *L. amazonensis*.

Alguns trabalhos contribuíram para a demonstração do efeito citotóxico do peroxinitrito em modelos *in vitro* com *Trypanosoma cruzi* (Denicola *et al.*, 1993), *Listeria monocytogenes* (Müller *et al.*, 1999), *Salmonella typhimurium* (Vazquez-Torres *et al.*, 2000) e *in vivo* em patógenos como *Leishmania amazonensis* (Giorgio *et al.*, 1998) e *Mycoplasma* (Hickman-Davis *et al.*, 1999). Porém, apesar de muitos estudos discorrerem sobre o papel efetor do peroxinitrito em patologias diferentes, grande parte deles são baseados na análise de proteínas com resíduos de 3-nitrotirosina, supondo que a formação desse grupo em ambiente fisiológico seja dependente apenas da reação com o peroxinitrito (Halliwell, 1997; Ischiropoulos, 1998). Pouco tempo depois descobriu-se que outras moléculas podem mediar a formação de resíduos de 3-nitrotirosina, como o ácido hipocloroso, formado pela mieloperoxidase de neutrófilos, e algumas outras peroxidases (Eiserich *et al.*, 1998). Linares e colaboradores (2001), publicaram um trabalho com controles um pouco mais rígidos para permitir o uso da técnica de detecção de 3-nitrotirosina em patas de camundongos infectados com *L. amazonensis* (Linares *et al.*, 2001). O grupo quantificou resíduos de 3-hidroxitirosina, que indica a presença de peroxinitrito em ambiente ácido como o vacúolo parasitóforo (Hensley *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2000), 3-nitrotirosina e a atividade de peroxidase nas amostras utilizadas para se ter uma ideia da nitração proveniente de outras fontes que não o peroxinitrito. Assim, obtiveram dados consistentes demonstrando que camundongos C57BL/6, que são capazes de estabilizar tanto a lesão quanto o parasitismo, apresentam maiores quantidades de 3-hidroxitirosina e menor atividade de peroxidase em relação ao camundongos BALB/c, que não estabilizam a lesão nem o parasitismo (Linares *et al.*, 2001). Portanto, uma análise mais cuidadosa dos dados obtidos é necessária para relacionar o peroxinitrito como um mecanismo efetor

responsável pela maior citotoxicidade sobre parasitos da espécie *Leishmania amazonensis*.

Para sobreviver e proliferar dentro do hospedeiro, patógenos muitas vezes desenvolvem a habilidade de evitar a liberação de ROS pela célula hospedeira, ou criam um ambiente “reduzidor” no qual se encontram protegidos dos efeitos tóxicos dessas moléculas. Um exemplo disso é o que ocorre com *L. pifanoi*, que é capaz de inibir o amadurecimento da subunidade gp91^{phox} de macrófagos RAW 264.7 murinos, evitando a formação do complexo NADPH oxidase (Pham *et al.*, 2005). O mesmo trabalho mostrou que a forma amastigota de *L. pifanoi* induz uma menor liberação de ROS em relação à forma promastigota, consistentes com o trabalho de Da Silva e colaboradores (1989). Além disto, o trabalho de Pham e colaboradores (2005) revela que a estratégia utilizada por amastigotas para evitar a montagem do complexo enzimático foi a indução da enzima heme oxigenase-1, enzima limitante para a maturação de p65 em gp91^{phox}. Outra evidência do comportamento elusivo desse protozoário aos efeitos dos radicais de oxigênio foi mostrado em ensaios com *L. donovani*, cujo LPG é capaz de bloquear a translocação de p47^{phox} e p67^{phox} para o fagossomo, impedindo a montagem de NADPH oxidase na membrana dessa organela e levando a uma deficiência de produção de superóxido (Lodge *et al.*, 2006). De maneira antônima, fagócitos, por meio do receptor de complemento (CR3) (Mosser and Edelson, 1985) ou receptor que se liga a porção Fc de IgG (Fc γ R) (Chang, 1981) fagocitam a *Leishmania*, que no caso de FcR deve se encontrar opsonizada, e induzem uma cascata de transdução de sinais que leva à produção das ROS no lúmen do vacúolo parasitóforo na tentativa de conter a infecção por esses parasitos. Um trabalho recente mostra que fosfoglicanos presentes na membrana de promastigotas de *Leishmania major* são capazes de induzir a produção de ROS por meio da sinalização dependente de TLR2 (Kavoosi *et al.*, 2009). Dessa forma, a indução de ROS pode ocorrer por meio de diferentes vias, e a seleção dessas vias depende do estímulo recebido. Levando em consideração os exemplos listados acima aliados à comprovada suscetibilidade de parasitos do gênero *Leishmania* às ROS (Murray, 1981) pode-

se concluir que é de extrema importância para o parasito escapar dos efeitos citotóxicos causados por ROS. Assim, parasitos da espécie *L. amazonensis* provavelmente apresentam estratégias sofisticadas para resistir aos efeitos de tais moléculas, porém, esses mecanismos ainda não foram desvendados. De acordo com os dados obtidos pelas infecções *in vitro*, talvez a *L. amazonensis* possua uma suscetibilidade aumentada aos efeitos de ROS em relação à *L. major*, já que o crescimento da segunda não sofre influência quando as ROS estão ausentes (Scott *et al.*, 1985; Santiago, 2006). Devemos considerar que todos os estudos mencionados acima que relacionam o bloqueio da produção de ROS pelo parasito do gênero *Leishmania* foram realizados em modelos de infecção de macrófagos *in vitro*, o que não deixa de ser significativo, mas demanda uma certa cautela para analisar os dados sem extrapolar nas conclusões. O desenvolvimento de trabalhos restritos apenas à manipulação *in vitro* se tornou uma ferramenta fundamental para a ciência e com vantagens incomensuráveis. De fato, evidências adicionais em modelos *in vivo* são necessárias para esclarecermos se os mecanismos de inibição já descritos realmente ocorrem.

Para o desenvolvimento desse trabalho foram utilizados métodos *in vitro* e *in vivo*, porém em abordagens diferentes. Enquanto nossos experimentos *in vivo* sugerem a não participação de ROS na morte do parasito, ou seja, o parasito é capaz de contornar a produção dessas espécies e replicar, os dados *in vitro* relatam a participação de ROS na citotoxicidade sobre o parasito. Nós acreditamos que o peroxinitrito tenha participação deletéria sobre o parasito em macrófagos nas infecções por *L. amazonensis*, porém isso não ficou claro nesse trabalho, cujos dados *in vivo* não retrataram evidências em favor dessa hipótese. Considerando a existência de poucas técnicas capazes de avaliar tanto a produção quanto a ação direta do peroxinitrito sobre o parasito *in vivo* e também a dificuldade de se trabalhar com um composto tão reativo, sabemos que a distância que se deve percorrer para solucionar essa hipótese e estabelecer a mesma como um novo conhecimento na imunologia da infecção por *Leishmania amazonensis* é muito grande. Portanto, como primeiro passo, os nossos dados

in vitro são relevantes para considerar a busca por essa resposta. Devemos lembrar que nas condições *in vivo*, caso haja produção de peroxinitrito, esse reagiria formando dois radicais (NO_2^\cdot e CO_3^\cdot) (Alvarez and Radi, 2003) que muito provavelmente não são formados nas mesmas concentrações por macrófagos em meio de cultura, o que sugere um efeito diferente na liberação de peroxinitrito se essa ocorrer em cultura.

Conclusão

Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar o efeito das ROS sobre infecções experimentais de camundongos com *L. amazonensis*, e com isso, a produção de dados consistentes que indicam alterações no curso de infecção de camundongos deficientes na produção de ROS sem mudança no parasitismo tecidual. O que permite associar a produção de espécies reativas de oxigênio com um efeito modulador da inflamação induzida por *L. amazonensis*. Por outro lado, infecções de macrófagos peritoneais demonstraram que a presença de ROS no sistema favorece a eliminação de parasitos confirmando a citotoxicidade dessas moléculas aos parasitos em cultura. Os dados apresentados nesse trabalho também confirmam o efeito citotóxico que a presença do óxido nítrico é capaz de induzir em parasitos do gênero *Leishmania* tanto em infecções de camundongos quanto em macrófagos peritoneais, sendo a citotoxicidade dessa molécula maior sobre *L. amazonensis* comparado com as ROS. E finalmente, as duas vias de produção de moléculas efetoras são necessárias para potencializar o efeito citotóxico sobre *L. amazonensis* que pode estar ligado a produção de peroxinitrito no sistema.

Referências

- Afonso, L.C., Scott, P., 1993. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. In, *Infection and Immunity*, Vol. 61, pp. 2952-2959.
- Alexander, J., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 1998. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. In, *J Immunol*, Vol. 161, pp. 6794-6801.
- Alexander, J., Satoskar, A.R., Russell, D.G., 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. In, *J Cell Sci*, Vol. 112 Pt 18, pp. 2993-3002.
- Aline, F., Bout, D., Dimier-Poisson, I., 2002. Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. In, *Infection and Immunity*, Vol. 70, pp. 2368-2374.
- Almeida, R.P., Barral-Netto, M., De Jesus, A.M., De Freitas, L.A., Carvalho, E.M., Barral, A., 1996. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. In, *Am J Trop Med Hyg*, Vol. 54, pp. 178-184.
- Alvarez, B., Radi, R., 2003. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. In, *Amino Acids*, Vol. 25, pp. 295-311.
- Aranha, F.C.S., Ribeiro, U., Basse, P., Corbett, C.E.P., Laurenti, M.D., 2005. Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigote and macrophage infection. In, *Scand J Immunol*, Vol. 62, pp. 334-341.
- Babior, B.M., 2004. NADPH oxidase. In, *Curr Opin Immunol*, Vol. 16, pp. 42-47.
- Bach, E.A., Aguet, M., Schreiber, R.D., 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. In, *Annu Rev Immunol*, Vol. 15, pp. 563-591.
- Baeuerle, P.A., Henkel, T., 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. In, *Annu Rev Immunol*, Vol. 12, pp. 141-179.
- Balestieri, F.M.P., Queiroz, A.R.P., Scavone, C., Costa, V.M.A., Barral-Netto, M., Abrahamsohn, I.d.A., 2002. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. In, *Microbes and Infection*, Vol. 4, pp. 23-29.
- Barral-Netto, M., Barral, A., Brownell, C.E., Skeiky, Y.A., Ellingsworth, L.R., Twardzik, D.R., Reed, S.G., 1992. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. In, *Science*, Vol. 257, pp. 545-548.

- Barral-Netto, M., Von Sohsten, R.L., Teixeira, M., dos Santos, W.L., Pompeu, M.L., Moreira, R.A., Oliveira, J.T., Cavada, B.S., Falcoff, E., Barral, A., 1996. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. In, *Acta Trop*, Vol. 60, pp. 237-250.
- Barua, M., Liu, Y., Quinn, M.R., 2001. Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF-kappaB activation and IkappaB kinase activity. In, *J Immunol*, Vol. 167, pp. 2275-2281.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. In, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 87, pp. 1620-1624.
- Belkaid, Y., Hoffmann, K.F., Mendez, S., Kamhawi, S., Udey, M.C., Wynn, T.A., Sacks, D.L., 2001. 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. In, *J Exp Med*, Vol. 194, pp. 1497-1506.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., Sacks, D.L., 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. In, *Nature*, Vol. 420, pp. 502-507.
- Biswas, S.K., Lopes de Faria, J.B., 2005. Does peroxynitrite sustain nuclear factor-kappaB? In, *Cardiovasc Res*, Vol. 67, pp. 745-746; author reply 747-748.
- Blackwell, J.M., 1996. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. In, *Parasitology*, Vol. 112 Suppl, pp. S67-74.
- Blake, D.R., Allen, R.E., Lunec, J., 1987. Free radicals in biological systems-a review orientated to inflammatory processes. In, *Br Med Bull*, Vol. 43, pp. 371-385.
- Blos, M., Schleicher, U., Soares Rocha, F.J., Meissner, U., Röllinghoff, M., Bogdan, C., 2003. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. In, *Eur. J. Immunol.*, Vol. 33, pp. 1224-1234.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. In, *International Journal for Parasitology*, Vol. 28, pp. 121-134.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., Diefenbach, A., 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. In, *Immunol Rev*, Vol. 173, pp. 17-26.
- Bogdan, C., 2001. Nitric oxide and the immune response. In, *Nat Immunol*, Vol. 2, pp. 907-916.
- Bonizzi, G., Piette, J., Merville, M.P., Bours, V., 2000. Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor-kappaB activation by interleukin-1. In, *Biochem Pharmacol*, Vol. 59, pp. 7-11.

- Brüne, B., von Knethen, A., Sandau, K.B., 1998. Nitric oxide and its role in apoptosis. In, *Eur J Pharmacol*, Vol. 351, pp. 261-272.
- Brunet, L.R., 2001. Nitric oxide in parasitic infections. In, *Int Immunopharmacol*, Vol. 1, pp. 1457-1467.
- Burchmore, R.J., Barrett, M.P., 2001. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*. In, *International Journal for Parasitology*, Vol. 31, pp. 1311-1320.
- Carrera, L., Gazzinelli, R.T., Badolato, R., Hieny, S., Muller, W., Kuhn, R., Sacks, D.L., 1996. *Leishmania promastigotes* selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. In, *J Exp Med*, Vol. 183, pp. 515-526.
- Chakravorty, D., Hensel, M., 2003. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. In, *Microbes and Infection*, Vol. 5, pp. 621-627.
- Chang, K.P., 1981. *Leishmania donovani*-macrophage binding mediated by surface glycoproteins/antigens: characterization in vitro by a radioisotopic assay. In, *Mol Biochem Parasitol*, Vol. 4, pp. 67-76.
- Chatelain, R., Varkila, K., Coffman, R.L., 1992. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. In, *J Immunol*, Vol. 148, pp. 1182-1187.
- Chen, D.Q., Kolli, B.K., Yadava, N., Lu, H.G., Gilman-Sachs, A., Peterson, D.A., Chang, K.P., 2000. Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. In, *Infection and Immunity*, Vol. 68, pp. 80-86.
- Croan, D.G., Morrison, D.A., Ellis, J.T., 1997. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. In, *Mol Biochem Parasitol*, Vol. 89, pp. 149-159.
- Da Silva, R.P., Hall, B.F., Joiner, K.A., Sacks, D.L., 1989. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. In, *J Immunol*, Vol. 143, pp. 617-622.
- de Araújo Soares, R.M., dos Santos, A.L.S., Bonaldo, M.C., de Andrade, A.F.B., Alviano, C.S., Angluster, J., Goldenberg, S., 2003. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. In, *Exp Parasitol*, Vol. 104, pp. 104-112.
- Denicola, A., Rubbo, H., Rodríguez, D., Radi, R., 1993. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. In, *Arch Biochem Biophys*, Vol. 304, pp. 279-286.
- Denise, H., McNeil, K., Brooks, D.R., Alexander, J., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 2003. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. In, *Infection and Immunity*, Vol. 71, pp. 3190-3195.
- Diefenbach, A., Schindler, H., Donhauser, N., Lorenz, E., Laskay, T., MacMicking, J., Röllinghoff, M., Gresser, I., Bogdan, C., 1998. Type 1

- interferon (IFN α / β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. In, *Immunity*, Vol. 8, pp. 77-87.
- Dinauer, M.C., Deck, M.B., Unanue, E.R., 1997. Mice lacking reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity show increased susceptibility to early infection with *Listeria monocytogenes*. In, *J Immunol*, Vol. 158, pp. 5581-5583.
- Ding, A.H., Nathan, C.F., Stuehr, D.J., 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. In, *J Immunol*, Vol. 141, pp. 2407-2412.
- Doussiere, J., Brandolin, G., Derrien, V., Vignais, P.V., 1993. Critical assessment of the presence of an NADPH binding site on neutrophil cytochrome b558 by photoaffinity and immunochemical labeling. In, *Biochemistry*, Vol. 32, pp. 8880-8887.
- Eiserich, J.P., Hristova, M., Cross, C.E., Jones, A.D., Freeman, B.A., Halliwell, B., van der Vliet, A., 1998. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. In, *Nature*, Vol. 391, pp. 393-397.
- Evans, P., Halliwell, B., 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. In, *Br J Nutr*, Vol. 85 Suppl 2, pp. S67-74.
- Evans, T.G., Thai, L., Granger, D.L., Hibbs, J.B., 1993. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. In, *J Immunol*, Vol. 151, pp. 907-915.
- Faulkner, K., Fridovich, I., 1993. Luminol and lucigenin as detectors for O₂·. In, *Free Radic Biol Med*, Vol. 15, pp. 447-451.
- Feng, G.J., Goodridge, H.S., Harnett, M.M., Wei, X.Q., Nikolaev, A.V., Higson, A.P., Liew, F.Y., 1999. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania phosphoglycans* subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. In, *J Immunol*, Vol. 163, pp. 6403-6412.
- Fong, D., Chang, K.P., 1982. Surface antigenic change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: Identification by monoclonal antibodies. In, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 79, pp. 7366-7370.
- Fujii, H., Finnegan, M.G., Miki, T., Crouse, B.R., Kakinuma, K., Johnson, M.K., 1995. Spectroscopic identification of the heme axial ligation of cytochrome b558 in the NADPH oxidase of porcine neutrophils. In, *FEBS Lett*, Vol. 377, pp. 345-348.
- Fujii, H., Finnegan, M.G., Johnson, M.K., 1999. The active form of the ferric heme in neutrophil cytochrome b(558) is low-spin in the reconstituted cell-free system in the presence of amphiphil. In, *J Biochem*, Vol. 126, pp. 708-714.

- Giorgio, S., Linares, E., Ischiropoulos, H., Von Zuben, F.J., Yamada, A., Augusto, O., 1998. In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. In, *Infection and Immunity*, Vol. 66, pp. 807-814.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J., 2006. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. In, *Biochem Pharmacol*, Vol. 72, pp. 1493-1505.
- Golenser, J., Kamyli, M., Tsafack, A., Marva, E., Cohen, A., Kitrossky, N., Chevion, M., 1992. Correlation between destruction of malarial parasites by polymorphonuclear leucocytes and oxidative stress. In, *Free Radic Res Commun*, Vol. 17, pp. 249-262.
- Gomes, I.N., Calabrich, A.F.d.C., Tavares, R.d.S., Wietzerbin, J., de Freitas, L.A.R., Veras, P.S.T., 2003. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. In, *Microbes and Infection*, Vol. 5, pp. 251-260.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. In, *Anal Biochem*, Vol. 126, pp. 131-138.
- Green, S.J., Crawford, R.M., Hockmeyer, J.T., Meltzer, M.S., Nacy, C.A., 1990a. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. In, *J Immunol*, Vol. 145, pp. 4290-4297.
- Green, S.J., Meltzer, M.S., Hibbs, J.B., Nacy, C.A., 1990b. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. In, *J Immunol*, Vol. 144, pp. 278-283.
- Green, S.J., Scheller, L.F., Marletta, M.A., Seguin, M.C., Klotz, F.W., Slayter, M., Nelson, B.J., Nacy, C.A., 1994. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. In, *Immunol Lett*, Vol. 43, pp. 87-94.
- Griffiths, M.J., Messent, M., MacAllister, R.J., Evans, T.W., 1993. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. In, *British Journal of Pharmacology*, Vol. 110, pp. 963-968.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 1992. Comments on review of *Free Radicals in Biology and Medicine*, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. In, *Free Radic Biol Med*, Vol. 12, pp. 93-95.
- Gyurko, R., Boustany, G., Huang, P.L., Kantarci, A., Van Dyke, T.E., Genco, C.A., Gibson, F.C., 2003. Mice lacking inducible nitric oxide synthase demonstrate impaired killing of *Porphyromonas gingivalis*. In, *Infection and Immunity*, Vol. 71, pp. 4917-4924.
- Halliwell, B., 1997. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? In, *FEBS Lett*, Vol. 411, pp. 157-160.

- Halliwell, B., 2006. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? In, *Trends Biochem Sci*, Vol. 31, pp. 509-515.
- Halliwell, B., M. C. Gutteridge, J., 2006. Free radicals in biology and medicine. 4th Ed. In, Oxford University Press, pp. 543.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. In, *Blood*, Vol. 92, pp. 3007-3017.
- Han, C.H., Lee, M.H., 2000. Expression and characterization of the flavoprotein domain of gp91phox. In, *J Vet Sci*, Vol. 1, pp. 19-26.
- Harris, N., Buller, R.M., Karupiah, G., 1995. Gamma interferon-induced, nitric oxide-mediated inhibition of vaccinia virus replication. In, *J Virol*, Vol. 69, pp. 910-915.
- Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffman, R.L., Locksley, R.M., 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. In, *J Exp Med*, Vol. 169, pp. 59-72.
- Heinzel, F.P., Schoenhaut, D.S., Rerko, R.M., Rosser, L.E., Gately, M.K., 1993. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. In, *J Exp Med*, Vol. 177, pp. 1505-1509.
- Heinzel, F.P., Maier, R.A., 1999. Interleukin-4-independent acceleration of cutaneous leishmaniasis in susceptible BALB/c mice following treatment with anti-CTLA4 antibody. In, *Infection and Immunity*, Vol. 67, pp. 6454-6460.
- Hensley, K., Maidt, M.L., Pye, Q.N., Stewart, C.A., Wack, M., Tabatabaie, T., Floyd, R.A., 1997. Quantitation of protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by high-performance liquid chromatography with electrochemical array detection. In, *Anal Biochem*, Vol. 251, pp. 187-195.
- Hickman-Davis, J., Gibbs-Erwin, J., Lindsey, J.R., Matalon, S., 1999. Surfactant protein A mediates mycoplasma-cidal activity of alveolar macrophages by production of peroxynitrite. In, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 96, pp. 4953-4958.
- Hierholzer, C., Harbrecht, B., Menezes, J.M., Kane, J., MacMicking, J., Nathan, C.F., Peitzman, A.B., Billiar, T.R., Tweardy, D.J., 1998. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. In, *J Exp Med*, Vol. 187, pp. 917-928.
- Hmadcha, A., Bedoya, F.J., Sobrino, F., Pintado, E., 1999. Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1beta via nitric oxide production. In, *J Exp Med*, Vol. 190, pp. 1595-1604.
- Ilg, T., 2000. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. In, *The EMBO Journal*, Vol. 19, pp. 1953-1962.
- Inamdar, N.M., Ahn, Y.I., Alam, J., 1996. The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site

- that resembles the recognition sequences for MAF and NF-E2 transcription factors. In, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 221, pp. 570-576.
- Iniesta, V., Gómez-Nieto, L.C., Corraliza, I., 2001. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. In, *J Exp Med*, Vol. 193, pp. 777-784.
- Iniesta, V., Gómez-Nieto, L.C., Molano, I., Mohedano, A., Carcelén, J., Mirón, C., Alonso, C., Corraliza, I., 2002. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. In, *Parasite Immunol*, Vol. 24, pp. 113-118.
- Ischiropoulos, H., 1998. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. In, *Arch Biochem Biophys*, Vol. 356, pp. 1-11.
- Jones, D.E., Buxbaum, L.U., Scott, P., 2000. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. In, *J Immunol*, Vol. 165, pp. 364-372.
- Jones, D.E., Ackermann, M.R., Wille, U., Hunter, C.A., Scott, P., 2002. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. In, *Infection and Immunity*, Vol. 70, pp. 2151-2158.
- Joshi, P.B., Sacks, D.L., Modi, G., McMaster, W.R., 1998. Targeted gene deletion of *Leishmania* major genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63). In, *Mol Microbiol*, Vol. 27, pp. 519-530.
- Joshi, P.B., Kelly, B.L., Kamhawi, S., Sacks, D.L., McMaster, W.R., 2002. Targeted gene deletion in *Leishmania* major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. In, *Mol Biochem Parasitol*, Vol. 120, pp. 33-40.
- Julia, V., Rassoulzadegan, M., Glaichenhaus, N., 1996. Resistance to *Leishmania* major induced by tolerance to a single antigen. In, *Science*, Vol. 274, pp. 421-423.
- Kane, M.M., Mosser, D.M., 2001. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. In, *J Immunol*, Vol. 166, pp. 1141-1147.
- Karupiah, G., Xie, Q.W., Buller, R.M., Nathan, C., Duarte, C., MacMicking, J.D., 1993. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. In, *Science*, Vol. 261, pp. 1445-1448.
- Kavoosi, G., Ardestani, S.K., Kariminia, A., 2009. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania* major phosphoglycans (PGs). In, *Parasitology*, Vol. 136, pp. 1193-1199.
- Kaye, P.M., Curry, A.J., Blackwell, J.M., 1991. Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. In, *J Immunol*, Vol. 146, pp. 2763-2770.

- Kelker, H.C., Le, J., Rubin, B.Y., Yip, Y.K., Nagler, C., Vilcek, J., 1984. Three molecular weight forms of natural human interferon-gamma revealed by immunoprecipitation with monoclonal antibody. In, *J Biol Chem*, Vol. 259, pp. 4301-4304.
- Kim, Y.-C., Yamaguchi, Y., Kondo, N., Masutani, H., Yodoi, J., 2003. Thioredoxin-dependent redox regulation of the antioxidant responsive element (ARE) in electrophile response. In, *Oncogene*, Vol. 22, pp. 1860-1865.
- Kima, P.E., Constant, S.L., Hannum, L., Colmenares, M., Lee, K.S., Haberman, A.M., Shlomchik, M.J., McMahon-Pratt, D., 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. In, *J Exp Med*, Vol. 191, pp. 1063-1068.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., Trinchieri, G., 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. In, *J Exp Med*, Vol. 170, pp. 827-845.
- Kopf, M., Brombacher, F., Köhler, G., Kienzle, G., Widmann, K.H., Lefrang, K., Humborg, C., Ledermann, B., Solbach, W., 1996. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. In, *J Exp Med*, Vol. 184, pp. 1127-1136.
- Kropf, P., Etes, R., Schopf, L., Chung, C., Sypek, J., Müller, I., 1997. Characterization of T cell-mediated responses in nonhealing and healing *Leishmania major* infections in the absence of endogenous IL-4. In, *J Immunol*, Vol. 159, pp. 3434-3443.
- Kwak, M.-K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., Kensler, T.W., 2003. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. In, *J Biol Chem*, Vol. 278, pp. 8135-8145.
- Lander, H.M., Hajjar, D.P., Hempstead, B.L., Mirza, U.A., Chait, B.T., Campbell, S., Quilliam, L.A., 1997. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. In, *J Biol Chem*, Vol. 272, pp. 4323-4326.
- Laroux, F.S., Romero, X., Wetzler, L., Engel, P., Terhorst, C., 2005. Cutting edge: MyD88 controls phagocyte NADPH oxidase function and killing of gram-negative bacteria. In, *J Immunol*, Vol. 175, pp. 5596-5600.
- Leal, L.M., Moss, D.W., Kuhn, R., Müller, W., Liew, F.Y., 1993. Interleukin-4 transgenic mice of resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection. In, *Eur. J. Immunol.*, Vol. 23, pp. 566-569.
- Legrand-Poels, S., Vaira, D., Pincemail, J., van de Vorst, A., Piette, J., 1990. Activation of human immunodeficiency virus type 1 by oxidative stress. In, *AIDS Res Hum Retroviruses*, Vol. 6, pp. 1389-1397.

- Leto, T.L., Adams, A.G., de Mendez, I., 1994. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. In, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 91, pp. 10650-10654.
- Li, N., Karin, M., 1999. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? In, *FASEB J*, Vol. 13, pp. 1137-1143.
- Liew, F.Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R.M., Moncada, S., 1990a. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. In, *J Immunol*, Vol. 144, pp. 4794-4797.
- Liew, F.Y., Parkinson, C., Millott, S., Severn, A., Carrier, M., 1990b. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. In, *Immunology*, Vol. 69, pp. 570-573.
- Linares, E., Giorgio, S., Mortara, R.A., Santos, C.X., Yamada, A.T., Augusto, O., 2001. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. In, *Free Radic Biol Med*, Vol. 30, pp. 1234-1242.
- Lodge, R., Diallo, T.O., Descoteaux, A., 2006. Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. In, *Cell Microbiol*, Vol. 8, pp. 1922-1931.
- Lowry, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. In, *J Biol Chem*, Vol. 193, pp. 265-275.
- Mannick, J.B., Hausladen, A., Liu, L., Hess, D.T., Zeng, M., Miao, Q.X., Kane, L.S., Gow, A.J., Stamler, J.S., 1999. Fas-induced caspase denitrosylation. In, *Science*, Vol. 284, pp. 651-654.
- Marnett, L.J., Wright, T.L., Crews, B.C., Tannenbaum, S.R., Morrow, J.D., 2000. Regulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide is revealed by targeted deletion of inducible nitric-oxide synthase. In, *J Biol Chem*, Vol. 275, pp. 13427-13430.
- Mathur, R.K., Awasthi, A., Wadhone, P., Ramanamurthy, B., Saha, B., 2004. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. In, *Nat Med*, Vol. 10, pp. 540-544.
- Matthews, D.J., Emson, C.L., McKenzie, G.J., Jolin, H.E., Blackwell, J.M., McKenzie, A.N., 2000. IL-13 is a susceptibility factor for Leishmania major infection. In, *J Immunol*, Vol. 164, pp. 1458-1462.
- Misko, T.P., Moore, W.M., Kasten, T.P., Nickols, G.A., Corbett, J.A., Tilton, R.G., McDaniel, M.L., Williamson, J.R., Currie, M.G., 1993. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. In, *Eur J Pharmacol*, Vol. 233, pp. 119-125.
- Mizrahi, A., Berdichevsky, Y., Ugolev, Y., Molshanski-Mor, S., Nakash, Y., Dahan, I., Alloul, N., Gorzalczy, Y., Sarfstein, R., Hirshberg, M., Pick, E., 2006. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships. In, *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 79, pp. 881-895.

- Mohrs, M., Holscher, C., Brombacher, F., 2000. Interleukin-4 receptor alpha-deficient BALB/c mice show an unimpaired T helper 2 polarization in response to *Leishmania major* infection. In, *Infection and Immunity*, Vol. 68, pp. 1773-1780.
- Moinova, H.R., Mulcahy, R.T., 1999. Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element. In, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 261, pp. 661-668.
- Mosser, D.M., Edelson, P.J., 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania promastigotes*. In, *J Immunol*, Vol. 135, pp. 2785-2789.
- Mukbel, R.M., Patten, C., Gibson, K., Ghosh, M., Petersen, C., Jones, D.E., 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. In, *Am J Trop Med Hyg*, Vol. 76, pp. 669-675.
- Müller, M., Althaus, R., Fröhlich, D., Frei, K., Eugster, H.P., 1999. Reduced antilisterial activity of TNF-deficient bone marrow-derived macrophages is due to impaired superoxide production. In, *Eur. J. Immunol.*, Vol. 29, pp. 3089-3097.
- Murray, H.W., 1981. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. In, *J Exp Med*, Vol. 153, pp. 1302-1315.
- Murray, H.W., 1982. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. In, *J Immunol*, Vol. 129, pp. 351-357.
- Murray, H.W., Masur, H., Keithly, J.S., 1982. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity. In, *J Immunol*, Vol. 129, pp. 344-350.
- Murray, H.W., Cartelli, D.M., 1983. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. In, *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 72, pp. 32-44.
- Murray, H.W., Rubin, B.Y., Carriero, S.M., Harris, A.M., Jaffee, E.A., 1985. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. In, *J Immunol*, Vol. 134, pp. 1982-1988.
- Murray, H.W., Nathan, C.F., 1999. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. In, *J Exp Med*, Vol. 189, pp. 741-746.
- Murray, H.W., Xiang, Z., Ma, X., 2006. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. In, *Am J Trop Med Hyg*, Vol. 74, pp. 1013-1015.

- Nathan, C., 1997. Perspectives Series: Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases. In, J. Clin. Invest, pp. 1-7.
- Nathan, C.F., Hibbs, J.B., 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. In, Curr Opin Immunol, Vol. 3, pp. 65-70.
- Noben-Trauth, N., Kropf, P., Müller, I., 1996. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. In, Science, Vol. 271, pp. 987-990.
- Noben-Trauth, N., Paul, W.E., Sacks, D.L., 1999. IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. In, J Immunol, Vol. 162, pp. 6132-6140.
- Noben-Trauth, N., Lira, R., Nagase, H., Paul, W.E., Sacks, D.L., 2003. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. In, J Immunol, Vol. 170, pp. 5152-5158.
- Oliveira, M.A.P., Tadokoro, C.E., Lima, G.M.C.A., Mosca, T., Vieira, L.Q., Leenen, P.J.M., Abrahamsohn, I.A., 2005. Macrophages at intermediate stage of maturation produce high levels of IL-12 p40 upon stimulation with *Leishmania*. In, Microbes and Infection, Vol. 7, pp. 213-223.
- Oswald, I.P., Gazzinelli, R.T., Sher, A., James, S.L., 1992. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. In, J Immunol, Vol. 148, pp. 3578-3582.
- Park, S.W., Huq, M.D.M., Hu, X., Wei, L.-N., 2005. Tyrosine nitration on p65: a novel mechanism to rapidly inactivate nuclear factor-kappaB. In, Mol Cell Proteomics, Vol. 4, pp. 300-309.
- Pearson, R.D., Harcus, J.L., Roberts, D., Donowitz, G.R., 1983a. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. In, J Immunol, Vol. 131, pp. 1994-1999.
- Pearson, R.D., Wheeler, D.A., Harrison, L.H., Kay, H.D., 1983b. The immunobiology of leishmaniasis. In, Rev Infect Dis, Vol. 5, pp. 907-927.
- Pham, N.-K., Mouriz, J., Kima, P.E., 2005. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. In, Infection and Immunity, Vol. 73, pp. 8322-8333.
- Pinheiro, R.O., Rossi-Bergmann, B., 2007. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. In, Mem Inst Oswaldo Cruz, Vol. 102, pp. 79-82.
- Reiner, S.L., Zheng, S., Wang, Z.E., Stowring, L., Locksley, R.M., 1994. *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. In, J Exp Med, Vol. 179, pp. 447-456.

- Repine, J.E., Fox, R.B., Berger, E.M., 1981. Hydrogen peroxide kills *Staphylococcus aureus* by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical. In, *J Biol Chem*, Vol. 256, pp. 7094-7096.
- Rogers, K.A., DeKrey, G.K., Mbow, M.L., Gillespie, R.D., Brodskyn, C.I., Titus, R.G., 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. In, *FEMS Microbiol Lett*, Vol. 209, pp. 1-7.
- Santiago, H., 2006. Mecanismos de resistência à infecção por *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi* mediados por IFN-gamma e independentes de óxido nítrico: do reconhecimento à imunidade efetora. UFMG, Belo Horizonte - MG - Brasil.
- Santiago, H.C., Feng, C.G., Bafica, A., Roffe, E., Arantes, R.M., Cheever, A., Taylor, G., Vieira, L.Q., Vierira, L.Q., Aliberti, J., Gazzinelli, R.T., Sher, A., 2005. Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth. In, *J Immunol*, Vol. 175, pp. 8165-8172.
- Santos, C.X., Bonini, M.G., Augusto, O., 2000. Role of the carbonate radical anion in tyrosine nitration and hydroxylation by peroxynitrite. In, *Arch Biochem Biophys*, Vol. 377, pp. 146-152.
- Schmidt, K.N., Traenckner, E.B., Meier, B., Baeuerle, P.A., 1995. Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappa B. In, *J Biol Chem*, Vol. 270, pp. 27136-27142.
- Schoonbroodt, S., Legrand-Poels, S., Best-Belpomme, M., Piette, J., 1997. Activation of the NF-kappaB transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. In, *Biochem J*, Vol. 321 (Pt 3), pp. 777-785.
- Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P.A., 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. In, *The EMBO Journal*, Vol. 10, pp. 2247-2258.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. In, *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 75, pp. 163-189.
- Scott, P., James, S., Sher, A., 1985. The respiratory burst is not required for killing of intracellular and extracellular parasites by a lymphokine-activated macrophage cell line. In, *Eur. J. Immunol.*, Vol. 15, pp. 553-558.
- Scott, P., 1991. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. In, *J Immunol*, Vol. 147, pp. 3149-3155.
- Seay, M.B., Heard, P.L., Chaudhuri, G., 1996. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. In, *Infection and Immunity*, Vol. 64, pp. 5129-5137.

- Segal, A.W., 2005. How neutrophils kill microbes. In, *Annu Rev Immunol*, Vol. 23, pp. 197-223.
- Segal, B.H., Sakamoto, N., Patel, M., Maemura, K., Klein, A.S., Holland, S.M., Bulkley, G.B., 2000. Xanthine oxidase contributes to host defense against *Burkholderia cepacia* in the p47(phox^{-/-}) mouse model of chronic granulomatous disease. In, *Infection and Immunity*, Vol. 68, pp. 2374-2378.
- Shatwell, K.P., Segal, A.W., 1996. NADPH oxidase. In, *Int J Biochem Cell Biol*, Vol. 28, pp. 1191-1195.
- Silveira, F.T., Lainson, R., Corbett, C.E., 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. In, pp. 1-13.
- Silveira, F.T., Lainson, R., Corbett, C.E.P., 2005. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. In, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 100, pp. 525-534.
- Soong, L., Chang, C.H., Sun, J., Longley, B.J., Ruddle, N.H., Flavell, R.A., McMahon-Pratt, D., 1997. Role of CD4⁺ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. In, *J Immunol*, Vol. 158, pp. 5374-5383.
- Späth, G.F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S.M., Avila, H.A., Turco, S.J., Beverley, S.M., 2000. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. In, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 97, pp. 9258-9263.
- Späth, G.F., Beverley, S.M., 2001. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. In, *Exp Parasitol*, Vol. 99, pp. 97-103.
- Stenger, S., Thuring, H., Rollinghoff, M., Manning, P., Bogdan, C., 1995. L-N⁶-(1-iminoethyl)-lysine potently inhibits inducible nitric oxide synthase and is superior to NG-monomethyl-arginine in vitro and in vivo. In, *Eur J Pharmacol*, Vol. 294, pp. 703-712.
- Stenger, S., Donhauser, N., Thuring, H., Röllinghoff, M., Bogdan, C., 1996. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. In, *J Exp Med*, Vol. 183, pp. 1501-1514.
- Stevens, J.R., Noyes, H.A., Schofield, C.J., Gibson, W., 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. In, *Adv Parasitol*, Vol. 48, pp. 1-56.
- Sypek, J.P., Chung, C.L., Mayor, S.E., Subramanyam, J.M., Goldman, S.J., Sieburth, D.S., Wolf, S.F., Schaub, R.G., 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. In, *J Exp Med*, Vol. 177, pp. 1797-1802.

- Torrentera, F.A., Glaichenhaus, N., Laman, J.D., Carlier, Y., 2001. T-cell responses to immunodominant LACK antigen do not play a critical role in determining susceptibility of BALB/c mice to *Leishmania mexicana*. In, *Infection and Immunity*, Vol. 69, pp. 617-621.
- Trinchieri, G., Matsumoto-Kobayashi, M., Clark, S.C., Sehra, J., London, L., Perussia, B., 1984. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. In, *J Exp Med*, Vol. 160, pp. 1147-1169.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Mastroeni, P., Ischiropoulos, H., Fang, F.C., 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. In, *J Exp Med*, Vol. 192, pp. 227-236.
- Vieira, L.Q., Goldschmidt, M., Nashleanas, M., Pfeffer, K., Mak, T., Scott, P., 1996. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. In, *J Immunol*, Vol. 157, pp. 827-835.
- Vieth, M., Will, A., Schröppel, K., Röllinghoff, M., Gessner, A., 1994. Interleukin-10 inhibits antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. In, *Scand J Immunol*, Vol. 40, pp. 403-409.
- Wanderley, J.L.M., Moreira, M.E.C., Benjamin, A., Bonomo, A.C., Barcinski, M.A., 2006. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. In, *J Immunol*, Vol. 176, pp. 1834-1839.
- Wei, X.Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.J., Huang, F.P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S., Liew, F.Y., 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. In, *Nature*, Vol. 375, pp. 408-411.
- Wild, A.C., Gipp, J.J., Mulcahy, T., 1998. Overlapping antioxidant response element and PMA response element sequences mediate basal and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit gene. In, *Biochem J*, Vol. 332 (Pt 2), pp. 373-381.
- Winterbourn, C.C., 2002. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. In, *Toxicology*, Vol. 181-182, pp. 223-227.
- Wolf, S.F., Temple, P.A., Kobayashi, M., Young, D., Diczig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R.M., 1991. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. In, *J Immunol*, Vol. 146, pp. 3074-3081.
- Zhang, Z., Kolls, J.K., Oliver, P., Good, D., Schwarzenberger, P.O., Joshi, M.S., Ponthier, J.L., Lancaster, J.R., 2000. Activation of tumor

necrosis factor-alpha-converting enzyme-mediated ectodomain shedding by nitric oxide. In, J Biol Chem, Vol. 275, pp. 15839-15844.

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](#)