

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

**Estudo envolvido na mudança de condição de
susceptibilidade à *Leishmania (Leishmania)*
major em camundongos com alergia alimentar.**

Janaína Cláudia da Silva Saldanha

**BELO HORIZONTE
2006**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

**Estudo envolvido na mudança de condição de
susceptibilidade à *Leishmania (Leishmania)*
major em camundongos com alergia alimentar.**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Janaína Cláudia da Silva Saldanha

**Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Denise Carmona Cara Machado
(Depto. Patologia Geral)**

**Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Leda Quercia Vieira
(Depto. Bioquímica e Imunologia)**

**BELO HORIZONTE
2006**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neuro Imuno Patologia Experimental (NIPE) do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com o apoio do CNPq, FAPEMIG e PRPq-UFMG.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Zilma e Laércio; sem o apoio de vocês seria impossível chegar até aqui. Amo muito vocês.

À Deus que é a força divina, que nos inspira e faz-nos crescer.

Aos meus irmãos Sandra, Juninho, Alexander, Flaviano, Carolina e Fabrícia, e ao meus sobrinhos por alegrarem o dia-a-dia.

Dori pela paciência e compreensão.

À amiga Daniela Longo pela convivência, companheirismo, pelas discussões e ajuda nas decisões a serem tomadas, tanto em relação aos experimentos quanto pessoais.

À Luana e Cláudia, novas amigas, que sempre estiverem dispostas a ajudar em todos os momentos, pelo alto astral.

Ao Wanderson pelo incentivo, pelo sorriso sempre estampado no rosto, pela lealdade.

À Maria, Frank, Maria Letícia, Pércia e Paloma pela convivência e ajuda nos experimentos.

Aos velhos e novos colegas do laboratório NIPE pela convivência, sorrisos, surpresas. Marta, Mirna, Felipe, Mariana, Weverton, Eliane, Camila, Silvia e Carolina.

Às alunas Mayra, Cláudia e Virgínia do laboratório de Gnotobiologia do departamento de Bioquímica e Imunologia, que disponibilizaram a *Leishmania* para a realização dos experimentos.

Ao Helton que ajudou na realização e análise do RT-PCR e das discussões envolvendo outros resultados.

À prof^a e co-orientadora Leda Quercia Vieira que forneceu a maioria dos animais deficientes e a *Leishmania major* que enriqueceu e viabilizou o desenvolvimento da tese.

Ao professor Mauro Martins Teixeira, pelas discussões e sugestões de experimentos, para aprimorar as discussões em relação à tese e por permitir o uso do espaço e equipamentos do laboratório de Imuno Farmacologia do depto. de Bioquímica e Imunologia.

Aos professores Wagner Luiz Tafuri e Rosa Arantes pela ótima convivência e ensinamento, mesmo que de forma indireta.

À professora Denise Carmona Cara Machado, que confiou no meu trabalho. Foram 9 anos de convivência, saio com um saldo positivo e tenho certeza que o que foi absorvido durante esses anos mudaram o meu jeito de pensar. As pessoas não passam pelas nossas vidas em vão. Levo não só conhecimentos científicos, mas também pessoais. Obrigada pelo incentivo e amizade.

Aprendi muito com cada um de vocês.

“Quando se é muito jovem e se sabe um pouco, as montanhas são montanhas, a água é água e as árvores são árvores. Quando se estuda e se é erudito, as montanhas já não são mais montanhas, a água já não é mais água e as árvores já não são mais árvores. Quando se é sábio, novamente as montanhas são montanhas, a água é água e as árvores são árvores.”

Antigo provérbio do Zen-budismo.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. RESUMO.....	11
2. ABSTRACT.....	12
3. INTRODUÇÃO.....	13
4. OBJETIVOS.....	26
4.1. OBJETIVO GERAL.....	26
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5.1. ANIMAIS.....	27
5.2. INDUÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR.....	27
5.2.1. ANTÍGENO.....	27
5.2.2. INDUÇÃO DA ALERGIA.....	28
5.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-OVA.....	29
5.3.1. OBTENÇÃO DO SORO.....	29
5.3.2. DOSAGEM DO ANTICORPO IgG1 NO SORO.....	29
5.3.3. DOSAGEM DE IgE ANTI-OVA POR ELISA.....	30
5.4. AVALIAÇÃO GERAL.....	31
5.4.1. AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	31
5.4.2. AVALIAÇÃO DO CONSUMO LÍQUIDO.....	31
5.4.3. AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO.....	31
5.5. INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>LEISHMANIA</i>	32
5.5.1. PARASITA.....	32
5.5.2. INFECÇÃO <i>IN VIVO</i>	32
5.5.3. AVALIAÇÃO DO TAMANHO DA LESÃO.....	33
5.5.4. HISTOPATOLOGIA.....	34
5.5.5. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>LEISHMANIA</i>	34
5.6. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS	35

5.6.1. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS IN VITRO.....	35
5.6.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCIAS.....	36
5.6.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS ATRAVÉS DO RT-PCR.....	36
5.7. AVALIAÇÃO DO RECRUTAMENTO CELULAR ATRAVÉS DA MICROSCOPIA INTRAVITAL	38
5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
6. RESULTADOS.....	40
6.1. PARÂMETROS DA ALERGIA NOS GRUPOS DE ANIMAIS DEFICIENTES.....	40
6.1.1. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS ANTI-OVA.....	40
6.2. AVALIAÇÃO GERAL DOS GRUPOS DE CAMUNDONGOS	43
6.3. PARÂMETROS DA INFECÇÃO PELA <i>LEISHMANIA MAJOR</i> NOS GRUPOS DE ANIMAIS DEFICIENTES COMPARADO AOS SELVAGENS	47
6.3.1. ANÁLISE DO TAMANHO DA LESÃO	47
6.3.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS PATAS.....	50
6.3.3. EXPRESSÃO DE RNAm PARA AS CITOCINAS IL-4, IL-10 E IFN- γ ATRAVÉS DO RT-PCR NA PATA INFECTADA.....	52
6.3.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM ENSAIO IN VITRO POR ELISA.....	52
6.3.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE QUIMIOCIAS NA PATA INFECTADA.....	58
6.4. AVALIAÇÃO DO ROLAMENTO, ADESÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS NO MÚSCULO CREMÁSTER DE ANIMAIS C57BL/6 E BALB/c.....	58
7. DISCUSSÃO.....	64
8. CONCLUSÕES.....	76
9. BIBLIOGRAFIA.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Protocolo experimental da alergia	28
Figura 2 – Protocolo experimental da infecção por <i>Leishmania major</i>	33
Figura 3 – Avaliação dos anticorpos IgG1 (a) e IgE (b) antes do desafio com SCO	41
Figura 4 – Avaliação dos anticorpos IgG1 (a) e IgE (b) no soro após ingestão de SCO	42
Figura 5 – Controle do peso corporal	44
Figura 6 – Controle do consumo de ração	45
Figura 7 – Controle do consumo líquido	46
Figura 8 – Tamanho da lesão na pata infectada com <i>Leishmania major</i> , ao longo de 8 semanas.	48
Figura 9 - Variação do tamanho da lesão da pata infectada com <i>Leishmania major</i> em animais BALB/c ao longo de 12 semanas	49
Figura 10 – Microfotografia de cortes histológicos da lesão de patas de comufongos infectados por <i>L. major</i> .	51
Figura 11 – Expressão de RNAm para IFN- γ , IL-4 e IL-10 através de RT-PCR após 4 semanas de infecção.	54
Figura 12 – Produção de citocinas dosadas por ELISA de suspensão de células retiradas do baço e linfonodo poplíteo <i>in vitro</i> .	55/56
Figura 13 – Produção dos anticorpos IgG1 e IgE no soro após infecção	57
Figura 14 – Detecção de quimiocinas no sítio de inflamação	60
Figura 15 – Avaliação do rolamento, adesão e migração no músculo cremáster de camundongos BALB/c e C57BL/6	61
Figura 16 – Número de leucócitos presentes no sangue periférico	62
Figura 17 – Microfotografia de corte histológico do músculo cremáster de animais BALB/c.	63

LISTA DE ABREVIATURAS

- Al(OH)_3 = Hidróxido de alumínio
- DMM = Dubelco Medium Modified
- ELISA = *Enzyme linked immunosorbent assay*
- H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio
- H_2SO_4 = Ácido sulfúrico
- HE = Hematoxilina-eosina
- $\text{IFN-}\alpha$ = Interferon gama
- Ig = Imunoglobulina
- IL = Interleucina
- LPG = Lipofosfoglicanos
- MCP = Proteína quimiotática para monócito
- MHC = Complexo Principal de Histocompatibilidade
- NaCl = Cloreto de sódio
- NK = Células natural killer
- NO = Óxido nítrico
- NO^{2-} = Nitrito
- OPD = Ortofenileno-diamino
- OVA = Ovalbumina, albumina da clara de ovo
- PAF = Fator ativador de plaquetas
- PBS = Salina tamponada com fosfato
- SCF = Stem cell factor
- SCO = Solução de clara de ovo a 20%
- $\text{TGF-}\beta$ = Fator de crescimento tumoral- β
- $\text{Th}1/2$ = Células T *helper* 1/2
- $\text{TNF-}\alpha$ = Fator de necrose tumoral alfa
- VCAM= Molécula de adesão celular expressa nos vasos

Resumo

A incidência de doenças alérgicas tem aumentado tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Entre as diversas repercussões, acredita-se que a relação hospedeiro-parasita pode ser alterada se o hospedeiro alérgico tem contínuo contato com o alérgeno. Neste trabalho buscamos estudar, através da associação de protocolos experimentais, a evolução de uma doença infecciosa, a leishmaniose cutânea, em camundongos pré-dispostos à alergia alimentar. A alergia alimentar foi induzida através da imunização com ovalbumina (ova) com posterior ingestão contínua de solução de clara de ovo 20% (SCO), contida na mamadeira. O protocolo de alergia foi induzido nas linhagens BALB/c, IL-4^{-/-}, C57BL/6, IL-10^{-/-}, IFN- γ ^{-/-}, IL-12^{-/-}, TNFRp55^{-/-} e iNOS^{-/-}. A imunização com ova levou ao aumento sistêmico de anticorpos IgE e IgG1 anti-ova 7 dias após a imunização secundária. Após o desafio oral com SCO, os níveis de IgE e IgG1 aumentaram em alguns grupos alérgicos. No entanto, esse protocolo de alergia induziu a uma dramática perda de peso corporal (20%) evidenciando repercussão sistêmica. A resposta à infecção com *Leishmania major* foi alterada na linhagem BALB/c, mas não nas demais estudadas, que permaneceram com o mesmo padrão de resistência ou susceptibilidade à infecção. Camundongos BALB/c, estabelecidos como susceptíveis, tornaram-se resistentes, ou seja, apresentaram menor desenvolvimento da lesão causada pelo parasito. A resposta nesses animais foi associada aos: (a) achados histopatológicos mostrando pata com raros macrófagos apresentando amastigotas em vacúolos parasitóforos, (b) aumento da expressão e produção de IFN γ por RT-PCR e ensaio in vitro com células do baço, (c) aumento da produção de IgG2a e (d) número menor de células migradas nos eventos iniciais à infecção. Esses resultados mostram que o processo alérgico foi capaz de interferir na susceptibilidade de camundongos BALB/c à *Leishmania major*.

Abstract

The incidence of allergic diseases has been increasing worldwide. Among the several repercussions in allergic individuals, it has been proposed that the host-parasite interactions can be altered. In the present work, we examined - through the association of experimental protocols - the development of an infectious disease, experimental leishmaniasis, in food allergic mice. Food allergy was induced after ovalbumin sensitization via the ingestion of a 20% solution of egg white (EWS). Control groups did not receive the sensitization, the oral challenge, or both. The allergy protocol was induced in wild type BALB/c (wt), IL-4 deficient BALB/c mice (IL-4 -/-), C57BL/6 (wt), IL-12 -/-, IFN- γ -, IL-10 -/-, iNOS -/- and TNFRp55 -/- all of the *background* C57BL/6. There was a significant increase in IgE and IgG₁ anti-ovalbumin serum antibodies seven days after secondary immunization with ovalbumin in wt BALB/c, wt C57BL/6 and all deficient C57BL/6 mice, but not in IL-4 deficient BALB/c mice. After oral challenge with EWS, wt mice showed an increase of IgE and IgG₁ and a dramatic loss (20%) of their body weight, which not were observed in wt BALB/c, wt C57BL/6 and all deficient C57BL/6 mice. The response to *Leishmania major* infection was higher in the wt BALB/c, IL-12 -/-, IFN- γ - and iNOS -/- mice of the *background* C57BL/6, but not in IL-4-/-, IL-10 -/-, C57BL/6 mice. On the other hand, allergic wt BALB/c mice became resistant, as assessed by the reduced growth of the footpad thickness after parasite inoculation. Footpad histology showed smaller necrotic areas, with less ulceration, infiltrated inflammatory mononuclear cells and rare macrophages with amastigotes in parasitophorus vacuoles, when compared to control groups. The resistance was connected to Th1 response once there was more IFN- γ production by splenic cell and increased of expression IFN- γ mRNA by RT-PCR, increased of level of IgG_{2a} anti-*Leishmania* and decreased of migration cellular. Our results show that the allergic process is capable of interfering with the susceptibility of BALB/c mice to *Leishmania major* infection.

Alergia alimentar

Aproximadamente, 20% da população dos países ocidentais sofrem de doenças alérgicas que incluem asma, rinite, dermatite atópica e alergia alimentar, entre outras. Essas desordens atópicas têm aumentado nos países ocidentais desenvolvidos e em desenvolvimento (HOLGATE, 1999).

As razões das mudanças na prevalência das desordens alérgicas não são ainda conhecidas e várias hipóteses têm tentado elucidar, incluindo a “hipótese da higiene”, que indica que a redução das infecções no início da infância predispõe às respostas alérgicas (STRACHAN, 1989; HELM & BURKS, 2000; YAZDANBAKHSH *et al.*, 2002). O contato com bactérias no início da vida favoreceria o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 devido à presença de IL-12. Modelos murinos experimentais mostram que a injeção de lipopolissacarídeo (LPS) antes do protocolo de sensibilização protege esse animal contra o desenvolvimento de respostas alérgicas (TULIC *et al.*, 2000). A incidência está correlacionada com diversos fatores como diferenças na genética das populações, imaturidade funcional da defesa imunológica que ocorrem nos primeiros anos de vida (HELM & BURKS, 2000; GEHA, 2000), na resposta imune do hospedeiro, amamentação e composição do leite, idade do desmame, padrões dos novos alimentos consumidos e processamento de novos alimentos (LACK, 2004).

O intestino é a principal via de entrada de antígenos no corpo e os linfócitos ali presentes na mucosa, submucosa, placas de Peyer ou linfonodos mesentéricos são responsáveis pela montagem da resposta imune adequada contra esses antígenos (SPRINGER, 1994; MAYER, 2003).

O lúmen gastrointestinal contém uma variedade de substâncias nocivas, incluindo patógenos e agentes químicos ingeridos com o alimento, bem como microrganismos e seus produtos tóxicos. No entanto, em condições fisiológicas, o sistema gastrointestinal apresenta muitas barreiras para evitar constantes reações a esses patógenos. Entre elas, o muco que cobre continuamente e de forma aderente a mucosa digestiva; as enzimas gástricas (pepsinas), pancreáticas (tripsina, quimitripsina carboxipeptidases) e intestinais (aminopeptidases e dipeptidases)

(LAMONT, 1992) e a produção de IgA que se liga a moléculas antigênicas e dificulta sua penetração no organismo (MESTECKY, *et al.*, 1986). A mucosa do trato gastrintestinal contém um grande número de células imunocompetentes, tais como: células “natural killer - NK”, polimorfonucleares, macrófagos, células epiteliais, linfócitos intraepiteliais e da lâmina própria, mastócitos e granulócitos, que representam importantes papéis na fisiologia (imunoregulação, remodelamento do tecido e defesa do hospedeiro) (GALLI & WERSHIL, 1996; LORENTZ & BISCHOFF, 2001) e na patofisiologia (YU & PERDUE, 2001).

Mesmo frente a essas barreiras, os antígenos da dieta podem entrar na mucosa intestinal através das células M situadas nas placas de Peyer. Macrófagos residentes nessa placa fagocitam, processam e apresentam peptídeos unidos à molécula de histocompatibilidade principal (MHC) II para linfócitos T. Estes, ativam linfócitos B comprometidos com a síntese de IgA. As células T e B migram, então, das placas de Peyer para os linfonodos mesentéricos; destes, trafegam para o ducto torácico chegando à circulação sanguínea. Da circulação, os linfócitos ativados retornam à mucosa digestiva e passam a residir na lâmina própria onde irão secretar mais IgA (HELM & BURKS, 2000).

Infecções por microrganismos, LPS de bactérias gram-negativas e a microbiota comensal do intestino são necessários para o desenvolvimento das funções desempenhadas pelas barreiras da mucosa e pelos fenômenos imunoregulatórios (BRANDTZAEG, 2002). As células T reguladoras representam um papel importante neste processo. Um número significativo de células T reguladoras tem sido definido nos últimos anos como, células CD4+CD25+, T helper tipo 3 (Th3) e T reguladoras tipo 1 (Tr1). As células CD4+CD25+ parecem mediar sua inibição por contato célula-célula, enquanto Th3 e Tr1 secretam fator de transformação beta (TGF- β) e IL-10, respectivamente (SHEVACH, 2002, GAVIN *et al.*, 2002).

O sistema imune de neonatos é predominantemente Th2. Assim, a resposta do tipo Th2 parece diminuir gradualmente por volta de 2 anos de vida em indivíduos não alérgicos. Por outro lado, em crianças alérgicas, essa resposta Th2 parece aumentar nesse mesmo período de tempo (WILLS-KARP *et al.*, 2001).

Contudo, o desenvolvimento imaturo de vários componentes das barreiras do intestino e do sistema imune reduz a sua eficiência (WEAVER, *et al.*, 1987). Por exemplo, a atividade enzimática é baixa em recém-nascidos e a síntese de IgA não é eficiente até os 4 anos de vida (MAYER, 2003). Consequentemente, este estado imaturo das barreiras da mucosa pode determinar um aumento da incidência de infecções gastrointestinais e de alergia alimentar vistos nos primeiros anos de vida (SAMPSON, 1999).

Alergia é um grupo de desordens geneticamente determinado caracterizadas por aumento na capacidade de linfócitos B de sintetizar imunoglobulina (Ig) E contra antígenos que entram no organismo através da inalação, ingestão ou penetração pela pele (PICCINNI *et al.*, 2000). É caracterizada por uma hiperatividade imunológica e inflamação alérgica (BUFE, 1998). Esses antígenos são considerados inócuos, mas capazes de induzir quadros patológicos em indivíduos sensibilizados. A alergia alimentar está incluída entre as alergias mais comuns em crianças (6 - 8%).(SAMPSON, 1999).

A despeito da enorme diversidade da dieta humana, poucos são os alimentos relacionados com a grande maioria das reações alérgicas; dentre as proteínas encontram-se: leite, ovo, amendoim, castanha, nozes, trigo, peixe e frutos do mar (BEYER, 2003).

Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento preferencial da resposta tipo Th2 reativas ao alérgeno em sujeitos atópicos não estão ainda completamente esclarecidos. Atenção tem sido dada ao possível papel das células apresentadoras de antígenos, frente ao repertório de células T e citocinas presentes no micro-ambiente durante a apresentação do antígeno (PICCINNI *et al.*, 2000).

Nessas condições, as células B sintetizam IgE específica ao antígeno na primeira exposição ao alérgeno. O peptídeo é então apresentado à célula T CD4⁺ específica ao antígeno via a MHC de classe II. A mudança de IgM para IgE requer interações entre antígeno, células B específicas e células T. As células T ativadas, secretam IL-4 e expressam o ligante CD40, que agem sobre as células B, estimulando a transformação em plasmócitos secretores de IgE e produzindo células

B de memória. Quando ocorrer uma nova exposição ao antígeno a IgE específica será secretada pelos plasmócitos e se ligará aos mastócitos.

A reação alérgica é iniciada quando um antígeno faz a ligação cruzada com IgEs ligadas a seus receptores Fc de alta afinidade (FcRI) em mastócitos no tecido ou basófilos na corrente sanguínea (SUTTON *et al.*, 1993). Esses receptores FcRI encontram-se em abundância nas membranas de mastócitos e basófilos e em menor número nas células de Langerhans, monócitos, plaquetas e eosinófilos. A fase aguda da reação alérgica reflete a ação dos mediadores liberados pelos mastócitos, alguns dos quais são pré-formados e estocados em grânulos citoplasmáticos, enquanto outros resultam da ativação enzimática. Os produtos mais conhecidos liberados pelos mastócitos incluem histamina, serotonina, mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos), proteases (triptases, quimases), quimiocinas (eotaxina, RANTES) e citocinas. Na fase tardia participam TNF- α , GM-CSF, MIP-1 α e citocinas da resposta tipo Th2, como: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (GOULD *et al.*, 2003). Histamina, prostaglandina e leucotrieno promovem a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa. Fatores quimiotáticos atraem eosinófilos que liberam outros mediadores prolongando a resposta alérgica (ANDERSON, 1997; FULEIHAN, 1998; SMARTIN *et al.*, 2001).

A etiologia das alergias mediadas por IgE é complexa e pouco entendida. Uma característica comum é a elevada produção de citocinas como IL-4, do repertório Th2, que induzem essa produção de IgE. A diferenciação de células T virgens para o fenótipo Th2 parece ser dependente de certas citocinas presentes nos estágios iniciais da resposta imune (HAAS *et al.*, 1999). Vários estudos têm mostrado que as células T do sangue periférico respondem ao alérgeno *in vitro* produzindo citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, e não do tipo Th1, como interferon-gama (IFN- γ) e IL-12 (KAY, 2000).

As citocinas do tipo Th2 influenciam uma variedade de eventos associados com a inflamação alérgica crônica e infecções helmínticas. Em adição à estimulação da produção de IgE (IL-4, IL-13), esses efeitos incluem maturação de eosinófilos (IL-5, IL-9), aumento da expressão das moléculas de adesão celular expressa nos vasos (VCAM-1) seletivas para eosinófilos/basófilos, desenvolvimento de mastócitos

(IL-3, IL-9, *stem cell factor* - SCF), hipersensibilidade respiratória (IL-9, IL-13) e produção excessiva de muco (IL-4, IL-9, IL-13) (KAY, 2000).

Resposta imune tipo Th1 e Th2

As citocinas representam um papel importante na diversidade funcional da resposta imune, sendo caracterizadas por uma relação inversa entre uma resposta mediada por anticorpo e outra por células. Isto é ilustrado pela existência de dois tipos de células Th que são classificadas como Th1 ou Th2 de acordo com os padrões de citocinas produzidas. (MOSMANN & COFFMAN, 1989).

Os fatores que determinam a diferenciação da resposta tipo 1 ou tipo 2 relacionam-se às características do antígeno (tipo, dose, exposição natural), do hospedeiro (fatores genéticos, idade, histórias prévias de infecções), o ambiente (adjuvantes naturais) e citocinas presentes durante a apresentação do antígeno (ABBAS *et al*, 1996).

As células Th1 produzem IL-12, IFN- γ e LT- α , LT- β e TNF- β , enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. A resposta tipo Th1 em camundongos está associada com o desenvolvimento da resposta imune mediada por células, caracterizada pela hipersensibilidade do tipo tardia, ativação de macrófagos e de células citotóxicas e pela produção de subclasse da IgG (IgG2a) por células B sendo associada às infecções com parasitas intracelulares. Por outro lado, na resposta Th2 ocorre a produção de IgA, IgG1, IgG2b e IgE nesses camundongos que está associada às respostas alérgicas e infecções por helmintos (FINKELMAN *et al*, 1990).

Ambas as células Th1 e Th2 desenvolvem-se de células T CD4⁺ tendo uma mesma célula T precursora (Th0). As citocinas neste meio ambiente representam um papel chave nesta diferenciação da célula Th0. Interleucina-2 é produzida por células Th0 quando exposta ao antígeno e serve como um importante fator de crescimento. Interleucina-12 induz células NK a produzirem IFN- γ , que junto com IL-12 promovem a diferenciação das células Th0 para a via Th1 (TRINCHIERI, 1995).

Interleucina-10 tem um amplo efeito antiinflamatório e antialérgico. Ela inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ) e citocinas derivadas de células Th2 (IL-4 e IL-5).

As células Th1 e Th2 sofrem um controle em sua expressão de acordo com o tipo de citocinas produzidas. Por exemplo, INF- γ produzido por células Th1 inibe a proliferação de células Th2 e mudança no isotipo das células B pela IL-4. Da mesma forma, células Th2 regulam as células Th1 através da secreção de IL-10 que inibe a secreção de IFN- γ por células Th1 e assim permite o desenvolvimento da resposta tipo Th2. (BOYAKA & McGHEE, 2001).

Leishmania

Entre as diversas doenças parasitárias, as leishmanioses são colocadas entre as seis mais importantes pela Organização Mundial da Saúde. Ocorre em 88 países em todos os continentes, com exceção da Oceania e Antártica. A incidência anual é estimada em 1,5-2 milhões de casos de leishmaniose sendo que somente 600.000 casos são declarados oficialmente. A prevalência mundial é estimada em 12 milhões de indivíduos infectados e 350 milhões expostos ao risco de adquirirem a doença (WHO, 2001).

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) subgênero *Leishmania* e *Viannia* (LAISON & SHAW, 1987). Os parasitos são transmitidos aos hospedeiros mamíferos através da picada de fêmeas de insetos hematófagos da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo).

No tubo digestivo dos insetos vetores, os parasitos do subgênero *Viannia* desenvolvem-se de modo diferente daqueles do subgênero *Leishmania*, mas em ambos os casos ocorrem o aparecimento de formas flageladas infectantes, denominadas promastigotas metacíclicas. No momento do repasto sanguíneo, o inseto injeta estas formas flageladas, juntamente com saliva, na pele do hospedeiro mamífero. Neste, os parasitos infectantes encontram a primeira barreira imunológica,

que é um ambiente contendo componentes solúveis (como complemento, anticorpos, citocinas e quimiocinas) (TAPIA, *et al.*, 1994), além de diversas células imunocompetentes (como células de Langerhans, queratinócitos, linfócitos T da pele, células endoteliais, mastócitos, macrófagos, entre outras). Como o parasito sobrevive e se multiplica exclusivamente dentro de fagócitos mononucleares no hospedeiro vertebrado, a promastigota precisa se ligar a receptores específicos dos fagócitos para serem internalizadas (MOSSER & ROSENTHAL, 1993).

Vários podem ser os receptores da superfície de macrófagos que participam destas interações, como os aqueles para imunoglobulinas e para fração do complemento como CR1 e CR3, para fibronectina e receptores do tipo lectina. Dentre estes, os receptores para complemento têm sido amplamente estudados, porque as principais moléculas de superfície de promastigotas das *Leishmania*, uma metaloprotease de 63 kDaltons que hidrolisa grande número de polipeptídeos *in vitro* (gp63) e lipofosfoglicano (LPG ancorado a fosfatidilinositol) são capazes de mediar a ligação do componente do sistema de complemento C3, na superfície do parasita (RUSSEL, 1987; PUENTES, *et al.*, 1988; KANE & MOSSER, 2000).

Além disto, sugere-se que a interação de *Leishmania* com macrófagos através dos receptores para C3 constitui uma via de proteção para o parasito, pois a formação de compostos reativos do oxigênio é menos estimulada quando os parasitos entram no fagócito utilizando-se desta via (MAUËL, 1996). A proteção do parasito pela LPG que está relacionada à inibição da fusão do endossomo ao fagossomo (DESJARDINS & DESCOTEAUX, 1997), inibição da proteína kinase C (PKC) (GIORGIONE *et al.*, 1996), inibição da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) e produção de NO (PROUDFOOT, *et al.*, 1996) garantindo sua sobrevivência até atingir formas mais resistentes às adversidades encontradas dentro do fagócito (CHANG, *et al.*, 1989). A grande parte da capacidade das *L. major* e *L. donovani* de entrar no fagócito é dependente da opsonização do parasito por C3 (MOSSER & ROSENTHAL, 1993).

O parasito dentro do macrófago transforma-se em amastigota, que tem como seu sítio de localização final o fagolisossoma. Este ambiente com pH extremamente ácido, rico em enzimas lisossomais e radicais de oxigênio altamente reativos exigem

que os parasitos utilizem diversos mecanismos adaptativos, muitos dos quais permanecem pouco entendidos ou ainda desconhecidos, para promover a sua sobrevivência (MAUËL, 1996). De maneira geral, formas amastigotas são mais resistentes à morte no macrófago do que formas metacíclicas que, por sua vez, são mais resistentes do que formas procíclicas. Uma das razões para esta diferença é que amastigotas são mais capazes de remover peróxido de hidrogênio que promastigotas (CHANNON & BLACKWELL, 1985). Além disto, a principal forma dos macrófagos matarem amastigotas em camundongos é dependente da ação de óxido nítrico (NO) e não pela ação de outros produtos oxidativos capazes de matar promastigotas (LIEW & O'DONNELL, 1993).

As amastigotas possuem diferentes expressões das moléculas de superfície, quando comparadas com promastigotas, diminuição da expressão de LPG e da gp63. Por isto, podem utilizar diferentes receptores para penetrar em macrófagos (MAUËL, 1996; MOSSER & ROSENTHAL, 1993; KANE & MOSSER, 2000).

Caso a *Leishmania* sobreviva dentro do macrófago, ela se replica culminando com a ruptura da célula fagocítica e a liberação das formas amastigotas que podem penetrar em novos fagócitos. O ciclo do parasito se completa quando a *Leishmania* é sugada e desenvolve-se, novamente, no inseto vetor (HANDMAN, 1999).

A via final que media a permanência ou destruição pelo macrófago dos camundongos envolve a produção de NO pela iNOS. A inibição de NO torna o macrófago incapaz de restringir o crescimento da *L. major in vitro* (GREEN *et al.*, 1990).

A infecção de camundongos com a *L. major* causadora da leishmaniose cutânea foi um dos primeiros modelos *in vivo* para o estudo da diferenciação da resposta imune e dos parâmetros que governam a resposta imune Th1 e Th2 (REINER & LOCKSLEY, 1995). Linhagens isogênicas de camundongos foram utilizadas e classificadas como sendo resistentes ou susceptíveis à infecção com *L. major*. Assim, os camundongos se tornaram excelente modelo para o estudo da leishmaniose, principalmente para a leishmaniose cutânea, onde a severidade da doença pode ser determinada pela mensuração do tamanho da lesão, entre outros parâmetros. Camundongos que montam a resposta imune tipo Th1 (C57BL/6),

caracterizada pela produção de IFN- γ , resolvem sua lesão e se curam. Enquanto, camundongos que montam uma resposta Th2 (BALB/c), caracterizada pela produção de IL-4, morrem devido à disseminação sistêmica do parasito (SCOTT, 1989, SCOTT, 1991).

Interleucina 12 é uma citocina produzida por células dendríticas, monócitos-macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos (TRINCHIERI, 1994). A produção de IL-12 é importante para a indução de uma resposta Th1 protetora ao *Toxoplasma* e *Leishmania* (AFONSO et al., 1993; HEINZEL et al., 1993; LIEW & O'DONNELL, 1993). Sua expressão induz a produção de IFN- γ por células NK e células T. IFN- γ por sua vez media a proteção por induzir a expressão de iNOS e produção de NO. Conseqüentemente, a neutralização de IL-12 leva à exacerbação da infecção pelas *L. major* e *L. donovani* (HEINZEL et al., 1993). A forma promastigota metacíclica de *Leishmania* inibe a produção de IL-12 por macrófagos, tanto *in vitro* (PIEDRAFITA et al., 1999), como *in vivo* (BELKAID et al., 1998; REINER et al., 1995).

As citocinas TGF-beta e a IL-10 também inibem os macrófagos. *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana* e *L. major* ativam a produção de TGF-beta tanto *in vivo* (infecções cutâneas) quanto *in vitro* (infecção com macrófagos peritoneais).

Embora a infecção pela *Leishmania* em camundongos geneticamente resistentes resulte no completo desaparecimento da doença, *L. major* viáveis podem ser encontradas no baço, medula óssea, nódulos linfóides e fígado por toda a vida do animal (AEBISCHER et al., 1993). E essa permanência está relacionada com estimulação de células CD4+CD25+ que confere aos camundongos C57BL/6 a imunidade à re-infecção (BELKAID et al., 2002).

Recrutamento celular

Os processos inflamatórios são importantes para conter e eliminar parasitas, bem como de promover a cura de feridas nos tecidos lesados. No entanto, se o

sistema imune é imprópriamente estimulado ou há ausência de fatores reguladores, a resposta inflamatória pode resultar em conseqüências deletérias para o hospedeiro.

O leucócito para sair do vaso sangüíneo deve ter um contato inicial e rolar ao longo do endotélio, aderir e então migrar. Essa seqüência de eventos é mediada por uma variedade de moléculas de adesão expressadas na membrana tanto da célula endotelial, quanto do leucócito (BUTCHER 1991, SPRINGER 1994). O contato inicial e o rolamento estão sob o controle das selectinas. Na resposta inflamatória aguda a P-selectina é expressada (ASAKO *et al.* 1994) e ao longo da progressão da resposta E-selectina e o ligante para L-selectina permite o recrutamento de mais neutrófilos e outras células inflamatórias. Durante esse evento os leucócitos são ativados e aderem ao endotélio através das moléculas de adesão β 2 integrina (CD11/CD18) à ICAM-1 do endotélio (KISHIMOTO & ANDERSON 1992). Com a progressão da resposta inflamatória o aumento de ICAM-1 e de molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) contribuem para recrutar mais células, incluindo monócitos, eosinófilos e linfócitos.

O recrutamento celular está sob o controle de vários mediadores inflamatórios. Sabe-se que as células endoteliais expressam a enzima sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) e na sua ausência há o recrutamento de leucócitos, mesmo sem um estímulo adicional (HICKEY *et al.*, 2001). Já nos processos inflamatórios, ocorre o estímulo da isoforma óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que está associada à eliminação de parasitas intracelulares e atua também no recrutamento dos leucócitos.

As quimiocinas são citocinas de baixo peso molecular e possuem importante papel no recrutamento e ativação de leucócitos (ROT & VON ANDRIAN, 2004). A sua produção é estimulada por LPS, mitógenos, citocinas pro-inflamatórias e vários patógenos (MOSER, 2004). A ação das quimiocinas se dá via os receptores presentes na superfície das células e é observado um efeito redundante entre eles (quimiocinas-receptor) (MAHALINGAM & KARUPIAH, 1999).

As quimiocinas são determinadas de acordo com os 2 resíduos de cisteína amino-terminal. MCP-1 e RANTES são quimiocinas CC e exercem sua ação em múltiplos subgrupos de leucócitos. MCP-1 atrai principalmente monócito, células T

de memória e células NK (MATSUSHIMA *et al.*, 1989). RANTES é quimiotática para eosinófilos, monócitos, basófilos e células T de memória (ROT *et al.*, 1992, SCHALL *et al.*, 1990).

Relação Alergia - Leishmania.

O aumento da alergia está ocorrendo paralelamente com muitas mudanças sociais como, programas de saúde pública, redução de infecções em crianças, programas de vacinação e mudanças na estrutura e condições de vida familiar.

Mesmo, com o advento de alimentos manufaturados, pequenas quantidades de alérgenos podem ainda, estar presentes na comida e alguns pacientes atópicos continuamente expostos a eles. Nesses indivíduos, a exposição contínua ao alérgeno pode induzir uma condição alérgica de leve a mais severa. Para tentar mimetizar essa situação, nós desenvolvemos um modelo experimental de alergia alimentar em camundongos BALB/c no qual os animais são sensibilizados com ovalbumina (OVA), proteína da clara do ovo, e posteriormente desafiados diariamente com solução de clara de ovo a 20% (SCO). Neste modelo mostramos os eventos iniciais, relacionados ao processo alérgico, como o aumento da permeabilidade vascular e edema intestinal após 6 horas do desafio, pico de eosinófilos, após 48 horas, nas vilosidades do jejuno proximal e 21 dias após, aumento no número de mastócitos, no muco produzido pelas células caliciformes, na produção de IgE anti-OVA e diminuição do peso corpóreo em 20% dos animais alérgicos quando comparados aos controles (SALDANHA *et al.*, 2004).

LEE e colaboradores (2004) mostram a resposta alérgica, com produção de IgE, a uma grande variedade de alimentos que não são normalmente considerados como alergênicos. Os autores descrevem anafilaxia em um indivíduo com alergia a berinjela com reatividade clínica e sorológica cruzada ao látex. Além desse, vários produtos encontrados no cotidiano alimentar de várias culturas, podem ser

considerados alergênicos, como vários frutos e vegetais, entre eles tomate, batata, banana e abacate (BLANCO, 1994).

O contato diário com substâncias alergênicas em pequenas doses pode levar à estimulação do sistema imunológico podendo alterar a resposta frente a outras manifestações imunológicas, como a infecção por parasitas intra ou extracelulares.

No entanto, as condições de saneamento básico não têm evoluído na mesma proporção que as indústrias alimentícias, em países em desenvolvimento como o Brasil. Assim, essa população está exposta a uma grande variedade de infecções causadas por bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Não está esclarecido se hospedeiros com alergia são mais susceptíveis ou resistentes à infecção ao protozoário do gênero *Leishmania*.

A partir do protocolo de imunização com OVA mais o adjuvante hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) em camundongos BALB/c, obtivemos um grupo alérgico. Nesse grupo a água foi trocada por solução de clara de ovo a 20% (SCO) e após 7 dias desse procedimento, esses animais, assim como, seu grupo controle foram infectados com *L. major*. Ao longo das quatro semanas de infecção somente os animais do grupo alérgico perderam peso (20%) quando comparado ao grupo controle. Mesmo diante da perda de peso, não foram observadas alterações em relação à morfologia e morfometria intestinais, à ingestão líquida, à desidratação, ao consumo de ração e nem à desnutrição. Entretanto, nos animais do grupo alérgico observou-se menor desenvolvimento da lesão causada pela infecção com *L. major* quando comparado ao grupo controle.

Portanto, observamos que camundongos BALB/c, conhecidos por apresentarem uma resposta do tipo Th2 à *L. major*, e, conseqüentemente, desenvolverem lesões graves a esse parasita, tornam-se resistentes se o processo alérgico a uma proteína alimentar é desencadeado anteriormente e mantido durante a evolução da doença parasitária. Em nossos estudos *in vitro*, observamos que os macrófagos peritoneais provenientes de camundongos alérgicos foram capazes de produzir mais óxido nítrico frente à *L. major* que macrófagos peritoneais provenientes de camundongos não alérgicos. Esses resultados mostram que a alergia tornou a capacidade leishmanicida do macrófago mais eficaz. No entanto, não está

claro se houve ou não reversão do tipo de resposta de Th2 para Th1 nesses animais, e nem mesmo porque isso ocorreria se a alergia é um processo do tipo Th2.

O sistema imune de humanos e camundongos são similares em muitos mecanismos (DASER *et al.*, 1998) como as respostas do tipo Th1 e Th2 (MOSMANN *et al.*, 1986; ROMAGNANI, 1991) envolvidas nas respostas alérgicas. Em camundongos o fenótipo alérgico pode ser criado sob condições ambientais controladas e com linhagens geneticamente definida. Além disso, há um grande número de reagentes imunológicos para estudar a resposta imune, assim como, animais deficientes ou transgênicos que fornecem ferramentas valiosas para isolar os vários componentes envolvidos nas respostas imunológicas. Estes estudos muitas vezes revelam a redundância das respostas imunológicas dos hospedeiros frente a diversos agentes.

4.1- OBJETIVO GERAL

Investigar mecanismos imunológicos envolvidos na interferência da alergia alimentar com a resistência de camundongo BALB/c alérgico à infecção com *Leishmania major*.

4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Realizar o protocolo de alergia alimentar em camundongos BALB/c, BALB/c IL-4^{-/-}; C57BL/6, IL-10^{-/-}, IFN- γ ^{-/-}, IL-12^{-/-}, iNOS^{-/-} e TNFRp55^{-/-} e avaliar peso dos animais, controle do consumo líquido e de ração e produção de imunoglobulinas (IgE e IgG1 anti-OVA), pelo teste do ELISA.
- 2- Inocular, *L. major* no coxim plantar dos animais e avaliar o desenvolvimento da lesão por mensurações com paquímetro, histopatologia da pata e produção de anticorpo (IgG2a e IgG1) contra antígenos do parasito como medida da resposta Th1 e Th2, respectivamente.
- 3- Realizar em camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de alergia alimentar e infecção com a *L. major* na pata e avaliar a produção de citocinas (IL-4, IL-10 e IFN- γ) secretadas por linfócitos do baço e linfonodo, produção das quimiocinas MCP-1 e RANTES por ELISA e expressão do mRNA das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ por RT-PCR.
- 4- Realizar a técnica de microscopia intravital em cremáster, infectados ou não pelo parasito, em animais BALB/c e C57BL/6, normais e alérgicos e avaliar o rolamento, adesão e transmigração de leucócitos, análise histopatológica do cremáster e coleta de sangue periférico para contagem de leucócitos circulantes nas condições estudadas.

5.1- ANIMAIS.

Foram utilizados camundongos (fêmeas e machos) jovens com 6 semanas de idade, das linhagens BALB/c e do mesmo *background* deficiente para a citocina IL-4 (IL-4 -/-), e C57BL/6 e deficientes para as citocinas IL-10 (IL-10/-/), IFN- γ (IFN- γ -/-), IL-12 (-/-), para o receptor p55 do TNF- α (TNFRp55 -/-) e para óxido nítrico sintase induzida - iNOS (iNOS/-/) todos com *background* C57BL/6. Os animais deficientes foram cedidos pelas professoras Leda Q. Vieira e Jacqueline I. Alvarez-Leite, do Laboratório de Gnotobiologia do Depto. de Bioquímica e Imunologia – ICB – UFMG.

Os camundongos selvagens foram provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-UFMG).

Foram utilizado 5 animais em cada grupo experimental e controle, respectivamente.

5.2- INDUÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR

5.2.1- Antígeno

Foi utilizado como antígeno a OVALBUMINA (OVA, albumina da clara de ovo, SIGMA Grade V, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

5.2.2- Indução alergia

A alergia alimentar foi induzida através da injeção (0,2 mL) de 10 µg ovalbumina (OVA, albumina da clara de ovo, grade V, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) adsorvida em 1 mg Al(OH)₃ como adjuvante via subcutânea no dorso do animal nos dias zero e 14. A ingestão de SCO contendo OVA teve início 7 dias após a sensibilização secundária.

O grupo controle recebeu adjuvante no dia zero e apenas salina após 14 dias, e permaneceu bebendo água ao longo de todo o experimento (Figura 1).

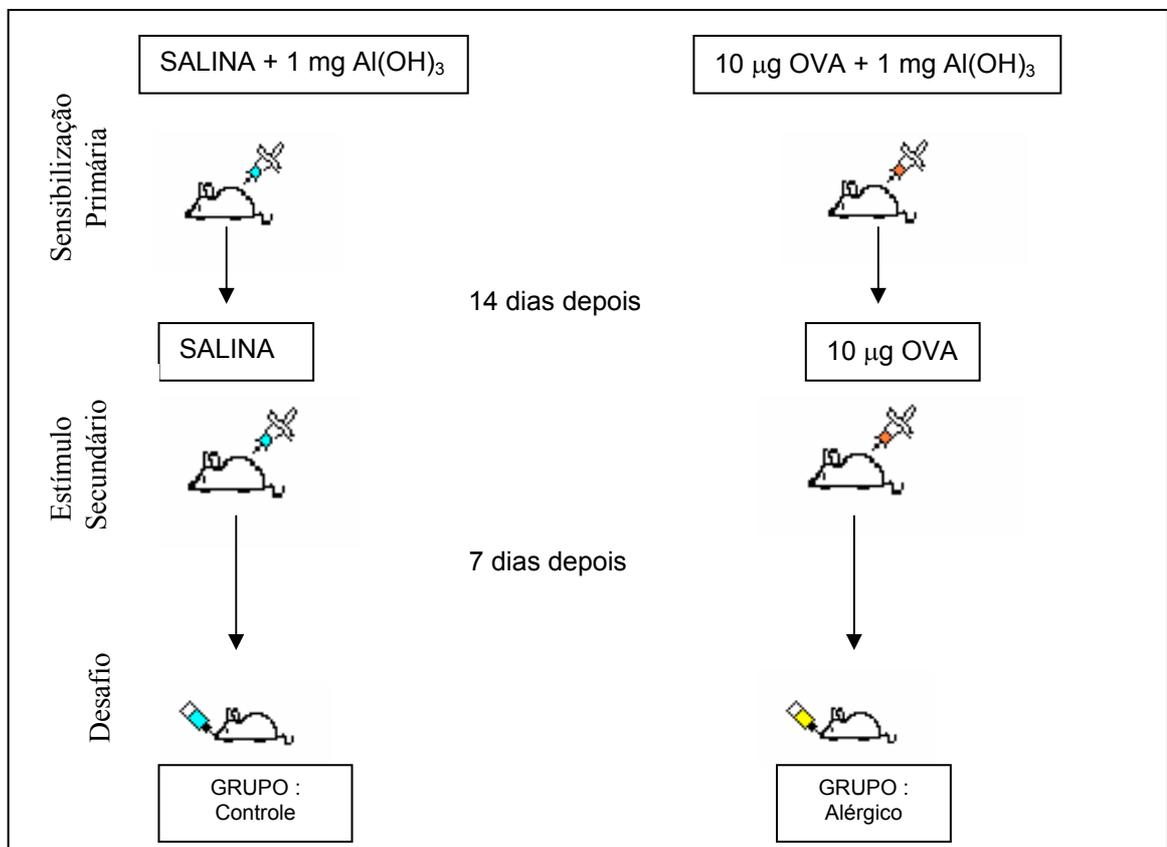


Figura 1: Protocolo Experimental da Alergia – Grupo controle: injeção subcutânea de salina + Al(OH)₃ no primeiro dia, e salina 14 dias após. Grupo alérgico: injeção subcutânea de 10 µg OVA + 1 mg Al(OH)₃ no primeiro dia, e OVA 14 dias após. Dias depois e até o final do experimento grupo alérgico recebeu solução de clara de ovo a 20% em substituição à água.

5.3- Avaliação da Produção de Anticorpos Anti-OVA

5.3.1- Obtenção do Soro

Sete e 81 dias após a sensibilização secundária, em todos os experimentos os animais foram anestesiados com xilazina (20 mg/Kg) e ketamina (100 mg/Kg) para obtenção do sangue. Após coagulação, o sangue foi centrifugado (900 g) por 10 minutos. As amostras do soro foram congeladas (-20° C) para posterior análise qualitativa dos títulos de anticorpos.

5.3.2- Dosagem do Anticorpo IgG1 no Soro

Microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight* (4°C), com 2 µg de OVA diluídos em 100 µl por poço em tampão carbonato pH=9,6 (*Coating Buffer*). Após 18 horas, no mínimo, as placas foram lavadas duas vezes com salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA – solução salina tween) e incubadas, por uma hora, com 200 µl de solução de caseína a 25% em PBS (PBS-caseína) por poço, para bloqueio, à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi desprezada e as placas incubadas, por 1 hora, com 100 µl por poço de seis diluições seriadas dos soros a serem testados, iniciando com a diluição 1:100 (fator de diluição seriada = 0,5 , diluições 1:100 a 1:3200). As placas foram, então lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, por 1 hora (37°C) com anticorpos de cabra anti-IgG1 de camundongo (*Goat anti-mouse IgG1*, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA), diluídos a 1:20000. As placas foram novamente lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas por 1 hora (37°C) com anticorpos de coelho anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase (*Rabbit anti-goat IgG – HRP*,

Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA). As placas foram novamente lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, no escuro, com 100 µl por poço de tampão citrato (pH=5,0) contendo H₂O₂ e ortofenileno-diamino (OPD). Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl por poço de H₂SO₄ a 2%. A densidade óptica foi obtida em leitor de ELISA automático (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com filtro de 492 nm. Em todas as placas foi utilizado um controle positivo padrão (*pool* de soros de animais imunes), um controle negativo (*pool* de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco).

Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (UA), tendo como controle o soro positivo de um animal sensibilizado, onde foi dado um valor de 1000 unidades e as amostras comparadas a partir desse valor na melhor diluição (1:1600).

5.3.3 – Dosagem de IgE anti-Ova por ELISA

Placas de poliestireno (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:250 (Rat anti-mouse IgE, Southern Biotechnology, Birmingham, Inc.) (50 µl/poço) por, no mínimo, 18 horas a 4°C. No dia seguinte, após lavagem e bloqueio (1 hora a temperatura ambiente (TA)) com 200 µl de PBS-caseína. Foram adicionados 50 µl/poço de soro total das amostras de camundongos. Após incubação por 2 horas, as placas foram lavadas com salina-Tween por seis vezes. Foram adicionados 50 µl da OVA-biotinilada (1 mg/mL) por 1 hora a TA. A placa foi novamente lavada com salina-Tween e incubada, agora, com a estreptavidina conjugada com a peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em uma diluição de 1:5000 (50 µl/poço) por mais 45 minutos. Em seguida foi realizada a etapa de revelação com OPD mais H₂O₂ em tampão citrato (100 µl/poço) e as amostras foram lidas em 492 nm em leitor de ELISA (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

Os resultados foram computados através das densidades ópticas e foram expressos como unidades arbitrárias (UA), tendo como controle o soro positivo de

um animal sensibilizado, onde foi dado um valor de 1000 unidades e as amostras comparadas a partir desse valor.

5.4. AVALIAÇÃO GERAL

5.4.1 Avaliação do peso corporal

Todos os animais foram pesados individualmente, uma vez por semana, em balança digital, a fim de se avaliar a variação do peso corpóreo ao longo de todo o experimento. O peso corporal final de cada grupo foi obtido através da média dos pesos.

5.4.2 Avaliação do consumo líquido

As mamadeiras contendo água ou SCO foram pesadas e trocadas diariamente, para avaliação do consumo líquido diário de cada grupo.

5.4.3 Avaliação do consumo de ração

Todos os grupos receberam ração "*ad libitum*" ao longo de todo experimento. Para controle do consumo, a ração foi pesada antes e depois de ser colocada nas gaiolas.

5.5- INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *LEISHMANIA*

5.5.1- Parasita.

Foi utilizada a *Leishmania major* da linhagem Friendlin clone IV (MHOM/IL/80/Friendlin), mantidas no laboratório de Gnotobiologia sob responsabilidade da prof^a Leda Q. Vieira, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG.

5.5.2 - Infecção *in vivo*

Com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis estéreis, os grupos estudados submetidos aos protocolos de sensibilização foram inoculados subcutâneamente na pata posterior esquerda com 1×10^7 promastigotas de *Leishmania major* no início da fase estacionária em 50 μ l de PBS, sete dias após o desafio com SCO permanecendo infectados por 6/8 semanas. (Figura 2).

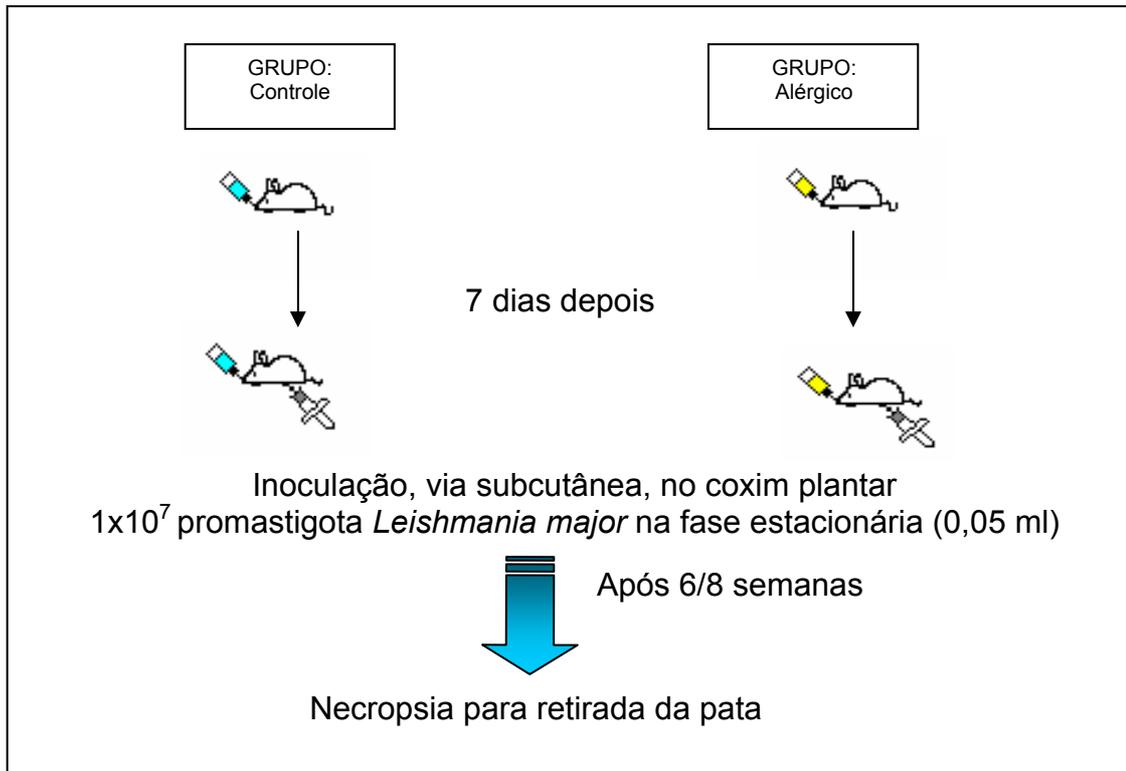


Figura 2- Protocolo Experimental da infecção por *Leishmania major* – Os animais, submetidos protocolo da alergia foram inoculados com 1×10^7 promastigota, *L. major* na fase estacionária (0,05 ml), no coxim plantar via subcutânea, permanecendo infectados por 6/8 semanas.

5.5.3 - Avaliação do tamanho da lesão

A evolução da infecção foi realizada através de observações macroscópicas e de mensurações com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo-Shock proof). Foram feitas medidas da pata posterior esquerda (infectada) e direita (não infectada) duas vezes por semana pelo período de 8 semanas. A diferença entre estas medidas, expressa em milímetros, representou o tamanho da lesão.

5.5.4 – Histopatologia

Após o término de cada experimento na 6^a/8^a semana, os animais foram anestesiados com xilazina (20mg/Kg) e ketamina (100mg/Kg), retirado sangue pelo plexo axilar, para obtenção do soro, e sacrificado para retirada do coxim plantar que foi colocado em solução tamponada e formol à 10% para análise histopatológica.

O material fixado foi preparado para histologia por desidratação em soluções sucessivas de álcoois, clarificado em xilol, incluído em parafina, cortado em secções de 4 µm de espessura em micrótomo (American Optical), montados em lâminas de vidro, corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e examinados em microscópio óptico (OLYMPUS B 201).

5.5.5- Avaliação da produção de anticorpos anti-*Leishmania*

Para avaliação de produção de anticorpos IgG1 e IgG2a, o soro dos animais após 6/8 semanas de infecção foi testado através do ELISA.

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com o antígeno de *L. major* (AgLm) 10 µg/mL a 4°C no dia anterior. Após esse tempo, foram lavadas com salina-Tween e feito o bloqueio com PBS/BSA 1% a 37°C por 1 hora. Posteriormente foram lavadas com salina-Tween e foram adicionadas as amostras na diluição 1:50 por 2 horas a 37°C. Após lavar 5 vezes com salina-Tween, foi acrescentado o isotipo IgG1 (*Goat anti-mouse IgG1*, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) ou IgG2a (*Goat anti-mouse IgG2a*, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) na diluição 1:10000, por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas e acrescentados anticorpos de coelho anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase (*Rabbit anti-goat IgG – HRP*, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) (1:2000) por 1 hora a 37°C. Após lavagem, foi acrescentada a solução reveladora contendo OPD mais H₂O₂ sendo mantida em local protegido da luz a TA.

A reação foi parada com H₂SO₄ (1:20) e as amostras foram lidas em 492 nm em leitor de ELISA (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

5.6- AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS

5.6.1-Avaliação da produção das citocinas *in vitro*

O padrão de citocinas produzidos pelos animais foi estabelecido a partir de células do baço e linfonodos poplíteos dos camundongos BALB/c.

Suspensões de células do baço e linfonodos poplíteos foram preparadas de acordo com o método descrito por TAYLOR e colaboradores (1987). Os órgãos foram retirados e macerados com 2 ml de RPMI 1640. Em seguida, a suspensão de células obtidas foi transferida para um tubo de 15 mL. Com uma pipeta Pasteur, a suspensão foi retirada deixando-se os debrís no fundo do tubo. A suspensão de células em meio foi transferida para outro tubo e centrifugada a 400g por 5 minutos. No caso do baço, o sobrenadante foi desprezado e 9 mL de água bidestilada foram acrescentados ao tubo para lisar as hemácias. Imediatamente, foi adicionado 1 mL de PBS 10x concentrado. A suspensão foi centrifugada novamente a 400g por 5 minutos, ressuspendidas em meio completo (RPMI 1640 enriquecido com 2mM de L-glutamina, 50 µM de 2-mercapto-etanol, 100 U/mL de penicilina e 5-10% de soro fetal bovino inativado) e contadas. As células (1×10^7 células/mL) foram colocadas em placas de 96 poços e estimuladas com o mitógeno concanavalina A (Con-A) (1µg/mL), o antígeno OVA (1mg/mL), antígeno da *Leishmania* (20 µg/mL AgLm) e OVA + antígeno da *Leishmania*, diluídos em meio completo. As placas foram incubadas a 37°C em estufa umidificada em atmosfera de 5% de CO₂, e o sobrenadante coletado 72 horas após para a dosagem de citocinas por ELISA, conforme recomendado pelo fabricante (RD System, Minneapolis, Minn.). Foram dosadas IL-10, IL-4, IL-5 e IFN-γ.

5.6.2- Avaliação da produção de quimiocinas

Foram dosadas as quimiocinas MCP-1 e RANTES nas patas de animais BALB/c controle e alérgico, após infecção por 6 semanas (como descrito por REES *et al.*, 1999). Cem miligramas da pata infectada ou não, de animais alérgicos e controle, foram retirados durante a necrópsia e mantidos a temperatura de -20°C. As amostras com PBS contendo antiproteases (0.1 mM PMSF, 0,1 nM benzethonium clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween20 após centrifugação por 10 minutos a 3000 g, o sobrenadante foi utilizado para o ensaio de ELISA diluídos 1:3.

Placas de ELISA foram cobertas com anticorpo policlonal anti-RANTES e MCP-1 (RD System, Minneapolis, Minn.) de camundongo (1-2 µg/ml) e incubadas a 4° C por 24 horas. As placas foram então lavadas 3 vezes, a reação bloqueada pela adição de albumina bovina 1% e deixadas em agitação horizontal durante 1 hora. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com amostras ou quimiocina recombinantes de rato por 24 horas. Os anticorpos policlonais biotinizados foram usados com diluição de 1:1000. Para detecção foram utilizados estreptoavidina e OPD como substrato. A curva padrão foi feita utilizando as concentrações de 1000, 500, 250, 125, 60, 30 e 15 pg/mL. A leitura foi realizada a 490 nm.

5.6.3- Avaliação da produção das citocinas através do RT-PCR:

Amostras das patas dos camundongos BALB/c foram tratadas com RNAsol (solução desnaturante que contém inibidores de RNase), maceradas com auxílio de um homogeneizador e estocadas a -70°C para posterior utilização. A esta temperatura o RNA mensageiro permanece conservado.

Após descongelamento, foi adicionado clorofórmio às amostras, mantidas em banho de gelo por 15 min. Após, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 4°C. e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos eppendorf, aos quais foi adicionado igual volume de isopropanol. Após estocagem por 15 min. a -20°C, as

amostras foram centrifugadas por 15 min a 4°C, quando então, foi possível visualizar um pequeno pellet branco contendo o RNA que então foi lavado com etanol 95%, seco e ressuspendido em água DEPC. O material permaneceu conservado a -70°C para uso posterior.

As amostras foram diluídas em água bidestilada, em placas de quartzo de 96 poços, para determinação da densidade óptica. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O cálculo da concentração, em µg/µL, foi efetuado a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Valor da leitura em 260nm} \times \text{fator de diluição das amostras} \times \text{coeficiente de extinção de RNA (40)}}{1.000}$$

A transcrição de fita simples de RNA em fita de cDNA foi realizada utilizando-se uma máquina de PCR. Inicialmente, foi adicionada às amostras de RNA (previamente diluídas a 0,1 µg/µL) uma solução contendo 2,5 mM de deoxinucleotídeos trifosfato (DNTPs), 0,1 M de ditioneitol (DTT), RNAsin (inibidor de RNase), 7,5 pM de oligonucleotídeos e água bidestilada. Essas soluções foram incubadas a 70°C por 5 min e resfriadas a 4°C por 5min. Foi então, adicionada a enzima transcriptase reversa e as soluções deixadas à temperatura ambiente por mais 5 min. A seguir, incubadas a 37°C por 60 min., a 90°C por 5 min e em banho de gelo por 5 min. O produto final foi diluído por adição de 87,5 µl de água bidestilada autoclavada e estocado a -20°C.

A viabilidade das amostras de cDNA obtidas foi verificada pela realização de reação de PCR para HPRT usando a expressão de um gene constitutivo como controle positivo para os experimentos.

A reação de PCR permite a amplificação de sequências específicas de DNA através da ação de uma enzima DNA polimerase termoestável, possibilitando o estudo da expressão de genes. Para tal, foi utilizada uma solução contendo 2,5 mM de DNTPs, 15 mM de tampão para a enzima Taq polimerase com MgCl₂, iniciadores 3' e 5' (senso e anti-senso) da citocina desejada, enzima Taq polimerase, água

bidestilada autoclavada e os cDNAs preparados anteriormente. As amostras passaram, então, por processos de desnaturação, anelamento e extensão das fitas de cDNA, possibilitando a obtenção das cópias dos cDNAs específicos para as diferentes citocinas. Esses processos sofreram vários ciclos de repetição para obtenção de quantidade suficiente de material para análise posterior através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

5.7- AVALIAÇÃO DO RECRUTAMENTO CELULAR PELA MICROSCOPIA INTRAVITAL

O músculo cremáster infectado ou não pela *L. major* de camundongos BALB/c e C57BL/6, dos grupos: alérgico e controle, foi usado para o estudo do comportamento de leucócitos na microcirculação e tecidos conjuntivos adjacentes, onde procuramos avaliar o rolamento, adesão e migração.

Previamente, os animais foram anestesiados por uma solução contendo xilazina (20 mg/Kg) e ketamina (100 mg/Kg). Foi introduzida uma cânula (EP10) em sua jugular e mantida para administração do anestésico. Após este procedimento, o animal foi levado a uma base de acrílico onde teve o músculo cremáster dissecado e exposto, com o auxílio de fios de sutura presos em suas bordas. O tecido exposto foi mantido aquecido e úmido através da superfusão com solução tampão (pH=7,4).

A visualização foi feita através de microscópio OLYMPUS conectado a videocâmera, que levava a imagem para um monitor de televisão. A imagem foi gravada em videocassete para posterior análise do número de leucócitos em rolamento, aderidos e transmigrados.

O rolamento foi avaliado contando-se o número de células que passavam por um determinado ponto durante 5 minutos, expressando-se o número de células/minuto. Foi considerada aderente, a célula que permaneceu estacionária por pelo menos 30 segundos. Foi contado o número de células migradas no espaço de 100 µm durante os 5 minutos, sendo o valor expresso em número de células/100µm.

O tecido foi posteriormente fixado e realizado sua histologia para análise do tipo celular.

5.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise de variância (ANOVA-TUKEY) para as diferenças na resposta entre os grupos de linhagens diferentes. Para análise de dois grupos experimentais foi utilizado o TESTE T DE STUDENT.

**6.1-PARÂMETROS DA ALERGIA NOS GRUPOS DE ANIMAIS
DEFICIENTES**

6.1.1- AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS ANTI-OVA

Exceto o grupo de camundongos BALB/c IL-4 $-/-$ deficientes para a citocina IL-4, todos os demais grupos sensibilizados com OVA apresentaram significativos níveis de IgG1 e IgE (Fig. 3).

A ingestão prolongada através da solução contendo o antígeno (ovalbumina) foi capaz de manter os níveis significativos dos anticorpos nos grupos sensibilizados ao longo de todo o experimento; com exceção dos camundongos BALB/c IL-4 $-/-$ (Fig. 4).

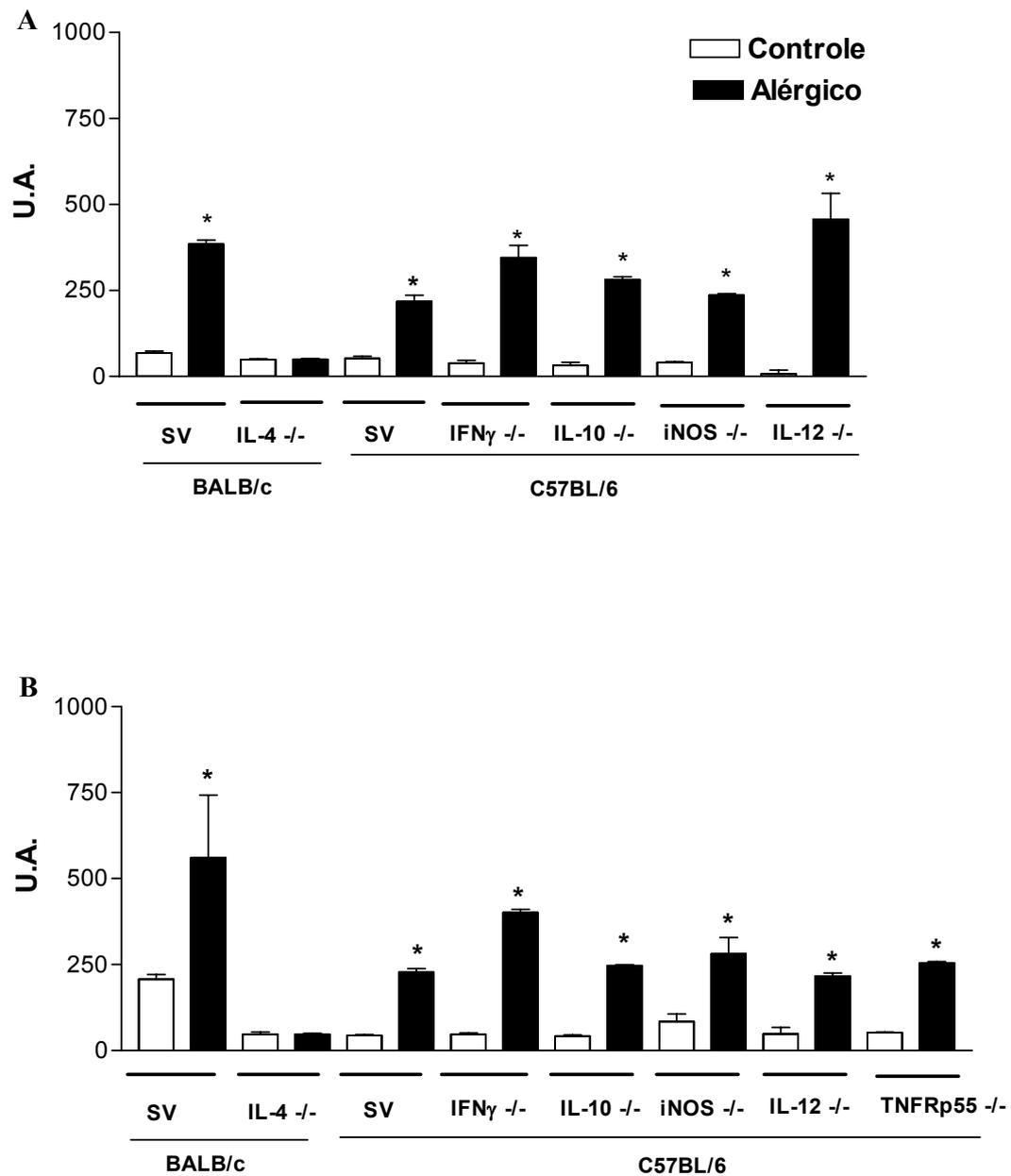


Figura 3: Avaliação dos anticorpos IgG1 (A) e IgE (B) antes do desafio com SCO. Camundongos BALB/c, IL-4^{-/-}, C57BL/6, IL-10^{-/-}, IFN- γ ^{-/-}, iNOS^{-/-}, IL-12 e TNFRp55^{-/-} receberam 10 μ g de OVA mais 1mg de Al(OH)₃ no dia 0 e OVA no dia 14. O grupo controle recebeu Al(OH)₃ no dia 0 e salina no dia 14. As barras representam a média dos valores obtidos na diluição 1:1600 para IgG1 e o soro total para IgE comparado ao soro positivo sendo considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). Foram utilizados 5 animais/grupo. * P < 0.05 em relação ao seu grupo controle. Selvagem (SV)

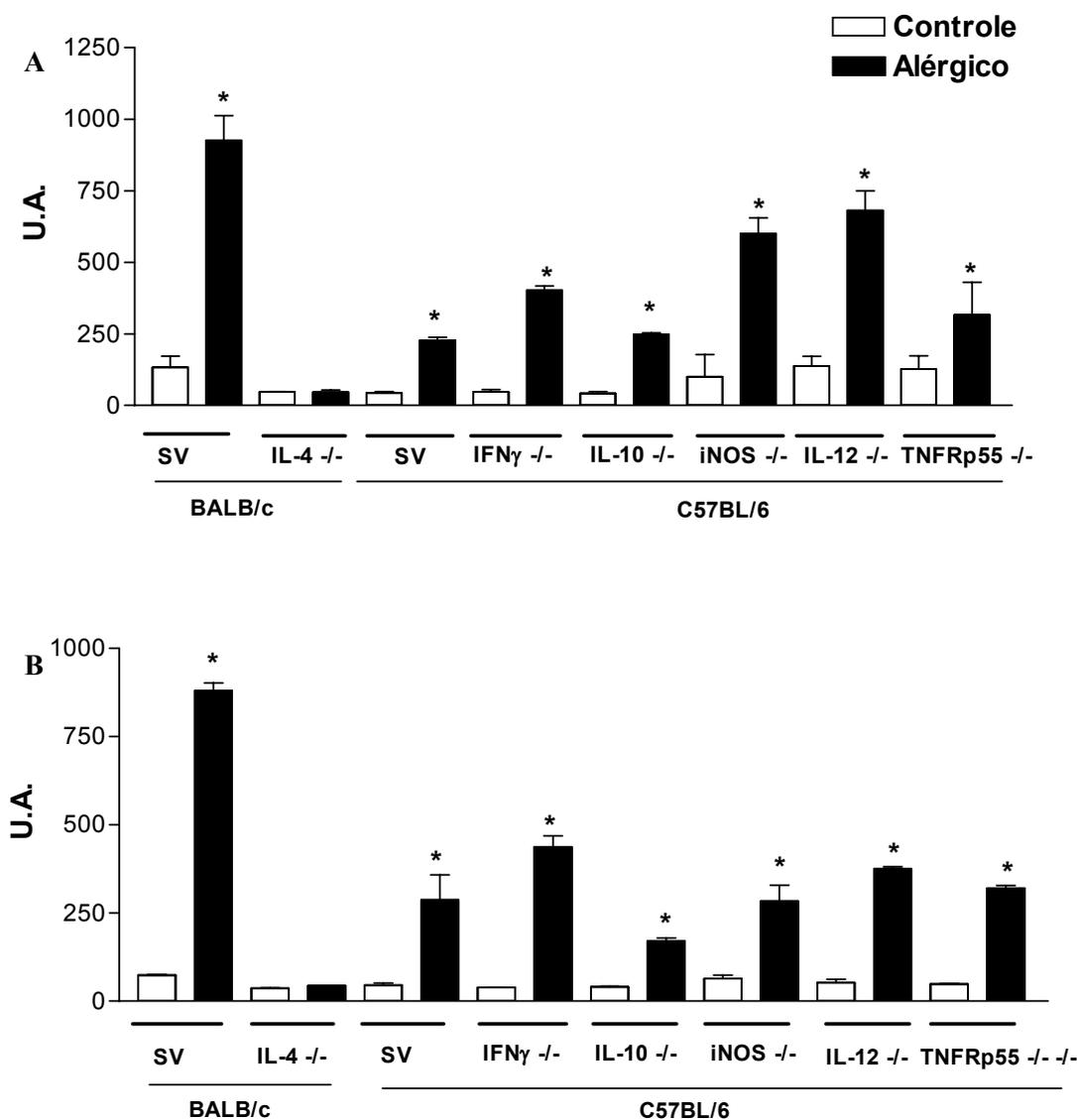


Figura 4 – Avaliação dos anticorpos IgG1 (A) e IgE (B) no soro após ingestão de SCO. Camundongos BALB/c, IL-4 -/-, C57BL/6, IL-10 -/-, IFN- γ -/-, iNOS -/-, IL-12 -/- e TNFRp55 -/- foram sensibilizados com 10 μ g de OVA mais 1mg de Al(OH)₃ no dia 0 e apenas OVA no dia 14. O grupo controle recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a segunda sensibilização a água dos grupos sensibilizados foi substituída por SCO por 35 dias. As barras representam a média dos valores obtidos na diluição 1/1600 para IgG1 e o soro total para IgE comparado ao soro positivo, considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). Foram utilizados 5 animais/grupo. * P < 0.05 em relação ao seu grupo controle. Selvagem (SV). Solução de clara de ovo a 20% (SCO)

6.2- AVALIAÇÃO GERAL DOS GRUPOS DE CAMUNDONGOS

A Figura 5 A demonstra que os camundongos BALB/c sensibilizados tiveram perda de peso em torno de 20% após o contato com o antígeno através da SCO que permaneceu ao longo do experimento, o que não aconteceu com os camundongos BALB/c IL-4^{-/-} (Fig. 5B). Já em camundongos IL-4^{-/-}, mesmo sendo do mesmo *background*, isso não foi observado.

Camundongos C57BL/6 ou deficientes para o mesmo *background* não mostraram perda de peso em momento algum do experimento (Fig. 5 C, D E, F, G e H).

A Fig. 6 A, B, C, D E, F, G e H mostra que não houve redução da ingestão de ração pelos animais durante todo o experimento, independentemente do *background* genético.

Não foi observada diferença na ingestão líquida entre os grupos alérgicos à OVA quando comparado aos seus grupos controles (Fig. 7 A, B, C, D, E, F, G e H).

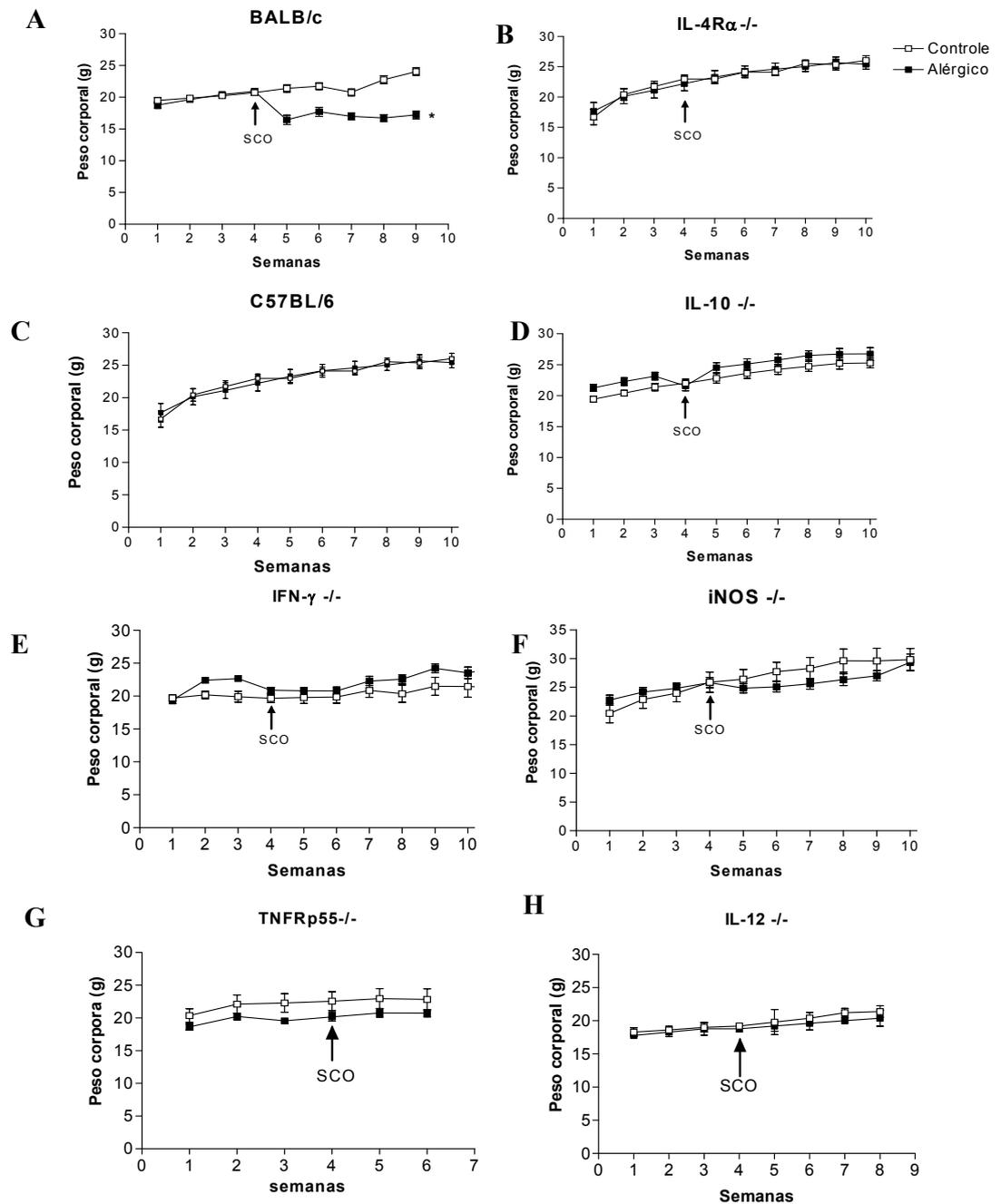


Figura 5 – Controle do peso corporal. Camundongos BALB/c, IL-4 -/-, C57BL/6, IL-10 -/-, IFN- γ -/-, iNOS -/-, IL-12 -/- e TNFRp55 -/- receberam 10 μ g OVA + 1mg Al(OH)₃ (dia 0) e OVA no dia 14. O grupo controle recebeu Al(OH)₃ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária a água dos grupos sensibilizados foram substituídas por SCO. Os animais foram pesados semanalmente. Foram utilizados 5 animais/grupo. * P < 0.05 em relação ao seu grupo controle. Solução de clara de ovo a 20% (SCO)

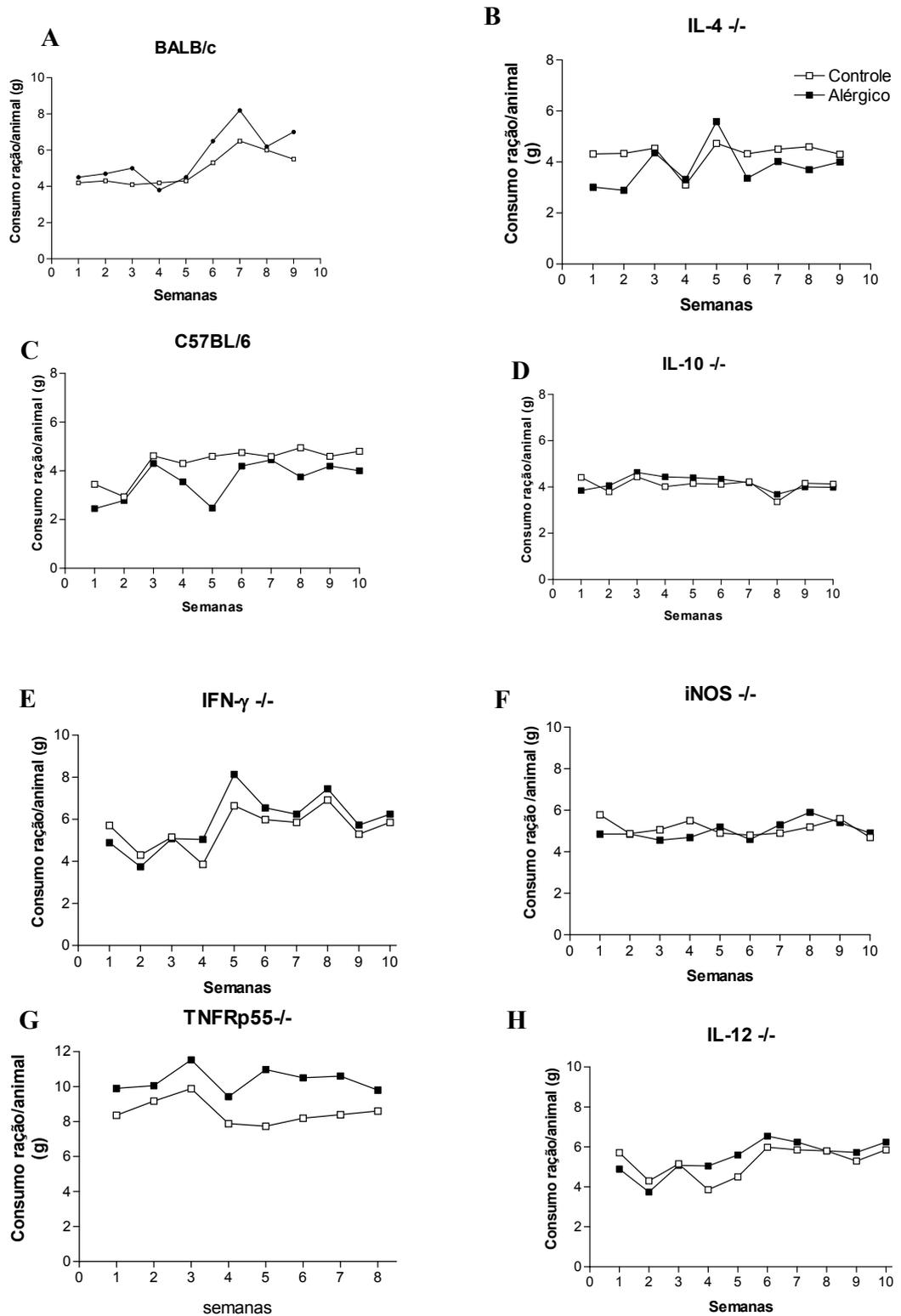


Figura 6 – Controle do consumo de ração por camundongos BALB/c (A), IL-4 -/- (B), C57BL/6 (C), IL-10 -/- (D), IFN- γ -/- (E), iNOS-/- (F), TNFRp55 -/- (G) e IL-12 -/- (H) durante e após a sensibilização com ovalbumina. Os dados representam o consumo médio semanal por animal.

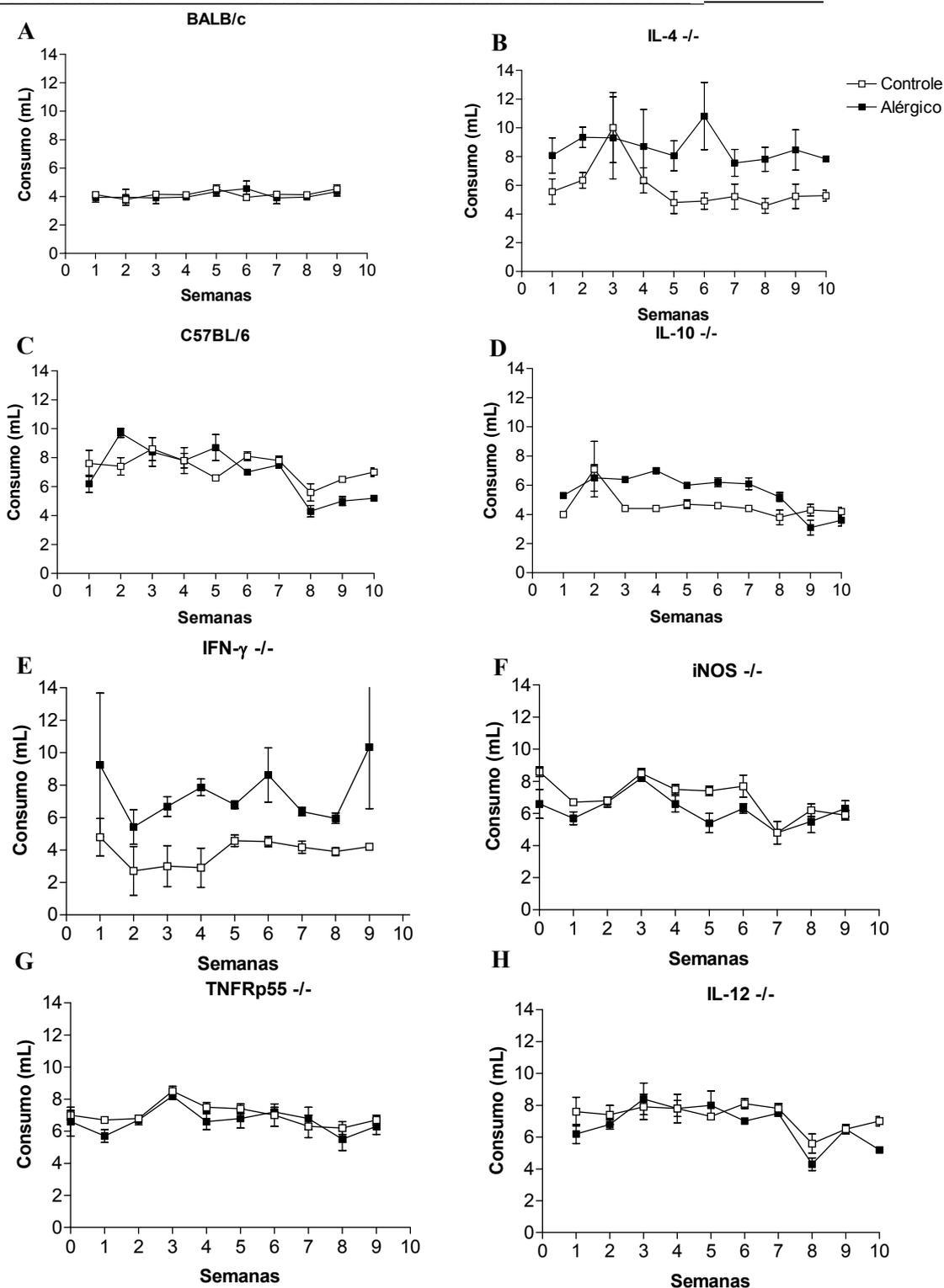


Figura 7 - Controle do consumo de líquido por camundongos BALB/c, IL-4 -/-, C57BL/6, IL-10 -/-, IFN- γ -/-, iNOS-/-, IL-12 -/- e TNFRp55 -/- que receberam OVA + Al(OH)₃ (dia 0) e OVA no dia 14. Em relação a seus controles que receberam Al(OH)₃ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária a água dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO. Os dados representam o consumo de líquido semanal dos grupos. Solução de clara de ovo 20% (SCO)

6.3 - PARÂMETROS DA INFECÇÃO PELA *LEISHMANIA MAJOR* NOS GRUPOS DE ANIMAIS DEFICIENTES COMPARADO AOS SELVAGENS

6.3.1 - Análise do tamanho da lesão

A Fig. 8 A, B, C, D, E, F, G e H mostra a evolução das lesões provocadas por *L. major* injetada do coxim plantar dos camundongos BALB/c e BALB/c IL-4^{-/-}, C57BL/6 e nos deficientes C57BL/6 IL10^{-/-}, IFN- γ , iNOS^{-/-}, IL-12^{-/-} e TNFRp55^{-/-}, respectivamente.

Fig. 8 A mostra nos controles uma curva de evolução normal de *L. major* nos camundongos BALB/c. Os animais alérgicos, embora, infectados mostram lesões significativamente menores que os seus controles ($p < 0,05$). Os animais do mesmo background IL-4^{-/-}, as lesões foram menores, independente da presença da alergia e tenderam para a cura.

Em relação aos animais C57BL/6, sabidamente resistentes à infecção por *L. major* ocorreu entre aqueles deficientes, respectivamente IFN- γ ^{-/-} (Fig. 8E), iNOS^{-/-} (Fig. 8F), IL12^{-/-} (Fig. 8G) e TNFRp55^{-/-} (Fig. 8H) evolução de lesões, de diferentes curvas e tamanhos sem tendência ao controle. Não houve, entretanto diferença na evolução entre os animais alérgicos e seus controles.

Na tentativa de elucidar se o desenvolvimento de lesão pelo camundongo BALB/c alérgico seria dependente do estímulo alérgico, durante o acompanhamento da lesão em um grupo de animais foi suspensa a pressão alérgica, substituindo a solução de clara a 20% por água pura. O resultado é apresentado na Figura 9, onde pode ser observado que a suspensão do alérgico, determinou a presença de lesões de tamanho menor, que apresentaram aumento tão logo foi substituída a solução ingerida pelo grupo alérgico.

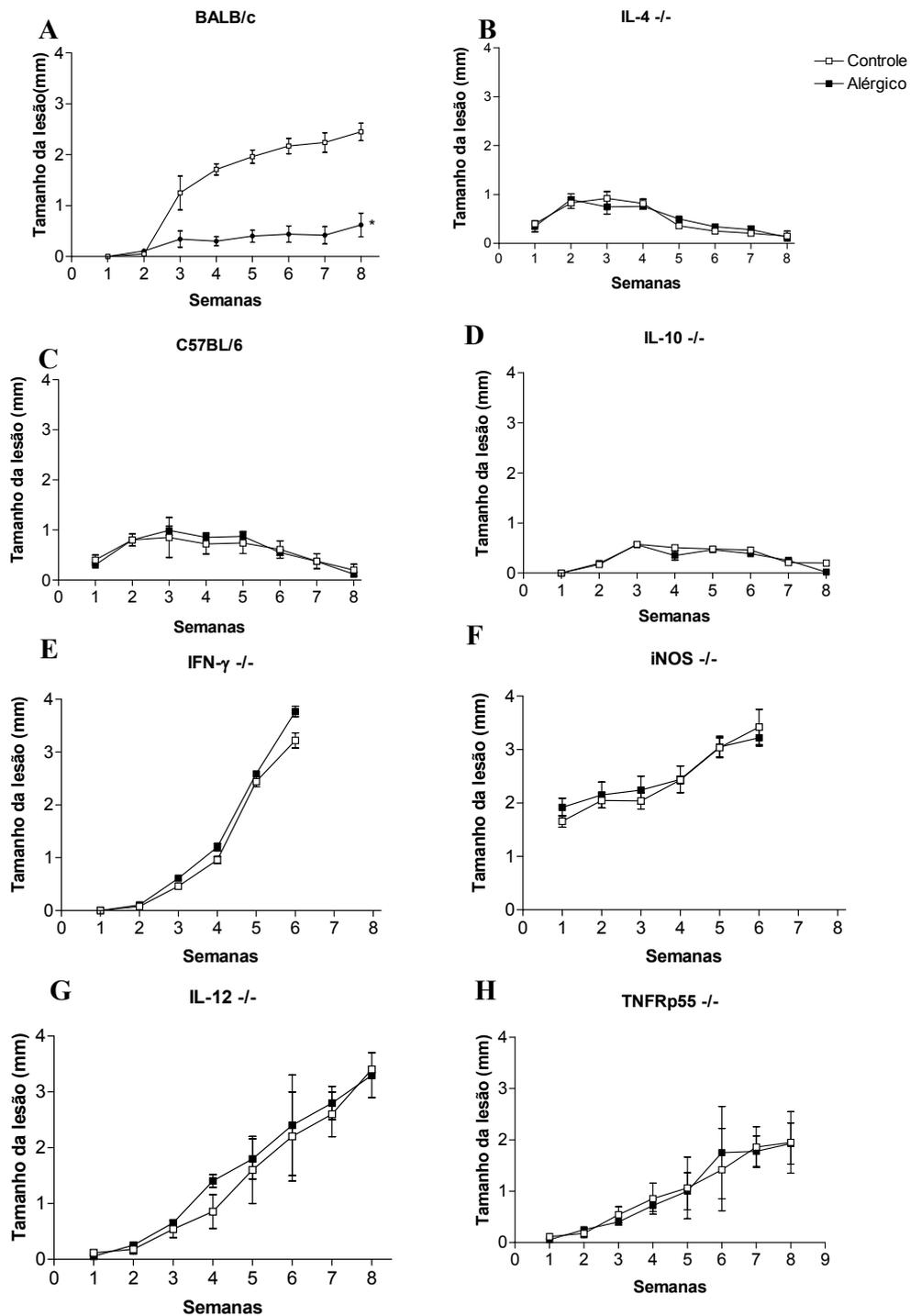


Figura 8 - Tamanho da lesão na pata infectada com *Leishmania major*, ao longo de 8 semanas. Camundongos BALB/c, IL-4 $-/-$, C57BL/6, IL-10 $-/-$, IFN- γ $-/-$, iNOS $-/-$, IL-12 e TNFRp55 $-/-$ após sensibilização e desafio com OVA presente na SCO, foram inoculados com 1×10^7 promastigota de *L major* na fase estacionária no coxim plantar, via subcutânea, permanecendo 6/8 semanas infectados. Cada ponto representa a média \pm erro padrão. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

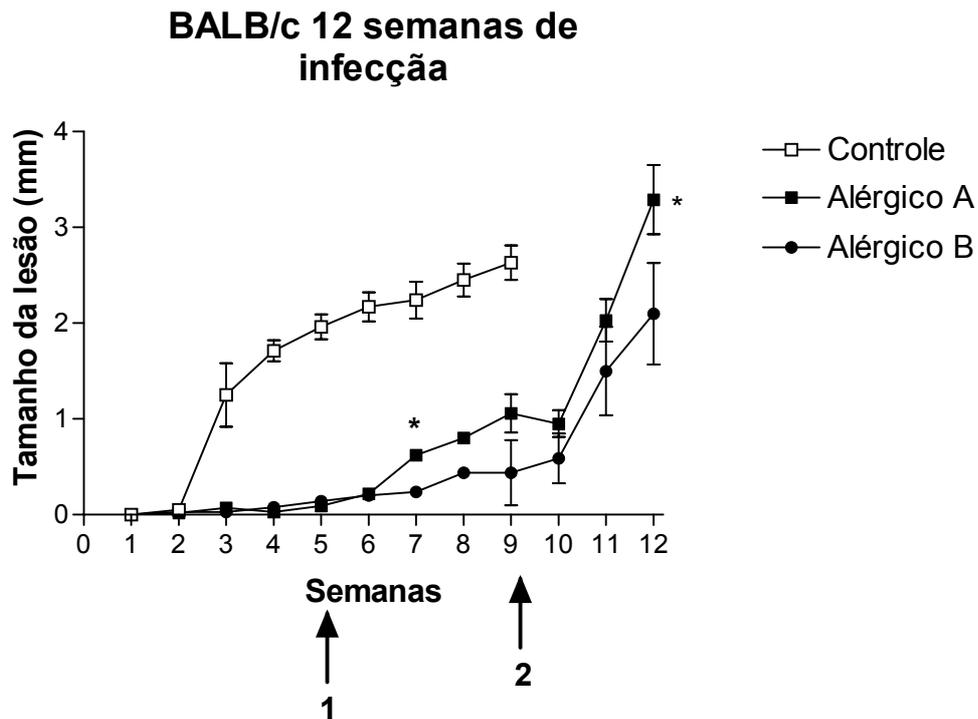


Figura 9 - Variação do tamanho da lesão da pata infectada com *Leishmania major* em animais BALB/c ao longo de 12 semanas. Camundongos BALB/c receberam OVA + Al(OH)₃ (dia 0) e OVA no dia 14. O grupo controle recebeu Al(OH)₃ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária a água dos grupos alérgicos (A e B) foi substituída por SCO. Todos foram inoculados com 1×10^7 promastigota de *L major* na fase estacionária no coxim plantar, via subcutânea permanecendo 1 semana infectados. Cada ponto representa a média \pm erro padrão. * $P < 0,05$ em relação ao grupo alérgico B. 1 indica a troca da mamadeira contendo SCO por água no grupo alérgico A. 2 indica nova troca, onde o grupo A voltou a beber SCO e o grupo B teve a SCO trocada por água. Solução de clara a 20% (SCO)

6.3.2 - Análise histopatológica das patas

A análise histopatológica das patas dos camundongos BALB/c, apresentaram extensas áreas de necrose com destruição do epitélio de revestimento como mostra a Figura 10 A coradas por hematoxilina-eosina. Na derme e hipoderme observou-se uma reação inflamatória intensa e difusa com exsudato celular predominantemente composto de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos) com granulócitos neutrófilos e eosinófilos (Fig. 10B). Os macrófagos, por sua vez, mostraram-se na sua maioria com o citoplasma de aspecto vacuolizado (Fig. 10C) e por vezes repletos de formas amastigotas de *Leishmania*.

Os camundongos BALB/c alérgico apresentaram pequenas áreas de necrose com preservação do tecido epitelial (Fig. 10D). Observou-se ainda na derme e hipoderme uma reação inflamatória que variou de discreta a moderada e difusa, composta por células mononucleares e alguns granulócitos neutrófilos e eosinófilos de permeio. Raros foram os macrófagos vistos com amastigotas intracelulares.

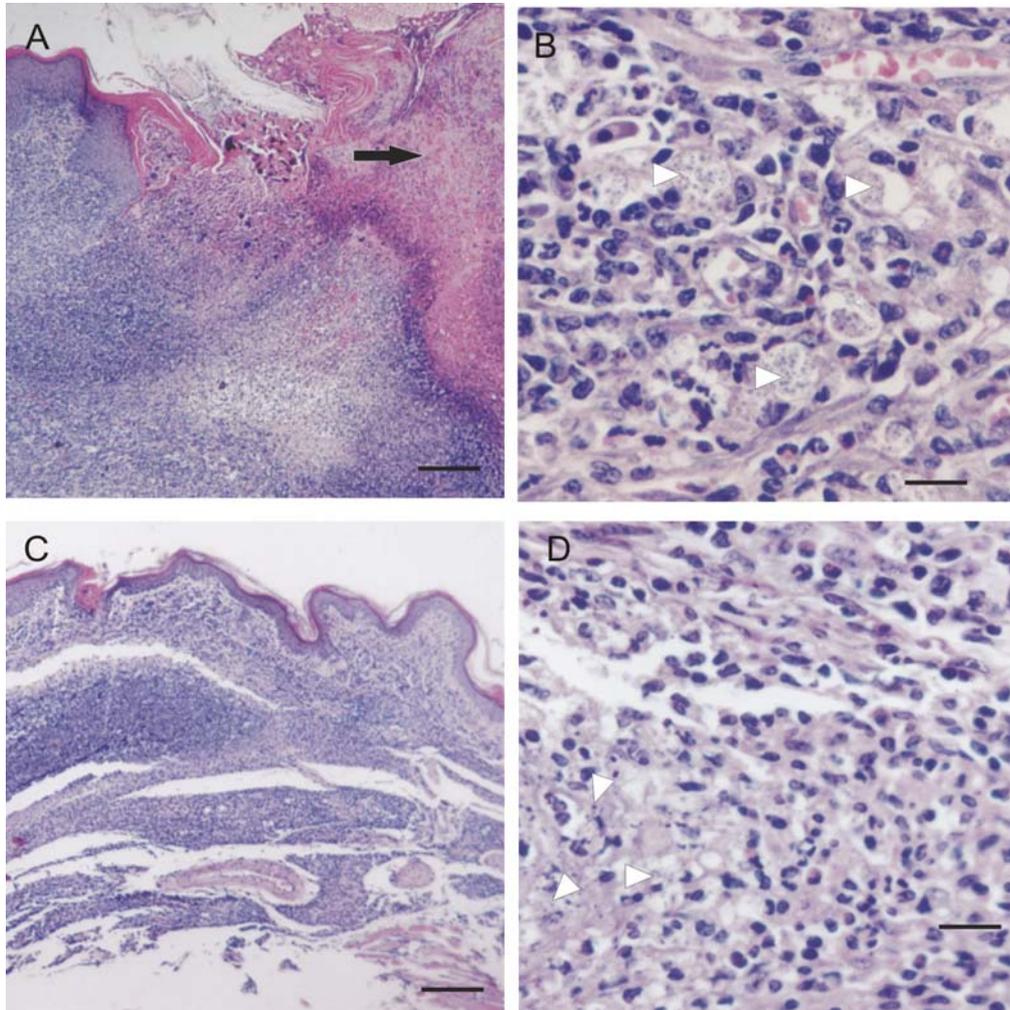


Figura 10 – Microfotografia de cortes histológicos da lesão de patas de comunfungos infectados por *L. major*. A e B mostram secções representativas da pata de camundongos BALB/c controle. A- área de necrose (seta) e intenso infiltrado inflamatório (*). B- presença de inúmeras amastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos (cabeça de seta). C e D são representativas da pata de animais BALB/c alérgico. C- preservação da epiderme e infiltrado inflamatório na derme (*). D- amastigotas no interior das células (cabeça de seta). Barras 250 μm A e C, B e D 25 μm . Hematoxilina e Eosina.

6.3.3 – Expressão de RNAm para as citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ através do RT-PCR na pata infectada.

A Fig. 11 demonstra a expressão de mRNA, através de RT-PCR, da pata de dois animais. A expressão do mRNA, para IFN- γ foi maior nos camundongos BALB/c do grupo alérgico, quando comparado ao controle. Já a expressão de IL-4 foi bem menor nos grupos alérgicos, em comparação ao grupo controle. Não houve diferença na expressão de IL-10 entre os grupos.

6.3.4- Avaliação da produção de citocinas em ensaio *in vitro* por ELISA

As células do baço e linfonodo poplíteo dos camundongos BALB/c alérgicos e de seus controles foram estimuladas, *in vitro*, para produzirem citocinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ) através de diferentes estímulos (con-A, OVA e AgLm) (Fig. 12).

A produção das citocinas pelas células do baço dos animais do grupo alérgico infectado foi maior que o controle infectado, quando estimulados pelo con-A e AgLm. Os níveis de produção foram maiores para IFN- γ (Fig. 12C) e IL-10 (Fig. 12G), quando comparado aos níveis de IL-4 (Fig 12K) produzidos pelos animais alérgicos. A citocina IL-5 teve uma produção significativa quando as células foram estimuladas com a OVA nos animais alérgicos infectados ou não (Fig. 12M e Fig. 12O).

A análise dos níveis de produção de citocinas no linfonodo poplíteo, que é um órgão que caracteriza a resposta local a infecção, demonstra que há um aumento para IFN- γ (Fig. 12B) nos animais alérgicos quando estimulados com con-A, mesmo sem estarem infectados com o parasito. A produção de IFN- γ (8656 pg/mL; Fig. 12B) foi maior que a observada para IL-4 (118 pg/mL; Fig. 12J) nos animais alérgicos. Não foi detectada diferença entre os grupos controle e alérgico quando o estímulo utilizado era o AgLm (Fig. 12D e Fig 12L).

Não houve diferença quanto à produção de IL-10 (Fig. 12H) entre os grupos controle e alérgico-infectados independentemente do estímulo. Quanto à produção de IL-5 (Fig. 12P), os animais alérgicos produziram maiores concentrações que os animais controles com todos os estímulos empregados. A produção de IL-10 foi muito baixa no linfonodo poplíteo de animais não infectados, já que eles não apresentavam nenhuma outra lesão próxima ao órgão (Fig. 12F).

Os resultados demonstram que a alergia é dependente de uma resposta tipo Th2. Como visto, houve maior produção de IL-4, IL-5 e IL-10, mas existe um contexto nos animais alérgicos em que leva a uma maior produção do IFN- γ , que é produzida em uma resposta tipo Th1. Essa resposta Th1 reflete o perfil da infecção a *L. major* observado nesses animais.

Os resultados da ELISA anti-*Leishmania* demonstram que os camundongos BALB/c alérgicos, assim como os controles, tiveram os níveis de IgG1 elevados. No entanto, o grupo alérgico apresentou diferença significativa nos níveis de IgG2a, que é um anticorpo que está associado ao perfil Th 1. Esse resultado confirma a resposta frente ao parasito nos camundongos BALB/c alérgicos. Em relação aos demais animais estudados, sendo controle ou alérgicos, os níveis de IgG2a foram significativamente mais elevados nos animais que mostraram uma resistência à infecção, enquanto os níveis de IgG1 foi maior nos grupos com perfil de susceptibilidade (Fig.13).

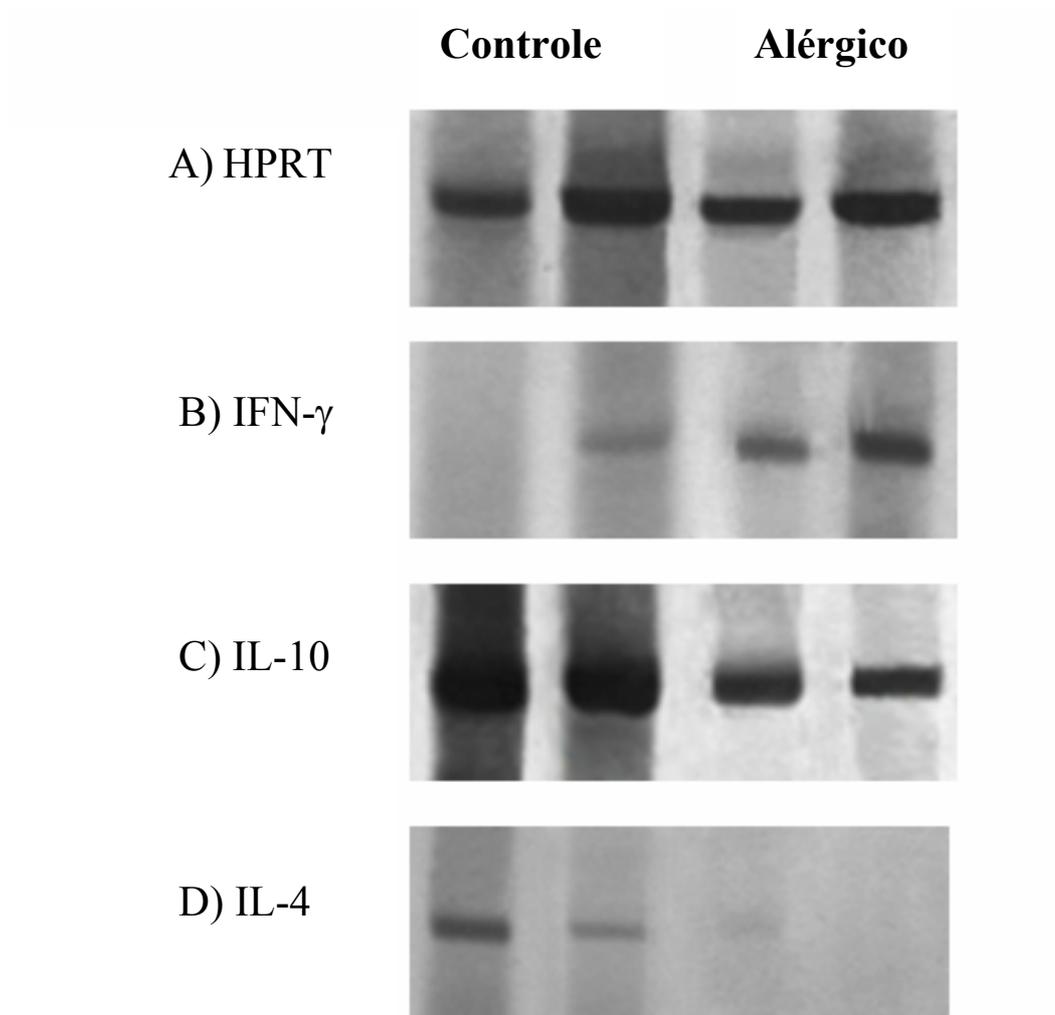


Figura 11 – Expressão de RNAm para IFN- γ , IL-4 e IL-10 através de RT-PCR após 4 semanas de infecção. Os animais BALB/c após sensibilizados, desafiados com o antígeno OVA e seus controles, foram infectados com *L. major* por 4 semanas. As patas foram coletadas e foi extraído o RNA total e feito o RT-PCR com os primers específicos para IFN- γ (B), IL-10 (C) e IL-4 (D) e gene constitutivo HPRT, usado como controle para a integridade de cada amostra. Gel representativo com 2 amostras/grupo de 2 experimentos independentes.

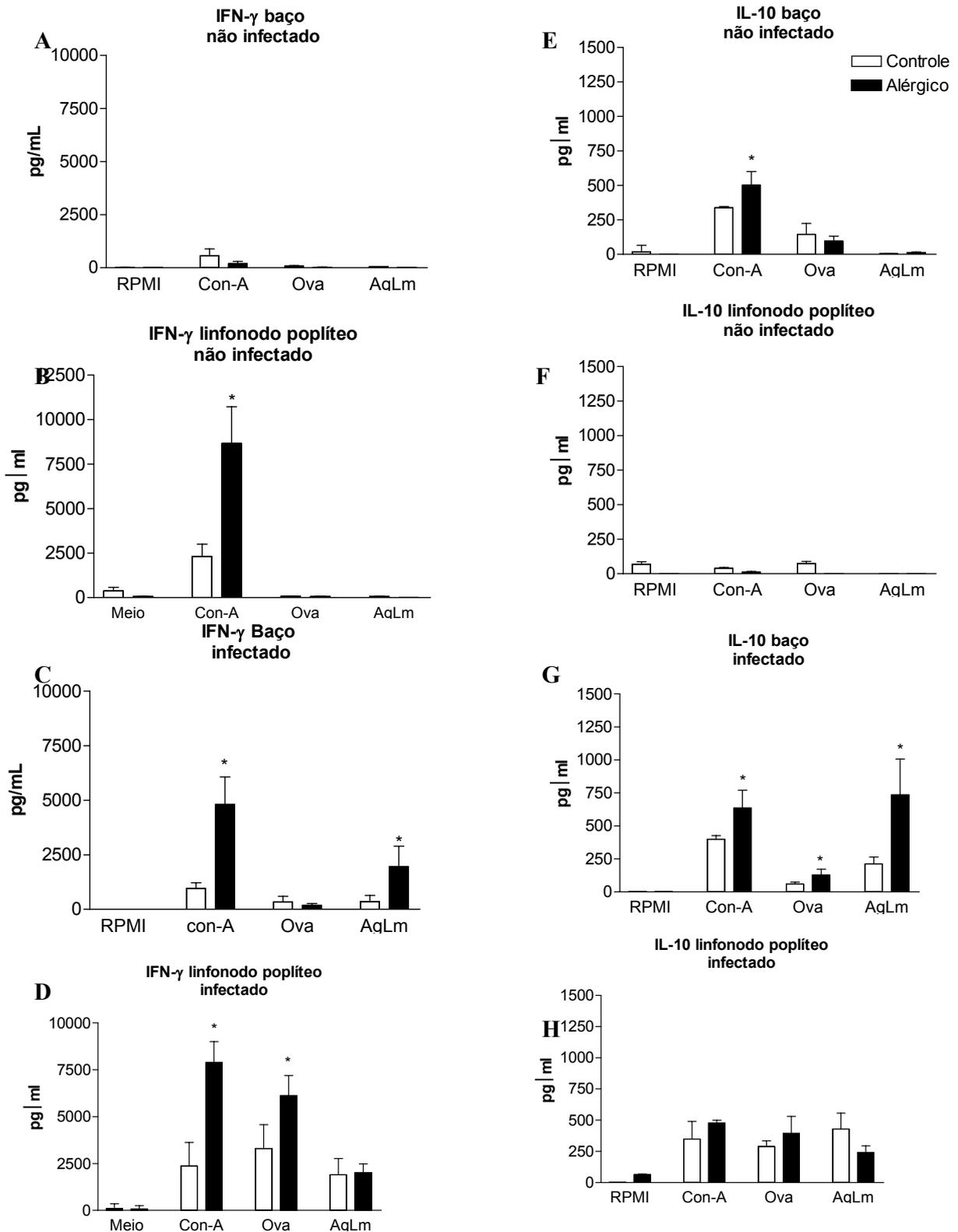


Figura 12 – Produção de citocinas dosadas por ELISA de suspensão de células retiradas do baço e linfonodo poplíteo *in vitro*. Camundongos BALB/c receberam 10 μ g OVA + 1mg Al(OH)₃ (dia 0) e OVA no dia 14. O grupo controle recebeu Al(OH)₃ no dia 0 e salina no dia 14. Após desafio com SCO os grupos controle e alérgico foram infectados com *L. major*. Após 6 semanas os animais foram sacrificados e retirados baço e linfonodo poplíteo. 55
* P < 0.05 em relação ao seu grupo controle. Antígeno da *L. major* (AgLm).

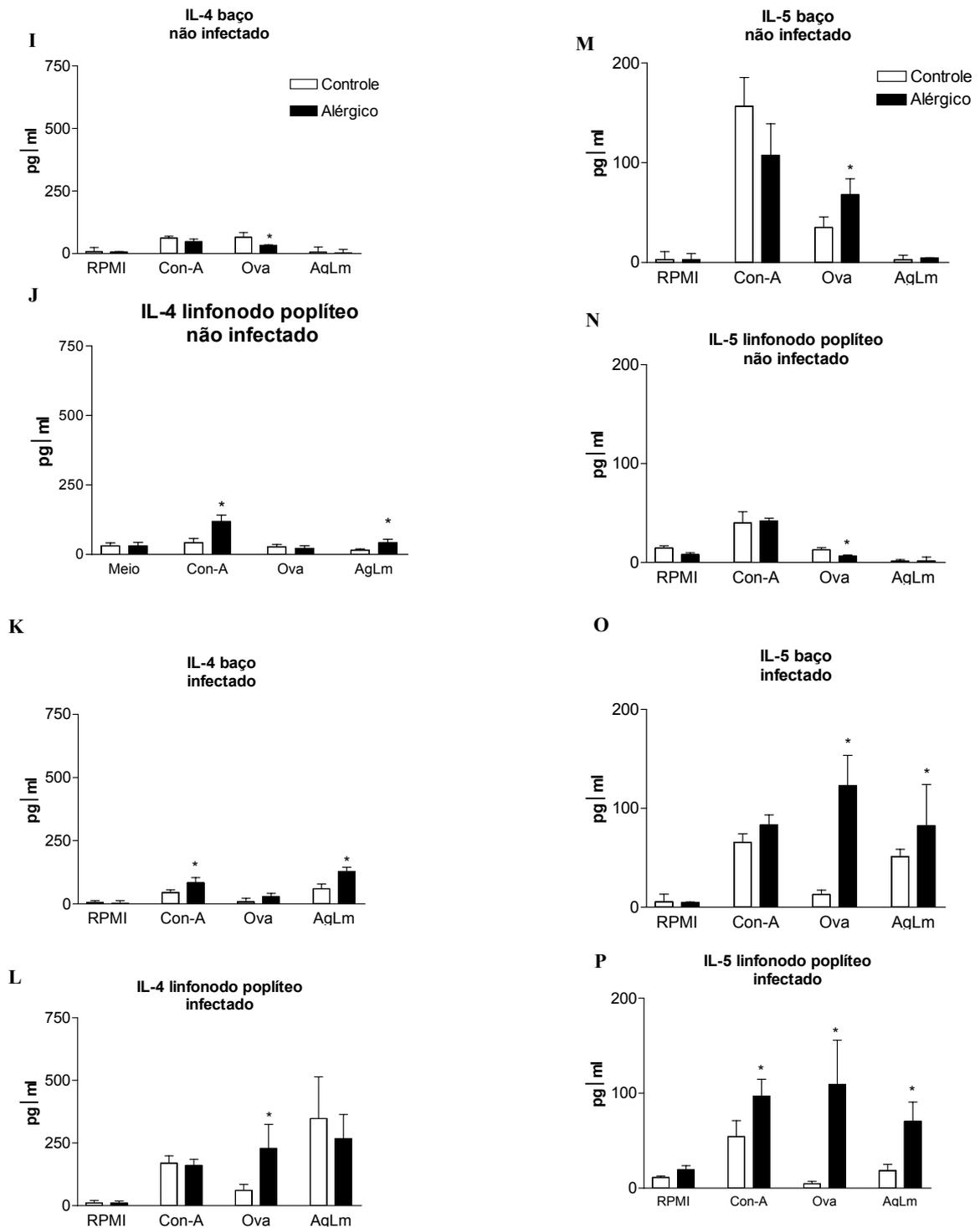
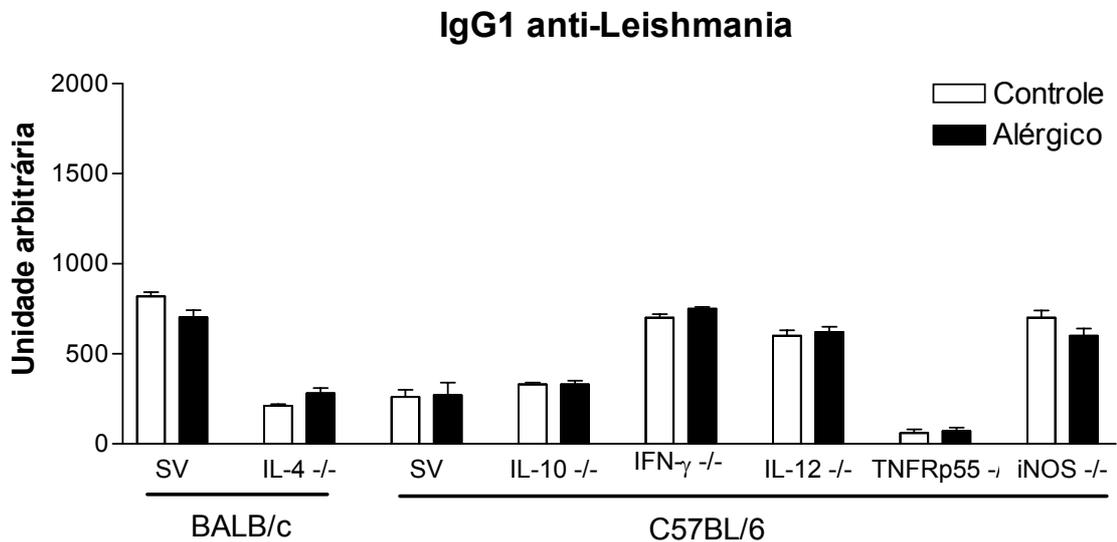


Figura 12 – Produção de citocinas dosadas por ELISA de suspensão de células retiradas do baço e linfonodo poplíteo *in vitro*. Camundongos BALB/c receberam 10 µg OVA + 1mg Al(OH)₃ (dia 0) e OVA no dia 14. O grupo controle recebeu Al(OH)₃ no dia 0 e salina no dia 14. Após desafio com SCO os grupos controle e alérgico foram infectados com *L. major*. Após 6 semanas os animais foram sacrificados e retirados baço e linfonodo poplíteo. * P < 0.05 em relação ao seu grupo controle. Antígeno da *L. major* (AgLm).

A



B

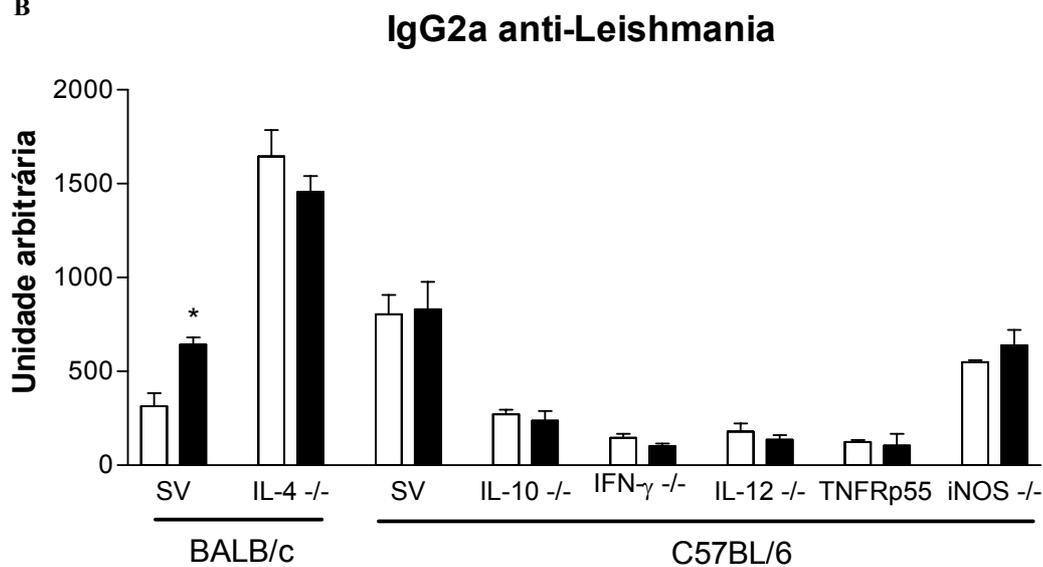


Figura 13 – Produção dos anticorpos IgG1 (A) e IgE (B) no soro após infecção com *L. major*. Camundongos BALB/c foram sensibilizados com 10 μ g de OVA mais 1mg de Al(OH)₃ no dia 0 e OVA no dia 14. O grupo controle recebeu Al(OH)₃ no dia 0 e salina no dia 14. Após desafio com SCO, os animais foram infectados com *L. major* e no término do experimento (6-8 semanas) foi realizado ensaio de ELISA para os anticorpos anti-Leishmania. As barras representam a média dos valores obtidos na diluição 1:50 para IgG1 e IgG2a comparado ao soro positivo sendo considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). Foram utilizados 5 animais/grupo. * P < 0.05 em relação ao seu grupo controle. Selvagem (SV)

6.3.5 – Avaliação da expressão de quimiocinas na pata infectada

Não foi observada diferença na expressão da quimiocina RANTES (Fig. 14A) nas patas de camundongos BALB/c alérgico ou controle. No entanto, a expressão de MCP-1 (Fig 14B) na pata dos animais alérgicos foi menor.

6.4- AVALIAÇÃO DO ROLAMENTO, ADESÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS NO MÚSCULO CREMÁSTER DE ANIMAIS C57BL/6 E BALB/C

A microscopia intravital é uma técnica que permite observar no animal vivo, os eventos de rolamento, adesão e migração dos leucócitos através do vaso sanguíneo em diversas condições. Para esse propósito foi utilizado o cremaster, que é um tecido translúcido, de animais BALB/c e C57BL/6 (Fig. 15), controle e alérgico, infectado ou não, em diferentes tempos (1, 24, 48, 72 horas e 1 semana).

As análises do rolamento (Fig. 15 A) e adesão (Fig. 15 B) dos animais BALB/c controle e alérgico, não demonstraram diferenças entre os tempos analisados. Quanto ao C57BL/6 houve uma diferença significativa tanto no rolamento (Fig. 15 A), quanto na adesão (Fig. 15B) no tempo de 48 horas após infecção intraescrotal pela *L. major*.

A análise da migração celular demonstrou que os animais BALB/c alérgico (Fig. 15C) tiveram um número menor de leucócitos fora dos vasos sanguíneos nos tempos 1, 24, 72 horas após infecção, quando comparado ao grupo BALB/c controle. Já os animais C57BL/6 (Fig. 15C), apresentaram diferença somente no tempo de 1 semana após infecção, onde o grupo controle teve um número menor de leucócitos presentes no tecido, comparado ao alérgico.

A contagem de leucócitos (Fig. 16) foi realizada após as gravações nos tempos estudados para a microscopia intravital. Os animais foram sangrados e foi

realizada a contagem do número de leucócitos circulantes. Não houve diferença no número de leucócitos entre os camundongos BALB/c e C57BL/6 do grupo controle ou alérgico e sem infecção. O protocolo de alergia alimentar por si só, não foi capaz de alterar o número de leucócitos presentes na corrente sanguínea. Já a partir da infecção intraescrotal houve aumento das células no sangue em alguns tempos e grupos estudados. Nos tempos de 1 e 24 horas após a infecção, nos camundongos BALB/c alérgico houve um aumento no número de leucócitos quando comparados aos grupos controle ou alérgico do *background* C57BL/6. Já em 48 horas, o grupo BALB/c alérgico comportou-se semelhante aos camundongos C57BL/6 alérgico, tendo um menor número de leucócitos circulantes que o grupo BALB/c controle.

A análise histopatológica do músculo cremáster demonstra que nos camundongos BALB/c e C57BL/6 não infectados ou infectados por 1 hora, não foi observada marginação leucocitária nos vasos presentes no corte. Já a partir de 24 horas, pôde-se observar a presença de leucócitos, sendo constituídos principalmente por neutrófilos, aderidos à parede dos vasos sanguíneos. (Fig. 17)

Os resultados da microscopia demonstram que o mais importante não é a quantidade de células que chegam, e sim o tipo e perfil de atividade delas. Apesar do grupo BALB/c controle apresentar um maior número de células que migraram para o tecido, eles apresentaram grandes lesões.

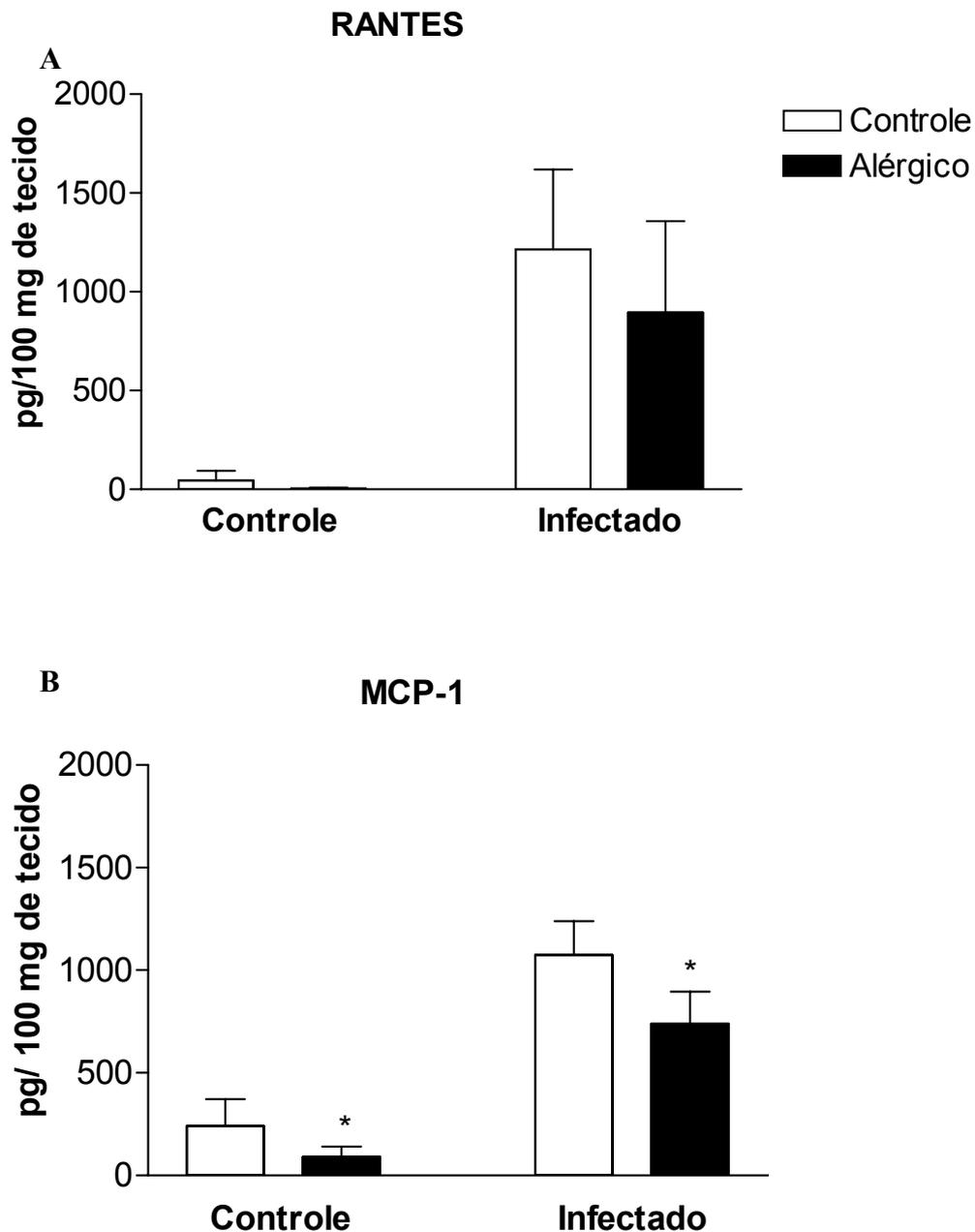


Figura 14 – Detecção de quimiocinas RANTES (A) e MCP-1 (B) no sítio de inflamação. Camundongos BALB/c receberam 10 μg OVA + 1mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ (dia 0) e OVA no dia 14. O grupo controle recebeu $\text{Al}(\text{OH})_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Após desafio com SCO os grupos controle e alérgico foram infectados. A infecção teve duração de 6 semanas onde os animais foram sacrificados e as patas foram coletadas para dosagem das quimiocinas por ELISA. * $P < 0.05$ em relação ao seu grupo controle. Antígeno da *L. major* (AgLm).

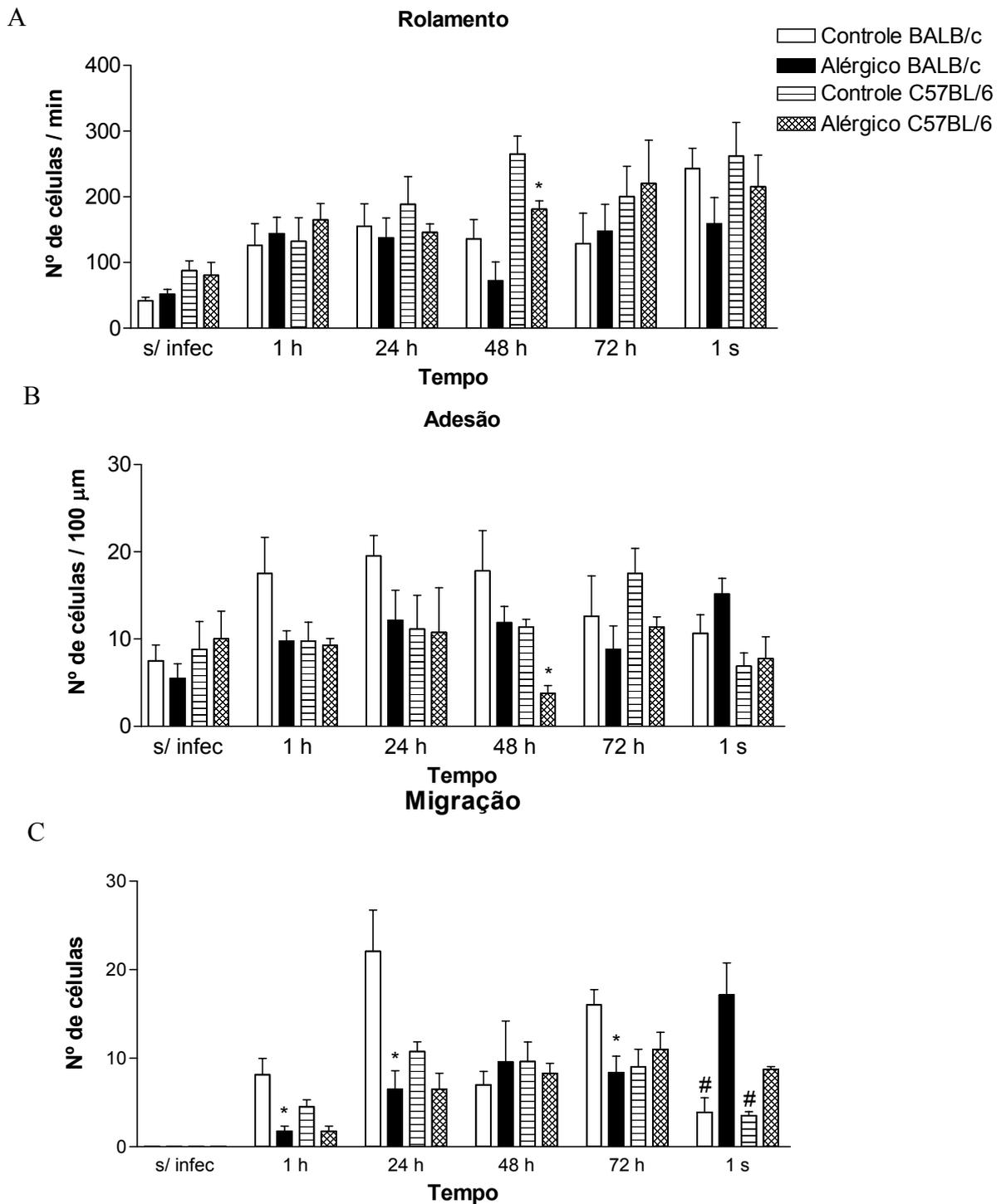


Figura 15 – Avaliação do rolamento (A), adesão (B) e migração (C) no músculo cremáster de camundongos BALB/c e C57BL/6. Camundongos foram sensibilizados com OVA, desafiados com SCO e foram infectados intraescrotal pela *L. major* ($1 \times 10^6/0,05\text{ml}$) permanecendo por: 1, 24, 48, 72 horas e 1 semana. O grupo controle correu junto para cada tempo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle do mesmo *background* (*t de Student*), # $P < 0,05$ em relação ao grupo alérgico do mesmo *background*

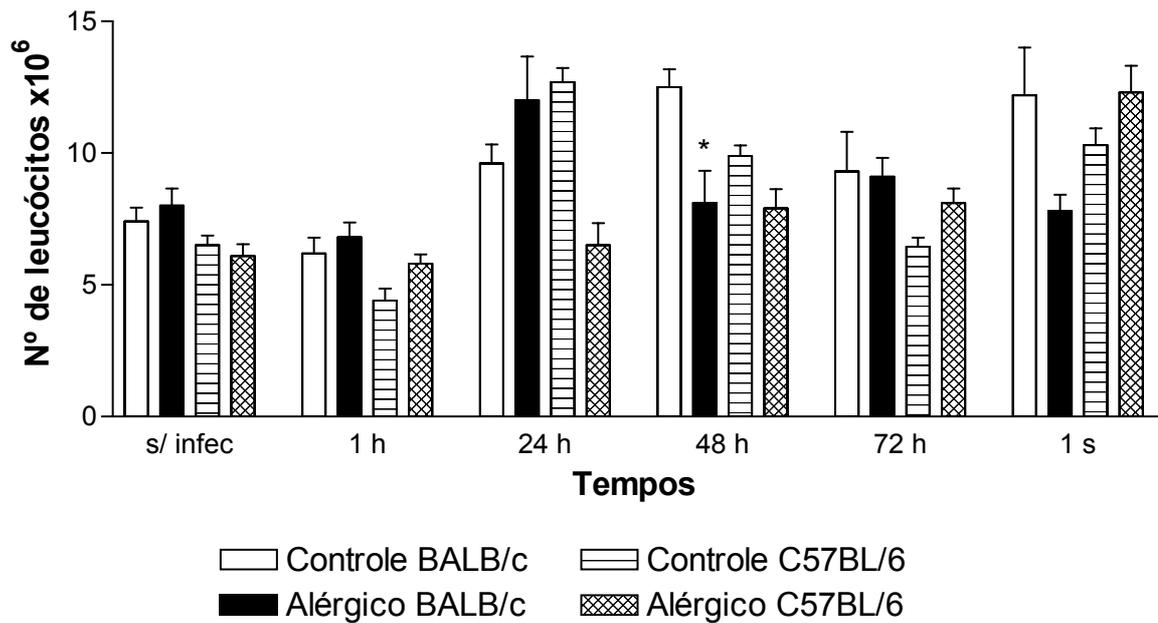


Figura 16 – Número de leucócitos presentes no sangue periférico. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram sensibilizados com OVA, desafiados com SCO e foram infectados intraescrotal pela *L. major* ($1 \times 10^6/0,05\text{ml}$) permanecendo por: 1, 24, 48, 72 horas e 1 semana. No final de cada experimento, o sangue foi diluído (1:10) em ácido acético (3%) e corante 3 do kit panóptico e contado em câmara de Neubauer. O grupo controle correu junto para cada tempo. *P < 0.05 em relação ao grupo controle do mesmo *background* (*t de Student*)..

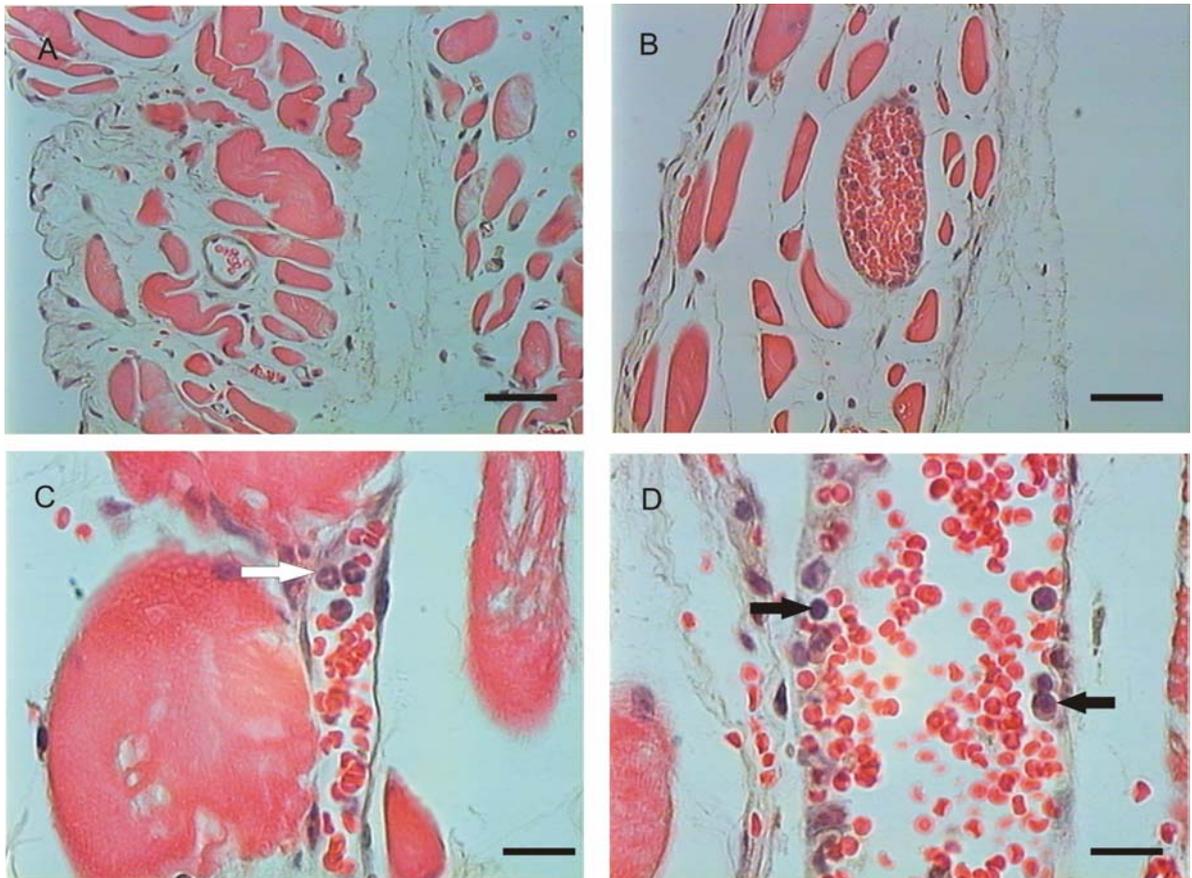


Figura 17 – Microfotografia de corte histológico do músculo cremáster de animais BALB/c. A- secção do músculo cremáster de camundongos BALB/c alérgico não infectados. B-secção do músculo cremaster de animais infectados. C- neutrófilos (seta branca), no início da infecção (24 horas) pela *L. major* em animais BALB/c controle. D- monócitos e linfócitos (setas pretas) após I semana de infecção pela *L. major*. 25 µm em A e B. 10 µm em C e D. Hematoxilina e Eosina.

Sabe-se que vários tipos de agentes infecciosos são capazes de estimular formas diferentes de respostas, as quais envolvem mecanismos distintos de interação com o sistema imune (ABBAS *et al.* 1996). Dentre estas infecções, as parasitoses, desencadeadas por protozoários e helmintos, são consideradas hoje um grande problema de saúde pública no mundo. A magnitude dos problemas de saúde pública associado ao grande interesse pela imunidade contra parasitos tem estimulado o desenvolvimento de novas metodologias para a compreensão de processo e conseqüente eliminação do agente causador da doença.

A indução de um processo alérgico, através de sensibilização subcutânea com ovalbumina em animais BALB/c demonstrou o aparecimento de uma resposta do tipo Th2 para a alergia, com aumento de IgE e IgG1 anti-OVA (SALDANHA *et al.*, 2004). No entanto, esses animais responderam com um perfil de resposta do tipo Th1 à infecção por *L. major*, e apresentaram pequeno desenvolvimento da lesão na pata, e produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais quanto infectados *in vitro* pelo parasito. Na tentativa de elucidar o mecanismo envolvido nessa resposta, animais deficientes para as citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-12, para a enzima sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) e para o receptor p55 do TNF foram previamente sensibilizados com a ova, desafiados e posteriormente infectados pela *L. major*.

O protocolo de alergia alimentar desenvolvido no laboratório foi aplicado nos animais e foi capaz de desencadear a produção de IgG1 e IgE nos camundongos BALB/C selvagens (SALDANHA *et al.*, 2004), assim como, no camundongo C57BL/6 (MOROKATA *et al.*, 1999) e nos demais animais deficientes dessa mesma linhagem. Estes isotipos de anticorpos associados a uma resposta do tipo Th2, onde a secreção de citocinas, como IL-4 ou ausência das citocinas IL-12 e IFN- γ , induz a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos secretores de IgE e IgG1 anafiláticos e é dependente de hidróxido de alumínio utilizado (FAQUIM-MAURO & MACEDO, 2000). A dependência de IL-4 para a produção de anticorpos com perfil de uma resposta Th2 foi observada nos camundongos BALB/c deficientes para essa citocina, nos quais não foram detectados níveis satisfatórios de anticorpos no soro, após a

aplicação do protocolo de alergia alimentar. Na ausência de citocinas do perfil Th1, como IL-12 e IFN- γ , pôde-se observar ainda o aumento nos níveis de IgG1 nos animais sensibilizados, quando comparado aos camundongos sensibilizados C57BL/6, IL-10 -/- e iNOS -/-. O padrão de resposta foi semelhante para IgE. Além disso, a ingestão de clara de ovo a 20% sete dias após a sensibilização, proporcionou um aumento ou a manutenção desses anticorpos nos grupos que foram sensibilizados, com exceção dos camundongos IL-4 -/- que permaneceram com níveis muito baixos, semelhante aos grupos controle.

Um evento constante nesse modelo de alergia, independente da infecção do animal por *L. major*, foi a redução do peso corporal somente do grupo de camundongos BALB/c alérgico. Essa perda não foi associada nem ao consumo de líquido, nem ração (Figs. 6 e 7). Os camundongos C57BL/6 deficientes mesmo para citocinas Th1, que produziram uma maior quantidade de anticorpos IgG1 e IgE que os seus controles C57BL/6 selvagens não apresentaram essa perda de peso. A perda de peso está associada a fatores imunológicos dependentes de citocinas Th2, uma vez que os camundongos BALB/c deficientes para IL-4, além de não produzirem anticorpos anti-ova, também não perderam peso. O emagrecimento foi acompanhado do aumento de IgE. Uma das características da alergia é a perda de peso que está associada, também, aos níveis de TNF- α , que causa caquexia nos pacientes portadores de câncer. Os animais deste experimento no entanto não produziram níveis de TNF- α dosados pelo ELISA, talvez pelo fato do TNF- α estar ligado ao receptor solúvel. Mesmo os camundongos TNFRp55 -/- não apresentaram perda de peso ao longo do experimento. Talvez o fato dos animais deficientes pertencerem a *background* C57BL/6 e esteja associado à manutenção do peso mesmo em estado de alergia. Aparentemente, esses animais não mostram muitos sinais clínicos quanto ao protocolo de alergia, a não ser o aumento na produção de IgE e IgG1 após desafio com a ova.

MOREIRA, 2006, mostrou, em nosso laboratório que, após a sensibilização com ova e desafio com uma dieta sólida balanceada com essa proteína, animais

BALB/c têm a perda de peso da mesma forma que no protocolo em que o antígeno é fornecido de forma líquida em solução de clara de ovo a 20%. Também em seu experimento, os animais C57BL/6 não tiveram perda de peso. No entanto, houve alteração em outros parâmetros que não tinham sido analisados como a carcaça desidratada e a gordura abdominal. MOREIRA, mostrou ainda que nesses animais o protocolo de sensibilização foi capaz de diminuir a quantidade de gordura abdominal tanto em BALB/c quanto nos C57BL/6, independente da ausência de emagrecimento nos últimos. Provavelmente, devido a presença de líquidos corporais nos tecidos dos animais sensibilizados decorrentes de maior retenção de líquido nos tecidos.

É possível que essa resposta se deva ao fato de que o trato gastrointestinal do animal sensibilizado pode ter se adaptado a essa exposição prolongada ao antígeno através de suas barreiras representadas pelo aumento do muco (SALDANHA *et al.*, 2004) e linfócitos, que podem ser encontrados dispersos por toda a lâmina própria, nas placas de Peyer e no interior da camada epitelial. SWIRSKI *et al.*, 2002, mostraram que a exposição contínua ao antígeno ao qual o animal foi sensibilizado, leva ao aumento de anticorpos IgE e IgG1 específicos, no entanto há uma redução de eosinófilos no pulmão após exposição crônica. Há um controle imune em que respostas muito elevadas são contrabalançadas para permitir o funcionamento do sistema na tentativa de restaurar o equilíbrio.

A citocina IL-10 apresenta atividade antiinflamatória em células epiteliais de diferentes linhagens. Por exemplo, camundongos deficientes em IL-10 ou em seu receptor, espontaneamente desenvolvem colite caracterizada pela produção de TNF- α e IFN- γ (KUHN *et al.*, 1993). Isso mostra que a célula epitelial através da ação da IL-10 pode responder à infecção e outras agressões permitindo que haja uma modulação da resposta imune local e da inflamação no trato digestivo. DENNING *et al.* (2000) mostram que o receptor para IL-10 está presente nas células epiteliais dos intestinos delgado e grosso de camundongos. Assim, essa pode ser uma citocina, que sendo produzida em grandes quantidades no grupo BALB/c alérgico estaria impedindo as alterações que a exposição crônica ao antígeno utilizado na sensibilização poderia ocasionar.

A partir do estabelecimento do protocolo de alergia alimentar, camundongos das linhagens BALB/c e do mesmo *background* deficiente para a citocina IL-4 (IL-4^{-/-}), e C57BL/6 selvagem e deficientes para as citocinas IL-10 (IL-10^{-/-}), IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}), IL-12 (-/-), para o receptor p55 do TNF- α (TNFRp55^{-/-}) e para sintase de óxido nítrico induzível iNOS (iNOS^{-/-}) foram infectados pela *L. major* sete dias após o desafio com a SCO.

O modelo de infecção com a *L. major* em camundongos BALB/c e C57BL/6 é amplamente utilizado para entender como se dá a diferenciação *in vivo* das células T helper CD4⁺ para o estabelecimento das respostas do tipo Th1 ou Th2 (SCOTT *et al.*, 1989, COFFMAN *et al.*, 1991, REINER & LOKSLEY, 1995, SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Camundongos C57BL/6 mostram resistência ao parasito, através da montagem de uma resposta do tipo Th1, caracterizada pela produção de IL-12 e IFN- γ . Estas citocinas determinam a ativação do macrófago, que através da produção de substâncias tóxicas, inibe a replicação dos parasitos. As lesões se curam em poucas semanas e os animais tornam-se resistentes a re-infecções. Nessa resposta participam células dendríticas presentes nos linfonodos, que possuem a capacidade de apresentar antígenos do parasito às células T estimulando, dessa forma, a manutenção de células T de memória e protegendo o animal de novas infecções pelo parasito (MOLL *et al.*, 1995). A produção de IL-10 por células T CD8⁺ e T reguladoras CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low} observada nesses animais é um fator que, também está associado à persistência desses parasitos nas lesões cutâneas e nos linfonodos adjacentes após cura clínica, mas não cura estéril (BELKAID *et al.*, 2001, BELKAID *et al.*, 2002). A persistência do parasito no animal apresenta um papel importante para a imunidade contra novas re-infecções.

Camundongos BALB/c quando infectados pela *L. major* desenvolvem lesões que ulceram e esses parasitos acabam migrando para outros órgãos causando a morte desses animais. A resposta imunológica, nesses animais, está associada à produção de IL-4, que é uma citocina que inibe as ações de células efetoras na eliminação do parasito (LOCKSLEY *et al.*, 1987). O antígeno recombinante LACK da *L. major* induz aumento de IL-4 através do estímulo de células T CD4⁺ que expressam o

receptor V β 4V α 8 CD4+T presentes nos linfonodos que drenam o local de infecção pela *L. major* em BALB/c (LAUNOIS *et al.*, 1997).

A resposta imunológica pode ser alterada sob determinadas condições (SANTIAGO *et al.*, 1999). MILES *et al.* (2005) mostram que IgG pode levar a exacerbação da infecção de animais pela *L. major*. Esses autores infectam camundongos BALB/c selvagens e deficientes para o locus J da cadeia pesada da imunoglobulina (J_H – não produzem anticorpo) com a *L. major*, e mostram que os animais J_H são resistentes a infecção. No entanto, quando é administrado uma IgG anti-*Leishmania* os animais J_H desenvolveram lesão. O crescimento da lesão foi associado ao aumento da expressão de IL-10 na pata infectada medida através do RT-PCR. Além disso, eles mostraram que macrófagos cultivados na presença de amastigotas, retiradas da lesão, aumentaram a produção de IL-10 associada à baixa produção de IL-12. O complexo imune, IgG mais *Leishmania*, induz a produção de IL-10 que tem um efeito inibitório sobre os macrófagos, permitindo o desenvolvimento da lesão. Para comprovar que, essa alteração de resposta frente ao parasito poderia ser desencadeada por outros complexos imunes, que não só o específico para a *Leishmania*, eles sensibilizaram com 25 μ g/mL de ova os animais C57BL/6. Os animais C57BL/6 produziram elevados títulos de IgG anti-ova. Então, eles infectaram os C57BL/6 com a *L. major* em PBS mais 50 μ g/mL de ova. Os animais imunizados e que foram infectados desenvolveram lesão grande e tiveram aumento da carga parasitária. No entanto, no modelo desenvolvido por nós, não observamos qualquer mudança na resposta frente ao mesmo parasita nesses animais. Os animais C57BL/6 alérgicos apresentaram níveis elevados de IgG1 para ova no soro, no entanto, permaneceram com um perfil de resistência. Essa diferença pode estar relacionada à metodologia empregada na sensibilização, a infecção e quanto aos níveis de IgG entre os tecidos. Os autores não mencionam a quantidade de IgG anti-ova produzida pelos animais C57BL/6. Pode ser que a quantidade de IgG produzida nos animais C57BL/6 neste experimento não tenha sido suficiente para alterar a resposta imune ou, os níveis de IgG estejam elevados no soro mas, baixos no tecido. Os fatores que interferem na resposta frente ao parasito são diversos, entre eles: dose

de infecção, linhagem do parasito e dos animais (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002), idade dos animais (EHRCHEN *et al.*, 2004), entre outros parâmetros.

Os animais BALB/c que passaram pelo protocolo de alergia desenvolveram certa resistência à infecção (SALDANHA, 2002). Para investigar o papel das citocinas envolvidas tanto na resposta alérgica, quanto na resposta ao parasito foram utilizados os animais deficientes para as citocinas: IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ , para a enzima sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) e para o receptor p55 do TNF- α .

Vários trabalhos têm mostrado a importância do repertório de citocinas produzidas durante a resposta imune nas diferentes linhagens de camundongos. A depleção de IFN- γ leva a uma resposta do tipo Th2 com disseminação da doença em camundongos resistentes (SCOTT, 1991). Já a depleção de IL-4, leva a uma resposta do tipo Th1 e permite a cura da lesão (SADICK *et al.*, 1990). Embora IL-4 seja importante para a indução de resposta Th2, trabalhos mostram que mesmo em sua presença, pode haver desvio para uma resposta Th1 (BIEDERMANN, *et al.* 2001) ou a formação de resposta Th2 em sua ausência (MOHRS *et al.*, 2000). CHATELAIN *et al.* (1999) mostraram que o bloqueio de duas citocinas, IL-4 e IFN- γ , envolvidas na diferenciação da célula Th, em camundongos BALB/c e C3H/HeN, induz a uma forte resposta Th1 e exacerbação da infecção, respectivamente. Isto pode indicar a presença de outros indutores da diferenciação Th1, como, por exemplo, a citocina IL-12 que tem sido implicada nesta diferenciação em experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Há uma variabilidade dentro do modelo da infecção com a *L. major*, em que camundongos considerados resistentes a uma cepa de *Leishmania* são susceptíveis à outra. Por exemplo, camundongos BALB/c deficientes para a citocina IL-4 ou para seu receptor quando infectados pela *L. major* da sublinhagem LV39 (MRHO/SU/59/P) (NOBEN-TRAUTH *et al.*, 1999) desenvolvem lesão na pata, mas conseguem controlar a infecção quando infectados pela *L. major* do clone VI (WHOM/IL/80/Friedlin).

O protocolo de alergia induzido nos animais IFN- γ -/- e IL-12 -/-, que são duas citocinas importantes na indução da resposta Th1 e nos iNOS -/-, que apresenta papel importante tanto no recrutamento celular (HICKEY, *et al.*, 2001), quanto na

eliminação de parasitas intracelulares, induziu a produção e/ou aumento de IgE e/ou IgG1 (IL-12 ^{-/-} e iNOS^{-/-}) porém, não foi capaz de alterar o curso de infecção frente à *L. major*. Os animais desenvolveram lesões grandes na pata. A resposta imune nesses animais mostrou que essas duas citocinas são importantes para a cura da lesão. Tudo indica, que a resistência observada nos animais BALB/c alérgicos é dependente da resposta Th1, onde a citocina IL-12 ativa a produção de IFN- γ , que por sua vez induz à produção de óxido nítrico pelas células efetoras da eliminação do parasito (LIEW *et al.*, 1990, GREEN *et al.*, 1990).

Paradoxalmente, os camundongos BALB/c que apresentam todo um perfil de resposta Th2, teve sua resposta modificada frente ao parasito.

IL-10 e IL-4 são produzidas durante a indução de resposta Th2, como nas alergias, e inibem a ação da enzima óxido nítrico sintase em macrófagos (CUNHA *et al.*, 1992). Os animais deficientes na sua produção do *background* C57BL/6 e BALB/c, alérgicos e controle, tiveram desenvolvimento de lesão menor na pata quando infectados, de forma semelhante ao observado nos animais C57BL/6 selvagens.

O TNF- α tem papel importante nas infecções por parasitas intracelulares e junto com IFN- γ aumenta a capacidade dos macrófagos em mediar à atividade microbicida (NATHAN & HIBBS, 1991) através da produção de óxido nítrico. Os principais efeitos do TNF- α estão associados ao receptor p55 de 55 kDa (TNFRp55), incluindo o de citotoxicidade e aumento da expressão de várias moléculas de adesão (PFEFFER *et al.*, 1993). Os resultados obtidos com os animais TNFRp55 ^{-/-} dos grupos controle e alérgico foram similares aos obtidos por VIEIRA *et al.*, (1996). Mesmo sensibilizados e sendo desafiados diariamente com a SCO, esses animais não mudaram o perfil da resposta inflamatória frente ao parasito. Claramente, a análise histológica da lesão mostra inflamação bastante difusa e com parasitos na lesão. A presença de parasitos era visualmente menor nas preparações de lesões dos animais selvagens C57BL/6 que naquelas dos animais susceptíveis como o BALB/c selvagem controle.

O protocolo de alergia alimentar foi capaz de determinar alterações da resposta imunológica frente a um parasito intracelular nos animais, embora dependente da linhagem estudada. O uso de animais deficientes na produção de citocinas mostrou a necessidade dos fatores associados a resposta do tipo Th1 para o controle do parasito.

O ensaio de proliferação celular mostra que as células presentes no baço dos animais BALB/c do grupo alérgico infectado, apresentaram níveis mais elevados para as citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-4 quando estimuladas pela con-A, quando comparado ao grupo controle. Os níveis de IFN- γ e IL-10 no baço dos animais infectados foram mais elevados que os níveis de IL-4 no grupo BALB/c alérgico. Sabe-se que em animais com perfil de resistência, ocorre aumento tanto de IFN- γ , quanto de IL-10 (BELKAID *et al.*, 2001). Já no linfonodo poplíteo os níveis de IFN- γ foram maiores que o de IL-10 e IL-4 no grupo alérgico, quando comparado ao controle. O aumento de IFN- γ , embora não esperado, pelo fato dos animais serem BALB/c e alérgicos, indica o processo pelo qual esse grupo conseguiu controlar sua infecção. Sabe-se que a citocina IFN- γ está associada à produção de óxido nítrico que é um elemento importante para a morte desses parasitos pelos macrófagos. Novamente, esse dado corrobora com o encontro dos os níveis basais elevados de NO produzidos pelos macrófagos peritoneais de animais BALB/c alérgico, quando infectados *in vitro* com a *L. major* por SALDANHA, 2002.

A técnica de RT-PCR, mostrou baixa expressão dos níveis de RNAm para IL-4, no grupo BALB/c alérgico, enquanto a expressão para IFN- γ foi maior. IL-10 não mostrou tanta diferença entre os grupos alérgico e controle. Esses resultados configuram melhor o perfil de resistência apresentados por estes animais.

Em camundongos é conhecido que a produção de IgG2a está associada à resposta do tipo Th1, enquanto IgG1 à resposta Th2 (BLISS *et al.*, 1996). Neste trabalho, não houve diferença significativa no níveis de IgG1 entre os grupos BALB/c. Os animais deficientes, com um perfil de resistência mostraram níveis baixos de produção para esse anticorpo. No entanto, a dosagem de IgG2a no grupo BALB/c alérgico foi significativamente maior que a observada no camundongo

BALB/c controle que foi igual aos níveis observados nos animais C57BL/6 que apresentam perfil de resistência, descrito pela literatura. Os níveis de IgG2a para os animais IL-4 -/- foram significativamente mais elevados que as demais linhagens estudadas. Esse resultado demonstra o papel importante da IL-4 na resposta inflamatória frente à *Leishmania*.

O efeito da estimulação contínua do sistema imunológico no camundongo BALB/c alérgico sobre a resposta frente a infecção por *L. major*, mostrada na Fig. 9 indica a dependência do controle da infecção ao estímulo antigênico. O aumento da lesão observado durante a suspensão do estímulo antigênico pode estar associado à diminuição dos níveis de IFN- γ , e provavelmente ao aumento das citocinas Th2, IL-4, IL-10 e IL-5. Dessa forma, os parasitos persistentes na lesão foram capazes de proliferar e determinar o aumento de lesão nos animais alérgicos de ambos os grupos.

As barreiras inatas são as primeiras na linha de defesa contra infecções primárias e são constantemente desafiadas por microrganismos patogênicos. Embora a imunidade natural seja eficiente para controlar grande parte das infecções, a completa erradicação dos microrganismos, quando ocorre, geralmente exige resposta imune específica ou adaptativa, baseada na expansão clonal de linfócitos B e T que expressam receptores específicos (TRINCHIERI, 1998). Após expansão clonal, essas células deixam os órgãos linfóides secundários, caem na circulação sanguínea e são estimuladas a migrarem para o tecido através do estímulo de quimiocinas.

As quimiocinas possuem um papel importante não só no recrutamento celular, como na ativação das células e liberação de mediadores inflamatórios, entre outros. Muitos estudos têm focalizado as respostas iniciais à infecção por *L. major* e têm mostrado que além das citocinas há também, a participação das quimiocinas (VESTER *et al.*, 1999). Trabalhos mostram que o recrutamento de monócitos e macrófagos através de MCP-1 estaria ligado à sua ativação (MILLER & KRANGEL, 1992) e eliminação do parasito. Outros demonstram que não há diferença quanto à expressão de MCP-1 entre animais com perfil de susceptibilidade ou resistência

(SANTIAGO *et al.*, 2004) e que a diferença estaria ligada à expressão de RANTES na 6ª semana após infecção. RANTES aumenta a expressão de IL-12 (ALIBERTI *et al.*, 2000), IFN- γ (MAKINO, *et al.*, 2002) e migração de células Th1, particularmente das células T de memória (WEBER *et al.*, 2001). Na 6ª semana de infecção foram realizadas as dosagens para as quimiocinas RANTES e MCP-1. A quantidade de MCP-1 presente na pata dos animais BALB/c alérgicos foi menor em relação aos controles, no entanto não foi encontrada diferença significativa entre os grupos BALB/c em relação à expressão de RANTES. A resposta do hospedeiro frente aos parasitos varia de modelo para modelo. Na 6ª semana já foi estabelecido o padrão de infecção no animal alérgico e nesse tempo não foi encontrada diferença entre os grupos na produção de RANTES, como relatado por SANTIAGO *et al.*, 2004.

A resposta inflamatória é importante para conter e eliminar parasitos, assim como, para promover a cura de lesões no tecido. No entanto, se essa resposta for estimulada de maneira não apropriada ou ocorrer ausência de certos fatores pode ser danoso ao tecido. A exacerbação tanto de uma resposta Th1 como observada nas colites, como na resposta Th2, presente nas alergias são capazes de lesar o tecido. O tipo de célula recrutada e seu perfil de ativação por citocinas locais determinarão o curso da resposta inflamatória. A irrigação sangüínea neste processo, é importante devida a migração de células para o local. O comportamento dos leucócitos dentro dos vasos sangüíneos pode ser avaliado utilizando a técnica de microscopia intravital.

Os resultados mostraram que não há grande diferença entre o perfil de rolamento dos leucócitos medido nos camundongos BALB/c e C57BL/6. Quando infectados ocorreu tendência, em alguns grupos, para o aumento do rolamento, nos tempos analisados, entretanto esse evento não esteve associado às diferenças do número de leucócitos no sangue desses animais. Nos eventos iniciais (1, 24 e 48 horas) as observações sobre a adesão, mostrou uma maior aderência de leucócitos aos vasos sangüíneos no grupo BALB/c controle, quando comparado aos demais.

Como mostrado na Fig. 15C, nos animais alérgicos ocorreu a migração de células nas primeiras horas após infecção. No tempo de 24 horas, o comportamento do grupo BALB/c alérgico foi semelhante ao observado nos animais C57BL/6. É sabido que os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o tecido e uma onda de macrófagos ocorre após 2 dias de infecção (SUNDERKÖTTER *et al.*, 1993). No modelo *L. major* tem sido mostrado o papel dessas células na persistência do parasito no local nas primeiras horas, como forma de sobrevivência (MÜLLER *et al.*, 2001, ZANDBERGEN *et al.*, 2004). A análise histopatológica mostrou a presença de neutrófilos aderidos aos vasos sangüíneos e no tecido conjuntivo do músculo cremáster dos animais. Essas células serviriam como abrigo para o parasito conseguir escapar da destruição pelos macrófagos, além de desencadear a liberação de fatores solúveis, citocinas e quimiocinas, que estariam associados ao desenvolvimento das lesões. ZAPH & SCOTT (2003) mostram o papel da citocina IL-12 não só na indução de IFN- γ por células TCD4+, mas também na regulação da enzima $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferase VII (FucTVII) e do ligante para E- e P-selectina (PESLs), que estão associadas à migração de células Th1 para o tecido. Como encontramos altos níveis de IFN- γ nos animais BALB/c alérgico infectado, acreditamos que o nível de IL-12 possa ser elevado e assim, mediar a migração de células Th1 para o local infectado, levando ao quadro de resistência observado nesses animais.

As células T reguladoras estão associadas ao controle e supressão da função de outras células, geralmente através de mecanismo inibitório. Essas células parecem controlar o desenvolvimento de doenças auto-imunes, rejeição de enxertos, doenças alérgicas, defesa contra infecções, entre outras. O mecanismo de ação dessa célula está sendo investigado e sabe-se que elas agem através do contato célula-célula (THORNTON *et al.*, 2000) ou através da produção de citocinas imunossupressoras como a IL-10 (ASSEMAN *et al.*, 1999) e TGF- β (POWRIE *et al.*, 1996). Foram descritas 3 tipos de células T reguladoras: células Th3, T reg 1 e T CD4+CD25+ (CHEN *et al.*, 1994; SAKAGUCHI *et al.*, 1995; GROUX *et al.*, 1997).

Trabalho desenvolvido por ZHANG *et al.*, 2001, mostrou que a tolerância aos antígenos da dieta está associada às células T CD4+CD25+. É sabido que indivíduos

alérgicos possuem níveis de células TCD4+CD25+ semelhantes aos indivíduos normais, no entanto, quando estimuladas *in vitro* por superantígeno elas perdem sua atividade imunossupressora (OU *et al.*, 2004). LING *et al.*, 2004 mostra que as células reguladoras de indivíduos alérgicos possuem baixa capacidade de reduzir a capacidade proliferativa, bem como, a produção de citocinas Th2.

LIU *et al.*, 2003, mostraram o papel das células T reguladoras CD4+CD25+ em animais SCID que receberam células do baço e linfonodos de animais BALB/c juntamente com infecção pela *L. major*. Quando animais SCID receberam células T CD4+CD25+ e foram infectados não tiveram colite, no entanto houve o desenvolvimento da lesão na pata, causada pelo parasito. Já ao receber células TCD4+CD25- e 1 dia após serem infectados, tiveram desenvolvimento de colite severa em que foi observada a perda de peso, além de alteração quanto à resposta ao parasita. A lesão que inicialmente se desenvolvia, começava a diminuir após 3 semanas de infecção. As dosagens de citocinas nos linfonodos mesentéricos mostraram níveis elevados de IFN- γ e de IL-4.

O animal BALB/c alérgico apresenta uma resposta Th2 frente ao protocolo de alergia como visto pelos níveis elevados de citocina Th2 e através da produção de IgG1 e IgE específicos para ova. Entretanto, existe uma resposta Th1, demonstrada pelos níveis elevados de IFN- γ . A hipótese é de que o protocolo de sensibilização à ova levou à supressão de células T reguladoras. A ausência dessas células permitiria a formação tanto da resposta Th2, quanto a de Th1. O estímulo diário através da SCO, para que esses animais sofram conseqüências que possam levar à morte, devido à sobrecarga do sistema imune frente à elevada resposta Th2; teria uma via compensatória onde ocorre a formação de uma resposta Th1. Parece que o sistema imune ocupado com a resposta Th2 no intestino, permite a formação da resposta Th1 em outros sítios de infecção. O papel do estímulo constante do sistema imune frente ao antígeno ova presente na SCO é visto quando é realizada a troca do líquido contendo solução de clara de ovo 20%.

Conclusões

- A perda de peso observada nos camundongos é dependente de IL-4.
- O não desenvolvimento da lesão ao parasito é dependente do constante estímulo antigênico pela ova, interferindo no padrão de produção de citocinas e na migração celular.

ABBAS A.K., MURPHY K.M., SHER A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383:787-793, 1996.

AEBISCHER T, MOODY SF, HANDMAN E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infect Immun*; 61 : 220-6, 1993.

AFONSO L.C., SCOTT P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun*.;61(7):2952-9, 1993.

ALIBERTI, J., C. R. SOUZA, M. SCHITO, S. HIENY, T. WELLS, G. B. HUFFNAGLE, A. SHER. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* 1:83–87, 2000.

ANDERSON J.A. Milk, Eggs and Peanuts: Food allergies in children. *Am Fam Physician*, 56: 1365–1374, 1997.

ASAKO, H., KUROSE, I., WOLF, R., DE FREES S., ZHENG Z.L., PHILLIPS M.L., PAULSON J.C., GRANGER D.N. Role of H1 receptors and P-selectin in histamine-induced leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules. *J Clin Invest* 93, 1508±1515, 1994.

ASSEMAN C, MAUZE S, LEACH MW, COFFMAN RL, POWRIE F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*;190: 995–1004, 1999.

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

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

BELKAID Y., PICCIRILLO C.A., MENDEZ S., SHEVACH E.M., SACKS D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, 420 (5): 502-507, 2002.

BEYER K. characterization of allergenic food proteins for improved diagnostic methods. *Curr. Opin Allergy Clin Immunol*, 3:189-197, 2003.

BIEDERMANN T, ZIMMERMANN S, HIMMELRICH H, GUMY A, EGETER O, SAKRAUSKI AK, SEEGMULLER I, VOIGT H, LAUNOIS P, LEVINE AD. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol*, 2:1054-1060, 2001.

BLANCO C, CARRILLO T, CASTILLO R, QUIRALTE J, CUEVAS M. Latex allergy: clinical features and cross-reactivity with fruits. *Ann Allergy*; 73: 309-14, 1994.

BLISS J., VANCLEAVE V., MURRAY K., WIENCIS A, KETCHUM M., MAYLOR R., HAIRE T., RESMINI C., ABBAS A., WOLF S. Interleukin 12 as an adjuvant, promotes a T helper 1 but does not suppress a T helper 2 recall response. *J. Immunol.* 156:887–894, 1996.

BOYAKA P. N., MCGHEE J. R. Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 51(1-3):71-79, 2001.

BRANDTZAEG P.E. Current understandign of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann N Y Acad Sci*, 964: 13-45, 2002.

BUFE, A. The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? *International Archives of Allergy and Immunology*, 117: 215-219, 1998.

BUTCHER E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67: 1033±1036, 1991.

CHANG H.R., PECHERE J.C. Macrophage oxidative metabolism and intracellular *Toxoplasma gondii*. *Microb Pathog.*; 7 (1) :37-44, 1989.

CHANNON J.Y., BLACKWELL J.M. A study of the sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes to hydrogen peroxide. I. Differences in sensitivity correlate with parasite-mediated removal of hydrogen peroxide. *Parasitology*, 91: 197-206. 1985.

CHATELAIN R., MAUZE S., VARKILA K., COFFMAN R.L. *Leishmania major* infection in interleukin-4 and interferon-gamma depleted mice. *Parasite Immunol.* Aug;21(8):423-31, 1999.

CHEN, Y., V. K. KUCHROO, J. INOBE, D. A. HAFLER, H. L. WEINER. Regulatoy T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:123, 1994.

COFFMAN R.L., R. CHATELAIN, L.M.C.C. LEAL e K. VARKITA. *Leishmania major* infection in mice: a model system for the study of CD4+ T –cell subset differentiation. *Research in Immunol.* 142: 36-39, 1991.

CUNHA F.Q., MONCADA S., LIEW F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 14;182(3):1155-9, 1992.

DENNING T.L., CAMPBELL N.A., SONG F., GAROFALO R.P., KLIMPEL G.R., REYES V.E., ERNST P.B. Expression of IL-10 receptors on epithelial cells from the murine small and large intestine. *Int Immunol.*, 12(2):133-9, 2000.

DESJARDINS, M., DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 185, 2061- 2068, 1997.

EHRCHEN J, SINDRILARU A., GRABBE S., SCHONLAU F., SCHLESIGER C, SORG C, SCHERFFETTER-KOCHANER K., SUNDERKOTTER C. Senescent BALB/c mice are able to develop resistance to *Leishmania major* infection. *Infect Immun.* 72(9):5106-14, 2004.

FAQUIM-MAURO E.L., MACEDO M.S. Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. *International Immunology*, 12: 1733-1740, 2000.

FINKELMAN F.D., HOLMES J., KATONA I.M., URBAN J.F., JR., BECKMANN M.P., PARK L.S., SCHOOLEY K.A., COFFMAN R.L., MOSMANN T.R., PAUL W.E. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 303-333, 1990.

FULEIHAN, R.L. Allergy, immunology, and related disorders. *Curr Opin Pediatr* 10: 581-583, 1998

GALLI S.J., WERSHIL B.K. The two faces of the mast cell. *Nature*, 381: 21-22, 1996.

GAVIN, M.A., S.R. CLARKE, E. NEGROU, A. GALLEGOS, A. RUDENSKY. Homeostasis and anergy of CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 3:33-41, 2002.

GEHA, R.S. Allergy, a disease of the internal and external environments. *Opinion in Immunology.* 12: 615-617, 2000.

GIORGIONE J.R., TURCO S.J., EPAND R.M. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 15; 93 (21): 11634-9, 1996.

GROUX, H., A. O'GARRA, M. BIGLER, M. ROULEAU, S. ANTONENKO, J. E. DE VRIES, M. G. RONCAROLO. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737. 4, 1997.

GOULD H.J., SUTTON B.J., BEAVIL A.J., BEAVI R.L.L, MCCLOSKEY N., COKER H. A., FEAR D., SMURTHWAITE L. The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annu. Rev. Immunol.* 21:579–628, 2003.

GREEN SJ, MELTZER MS, HIBBS JB, NACY CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol*;144 : 278-86, 1990.

HANDMAN, E. Cell biology of Leishmania. *Advances in Parasitology*, 44: 1-39, 1999.

HAAS H., FALCONE F.H., HOLLAND M.J., SCHRAMM G., HAISCH K., GIBBS B.F., BUFE A., SCHLAAK M. Early interleukin-4: its role in the switch towards a Th2 response and IgE-mediated allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 119: 86-94, 1999.

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

HELM R.M., BURKS A.W. Mechanisms of food allergy. *Current Opinion in Immunology*, 12 (6): 647-653, 2000.

HICKEY M. J., GRANGER D.N., KUBES P. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiol Scand*, 173, 119±126, 2001

HOLGATE S.T. The epidemic of allergy and asthma. *Nature*, 402: B2-B4, 1999.

KANE M.M., MOSSER D.M. *Leishmania* parasites and their plays to disrupt macrophage activation. *Curr. Opin. Hematol.*, 7(1): 26-31, 2000.

KAY A.B. Overview of allergy and allergic diseases: with a view to the future. *British Medical Bulletin*, 56(4): 843-864, 2000.

KISHIMOTO, T.K., ANDERSON, D.C. The role of integrins in inflammation. In: J.I. Gallin, I.M. Goldstein & R. Snyderman (eds) *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, pp. 353±406. Raven Press Ltd, New York. 1992.

KUHN R., LOHLER J., RENNICK D., RAJEWSKY K., MULLER W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 22;75(2):263-74, 1993.

LACK G. New developments in food allergy: old questions remain. *J Allergy Clin Immunol.* 114(1):127-30, 2004.

LAISON R., SHAW J.J. Evaluation, classification and geographical distribution. In: PETERS. W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.) *The leishmaniasis in Biology and Medicine.* New York: Academic Press.,1-120, 1987.

LAMONT, J T. Mucus: the front line of intestinal mucosal defense. *Ann N Y Acad Sci,* 664: 190-209, 1992.

LAUNOIS P., I. MILLARD, S. PINGEL, K. G. SWIHART, I. XÉNARIOS, H. ACHA-ORBEA, H. DIGGELMANN, R. M. LOCKSLEY, H. R. MacDONALD e J. A. LOUIS. IL-4 rapidly produced by V α 4V β 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity,* 6: 541-549, 1997.

LEE J., PARK S., LEE C., CHO Y., YOO B., MOON H., PARK H. Eggplant anaphylaxis in a patient with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 113: 995–996, 2004.

LIEW F.Y., S. MILLOT, C. PARKINSON, R.M.J. PALMER e S. MONCADA. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 144: 4794 – 4797, 1990.

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

LING EM, SMITH T, NGUYEN XD, PRIDGEON C, DALLMAN M, ARBERY J, ROBSON D. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*;363:608–615, 2004.

LIU H., B. HU, D. XU, F.Y. LIEW. CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF- β and CTLA4. *The Journal of Immunology,* 171: 5012–5017, 2003.

LOCKSLEY R.M., HEINZEL F.P., SADICK M.D., HOLADAY B.J., GARDNER K.D. Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol.*; 138(5):744-9, 1987.

LORENTZ A., BISCHOFF C.S. Regulation of human intestinal mast cells by stem cell factor and IL-4. *Immunological Reviews,* 179:57-60, 2001.

MAHALINGAM, S., KARUPIAH, G. Chemokines and chemokines receptors in infectious diseases. *Immunol. Cell Biol.* 77, 469–475, 1999.

MAKINO, Y., D. N. COOK, O. SMITHIES, O. Y. HWANG, E. G. NEILSON, L. A. TURKA, H. SATO, A. D. WELLS, T. M. DANOFF. Impaired T cell function in RANTES-deficient mice. *Clin. Immunol.* 102:302–309, 2002.

MATSUSHIMA K, LARSEN CG, DUBOIS GC, OPPENHEIM JJ. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* 169:1485–1490, 1989.

MAUËL J. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.* 38: 1-51, 1996.

MAYER L. Mucosal immunity. *Pediatr* 11: 1595–1600, 2003.

MESTECKY J., RUSSEK M.W., JACKSON S., BROWN T.A. The human IgA system: a reassessment. *Clin Immunol Immunopathol*, 40: 105-114, 1986.

MILLER M.D., KRANGEL M.S. The human cytokine I-309 is a monocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 1;89(7):2950-4, 1992.

MILES S.A., CONRAD M.S., ALVES R.G., JERONIMO M.B., MOSSER D.M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *JEM* Vol. 201, No. 5, March 7, 747–754, 2005.

MOHRS M., HOLSHER C., BROMBACHER F. Interleukin-4 receptor alpha-deficient BALB/c mice show an unimpaired T helper 2 polarization in response to *Leishmania major* infection. *Infect Immun.* Apr;68(4):1773-80, 2000.

MOLL H., FLOHE S., ROLLINGHOFF M. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur J Immunol.* Mar;25(3):693-9, 1995.

MOREIRA L.F. Estudo dos componentes nutricionais e imunológicos na perda de peso em camundongos com alergia alimentar. Belo Horizonte, 2006.

MOROKATA T., ISHIKAWA J, IDA K., YAMADA T. C57BL/6 mice are more susceptible to antigen-induced pulmonary eosinophilia than BALB/c mice, irrespective of systemic T helper 1/T helper 2 responses. *Immunology.* 98 (3): 345, 1999

MOSER, B. WOLF M. WALZ A., LOETSCHER P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 25, 75–84, 2004.

MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136: 2348-57, 1986.

MOSMANN T.R., COFFMAN R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173, 1989.

MOSSER D.M., ROSENTHAL L.A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Seminars in Cell Biology*, 4: 315-322, 1993.

MÜLLER, K., G. VAN ZANDBERGEN, B. HANSEN, H. LAUFS, N. JAHNKE, W. SOLBACH, T. LASKAY. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med. Microbiol. Immunol.* 190:73, 2001.

NATHAN C.F., J.B. HIBBS Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 65 , 1991.

NOBEN-TRAUTH N., PAUL W. E., SACKS D. L. IL-4- and IL-4-receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. *J. Immunol.* 162, 6132-6140, 1999.

OU LS, GOLEVA E, HALL C, LEUNG DY. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol*; 113:756-763, 2004.

PFEFFER K., T. MATSUYAMA. T.M. KUNDIG, A. WAKEHAM, K. KISHIHARA, A. SHAHINIAN, K. WEIGNMANN, P.S. OHASHI, M. KRONKE e T.W. MAK. Mice deficient for the 55 kDa tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73 : 457, 1993.

PICCINNI M-P; MAGGI E., ROMAGNANI S. Environmental factors favoring the allergen-specific Th2 response in allergic subjects. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 917: 844-852, 2000.

PIEDRAFITA D, PROUDFOOT ., NIKOLAEV A.V., XU D, SANDS W, FENG G.J., THOMAS E., BREWER J., FERGUSON M.A., ALEXANDER J., LIEW F.Y. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans. *Eur J Immunol.* Jan;29(1):235-44, 1999.

POWRIE F, CARLINO J, LEACH MW, MAUZE S, COFFMAN RL. A critical role for transforming growth factor β but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RBlow CD4+ T cells. *J Exp Med*;183:2669-2674, 1996.

PROUDFOOT L., NIKOLAEV A.V., FENG G.J., WEI W.Q., BRIMACOMBE J.S., LIEW F.Y. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;93(20):10984-9, 1996.

PUENTES S.M., SACKS D., DA SILVA R.P., JOINER K.A. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 167: 887-902, 1988.

REINER S.L., LOCKSLY R. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*, 13: 151-177, 1995.

ROMAGNANI S. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol Today*, 12:256-7, 1991.

ROSS R.F. Notes on *Leishmania*'s bodies. *Brit. Med. J.* 11: 1401, 1903.

ROT, A., VON ANDRIAN, U.H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 891–928, 2004

ROT A, KRIEGER M, BRUNNER S, SCHALL TJ, DAHINDEN CA (1992) RANTES and macrophage inflammatory protein 1 α induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med* 176:1489–1495, 1992.

RUSSEL D.G. The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is predominate C3 acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigote. *Eur. J. Bioch.* 164: 213-221, 1987.

SACKS D, N. NOBEN-TRAUTH. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews*, 2:845-858, 2002.

SADICK M.D., HEINZEL F.P., HOLADAY B.J., PU R.T., DAWKINS R.S., LOCKSLEY R.M. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J Exp Med.* Jan 1;171(1):115-27, 1990.

SAKAGUCHI, S., N. SAKAGUCHI, M. ASANO, M. ITOH, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor β -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151, 1995.

SALDANHA J.C.S. Avaliação da resposta inflamatória à *Leishmania major* em camundongos com alergia alimentar. Belo Horizonte, 2002.

SALDANHA J.C.S., GARGIULO D.L., SILVA S.S., CARMO-PINTO F.H., ANDRADE M.C., ALVAREZ-LEITE J.I., TEIXEIRA M.M., CARA D.C A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Braz Jour Med Biol Reser*, 37: 809-816, 2004

SAMPSON H.A. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol.*;103(5 Pt 1):717-28, 1999.

SANTIAGO H.C., OLIVEIRA M.A., BAMBIRRA E.A., FARIA A.M., AFONSO L.C., VIEIRA L.Q., GAZZINELLI R.T. Coinfection with *Toxoplasma gondii* inhibits antigen-specific Th2 immune responses, tissue inflammation, and parasitism in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Infect Immun.*; 67(9):4939-44, 1999.

SANTIAGO H C., OLIVEIRA C.F., SANTIAGO L, FERRAZ F.O., SOUZA D.G., FREITAS L.A., AFONSO L.C., TEIXEIRA M.M., GAZZINELLI RT, VIEIRA L.Q. Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. *Infect Immun.* Aug;72(8):4918-23, 2004.

SCHALL TJ, BACON K, TOY KJ, GOEDDEL DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347:669–671, 1990.

SCOTT P., E. PEARCE, A.W. CHEEVER, R.L. COFFMAN e A. SHER. Role of cytokines and CD4+ T cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol. Review* 112: 161-182, 1989.

SCOTT P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* 1;147(9):3149-55, 1991.

SHEVACH, E.M. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2:389–400, 2002.

SMARTIN S., MARCOS A., CHANDRA R.K. Food hypersensitivity. *Nutrition Research*, 21(3): 473-497, 2001.

SPRINGER T.A.. Traffic signals of lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76, 301±314, 1994.

STRACHAN D.P. Hay fever, hygiene, and household size. *Br. Med. J.* 299: 6710 1259–1260, 1989.

SUNDERKÖTTER, C., M. KUNZ, K. STEINBRINK, G. MEINARDUS-HAGER, M. GOEBELER, H. BILDAU, AND C. SORG. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 151:4891, 1993.

- SUTTON B.J., GOULD H.J. The human IgE network. *Nature* 366:421–28, 1993.
- SWIRSKI F.K., D. SAJIC, C.S. ROBBINS, B.U. GAJEWSKA, M. JORDANA e M. R. STÄMPFLI. Chronic exposure to innocuous antigen in sensitized mice leads to suppressed airway eosinophilia that is reversed by granulocyte macrophages colony-stimulating factor. *J. Immunol.*, 169: 3499-3506, 2002.
- TAPIA F., CÁCERES-DITMAR S., SÁNCHEZ M. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Today*. 15: 160-165, 1994.
- TAYLOR P.M., THOMAS D.B., MILLS K.H.G. In vivo culture of T cell lines and clones. In: *Lymphocytes. A practical approach.*, 133-147. IRL press, Washington, 1987.
- THORNTON AM, SHEVACH EM. Suppressor effector function of CD25+CD4+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*;164: 183–190, 2000.
- TRINCHIERI G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*, 84:4008±27, 1994.
- TRINCHIERI G. A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 251-276, 1995.
- TRINCHIERI G. Immunobiology of interleukin-12. *Immunol Res.*;17(1-2):269-78, 1998.
- TULIC M.K., WALE J.L., HOLT P.G., SLY P.D.. Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol.*; 22:604–612, 2000.
- VAN ZANDBERGEN G., KLINGER M., MUELLER A, DANNENBERG S., GEBERT A, SOLBACH W., LASKAY T. Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages1. *The Journal of Immunology*, 173: 6521–652, 2004.
- VESTER, B., MULLER K., LASKAY T.. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 67:3155–3159, 1999.
- VIEIRA L.Q., GOLDSCHMIDT M., NASHLEANAS M., PFEFFER K., MAR T., SCOTT P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J Immunol.* Jul 15;157(2):827-35, 1996.

WEAVER L.T., LAKER M.F., NELSON R., LUCAS A.. Milk feeding and changes in intestinal permeability and morphology in the newborn. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 6: 351–358, 1987.

WEBER, C., K. S. WEBER, C. KLIER, S. GU, R. WANK, R. HORUK, P. J. NELSON. Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO T cells. *Blood* 97:1144–1146, 2001.

WHO: fonte: www.who.int/emc/diseases/leish/leis.html 2001

WILLS-KARP M., SANTELIZ J., KARP C.L. The germless theory of allergic disease revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Ver Immunol*, 1:69-75, 2001.

YAZDANBAKHSI M., KREMSNER P.G., VAN REE R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*, 296: 490-494, 2002.

YU L.C.H., PERDUE M.H. Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. *Immunological Reviews*, 179: 61-73, 2001.

ZAPH C. e P. SCOTT. Th1 cell-mediated resistance to cutaneous infection with *Leishmania major* is independent of P- and E- selectins. *J. Immunol.*, 171: 4726 – 4732, 2003.

ZHANG X, IZIKSON L, LIU L, WEINER HL. Activation of CD25+CD4+ regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol*;147:4245–4253, 2001.

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](#)