



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

EFEITO DA QUIMIOCINA CXCL10 NA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum chagasi* EM CAMUNDONGOS BALB/c

WEBERTTY MAYK EUFRÁSIO DE FIGUEIREDO

**FORTEZA
2012**

WEBERTTY MAYK EUFRÁSIO DE FIGUEIREDO

EFEITO DA QUIMIOCINA CXCL10 NA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum chagasi* EM CAMUNDONGOS BALB/c

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira

**FORTALEZA
2012**

WEBERTTY MAYK EUFRÁSIO DE FIGUEIREDO

EFEITO DA QUIMIOCINA CXCL10 NA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum chagasi* EM CAMUNDONGOS BALB/c

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Jania Teixeira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Fernanda Cristina Macedo Rondon
Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Cristina de Souza Chaves
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Max Vitor Carioca Freitas
Universidade Federal do Ceará

À minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força para enfrentar mais este desafio em minha vida e por colocar ao meu lado, ao longo desses dois anos de mestrado, pessoas maravilhosas com quem muito aprendi e com as quais sempre pude contar, tornando possível a conclusão desse projeto.

Em especial, agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Maria Jania Teixeira pela valiosa orientação, pela serenidade nos meus momentos de incerteza, pelas sugestões sempre pertinentes, pela confiança que depositou em mim, por todo o conhecimento transmitido e pela amizade inestimável que tanto contribuiu para que eu conseguisse realizar esse trabalho. Além de prazeroso, foi uma honra ter sido orientado por um ser humano tão fascinante, que para mim é um exemplo de abnegação em prol da pesquisa.

À Profa. Dra. Zirlane Castelo Branco Coêlho, que tanto me ajudou nas muitas análises laboratoriais que fizemos e que nunca me negou auxílio quando precisei. Obrigado pelo carinho e atenção com que sempre me tratou e também por ter me ensinado que a vida pode ser mais leve e cheia de alegria.

À bióloga Mayara Araújo Brilhante e os agora mestrandos João Vitor Serra Nunes, Sayonara de Melo Viana e Priscila Valera Guerra, vocês contribuíram para que tudo fosse mais fácil. Amigos fiéis, sempre estiveram ao meu lado, com vocês pude enfrentar as dificuldades inerentes a um projeto como esse. O convívio diário, ao longo desses anos, foi algo tão enriquecedor para mim que se tornou indispensável e talvez por isso já sofra com a nossa separação, tomara que a vida nos reúna em novos projetos, porque sempre que isso acontecer vocês farão de mim uma pessoa melhor. Tudo que vivemos foi muito especial, aprendi muito com vocês e é por isso que os guardarei para sempre no meu coração.

Aos meus amigos Paulo Florentino Teixeira Neto, Laiane Fernanda de Melo Bezerra, Raissa Matos Fontes, Claudênia Costa Praciano, Allan Rodrigo Soares Maia, Juliana Montezuma Barbosa, Jânio Emanuel Andrade Cavalcante e Nayrton Flávio Moura Rocha, pela valiosa amizade e companheirismo.

À Profa. Dra. Margarida Maria Lima Pompeu, patologista responsável pela orientação e suporte nas análises histopatológicas que foram feitas, trabalho árduo que em alguns momentos foi feito nos finais de semana na sua própria casa, o que mostra o grau de comprometimento dessa professora com o trabalho. Obrigado pela paciência, pela disponibilidade e pelos ensinamentos.

À Profa. Dra. Cristina de Souza Chaves, uma profissional exemplar por quem tenho uma admiração e um carinho especial, obrigado por ter me iniciado na pesquisa ainda quando eu era aluno do curso de farmácia da UFC, sob sua orientação aprendi bastante e graças à oportunidade que me deu, pude descobrir meu gosto pela pesquisa.

A todos que fazem parte do Setor de Estudos em Parasitologia Profa. Zilmar Fontenele e Silva do DPML/UFC, Prof. Dr. Vladimir Michailowsky Leite Ribeiro, Profa. Dra. Kelma Maria Souza Bastos, Josias Martins Vale, Alísio Bandeira Girão, Lucineide de Sousa Barros, por terem me acolhido de braços abertos e por fazerem do ambiente de trabalho um local de amizade e cooperação.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal, em especial à secretária do Mestrado em Patologia, Paula da Paz Palácio, pela disponibilidade e eficiência na resolução de todos os assuntos administrativos e também não poderia deixar de agradecer à Débora Rejane Alves Cavalcante e Ana Graziely Alves Cavalcante as responsáveis pelo preparo das lâminas de histopatológico, sem o esforço de vocês essas lâminas não teriam ficado prontas a tempo.

À coordenação do Mestrado em Patologia/UFC pelo auxílio e presteza, ao longo destes dois anos.

Aos professores do Mestrado, pelo conhecimento transmitido.

À minha família, em especial meus pais Floro Bento de Figueiredo e Regina Maria Eufrásio de Figueiredo pela dedicação e zelo com que sempre cuidaram da sua família, exemplos de honestidade e caráter sempre estiveram do meu lado. As minhas irmãs Vanessa Maria Eufrásio de Figueiredo e Valéria Régis Eufrásio de Figueiredo, a minha tia Rita Maria Eufrásio, a minha prima Ana Luzia de Figueiredo Lacerda e também a minha namorada Francisca Maria Rodrigues Santos, obrigado pelo apoio que me tem sido dado, pois sem ele eu não teria conseguido.

A CAPES, pelo apoio financeiro com o provimento da bolsa durante todo o trabalho.

“Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior.”

(Dalai Lama)

RESUMO

A leishmaniose visceral causada por *Leishmania infantum chagasi* é caracterizada pela perda da habilidade do hospedeiro gerar uma resposta imunológica eficaz. Neste estudo, foi investigado o papel da quimiocina CXCL10 no controle da infecção por *L. infantum chagasi* in vivo. Grupos de camundongos BALB/c foram tratados ou não com CXCL10 (5 µg/kg) com 1, 3 e 7 dias de infecção e após 1, 7 e 23 dias do tratamento, alguns parâmetros foram avaliados: a carga parasitária, os níveis de IFN- γ , IL-4, TGF- β e IL-10, e as alterações histopatológicas no fígado. Após 23 dias de tratamento, CXCL10 induziu, no baço, uma redução expressiva no número de parasitos, quando comparado ao grupo controle. No fígado, a carga parasitária mostrou uma queda no grupo tratado, entre o 7º e 23º dia após o tratamento. Entretanto, o efeito leishmanicida de CXCL10, neste trabalho, não parece ser mediado por NO, uma vez que não houve diferença na produção de NO entre os grupos. IFN- γ foi induzida de maneira mais significativa no grupo tratado do que nos controles, e atingiu sua produção máxima (100 pg/mL) no 23º dia após o tratamento, correlacionando-se com a queda da carga parasitária nos órgãos-alvo. IL-4 foi produzida em baixas concentrações, em ambos os grupos, embora os animais tratados com CXCL10 tenham mostrado níveis mais elevados do que os controles. Em relação às citocinas antiinflamatórias, após 23 dias do tratamento, os níveis de IL-10 nos animais tratados foram menores do que os do controle. A produção de TGF- β após 7 dias do tratamento foi 2 vezes menor no grupo tratado quando comparado ao controle, e após 23 dias do tratamento, essa citocina continuou com níveis mais baixos do que aqueles observados no controle. Na análise histopatológica do fígado após o 1º dia do tratamento, foram encontrados, em ambos os grupos, mais granulomas imaturos (GI), do que infiltrados não granulomatosos (NG) e alguns poucos granulomas maduros (GM) apenas no grupo tratado. Após 7 dias do tratamento, a quantidade de infiltrados NG estava menor e os GI ainda foram os mais encontrados, em ambos os grupos, além disso, foi observado um pequeno aumento de GM no grupo tratado. Em resumo, diante dos resultados encontrados, é possível sugerir um importante papel leishmanicida de CXCL10 em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum chagasi*, que parece ser mediado por uma expressiva produção de IFN- γ e supressão das citocinas imunorreguladoras, IL-10 e TGF- β , abrindo a hipótese se isto não estaria associado a uma diminuição na frequência de células regulatórias, induzida por CXCL10, nesses animais.

Palavras-chave: *L. infantum chagasi*, CXCL10, IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , granuloma.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum chagasi* is characterized by the loss of the ability of host to generate an effective immune response. In this study it was investigated the role of CXCL10 chemokine in controlling *L. infantum chagasi* infection in vivo. Groups of BALB/c mice were treated or not with recombinant CXCL10 chemokine (5 µg/kg) with 1, 3 and 7 days of infection and after 1, 7 and 23 days of treatment, some parameters were evaluated: parasite load, levels of IFN- γ , IL-4, TGF- β and IL-10, and the histopathological alterations in the liver. After 23 days of treatment, CXCL10 induced in the spleen a significant reduction on the number of parasites as compared to control group. In the liver, parasite load decreased in treated group between the 7th and 23th day post treatment. However, the antileishmanial effect of CXCL10, in this work, does not seem to be mediated by NO, since there was no difference in the NO production among the groups. IFN- γ was induced most significantly in treated group than in controls, and reached its maximum production (100 pg/mL) on day 23 after treatment, correlating with the reduction in parasite burden in target organs. IL-4 was produced in low doses, in both groups, although treated animals had shown higher levels than control group. Regarding to anti-inflammatory cytokines, after the 23th day of treatment, IL-10 levels in treated animals were smaller than in control group. Production of TGF- β after 7 days of treatment was 2 times lower in treated group when compared to control, and after the 23th day of treatment, this cytokine remained with lower levels than those observed in control. In the histopathological analysis of the liver after the 1st day of treatment, were found in both groups more immature granulomas (GI) than non-granulomatous infiltrate (NG), and some few mature granulomas (GM) were only observed in treated group. After 7 days of treatment, the amount of NG infiltrates was lower, and GI were still the most frequent in both groups, besides a slight increase of GM was observed in treated group. In summary, at the light of the found results, it is possible to suggest an important leishmanicidal role to CXCL10 in BALB/c mice infected by *L. infantum chagasi*, which seems to be mediated by a significant IFN- γ production, and suppression of immunoregulatory cytokines, IL-10 and TGF- β , opening the hypothesis that this would be associated to a decrease in the frequency of regulatory T cells induced by CXCL10 in these animals.

Keywords: *L. infantum chagasi*, CXCL10, IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , granuloma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura1.	Visão esquemática da resposta imunológica no fígado de camundongos BALB/c após infecção experimental.....	18
Figura2.	Falha na ativação dos macrófagos da Zona Marginal.....	20
Figura3.	Mudanças na arquitetura do baço durante a infecção crônica.....	21
Figura4.	Fluxograma- Desenho experimental do estudo.....	29
Figura5.	Peso relativo do baço (A) e do fígado (B) de camundongos BALB/c infectados com <i>L.infantum chagasi</i> e tratados com CXCL10.....	34
Figura6.	Carga parasitária no baço (A) e no fígado (B) de camundongos BALB/c infectados com <i>L.infantum chagasi</i> tratados com CXCL10.....	35
Figura7.	Produção de óxido nítrico por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum chagasi</i> e tratados com CXCL10.....	36
Figura8.	Produção de IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com <i>L.infantum chagasi</i> e tratados com CXCL10....	38
Figura9.	Resposta granulomatosa do fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>L.infantum chagasi</i> e tratados com CXCL10.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático ligado a enzima
IFN	Interferon
IL-	Interleucina
LV	Leishmaniose visceral
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde / World Health Organization
PBS	Solução-tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMN	Polimorfonucleares
SBF	Soro bovino fetal
TGF	Fator transformador de crescimento
Th	T <i>helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TRL	Receptor <i>toll-like</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Leishmaniose visceral.....	13
1.1.1	Aspectos epidemiológicos	13
1.1.2	Agente etiológico e aspectos clínicos.....	14
1.1.3	Aspectos imunopatológicos no modelo experimental murino.....	16
1.2	Quimiocinas e seus receptores	21
1.2.1	A quimiocina CXCL10	24
2	JUSTIFICATIVA.....	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo Geral	27
3.2	Objetivos Específicos	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Reagentes e meios de cultura	28
4.2	Animais.....	28
4.3	Parasitos	29
4.4	Infecção experimental e tratamento dos animais	30
4.5	Carga parasitária	30
4.6	Cultura de esplenócitos.....	30
4.7	Dosagem de citocinas	31
4.8	Dosagem de óxido nítrico (NO).....	31
4.9	Análise histopatológica.....	32
4.10	Análise estatística	32
5	RESULTADOS	33
5.1	Alteração ponderal dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum chagasi</i> e tratados com CXCL10.....	33
5.2	Peso relativo do baço e do fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum chagasi</i> e tratados com CXCL10.....	33
5.3	Carga parasitária do baço e do fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum chagasi</i> e tratados com CXCL10.....	34
5.4	Produção de óxido nítrico por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum chagasi</i> e tratada com CXCL10.....	36

5.5	Produção de citocinas por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum chagasi</i> e tratados com CXCL10	37
5.6	Análise da resposta granulomatosa do fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum chagasi</i> e tratados com CXCL10.....	39
6	DISCUSSÃO	41
7	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose visceral

1.1.1 Aspectos epidemiológicos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses encontram-se amplamente distribuídas pelo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do Oriente Médio, Sul da Ásia, África e América Latina. As leishmanioses podem apresentar-se com comprometimento da pele, mucosas ou vísceras, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que acometem cerca de 12 milhões de indivíduos e ameaçam outros 350 milhões em 98 países, fazendo surgir cerca de 2 milhões de casos a cada ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Dentre as leishmanioses, a forma mais grave é a visceral, que quando não tratada pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos. Estima-se que, em todo o mundo, ocorrem 500.000 novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) anualmente, sendo que 90% desses casos são provenientes de Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. Vale salientar que 90% dos casos registrados na América Latina ocorrem no Brasil. A doença é endêmica no Brasil e apresenta surtos frequentes, sendo considerada de grande importância para a Saúde Pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Conforme dados fornecidos pelo Ministério da Saúde, 34.583 casos de LV foram registrados durante o período entre 2003 e 2009, sendo a região Nordeste a de maior prevalência com 47,5% dos casos confirmados. É importante observar também que, através da análise desses dados, o Ceará foi o estado onde mais ocorreram notificações de LV em 2009 (17,03%), sendo mais frequente em indivíduos do sexo masculino (63,9%) e em crianças menores de 10 anos (48,9%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Os vetores da LV são insetos denominados flebotomíneos e dependendo da região que se encontram, são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. Duas espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* relacionam-se com a transmissão da LV no país: *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*. A espécie *Lu. longipalpis* é encontrada nas cinco regiões do Brasil, adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas, sendo considerada a principal transmissora da forma visceral no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), enquanto a espécie *Lu. cruzi* parece ter uma contribuição menor, sendo

identificada até agora somente nos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (SANTOS *et al.*, 1998; DE PITA-PEREIRA *et al.*, 2008; MISSAWA *et al.*, 2011).

Em busca de melhores condições de vida, ocorreu uma ampla migração de pessoas da zona rural para a periferia das grandes cidades, promovendo a urbanização da doença (DESJEUX, 2001). Nessas comunidades não há planejamento algum, as áreas verdes foram amplamente destruídas, as condições sanitárias são precárias, os animais são criados sem nenhuma infraestrutura em meio aos moradores, o que gera um excelente habitat para o vetor *Lu. longipalpis* (BORGES *et al.*, 2009).

Estudos publicados em 2009 mostraram que a doença vem urbanizando-se rapidamente em Fortaleza. Dos 1.636 casos confirmados entre 2001 e 2006, a capital cearense foi responsável por 60% deles (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009). O mesmo fenômeno da urbanização da LV com aumento da pobreza e das péssimas condições de vida tem sido observado em outras capitais do Nordeste, como São Luís, Teresina, Natal e Salvador (COSTA, 2008).

Casos de LV associados à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) foram relatados em 35 países, inclusive no Brasil (CHAPPUIS *et al.*, 2007). A leishmaniose é considerada uma infecção oportunista em indivíduos imunocomprometidos, pois se instala ou se exacerba facilmente no indivíduo HIV positivo, acelerando o curso clínico da infecção e prejudicando a resposta ao tratamento (PAREDES *et al.*, 2003). A ruralização do HIV/AIDS e a urbanização da LV têm promovido um aumento na incidência desta co-infecção (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

1.1.2 Agente etiológico e aspectos clínicos

A atual classificação taxonômica proposta por ADL e colaboradores (2005), através de estudos ultraestruturais e moleculares, coloca os protozoários parasitas causadores das leishmanioses no supergrupo Excavata, táxon Euglenozoa, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Esses parasitos têm um ciclo de vida heteroxênico, ocorrendo sob duas formas evolutivas: a forma extracelular, denominada promastigota, encontrada no trato digestivo dos vetores flebotomíneos (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987); e a forma amastigota, encontrada parasitando células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) dos hospedeiros mamíferos (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

L. donovani e *L. infantum* são as espécies causadoras da LV no Velho Mundo, e *L. chagasi* nas Américas (PISCOPO; MALLIA, 2006). Apesar das diferenças no nome e na origem geográfica de *L. infantum* e *L. chagasi*, estudos recentes envolvendo diferentes marcadores moleculares sugerem que a diversidade entre as espécies é restrita, o que impede sua distinção (MAURÍCIO *et al.*, 2000).

O curso clínico da doença pode depender tanto de fatores relacionados à natureza da resposta imunológica e da genética do hospedeiro, do seu estado nutricional e da baixa idade, como também da espécie de *Leishmania*, da quantidade de parasitos inoculada, da infectividade e patogenicidade do parasito (BADARO *et al.*, 1986; PEARSON; SOUZA, 1996; MURRAY *et al.*, 2005).

Na LV, o tempo de incubação do protozoário costuma variar de 3 a 8 meses, mas pode durar apenas 10 dias em alguns casos, ou ainda se estender por um período muito longo, de 34 meses em outros casos. A doença também tem sido diagnosticada em pessoas que se tornam imunocomprometidas anos após terem se mudado de áreas endêmicas (PEARSON; SOUZA, 1996). A forma assintomática da LV é caracterizada por sorologia positiva para *Leishmania* e exame físico normal. O aparecimento dos sintomas geralmente é gradual, mas podem se manifestar abruptamente, levando a um desfecho fatal em poucas semanas. Os sintomas clássicos são febre irregular e mal-estar, perda de peso progressiva, caquexia, hepatoesplenomegalia, anemia e pancitopenia, podendo levar a morte dentro de 2 a 3 anos, se não houver tratamento (FERREIRA *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas da LV são divididas em três períodos: período inicial, período de estado e período final. O primeiro deles, também conhecido como fase aguda, representa o início da sintomatologia que, mesmo podendo variar de paciente para paciente, na maioria das vezes corresponde a sintomas como hepatoesplenomegalia, palidez cutâneo-mucosa e febre com duração de no máximo quatro semanas (BRASIL/MS, 2006). Em regiões endêmicas, é possível encontrarmos a forma da doença denominada oligossintomática, nesse caso, a infecção frequentemente evolui para a cura clínica aparente dentro de no máximo 15 dias. O paciente oligossintomático, geralmente criança, apresenta um quadro clínico discreto com presença de febre baixa, diarréia, leve palidez cutâneo-mucosa, tosse não produtiva e discreta hepatoesplenomegalia (EVANS *et al.*, 1992).

O período de estado da doença caracteriza-se por febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. O quadro clínico é arrastado e prossegue por mais de dois meses de

evolução, o que compromete bastante o estado geral do indivíduo. Caso não seja feito o diagnóstico e tratamento, a doença evolui progressivamente para o terceiro e último estágio, o período final. Nesse momento, o paciente apresenta febre contínua, além de um comprometimento mais intenso do estado geral. Instala-se a desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca), há edema dos membros inferiores, podendo evoluir para anasarca. Outras manifestações importantes incluem hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite. Indivíduos não tratados podem apresentar com o tempo caquexia e maior suscipitibilidade a infecções bacterianas devido à imunossupressão (NYLÉN; SACKS, 2007). O óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos (BRASIL/MS, 2006).

1.1.3 Aspectos imunopatológicos no modelo experimental murino

Em camundongos BALB/c, mutações no gene *Slc11a1* causam a sua suscipitibilidade ao protozoário *Leishmania* no início da infecção. O fenômeno altera a capacidade do gene de codificar uma importante bomba transportadora de prótons, que fica também localizada no vacúolo parasítóforo de macrófagos teciduais e tem como função levar íons para o citosol. O defeito dessa bomba faz com que o vacúolo que antes era pobre em Fe^{2+} passe a ficar repleto desse íon. O Fe^{2+} é um cofator indispensável para a produção da enzima superóxido dismutase (SOD), deixando o vacúolo parasítóforo menos hostil para o parasita, e desta forma, permitindo a sobrevivência e multiplicação do parasita (HUYNH; ANDREWS, 2008).

Na LV observa-se que o parasita tem tropismo principalmente pela medula óssea, fígado e baço (LANG; LECOEUR; PRINA, 2009). A doença tem características diferentes no fígado e baço, os dois principais órgãos-alvo. No baço, a doença caracteriza-se pela persistência, chegando a atingir um estágio crônico se não tratada, enquanto no fígado, a infecção pode ser controlada ainda no início, com posterior imunidade para re-infecções (ENGWERDA; KAYE, 2000; STANLEY; ENGWERDA, 2007). No fígado, a LV caracteriza-se por duas fases conhecidas como inicial e tardia. A fase inicial, também chamada de aguda, começa com a chegada da *Leishmania* ao fígado e consequente persistência do parasita durante as duas primeiras semanas após a infecção. É nesse período que a forma amastigota do parasita infecta as células de Kupffer, ocorrendo um rápido aumento da carga parasitária dentro destas células, e isso acontece porque há baixos níveis de

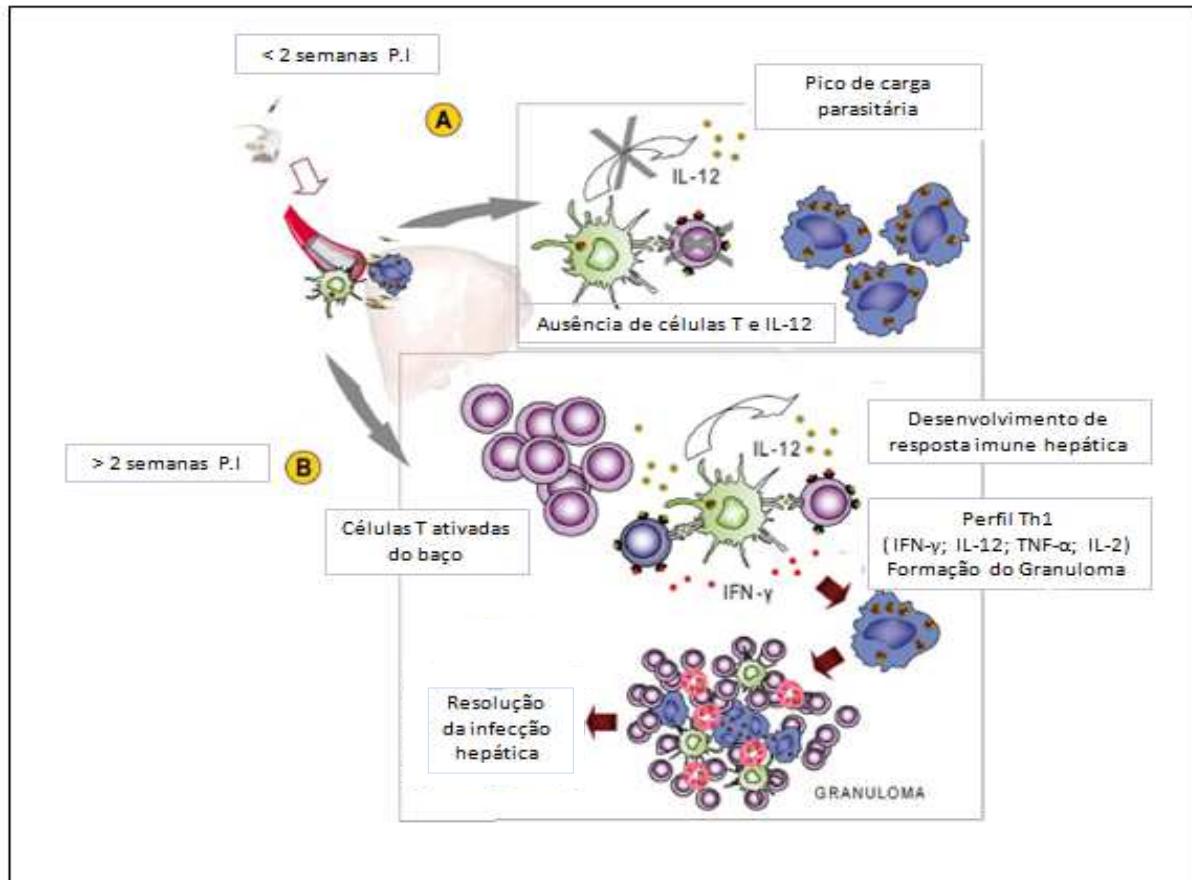
citocinas e de células T que são insuficientes para conter a multiplicação das amastigotas (NIETO *et al*, 2011).

Há trabalhos mostrando que em camundongos BALB/c o acúmulo de CXCL10, uma quimiocina conhecida como recrutadora e ativadora de linfócitos Th1, é progressivo durante os primeiros 14 dias da infecção, porém não é suficiente, uma vez que essa expressão no início da doença é independente de células T, portanto, incapaz de desencadear uma forte resposta inflamatória granulomatosa (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 1999).

A fase da doença no fígado é considerada tardia após a segunda semana de infecção. É nesse momento que a resposta imunológica inicia uma etapa determinante, caracterizada pela chegada ao fígado de linfócitos T ativados na bainha linfóide periarteriolar do baço (PALS) (ENGWERDA; KAYE, 2000; ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004; KAYE *et al*, 2004). Uma vez no fígado, ocorre interação dessas células T ativadas com células dendríticas e macrófagos infectados, mas somente as células dendríticas são capazes de produzir interleucina doze (IL-12), ativando células T CD4⁺ antígeno específicas (SOONG, 2008). São as células dendríticas, num mecanismo envolvendo receptor *toll-like* (TLR) e IL-12, as responsáveis pela ativação de células *natural killer* (NK), gerando citotoxicidade contra o parasito e liberação de IFN-γ (SCHLEICHER *et al*, 2007).

Análises histopatológicas do fígado de camundongos BALB/c desafiados com *L. donovani* mostraram a formação de uma estrutura capaz de conter a infecção, denominada de granuloma. Essa estrutura começa a ser formada através da ação de células mononucleares de defesa, que cercam gradualmente as células de Kupffer parasitadas, formando uma espécie de manta de contenção em torno delas. As primeiras células a aparecerem ao redor das células de Kupffer são granulócitos e monócitos, sendo possível identificar neutrófilos e eosinófilos nessa etapa inicial. A chegada dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ é iniciada após 14 dias da inoculação de *Leishmania*, porém somente depois da quarta semana é que a estrutura está completamente formada. Nesse momento, a resposta imunológica no fígado é capaz de induzir uma eficiente e progressiva redução na quantidade de amastigotas no interior das células de Kupffer, o que começa a ser visualizado com o surgimento cada vez maior de granulomas estéreis. Até o final da doença, células T CD8⁺ irão predominar, sendo possível identificar ainda, embora em pequena quantidade, a presença de linfócitos B (Mc ELRATH; MURRAY; COHN, 1988; MURRAY, 2001) (Fig. 1).

Figura 1. Visão esquemática da resposta imunológica no fígado de camundongos BALB/c após infecção experimental.



(A) Durante a fase aguda hepática (até 2 semanas após a infecção), amastigotas de *Leishmania* multiplicam-se na ausência de IL-12 e de células T ativadas, consequentemente, o número de parasitos no fígado atinge um pico. (B) Duas semanas após a infecção, os linfócitos T ativados do baço migram para o fígado, iniciando a resposta imunológica hepática. A interação das células T ativadas com células de Kupffer infectadas e células dendríticas desencadeia uma resposta pró-inflamatória Th1 com formação de granulomas, resultando na resolução da infecção no fígado (NIETO *et al*, 2011).

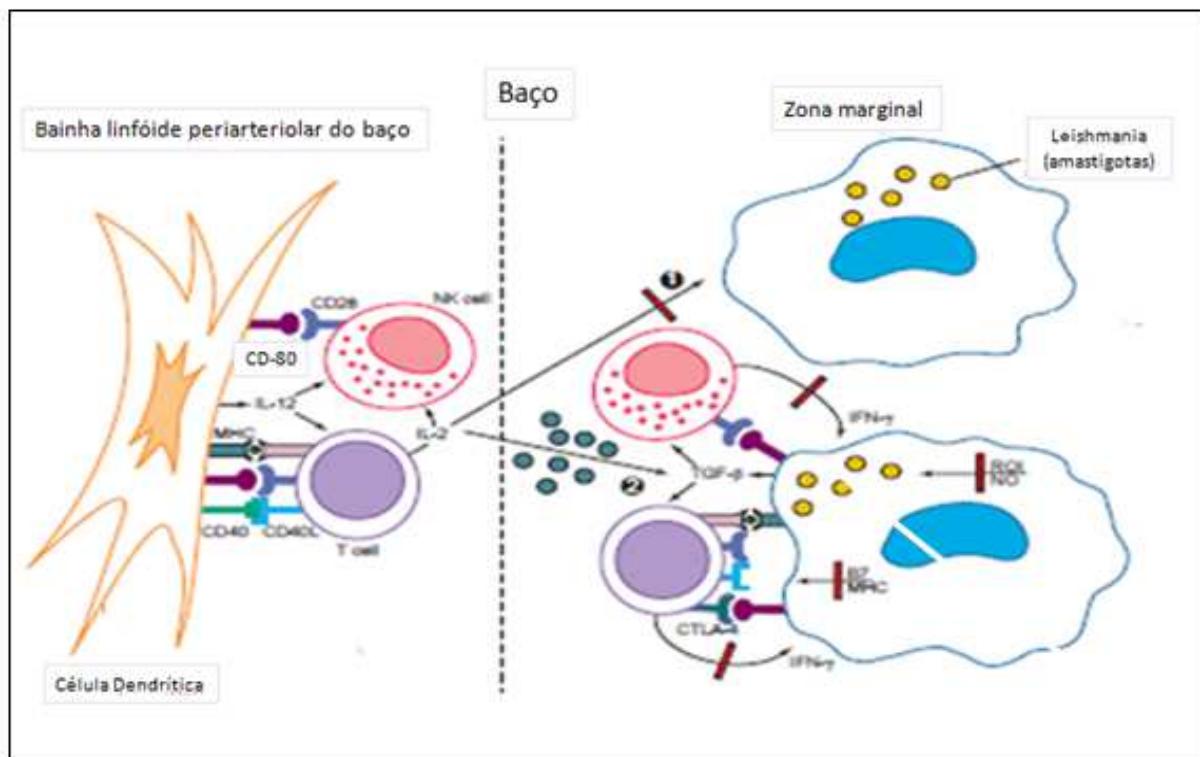
Para Stager e colaboradores (2003), a resposta granulomatosa é constituída pelas seguintes etapas: (i) célula de Kupffer infectada sem associação com infiltrado celular, (ii) granuloma imaturo, em que a célula de Kupffer está envolvida por um pequeno número de células inflamatórias e linfócitos, mas sem organização, (iii) granuloma maduro, onde a estrutura é bem organizada; e (iv) granuloma estéril, estrutura livre de amastigotas, como resultado de um processo de imunidade contra o parasito. A resistência hepática é efetivada à medida que mais granulomas maduros vão sendo formados. Essas estruturas são eficientes na destruição dos invasores, fazendo com que o número deles dentro do granuloma esteja próximo a zero na oitava semana de infecção (NIETO *et al*, 2011).

Após a infecção de *L. infantum* pela via intraperitoneal, em camundongos BALB/c, as promastigotas caem na circulação sanguínea e chegam ao baço através da artéria esplênica, sendo rapidamente removidas da circulação por macrófagos da zona marginal. Estima-se que mais de 95% de *L. infantum*, administrada via intravenosa, é fagocitada por esses macrófagos, sendo que mais de 50% do inóculo inicial é morto nas primeiras 24 horas (ENGWERDA; KAYE, 2000). As células dendríticas da zona marginal adquirem抗ígenos de *Leishmania* tanto pela fagocitose de macrófagos infectados, como também de抗ígenos remanescentes, mas somente em raros casos podem ser infectadas (MEBIUS; KRAAL, 2005).

Ainda na fase aguda, é iniciada no baço a migração de células dendríticas parasitadas da zona marginal para dentro da zona de células T, onde há uma rápida e transitória explosão na secreção de IL-12. Essa elevada produção da citocina acontece nas primeiras 5 horas pós-infecção e diminui logo depois. Observa-se alta afinidade dos receptores de IL-2 nas células T CD4⁺ nesse momento. IL-12 é a citocina responsável pela importante ativação de células NK, T CD4⁺ e T CD8⁺ (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004).

No entanto, apesar da ativação, ocorre uma falha na resposta imunológica no baço, permitindo que a infecção atinja um estágio crônico. Têm sido consideradas duas hipóteses para explicar porque as células T e NK não conseguem ativar de forma eficiente os macrófagos da zona marginal: a primeira delas é que, como a bainha linfóide periarteriolar do baço, onde estão células T e NK ativadas, é segregada anatomicamente da zona marginal, os macrófagos falhariam na produção de quimiocinas capazes de trazer essas células efetoras para sua vizinhança; e a segunda hipótese é que estas células infectadas seriam incapazes de ativar mecanismos microbicidas intrínsecos, como a formação de derivados reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (NO) após estímulo por IFN- γ , ou ainda, seriam capazes de inativar células T e outros macrófagos através de fatores solúveis supressores como TGF- β , além de diminuir a expressão de CD80 e MHC II (ENGWERDA, KAYE, 2000) (Fig. 2).

Figura 2. Falha na ativação dos macrófagos da Zona Marginal.

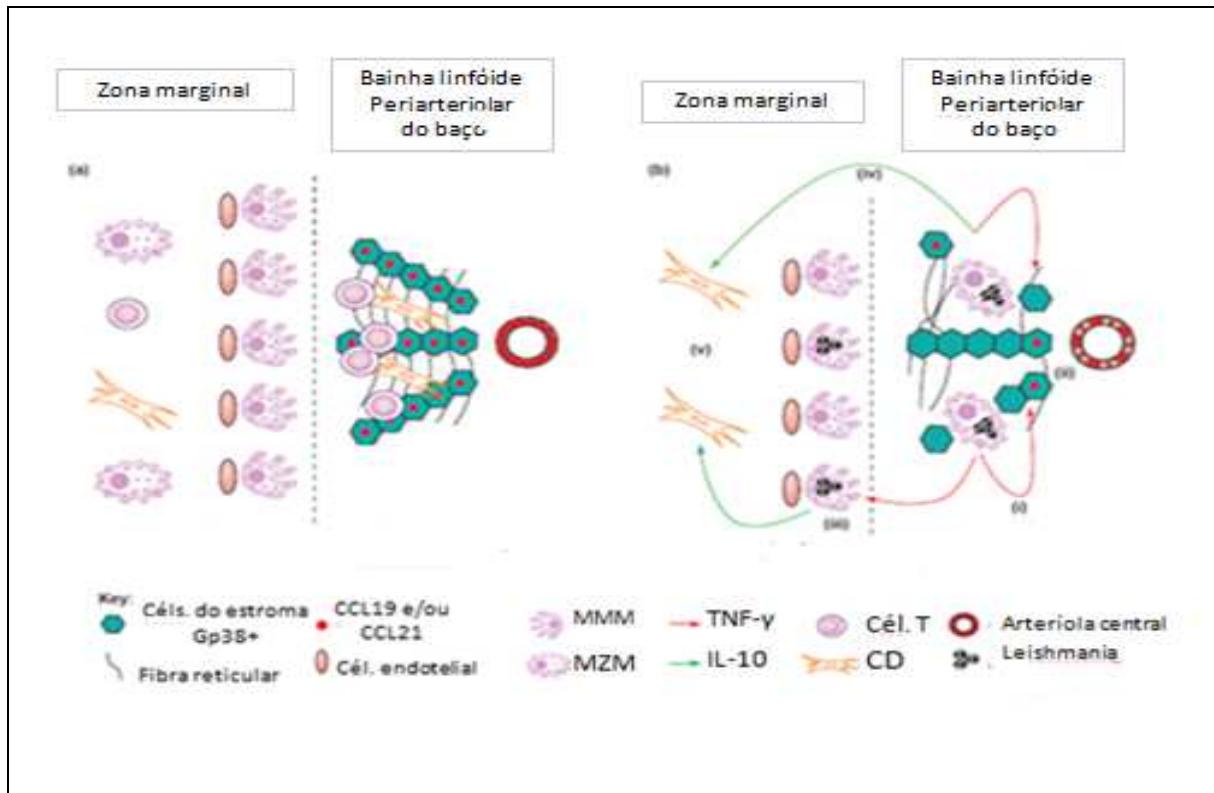


- (1) Falha de macrófagos da ZM em produzir quimiocinas capazes de recrutar células efetoras da vizinhança.
- (2) Falha na ativação de mecanismos microbicidas por células infectadas (ENGWERDA; KAYE, 2000).

A principal característica da fase crônica no baço é a mudança da sua arquitetura. Para que ela ocorra, o órgão sofre alterações na zona marginal, na função das células do estroma e na migração de células dendríticas (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004). No estado normal, os baixos níveis de TNF- α permitem que o tecido linfóide permaneça altamente organizado, porém na presença de *Leishmania*, esta citocina passa a ser produzida em grande quantidade, desencadeando alteração na estrutura da zona marginal e perda dos seus macrófagos, o que gera consequências graves no tráfego de linfócitos para a polpa branca (ENGWERDA *et al*, 2002). Na bainha linfóide periarteriolar do baço (PALS), células do estroma gp38 positivas e do endotélio da arteríola central são as responsáveis pela produção das quimiocinas CCL19 e CCL21. São essas quimiocinas constitutivas que promovem o recrutamento para a região do PALS de células T virgens e células dendríticas portadoras do receptor de quimiocina CCR7 expresso em sua superfície. No mesmo momento em que a grande produção de TNF- α promove a perda de macrófagos marginais, ocorre destruição do estroma, perda da matriz reticular e queda na produção dessas quimiocinas (ATO *et al*, 2002). Nesse momento, a citocina IL-10, regulada positivamente pelo excesso de TNF- α , atinge rapidamente altos níveis. Isso diminui a expressão do receptor CCR7 na superfície das células

dendríticas, comprometendo também a migração dessas células para o PALS (ATO *et al.*, 2002) (Fig. 3).

Figura 3. Mudanças na arquitetura do baço durante a infecção crônica



(a) A estrutura do baço permanece normal durante a fase aguda da infecção. A Zona Marginal (*Marginal Zone – MZ*) compreende duas populações distintas de macrófagos: (i) os Macrófagos da Zona Marginal (*Marginal Zone Macrophages – MZM*) no limite externo; e (ii) os Macrófagos Metalófilicos Marginais (*Marginal Metallophilic Macrophages – MMM*) nas proximidades da Bainha linfóide Peri-Arteriolar (*Peri-Arteriolar Lymphoid Sheath – PALS*), composta por células do estroma gp38⁺, células T e pela Arteríola Central (*Central Arteriole*) do endotélio. Os MMM são ricas fontes das quimiocinas constitutivas CCL19 e CCL21, que atraem Células dendríticas CCR7⁺ (*CCR7⁺ DCs*) e células T da MZ para dentro da PALS. (b) A quebra da arquitetura do baço ocorre na fase crônica. A produção excessiva de TNF, provavelmente de macrófagos não residentes (i) leva à destruição do estroma gp38⁺, perda da matriz reticular e (ii) queda da expressão de CCL19 e CCL21. Os altos níveis de TNF produzidos também regulam positivamente a produção de IL-10. Esta citocina regula negativamente a expressão de CCR7 em células dendríticas, inibindo a sua habilidade para migrar para as PALS (iv). As setas indicam as fontes e alvos de TNF e IL-10 (ENGWERDA, ATO, KAYE, 2004).

1.2 Quimiocinas e seus receptores

As quimiocinas são pequenas proteínas quimiotáticas (8 a 17 kDa) que recrutam distintos subtipos de leucócitos em condições fisiológicas e patológicas (ROSSI; ZLOTNIK, 2000; ROT; VON ANDRIAN, 2004). A produção dessas proteínas é estimulada por uma variedade de agentes como lipopolissacarídeos (LPS), vírus, bactérias, patógenos e algumas

citocinas como IL-4, IL-13, IL-1 e IFN- γ . As quimiocinas são secretadas por células epiteliais, endoteliais e leucócitos, dentre outros tipos celulares (ROT; VON ANDRIAN, 2004; MOSER *et al*, 2004). As quimiocinas desempenham papéis importantes na resposta inflamatória por desencadear a ativação de integrinas durante a adesão das células ao endotélio, induzir o recrutamento de linfócitos antígeno-específico para os tecidos periféricos e liberar enzimas de estoques celulares (SPRINGER, 1994).

Essas proteínas são classificadas em famílias com base no número e na localização dos resíduos de cisteína amino terminais. As duas maiores famílias de quimiocinas são as CXC e as CC. As quimiocinas da família CC possuem duas cisteínas em posições adjacentes, são proinflamatórias, induzindo tipicamente inflamações crônicas e alérgicas, enquanto as da família CXC possuem em sua estrutura dois resíduos de cisteína separados por um aminoácido, apresentam características proinflamatórias em sua maioria, além de quimiotaxia dependente dos receptores a que se ligam (RITTER; KORNER, 2002).

As quimiocinas CXC são divididas ainda em dois subgrupos, dependendo da presença ou ausência do segmento formado por ácido glutâmico, leucina e arginina (ELR), que fica próximo ao domínio amino terminal. O subgrupo CXC ELR+ é aquele em que o segmento está presente, sendo representado, por exemplo, pelas quimiocinas CXCL1 e CXCL8, enquanto o subgrupo CXC ELR- não possui o segmento e é neste subgrupo que estão agrupadas as quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 (MANTOVANI; BONECCHI; LOCATI, 2006). As outras duas famílias de quimiocinas são C, que possui uma cisteína apenas, e CX3C, que possui duas cisteínas separadas por três aminoácidos. A família C é representada pela linfotactina, quimiotática para linfócitos T e células dendríticas, e a família CX3C é representada pela fractalcina, quimiotática para linfócitos T (BAGGIOLINI, 2001).

As ações das quimiocinas são específicas para grupos de células particulares. Membros da classe CXC agem principalmente em células polimorfonucleares (PMN), enquanto membros da classe CC agem em um grupo maior de células, incluindo monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos, mas não em PMN (RITTER; KORNER, 2002). As ligações sulfeto, que participam da estabilização da estrutura da molécula em todas as famílias de quimiocinas, são fornecidas por resíduos de cisteínas conservados (SAUNDERS; TARBY, 1999).

Os receptores de quimiocinas pertencem à superfamília dos receptores de sinalização intracelular acoplados a proteína G, formados por cerca de 350 aminoácidos, compostos por um curto domínio NH₂-terminal, sete domínios α - helicoidais

transmembranares, sendo três alças na porção intracelular, mais três na porção extracelular, somados a um domínio carboxi (COOH) terminal intracelular (MURDOCH; FINN, 2000). A interação entre a quimiocina e seu receptor é caracterizada pela possibilidade de cada quimiocina poder se ligar a vários receptores e cada receptor se ligar a várias quimiocinas (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

São descritos 21 tipos de receptores de quimiocinas. As quatro famílias de receptores de quimiocinas são: CXCR, CCR, XCR e CX3CR. Os receptores CXCR1 e CXCR2, agrupados na família CXCR e expressos em células PMN, estão envolvidos na inflamação aguda, enquanto CXCR3, expresso em linfócitos T ativados, monócitos e células NK, está envolvido na inflamação crônica. Proteínas induzidas por IFN- γ como CXCL10, conhecida anteriormente como IP-10 (Proteína 10 induzida por IFN- γ), CXCL9 e CXCL11, ligam-se a CXCR3, induzindo tipicamente este tipo de inflamação (THELEN, 2001).

Os estudos utilizando animais deficientes de quimiocinas e/ou de seus receptores vêm se tornando uma importante ferramenta para entender o papel de várias quimiocinas na leishmaniose. Entre eles, os estudos de SATO e colaboradores (1999) mostraram que camundongos deficientes de CCR2, CCR5 ou CCL3, infectados com *L. donovani*, apresentaram uma baixa produção de IFN- γ durante a fase inicial da infecção, entretanto, durante a fase crônica da doença, as concentrações de IFN- γ aumentaram nos camundongos deficientes de CCR5 e CCL3, e o aumento desta citocina se correlacionou com a diminuição da carga parasitária. Os autores sugerem que CCR2, CCR5 e CCL3 têm um papel importante na geração de IFN- γ por células T. Os dados também indicam que CCL3 e os receptores CCR2 e CCR5 participam da defesa do hospedeiro contra *L. donovani*. Adicionalmente, outro estudo mostrou que a ausência do receptor CCR2 em camundongos infectados com *L. donovani* estava associada com uma migração diminuída de células de Langerhans para o linfonodo, resultando em uma deficiência de células dendríticas CD8 α + e deficiência na sensibilização de linfócitos Th1 (SATO *et al.*, 2000).

Receptores da família CCR são divididos em 9 subtipos (CCR1-9), estão envolvidos essencialmente na inflamação (CCR1,2,3,5,8) e na regulação do trânsito celular (CCR4,6,7,9), enquanto os da família CX3CR atuam na ancoragem dos leucócitos ao endotélio. Os pertencentes à família XCR participam no recrutamento de células T (MURDOCH; FINN, 2000).

1.2.1 A quimiocina CXCL10

CXCL10 é uma quimiocina do grupo CXC secretada principalmente por monócitos, fibroblastos e células endoteliais em resposta a diferentes estímulos, como infecção viral, LPS e IL-1 (DUFOUR *et al*, 2002; LEE; LEE; SONG, 2009). Ao contrário de outras quimiocinas do grupo CXC que induzem a migração de neutrófilos, CXCL10 estimula a quimiotaxia direcional de células T e monócitos para sítios de inflamação, além de potencializar a adesão de células T ao endotélio (TAUB *et al*, 1993). É um potente inibidor da angiogênese in vivo (ANGIOLILLO *et al*, 1995) e da formação de colônias de progenitores hematopoiéticos (SARRIS *et al*, 1993), mobiliza cálcio intracelular em células NK, além de promover a quimiotaxia dessas células (MAGHAZACHI *et al*, 1997).

Acredita-se que sua produção seja induzida principalmente por IFN- γ , visto que camundongos *knockout* para o gene dessa citocina não expressam RNAm de CXCL10 (AMICHAY *et al*, 1996). A ligação ao receptor CXCR3 é de alta afinidade (CHEN *et al*, 2004), e vários tipos de células tais como células T CD4 $^{+}$ e T CD8 $^{+}$ ativadas e de memória, células NK, algumas populações de células dendríticas e macrófagos ativados expressam esse receptor (MOHAN *et al*, 2005; RITTER; MOLL, 2000; VESTER *et al*, 1999). Na ausência de CXCR3, camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* são capazes de montar uma resposta Th1 eficiente, mas falham em controlar a infecção, apresentando uma diminuição na produção de IFN- γ (ROSAS *et al*, 2005).

Alguns trabalhos mostraram que a injeção de CXCL10 em camundongos BALB/c infectados com *L. major* tem promovido um forte recrutamento e ativação de células NK (VESTER *et al*, 1999; MULLER *et al*, 2001). Outro estudo demonstrou que o tamanho da lesão e a carga parasitária podem diminuir em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados com essa quimiocina, e isso é mediado por IFN- γ , IL-12 e NO (VASQUEZ; SOONG, 2006). Outros estudos têm mostrado que CXCL10 também atua na resposta protetora contra *L. donovani*, induzindo uma resposta celular tipo Th1, por meio da regulação da via de mediadores inflamatórios, como NO e citocinas proinflamatórias (GUPTA *et al*, 2009).

Não é somente nas leishmanioses que as ações das quimiocinas vêm sendo estudadas, há relatos na literatura de trabalhos avaliando também o papel das quimiocinas em infecções causadas por outros protozoários. Na malária cerebral, CXCL10 liga-se ao seu

receptor na superfície de células T CD8⁺ recrutando-as, e esse fato é imprescindível para o desenvolvimento da doença (CAMPANELLA *et al.*, 2008).

Estudos realizados com pacientes co-infectados com HIV e *Cryptosporidium* sp. mostraram que, apesar de células epiteliais produzirem a quimiocina, sua presença no intestino não ajuda no combate ao parasita. Isso ocorre porque o vírus diminui a população de células T CD4⁺, impedindo que CXCL10 atraia os linfócitos para o sítio da infecção (WANG *et al.*, 2007). Na toxoplasmose ocular crônica, CXCL10 age de maneira determinante, induzindo uma resposta mediada por células T que controla de forma eficiente a ação do protozoário. Estudos mostram que pacientes portadores de doenças autoimunes, como esclerose múltipla, que fizeram uso de bloqueadores da quimiocina tiveram o comprometimento dessa resposta celular. Nesses pacientes, houve desenvolvimento de toxoplasmose ocular crônica após o bloqueio de CXCL10 (ZECCA *et al.*, 2009).

Até o momento, não há nenhum trabalho mostrando o efeito das quimiocinas na leishmaniose visceral causada por *L. infantum chagasi*. A maioria dos estudos envolvendo quimiocinas e leishmaniose, feitos em modelo murino, tem utilizado *L. major* (que causa leishmaniose cutânea no Velho Mundo), *L. donovani* ou *L. infantum* (causadoras de leishmaniose visceral no Velho Mundo), *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (que causam leishmaniose cutânea no Novo Mundo) (TEIXEIRA *et al.*, 2006; OGHUMU *et al.*, 2010).

Coletivamente, os trabalhos publicados até agora sugerem que as quimiocinas desempenham importantes papéis na infecção por *Leishmania*, incluindo funções de defesa do hospedeiro, tais como recrutamento de leucócitos e ativação celular, participação na imunidade mediada por células e atividade leishmanicida, indicando que essas proteínas podem ser relevantes para o controle e/ou progressão da doença (TEIXEIRA *et al.*, 2006; OGHUMU *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Até o momento não há vacina eficaz contra as leishmanioses, mas há drogas disponíveis para tratar de maneira eficiente estas doenças, e entre as mais comumente usadas estão os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina e recentemente, miltefosina. Entretanto, todas estas drogas estão associadas ao aparecimento de cepas resistentes, significante toxicidade, e, além disso, apresentam um curso de tratamento muito longo (CROFT et al., 2006; SANTOS et al., 2008). Novos tratamentos contra as leishmanioses ou estratégias para melhorar a segurança e eficácia das drogas correntes continuam extremamente necessárias. As quimiocinas têm mostrado um envolvimento direto no processo da doença, uma vez que ocorre rápida mudança na expressão dessas moléculas durante a infecção por *Leishmania* (TEIXEIRA et al., 2006). Além disso, no início da infecção hepática por *L. donovani*, várias quimiocinas são secretadas, tais como CCL3, CCL2 e CXCL10, que vão desempenhar um importante papel na quimioatração e consequente ativação das células de defesa (STANLEY ; ENGWERDA, 2007).

A administração de quimiocinas tem mostrado resultados promissores no tratamento da leishmaniose visceral in vitro e in vivo (BHATTACHARYYA et al., 2002; GUPTA et al., 2009). Há evidências de que o tratamento com quimiocinas da família CC leva a uma significante resposta imunológica do tipo Th1 na leishmaniose visceral experimental (DEY et al., 2007). Entretanto, o papel das quimiocinas da família CXC, como CXCL10, precisa ser melhor estudado na infecção por *L. infantum chagasi*. CXCL10 é um potente candidato para imunoterapia na leishmaniose visceral, uma vez que é uma quimiocina conhecida por favorecer o recrutamento e a ativação de células polarizadas para Th1, além de recrutar e ativar células NK, ambas células produtoras de IFN- γ .

Portanto, este estudo poderá trazer importantes conhecimentos sobre os mecanismos associados à patogênese da infecção por *L. infantum chagasi*, o que dará subsídios para a elaboração de futuras abordagens terapêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar se o tratamento com a quimiocina CXCL10 controla a infecção por *L. infantum chagasi* in vivo.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a carga parasitária no baço e no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10;
- Avaliar a produção de IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi*, tratados com CXCL10 e reestimulados in vitro;
- Avaliar os aspectos histopatológicos do fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e meios de cultura

- CXCL10 recombinante anti-camundongo (Thermo Scientific): foi reconstituída com água ultra pura para a concentração de 1 µg/mL. Alíquotas de 10 µg/mL foram conservadas a - 20°C até o uso. Para o tratamento dos animais CXCL10 recombinante foi utilizado na concentração de 5µg/kg (GUPTA *et al.*, 2009).
- Meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich): O meio RPMI-1640 foi suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 50µM de 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina). Será mencionado como RPMI suplementado o meio contendo todos os componentes acima e como RPMI aquele utilizado sem suplementos.
- Meio Schneider (Sigma-Aldrich): O meio Schneider foi suplementado com 20% de SBF (Sigma-Aldrich), urina humana estéril a 2% e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Será mencionado como Schneider suplementado o meio contendo todos os componentes acima e como Schneider aquele utilizado sem suplementos.
- Meio Neal, Novy & Nicolle (N.N.N): O meio N.N.N foi suplementado com Schneider e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina).

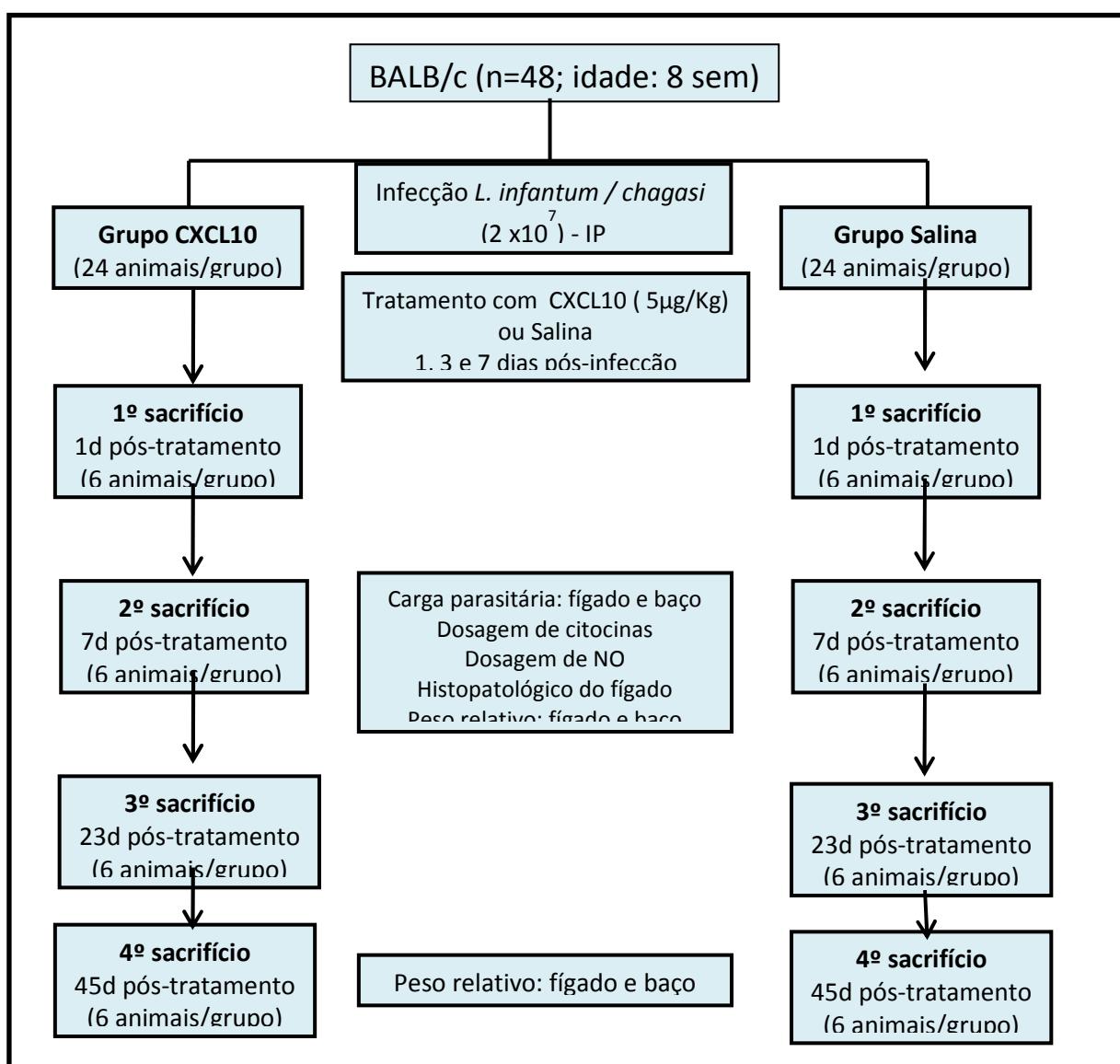
4.2 Animais

Para os experimentos, foram utilizados 48 camundongos BALB/c com 8 semanas de vida, provenientes do biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML)/UFC. Para a manutenção da cepa de *L. infantum chagasi* foram utilizados hamsters dourados, provenientes do biotério do DPML/Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos à temperatura de 25º C, com ração comercial apropriada e água *ad libitum*. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, registro nº 73/08.

4.3 Parasitos

Promastigotas de *L. infantum chagasi* (MHOM/BR/BA-262) foram cultivadas a 25°C em meio N.N.N com fase líquida constituída por meio Schneider. A virulência da cepa foi mantida através de passagem regular em hamster dourado. Após serem recuperados do animal, os parasitos foram cultivados a 25°C em meio N.N.N, contendo meio Schneider (HIMEDIA) suplementado. Para a infecção, os parasitos foram utilizados até a 5^a passagem.

Figura4. Fluxograma, desenho experimental do estudo.



4.4 Infecção experimental e tratamento dos animais

Promastigotas metacíclicas na fase estacionária foram inoculadas por via intraperitoneal em camundongos BALB/c ($n=48$) na concentração de 2×10^7 parasitos em 100 μL de salina. Os animais foram divididos em dois grupos, cada um com 24 animais. Um grupo foi tratado com CXCL10 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e o outro com salina (Controle), por via intraperitoneal, após 1, 3 e 7 dias da infecção (GUPTA *et al.*, 2009). Os sacrificios foram realizados após 1, 7, 23 e 45 dias do tratamento através da inalação de Halotano (Sigma-Aldrich). Em cada tempo foram sacrificados 6 animais por grupo. Os animais foram pesados antes do início do tratamento e antes de cada sacrificio para a realização da análise ponderal (Fluxograma).

4.5 Carga parasitária

A carga parasitária foi quantificada através da técnica de diluição limitante, como previamente descrito (TITUS *et al.*, 1985). Brevemente, os animais foram eutanasiados através de inalação com halotano (Sigma-Aldrich) e mergulhados em álcool-iodado a 3% por até 3 minutos a fim de permitir a descontaminação dos mesmos. Em seguida, o baço e o fígado foram retirados assepticamente, pesados, e um fragmento de cada órgão (baço: entre 0,0671 a 0,0700 g; fígado: entre 0,26 a 0,30 g) foi macerado em 1 mL de meio Schneider e deixado em repouso por 5 minutos. A partir dessa suspensão de células, foram feitas 8 diluições ($10, 50, 100, 500, 10^3, 10^4, 10^5$ e 10^6) em Schneider suplementado. Cem microlitros de cada uma das diluições foram distribuídos em placas de 96 poços, fundo chato, 6 poços/diluição. As placas foram seladas e incubadas a 25°C , por 3 semanas. Os poços foram observados em microscópio óptico invertido (Nikkon) de 3 em 3 dias para o registro das diluições que continham promastigotas. O número final de parasitos foi determinado utilizando-se o programa ELIDA (TASWELL, 1984).

4.6 Cultura de esplenócitos

Células do baço de animais tratados ou não com CXCL10 (3 animais por grupo) foram separadas por centrifugação com Ficoll, 1.200 rpm por 30 minutos à 25°C , após 1, 7 e

23 dias de infecção. As células foram lavadas com RPMI, 2.500 rpm por 15 minutos à 5°C, e depois cultivadas em placas de 96 poços (1×10^6 células/mL) em meio RPMI na presença ou ausência de promastigotas (concentração de promastigotas de 1×10^7 /mL), em estufa a 37°C, 5% CO₂. Os sobrenadantes foram coletados com 48h e conservados a -20°C para a dosagem de citocinas.

4.7 Dosagem de citocinas

Os sobrenadantes obtidos na cultura de esplenócitos tiveram os níveis de IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β determinados utilizando-se a técnica ELISA, como recomendado pelo fabricante (BD Biosciences). Brevemente, placas de 96 poços, fundo chato (Nunc), foram sensibilizadas por 12 a 18 h com o anticorpo de captura anti-citocina purificado na concentração determinada, a 4°C. A placa foi lavada, utilizando-se solução de lavagem (PBS com Tween 20 a 0,05%), e em seguida foi realizado bloqueio com PBS e soro bovino fetal (SBF 10%), seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS+ Tween, foram adicionados o padrão e as amostras e em seguida a placa foi incubada novamente por 2 h à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS+ Tween, a placa foi incubada por mais 1 h com o anticorpo de detecção adicionado da enzima peroxidase. Após isso, a placa passou por nova lavagem, e o substrato foi adicionado. A placa foi incubada por 30 min, à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi finalizada com ácido fosfórico 1:20, e a leitura realizada em leitor de ELISA (Molecular Devices Corp.; Sunnyvale, CA, USA), usando filtro de 450nm. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Softmax PRO (Molecular Devices).

4.8 Dosagem de óxido nítrico (NO)

Sobrenadantes da cultura de esplenócitos foram testados para detectar a liberação de NO sob a forma de nitrito (NO₂) pela reação de Griess (GREEN *et al.*, 1990). Os sobrenadantes foram incubados com o reagente de Griess (1:1 v/v), recém-preparado, por 10 min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida espectrofotometricamente a 540 nm e a concentração de NO₂ determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio e expressa em $\mu\text{mol}/\text{mL}$. Para evitar interferência por NO₂ possivelmente presente no meio, foi realizado

um branco para cada experimento, utilizando RPMI 1640 suplementado, meio empregado na cultura das células.

4.9 Análise histopatológica

Animais tratados ou não com CXCL10 foram eutanasiados com 1 e 7 dias após o tratamento, para a retirada do fígado, que foi então fixado em formol tamponado a 10%. Posteriormente os cortes foram processados, emblocados em parafina e as lâminas confeccionadas. Seções de 5 µm de espessura dos blocos foram coradas com hematoxilina e eosina (H & E). As alterações foram analisadas em microscópio óptico, como descrito previamente (MURRAY, 2001; STAGER et al., 2003).

4.10 Análise estatística

Para verificar a significância estatística entre o grupo tratado e o grupo controle foi aplicado o teste t-Student. Para as comparações entre múltiplos grupos foi realizado o teste one-way ANOVA, seguido pelo post-test Bonferroni. Os testes foram realizados utilizando o Programa GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os resultados são apresentados como média aritmética e erro padrão. Em todos os testes utilizados, a significância mínima foi aceita quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Alteração ponderal de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10

O estado nutricional dos camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* foi avaliado antes do tratamento (D0) e com 1, 7, 23 e 45 dias após o tratamento com CXCL10. Os resultados mostraram que tanto no grupo tratado quanto no grupo controle, houve um ganho ponderal ao final do experimento, D45, em relação ao peso inicial, D0. Esse aumento de peso foi de 3,83 g no grupo tratado e de 3,53 g no grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Alteração ponderal dos camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* durante um período de 45 dias após o tratamento com CXCL10.

Dias	Controle	CXCL10
D0	25,46±0,21	25,46±0,21
D1	26,38±0,44	26,20±0,61
D7	27,06±0,49	26,84±0,76
D23	29,32±0,43	28,61±0,48
D45	28,99±1,09	29,29±0,58
Ganho peso (*)	+3,53 g	+3,83 g

Os valores representam a média aritmética ± E.P.

(*) ganho ponderal ao final do experimento, D45, em relação ao peso antes do tratamento, D0.

5.2 Peso relativo do baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10

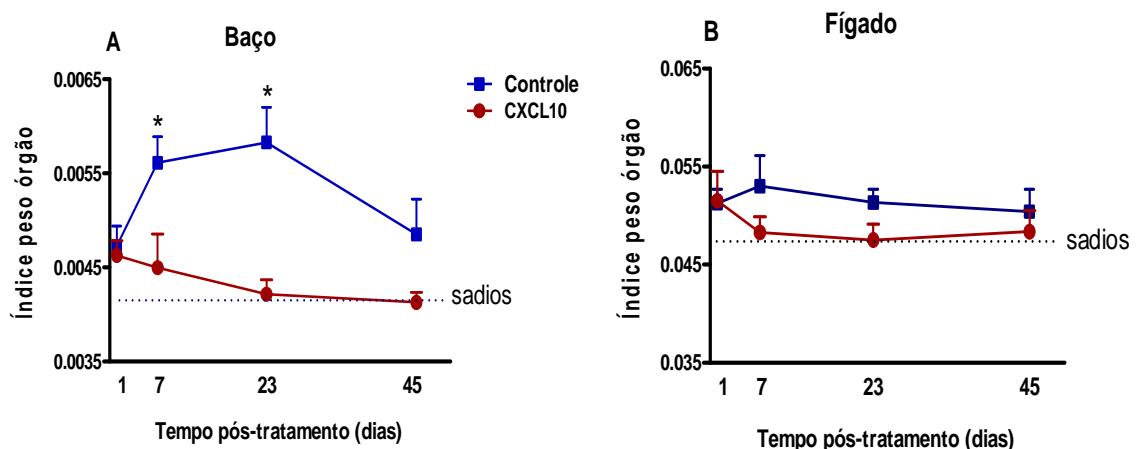
Para avaliar se CXCL10 era capaz de induzir uma diminuição no peso dos órgãos-alvo, foi realizada a análise do peso relativo do baço e fígado após 1, 7, 23 e 45 dias de tratamento. Em relação ao peso do baço, foi possível observar que no 1º dia após o tratamento, o grupo tratado e o grupo controle não apresentaram diferença, embora o peso dos baços de ambos os grupos (controle: 0,0056 ± 0,003; tratado: 0,0045 ± 0,0004) já se encontrasse ligeiramente acima do encontrado em animais sadios (0,0042 ± 0,0002) (Fig. 5).

Quando o grupo tratado foi analisado separadamente, observou-se uma queda no peso do baço dos animais após o 7º dia, atingindo os valores normais no 23º dia após o tratamento, diferentemente do que acontece com o grupo controle, cujos pesos só declinaram após 45 dias do tratamento, e ainda assim, ficaram acima do peso do baço dos animais sadios.

Quando os grupos foram comparados entre si, foi observado que houve diferença entre eles no dia 7 ($p = 0,0286$) e 23 ($p = 0,0033$) após o tratamento (Fig. 5A).

Com relação ao peso do fígado, foi observado que nos animais tratados, o peso desse órgão regrediu após o 7º dia de tratamento, quando comparado com o dos animais controle. Apesar disso, não foi observada diferença entre os grupos, embora o peso do fígado nos animais controle tenha mostrado uma pequena tendência a aumentar mais do que o dos animais tratados, quando se comparou com o peso do fígado dos animais sadios (Fig. 5B).

Figura 5. Peso relativo do baço (A) e do fígado (B) de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10.



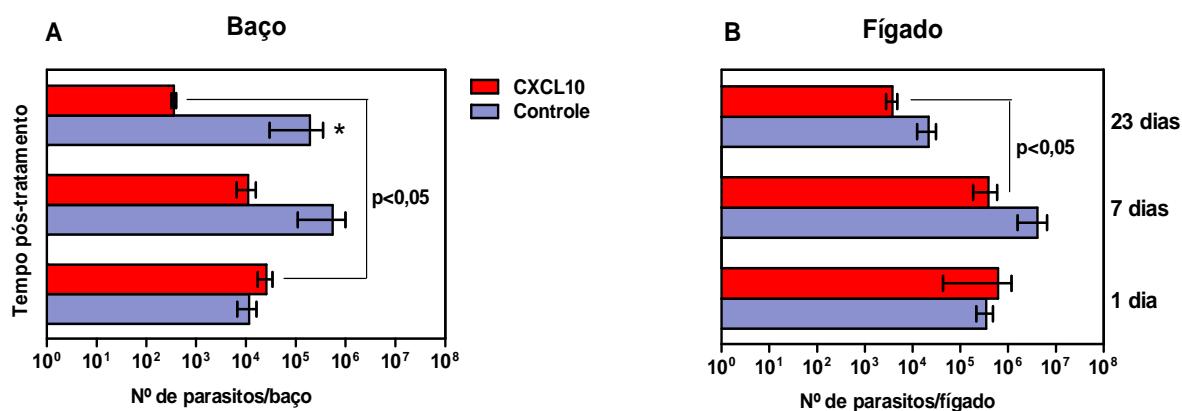
Os animais foram tratados com CXCL10, por via intraperitoneal (5 μ g/kg), ou salina com 1, 3 e 7 dias de infecção. Após 1, 7, 23 e 45 dias do final do tratamento os animais foram eutanasiados e o baço e o fígado foram retirados. Os dados de 4-6 animais por grupo estão representados pela média aritmética \pm erro padrão. Diferenças significantes entre os grupos, dentro do mesmo tempo, foram determinadas pelo teste t-Student ($p < 0,05$), e entre os mesmos grupos, nos diferentes tempos, foram determinadas pelo teste ANOVA ($p < 0,05$). As linhas tracejadas representam a média do peso relativo do baço (0,0042) e do fígado (0,048) de 6 animais sadios.

5.3 Carga parasitária no baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10

Para avaliar se a quimiocina CXCL10 era capaz de induzir uma redução no número de parasitos nos órgãos-alvo de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi*, esses órgãos foram avaliados após 1, 7 e 23 dias do término do tratamento. Os resultados mostraram que após o 1º dia do tratamento, os animais tratados com CXCL10 não apresentaram diferença no número de parasitos nos órgãos-alvo quando comparados aos

animais tratados apenas com salina (Fig. 6A e 6B). Como era esperado, o órgão mais infectado nos primeiros 8 dias de infecção foi o fígado, apresentando, em ambos os grupos, um número de parasitos próximo a 10^6 , indicando que o número de parasitos, nesse tempo, ainda se mantém próximo ao número utilizado para a infecção inicial, que foi de 2×10^7 parasitos (Fig. 6B). Por outro lado, foi encontrado no baço aproximadamente metade do inóculo inicial, cerca de 10^4 parasitos, em ambos os grupos (Fig. 6A).

Figura 6. Carga parasitária no baço (A) e no fígado (B) de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10.



Os animais foram tratados com CXCL10, por via intraperitoneal ($5\mu\text{g}/\text{kg}$), ou salina com 1, 3 e 7 dias de infecção. Após 1, 7 e 23 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados, o baço e o fígado foram retirados e utilizados para a avaliação da carga parasitária. Os dados de 4-6 animais por grupo estão representados pela média aritmética \pm erro padrão. Diferenças significantes entre os grupos, dentro do mesmo tempo, foram determinadas pelo teste t-Student ($p < 0,05$), e entre os mesmos grupos, nos diferentes tempos, foram determinadas pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

Após 7 dias do tratamento, o número de parasitos nos animais tratados permaneceu estável, tanto no baço (aproximadamente 10^4) quanto no fígado (aproximadamente 10^6). Entretanto, foi possível observar que os animais controle apresentaram uma tendência de aumento no número de parasitos em ambos os órgãos, chegando próximo a 10^6 no baço e 10^7 no fígado, o que significa um aumento na carga parasitária, em relação ao tempo anterior (Fig. 6A e 6B).

Após 23 dias do tratamento, houve um declínio no número de parasitos nos órgãos-alvo, tanto no grupo tratado quanto no grupo controle. Entretanto, essa diminuição na carga parasitária mostrou-se expressiva apenas no baço do grupo tratado ($p=0,0272$), quando

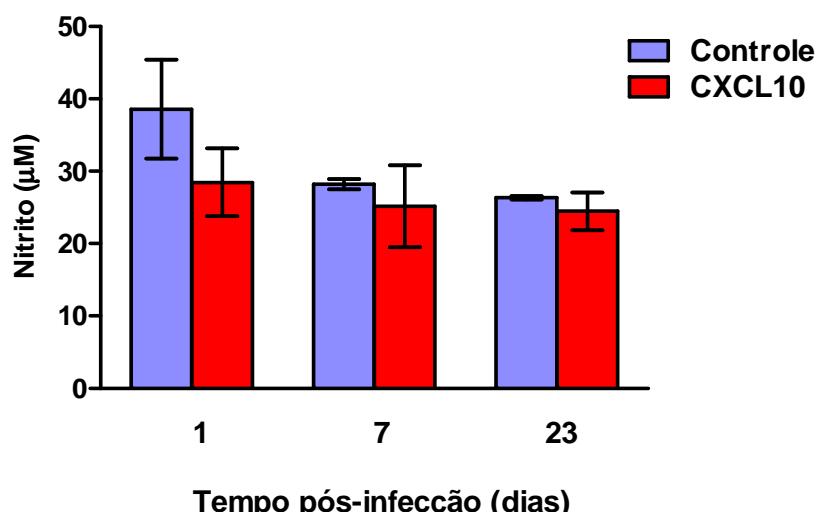
comparado ao grupo controle (Fig. 6A). Ainda nesse tempo, foi possível observar que no grupo tratado, em ambos os órgãos, o número de parasitos atingiu os menores valores (aproximadamente 10^2 no baço e 10^3 no fígado) em relação aos três tempos avaliados. Esses índices representaram uma redução em relação ao número de parasitos vistos após 1 dia do tratamento (Fig. 6A e 6B).

A análise do grupo que recebeu CXCL10 nos diferentes tempos mostrou que, no baço, houve diferença ($p<0,05$) entre 1 e 23 dias após o tratamento. No fígado, também houve uma queda expressiva ($p<0,05$) do 7º para o 23º dia após o tratamento, mostrando uma redução na carga parasitária equivalente à encontrada no baço (Fig. 6A e 6B).

5.4 Produção de óxido nítrico por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10

Para avaliar se o tratamento com CXCL10 era capaz de induzir a produção de NO pelos esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi*, os sobrenadantes das culturas de esplenócitos coletados dos animais tratados ou não, foram dosados em 3 diferentes tempos. Os resultados mostraram que não houve diferença na produção de NO nos tempos avaliados, em ambos os grupos, entretanto, pôde-se notar que o grupo tratado com CXCL10 apresentou uma pequena tendência a produzir menos NO após o 1º dia do tratamento do que o grupo controle (Fig. 7).

Figura 7. Produção de óxido nítrico por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10.



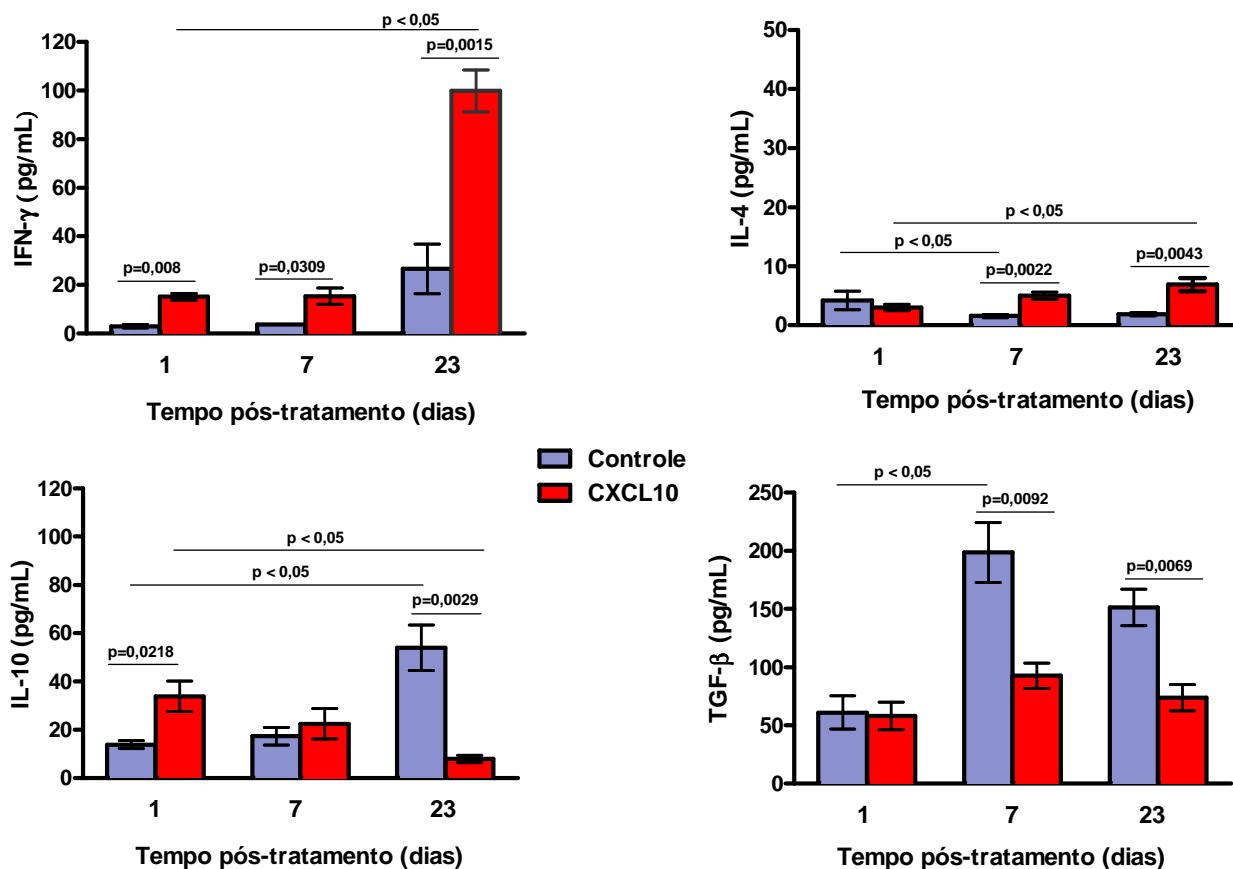
Os animais foram tratados com CXCL10, por via intraperitoneal ($5\mu\text{g/kg}$), ou salina com 1, 3 e 7 dias de infecção. Após 1, 7 e 23 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados para a obtenção dos esplenócitos. Os sobrenadantes dessas células foram coletados após 48 h para a dosagem de NO. Os dados de pelo menos 3 animais por grupo estão representados pela média aritmética \pm erro padrão. Diferenças significantes foram determinadas pelo teste t-Student ($p < 0,05$), e entre os mesmos grupos nos diferentes tempos, foram determinadas pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

5.5 Produção de citocinas por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10

O passo seguinte foi avaliar o perfil de citocinas induzido após o tratamento com CXCL10. Para isso foram avaliadas as concentrações de IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β no sobrenadante de esplenócitos provenientes de animais tratados com CXCL10 e após sensibilização in vitro com *L. infantum chagasi*. Em relação a IFN- γ , observou-se que essa citocina foi produzida de maneira mais marcante pelos esplenócitos dos animais tratados do que pelos dos animais controle, nos 3 tempos avaliados (após 1 dia, $p=0,0218$; 7 dias, $p=0,0309$; e após 23 dias do tratamento, $p=0,0015$). Nos animais que receberam CXCL10, a produção de IFN- γ atingiu o valor máximo de 100 pg/mL no 23º dia após o tratamento, o que equivaleu a um aumento de 5 vezes em relação à concentração inicial, 20 pg/mL ($p<0,05$) (Fig. 8).

Quanto a IL-4, em ambos os grupos, a produção dessa citocina manteve-se sempre abaixo de 10 pg/mL, em todos os três tempos avaliados (Fig. 8). Após o 1º dia do tratamento não houve diferença entre os grupos, no entanto, nos dois últimos tempos do estudo foi possível observar que os animais tratados com CXCL10 induziram uma maior produção de IL-4, quando comparados com aqueles não tratados (após 7 dias do tratamento, $p=0,0022$; após 23 dias, $p=0,0043$) (Fig. 8). Quando o grupo tratado foi comparado nos diferentes tempos avaliados no estudo, encontrou-se diferença entre o 1º e o 23º dia após o tratamento ($p<0,05$).

Figura 8. Produção de IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10



Os animais foram tratados com CXCL10, por via intraperitoneal (5 μ g/kg), ou salina com 1, 3 e 7 dias de infecção. Após 1, 7 e 23 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados para a obtenção dos esplenócitos. Os sobrevadantes dessas células foram coletados com 48 h para a dosagem de citocinas. Os dados de pelo menos 3 animais por grupo estão representados pela média aritmética \pm erro padrão. Diferenças significantes entre os grupos dentro do mesmo tempo foram determinadas pelo teste t-Student ($p < 0,05$), e entre os mesmos grupos nos diferentes tempos foram determinadas pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

Interessantemente, observou-se que após o 1º dia do tratamento, a produção da citocina IL-10 encontrava-se 2 vezes mais elevada do que a produção de IFN- γ , atingindo uma concentração de aproximadamente 40 pg/mL, e significativamente mais elevada também do que a dos animais controle ($p=0,0218$), nesse mesmo tempo. Após 7 dias do tratamento, não houve diferença na produção de IL-10 entre os grupos, porém, após 23º dia, ela caiu expressivamente nos animais tratados ($p=0,0029$). Essa queda resultou numa concentração de 20 pg/mL, valor cerca de duas vezes menor ($p < 0,05$) quando comparado à produção pelo

grupo tratado após o 1º dia do tratamento. Ao contrário, no grupo não tratado, a produção de IL-10 manteve-se crescente, sendo detectada cerca de 60 pg/mL dessa citocina após 23 dias do tratamento. É interessante observar que foi nesse momento que houve uma produção máxima de IFN- γ (100pg/mL) nos animais tratados (Fig. 8).

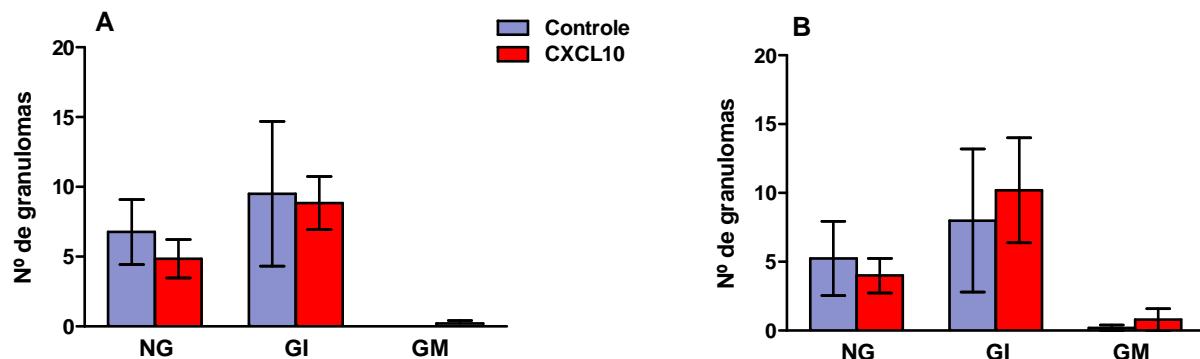
Quando a produção de TGF- β foi analisada, foi observado que os níveis dessa citocina foram sempre bem mais elevados quando comparados aos das outras citocinas avaliadas. Após o 1º dia do tratamento, tanto o controle quanto o grupo tratado apresentaram os mesmos níveis de TGF- β , cerca de 50 pg/mL. Após 7 dias do tratamento, a produção de TGF- β foi menor no grupo tratado, cerca de 100 pg/mL, aproximadamente 2 vezes menor do que a produzida pelo grupo controle (200 pg/mL; $p=0,0092$). Após 23 dias do tratamento, a produção dessa citocina caiu nos dois grupos, atingindo uma concentração maior do que a do 1º dia e menor do que a do 7º dia após o tratamento. Vale salientar que os níveis de TGF- β no grupo tratado caíram aproximadamente 2 vezes mais do que os do grupo controle ($p=0,0069$) nesse tempo (Fig. 8).

5.6 Análise da resposta granulomatosa do fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10

Para avaliar se o tratamento com CXCL10 era capaz de acelerar a resposta granulomatosa no fígado infectado por *L. infantum chagasi*, diminuindo, dessa forma, o tempo de cura da infecção, cortes histopatológicos do fígado foram analisados após 1 e 7 dias do término do tratamento. A análise microscópica desse material permitiu observar que, após o 1º dia do tratamento, já era possível identificar infiltrados ainda não granulomatosos e granulomas imaturos, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado (Fig. 9A).

Após o 1º dia do tratamento, também foi observado que em ambos os grupos havia mais infiltrados granulomatosos, embora ainda imaturos, do que infiltrados não granulomatosos. Nesse período foram identificados alguns poucos granulomas maduros somente no grupo tratado (Fig. 9A). Após 7 dias do tratamento, observou-se que a quantidade de infiltrados não granulomatosos começou a diminuir, em ambos os grupos, e os granulomas imaturos ainda foram os mais encontrados. Nesse período foram observados os primeiros granulomas maduros no grupo controle e um pequeno aumento desses granulomas no grupo tratado (Fig. 9B).

Figura 9. Resposta granulomatosa do fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10.



Os animais foram tratados com CXCL10, por via intraperitoneal ($5\mu\text{g/kg}$), ou salina com 1, 3 e 7 dias de infecção. Após 1 (A) e 7 (B) dias de tratamento, os animais foram eutanasiados para a retirada do fígado. Os dados de pelo menos 3 animais por grupo estão representados pela média aritmética \pm erro padrão. NG = não granulomatoso; GI = granuloma imaturo; GM = granuloma maduro. Diferenças significantes foram determinadas pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi avaliado o papel da quimiocina CXCL10 na infecção por *L. infantum chagasi* usando o modelo de LV em camundongos BALB/c. Alguns trabalhos têm mostrado que as quimiocinas podem atuar de maneira promissora como novos agentes terapêuticos no combate a *L. donovani*, pois, dentre os tipos de resposta mediada por células, algumas quimiocinas podem induzir a polarização da resposta celular do tipo Th1, capaz de combater a infecção (DEY *et al.*, 2007; GUPTA *et al.*, 2009). Vários modelos experimentais de LV em roedores têm sido desenvolvidos, e embora nenhum deles reproduza integralmente a doença humana (HANDMAN, 2001), os estudos utilizando estes modelos têm se mostrado muito importantes porque permitem investigar os mecanismos imunológicos e os aspectos histopatológicos da doença (WILSON; JERÔNIMO; PERSON, 2005; NIETO *et al.*, 2011).

Camundongos BALB/c, quando infectados por *L. donovani* or *L. infantum chagasi*, conseguem resolver a infecção após algum tempo, tornando-se um bom modelo de infecção aguda e subclínica. Nestes animais, o efeito de IL-12 é retardado por mais ou menos 4 semanas após a infecção, momento em que ocorre o aparecimento dos linfócitos produtores de IFN- γ antígeno específico, a formação de granulomas no fígado e o desenvolvimento de uma resposta antígeno específica das células T CD4+ e CD8+ (WILSON; JERÔNIMO; PERSON, 2005; NIETO *et al.*, 2011).

No presente estudo, foi observado que o tratamento com CXCL10 foi capaz de reduzir a carga parasitária, tanto no fígado quanto no baço, após o 23º dia do tratamento (4ª semanas após a infecção), o que representou uma queda expressiva no número de parasitos nesses órgãos. A queda no número de parasitos no baço correlacionou-se com a diminuição do tamanho desse órgão nos animais tratados, quando comparados aos animais controle. Há trabalhos mostrando que durante a infecção por *L. chagasi* em camundongos, as amastigotas se multiplicam rapidamente nas primeiras 4 semanas no fígado, e desaparecem espontaneamente por volta da 8ª semana de infecção, enquanto no baço, os parasitos crescem mais lentamente, levando a uma cronicidade da infecção nesse órgão (WILSON *et al.*, 1996). Este crescimento dos parasitos de maneira específica nos órgãos-alvo tem sido observado na doença murina causada por todas as espécies de *Leishmania* viscerotrópicas, e mesmo quando os parasitos são inoculados por diferentes vias, tais como a intravenosa, intradérmica ou intraperitoneal (WILSON; JERÔNIMO; PERSON, 2005). Os resultados da carga parasitária

encontrados no presente trabalho corroboram com os achados da literatura, e mais importante, apontam para um papel leishmanicida de CXCL10 contra *L. infantum chagasi*, uma vez que essa quimiocina foi capaz de reduzir de maneira expressiva o número de parasitos nos dois órgãos-alvo dos animais tratados, o que não foi observado no grupo controle.

O estabelecimento das leishmanioses tem sido relacionado à polarização da resposta de células T CD4⁺ subtipo Th2. Na leishmaniose experimental murina utilizando *L. major*, os camundongos da linhagem geneticamente resistente C57BL/6 exibem resposta imunológica do tipo Th1, enquanto os camundongos susceptíveis BALB/c desenvolvem resposta imunológica de perfil Th2 (ALEXANDER; BRYSON, 2005). Camundongos BALB/c infectados com *L. major* se mostram incapazes de controlar a disseminação do parasito e o desenvolvimento da doença acaba levando o animal à morte. Esta incapacidade de controlar a doença está relacionada com a resposta precoce do tipo Th2, que se inicia e se mantém a partir de células T CD4⁺ secretoras de IL-4, resultando em ativação de células B policlonais (CHATELAIN; VARKILA; COFFMAN, 1992).

Em modelos murinos de LV, utilizando o camundongo BALB/c, o controle da doença depende da magnitude da resposta celular Th1, levando à produção de IFN-γ, à ativação de macrófagos (KAYE *et al.*, 2004), à formação de granulomas hepáticos maduros, assim como à produção de espécies reativas de nitrogênio e intermediários de oxigênio, que são essenciais para a eliminação de parasitos dentro das células de Kupffer e células dendríticas (MURRAY, 2001; STANLEY; ENGWERDA, 2007). O estabelecimento da doença está associado à diminuição na resposta desses fatores, o que auxilia o parasito a viver e se reproduzir no fagolisossomo do macrófago (MELBY *et al.*, 2001).

No presente trabalho foi encontrado que, no baço, a produção de IFN-γ no grupo tratado com CXCL10 foi bastante significativa quando comparada a do controle, em todos os três tempos avaliados. Ressaltando que, no grupo tratado, a concentração desta citocina após o 23º dia do tratamento, foi de 100 pg/mL, a concentração máxima obtida nos tempos analisados. Essa produção significou um aumento de 5 vezes na concentração produzida após o 1º dia do tratamento (20 pg/mL), um crescimento significativo que coincidiu com a expressiva queda na carga parasitária após 23 dias do tratamento, fortalecendo a hipótese do papel leishmanicida de CXCL10. No entanto, é possível observar que apesar da elevada produção de IFN-γ e consequente redução da carga parasitária após 23 dias do tratamento, CXCL10 ainda não foi capaz de eliminar totalmente a infecção nos órgãos-alvo. Como no presente trabalho não foram avaliados outros tempos mais tardios da infecção não é possível

saber se isso de fato acontece, pode-se apenas sugerir que isso aconteça, uma vez que a carga parasitária manteve-se em declínio nos animais tratados, e o mesmo não foi observado nos animais controle.

Estudos anteriores têm demonstrado a importância de IFN- γ no controle da infecção visceral (SQUIRES *et al.*, 1989). Sabe-se que macrófagos ativados por IFN- γ são capazes de matar parasitos intracelulares através da produção de mediadores tóxicos, tais como NO, e a importância desse reagente na ativação de macrófagos tem sido bem documentada em modelos animais de infecção por *Leishmania* (BHATTACHARYYA *et al.*, 2002; BRANDONISIO *et al.*, 2002). De acordo com Reiner e colaboradores (1990), os monócitos de indivíduos saudáveis previamente tratados com IFN- γ produzem, após a infecção com *L. donovani*, maior quantidade de TNF- α e IL-1, duas citocinas importantes na resposta do hospedeiro a infecções microbianas. Corroborando com os altos níveis de INF- γ e a queda da carga parasitária após 23 dias do tratamento, foi observado que CXCL10 induziu uma redução significante na produção de IL-10 e TGF- β , citocinas antiinflamatórias, sugerindo um papel protetor de CXCL10 através de uma forte resposta de perfil Th1 nos camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi*.

Nos animais tratados, a concentração de IL-10 foi aproximadamente 10 vezes menor que a concentração de IFN- γ , entretanto, apesar de CXCL10 ter reduzido a concentração de TGF- β (~ 75pg/mL) para bem próximo da concentração de IFN- γ (~100pg/mL), IFN- γ ainda foi capaz de promover a polarização da resposta Th1 e a redução da carga parasitária após o 23º dia do tratamento. Isso corrobora com os achados da literatura que mostram que IL-10 tem um importante papel na supressão da resposta imunológica protetora na LV murina (MURPHY *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 2003). A associação da imunossupressão induzida por IL-10 na LV humana já está bem estabelecida. Pacientes com doença ativa apresentam elevados níveis de IL-10 no soro, assim como expressão aumentada e mRNA de IL-10 nos sítios das lesões. IL-10 é uma citocina regulatória que pode ser produzida por células T, B, macrófagos, células dendríticas e epiteliais, e células T regulatórias, e acredita-se que seja induzida como uma resposta de equilíbrio homeostático que protege os tecidos do dano colateral causado por inflamação excessiva (MEGE *et al.*, 2006; MOORE *et al.*, 2001). Apesar de níveis elevados de IL-10 observados em pacientes de LV poderem ajudar a limitar a patologia decorrente da própria defesa imunológica, especialmente no fígado, a atividade imunossupressora da citocina pode promover a replicação do parasito e evolução da doença (NYLÉN; SACKS, 2007).

Estudos com camundongos C57BL6 e BALB/c levantam evidências diretas do papel de IL-10 como o principal fator imunossupressor em modelos murinos de LV. Em ambas as linhagens, os animais deficientes em IL-10 são altamente resistentes à infecção por *L. donovani* (MURPHY *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 2003). A principal atividade promotora da doença desempenhada por IL-10 é aquela relacionada aos macrófagos, que podem se tornar não responsivos a sinais de ativação, inibindo a morte de amastigotas dentro dos fagolisossomos, pela diminuição da produção de TNF- α e NO (WU *et al.*, 1993; VOULDOUKIS *et al.*, 1997). Recentemente, estudos têm mostrado também que o tratamento com CXCL10 resulta na proteção in vivo contra *L. donovani*, por meio da expressiva diminuição das citocinas imunossupressoras, IL-10 e TGF- β , devido a modulação de células T regulatórias (GUPTA *et al.*, 2011).

Assim como IL-10, altos níveis da citocina TGF- β também têm sido descritos na LV humana e murina, ambas as citocinas associadas com a imunossupressão da doença (WILSON *et al.*, 1998; CALDAS *et al.*, 2005; GOMES-PEREIRA *et al.*, 2004). TGF- β pode suprimir a expressão de NO e IFN- γ em macrófagos, inibindo a habilidade destas células em controlarem intracelularmente o crescimento dos parasitos (BARRAL *et al.*, 1993). Além disso, TGF- β é também um fator supressor da produção de IFN- γ por células de granulomas hepáticos em camundongos BALB/c (WILSON; WEINSTOCK, 1998). Sua liberação ocorre após a interação da célula apresentadora de antígeno, através do seu ligante CD80, com o receptor CTLA4 do linfócito. A estrutura do CTLA4 é bastante semelhante ao receptor CD28, porém apresenta maior afinidade pelo ligante CD80. Clones de linfócitos de memória, ao interagirem com antígenos de *Leishmania*, acabam priorizando a liberação de TGF- β devido à ação co-estimulante do receptor CTLA4, que se sobrepõe em sua superfície, promovendo não só a queda dos níveis de IFN- γ , mas também a diminuição de NO e bloqueio da apoptose, favorecendo dessa forma, a sobrevivência e o crescimento do parasito no interior de macrófagos residentes no fígado (GOMES *et al.*, 2000; GOMES; DOS REIS, 2001). Células T CD4+CD25+ Foxp+ são também as principais fontes de TGF- β (RODRIGUES *et al.*, 2009). Estudos com camundongos deficientes de TGF- β mostraram que as células Treg Foxp3+ são defeituosas em sua função supressora (LI; WAN; FLAVELL, 2007). No presente estudo os níveis de TGF- β nos animais tratados com CXCL10 foram sempre bem mais elevados do que os das outras citocinas que foram avaliadas, o que não corrobora totalmente com trabalhos que sugerem que o papel de TGF- β no controle da carga parasitária e na resistência do hospedeiro, dependente de IFN- γ , durante a infecção por cepas viscerotrópicas, como *L.*

donovani, parece ser menos importante quando comparado ao de IL-10 (MURRAY et al., 2005). Estudos com animais deficientes de IL-10 e TGF- β , infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com CXCL10 talvez pudessem esclarecer melhor essa questão.

A eficiente regulação de citocinas pró e antiinflamatórias demonstrada por CXCL10, neste trabalho, sugeriu que esta quimiocina poderia também regular a geração de NO, uma vez que, na leishmaniose visceral, citocinas pró-inflamatórias apresentam um papel crítico na indução de NO via iNOS2 (DIEFENBACH et al., 1999; GUPTA et al., 2009) e as citocinas IL-10 e TGF- β inibem NO (BHATTACHARYYA et al., 2001). Entretanto, diferentemente do que foi mostrado por outros estudos com CXCL10 e algumas quimiocinas da família CC (DEY ET AL., 2007; GUPTA et al., 2009), o efeito leishmanicida de CXCL10, neste trabalho, não parece ser mediado por NO, uma vez que não houve diferença na produção de NO entre os grupos. Isso sugere que provavelmente outros mecanismos que não a produção de NO podem estar envolvidos com a morte do parasito. Na literatura, há relatos de que outros produtos do metabolismo do oxigênio, envolvidos na explosão respiratória em macrófagos murinos ativados, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido (O_2^-) também estão implicados com a morte de *Leishmania* (ASSCHE et al., 2011).

O controle da infecção hepática em camundongos requer uma resposta coordenada do hospedeiro, envolvendo o desenvolvimento de granulomas em volta dos macrófagos infectados (MURRAY, 2001). Esta resposta inflamatória granulomatosa é semelhante à resposta protetora encontrada na maioria das infecções humanas por *L. donovani* que permanecem como infecção subclínica (MORENO et al., 1988; EL HAG et al., 1994). Vale salientar que a formação de um granuloma nem sempre está associada com o controle do parasito, e a efetividade dos granulomas hepáticos para matar os parasitos depende do grau de maturação do granuloma (MURRAY et al., 1992; CARRION et al., 2006; MURRAY, 2001). Apenas os granulomas maduros parecem desenvolver mecanismos leishmanicidas eficientes para matar os parasitos (NIETO et al., 2011).

Na análise histopatológica do fígado após os primeiros oito dias do tratamento, foram encontrados, em ambos os grupos, mais granulomas imaturos, do que infiltrados não granulomatosos, e alguns poucos granulomas maduros já puderam ser vistos no grupo tratado a partir do 1º dia após o tratamento, sugerindo uma ação positiva da droga. Após 7 dias do tratamento, a quantidade de infiltrados não granulomatosos começou a diminuir, e os granulomas imaturos ainda foram os mais encontrados, em ambos os grupos. O número de granulomas maduros aumentou nos animais tratados e só então começou a aparecer nos

controle, sugerindo que após 7 dias do tratamento as estruturas estavam evoluindo para a formação de granulomas maduros, as únicas estruturas que parecem ser capazes de conter a infecção de maneira eficiente no fígado. Portanto, a determinação do grau de maturação dos granulomas hepáticos é uma importante ferramenta para monitorar a progressão da doença (NIETO *et al.*, 2011).

Diferente dos modelos de leishmaniose cutânea murina onde IL-4 é associada à resposta Th2 (SATOSKAR; BLUETHMANN; ALEXANDER, 1995; LAUNOIS *et al.*, 1997; MOHRS *et al.*, 1999), no modelo de infecção por *L. donovani* há trabalhos mostrando que IL-4 não exacerba a doença, podendo, na verdade, atuar no combate ao parasito, o que é bastante paradoxal (ALEXANDER *et al.*, 2000; STAGER *et al.*, 2003). Esses estudos mostraram que IL-4 pode agir regulando positivamente a imunidade contra *L. donovani* por meio do aumento do número de granulomas maduros e consequente diminuição da carga parasitária no fígado (STAGER *et al.*, 2003). Um processo que é intimamente ligado à secreção de IFN- γ (MURRAY *et al.*, 2000). No presente estudo, a produção de IL-4, em ambos os grupos, manteve-se sempre abaixo de 10 pg/mL, em todos os três tempos analisados. Entretanto, nos animais tratados foi observado uma produção maior de IL-4 quando comparado com o grupo controle nos tempos avaliados, corroborando com a presença mais precoce de granulomas maduros no fígado dos animais que receberam a quimiocina.

Há trabalhos mostrando que, sem a ação de IL-10, camundongos BALB/c nocautes combatem a infecção mais cedo e a razão para que isso ocorra é que com o fim da regulação feita pela citocina, o processo de formação do granuloma no fígado passa a ser mais eficiente, permitindo que um grande número dessas estruturas termine a maturação, tornando-se livres de parasitos (MURRAY *et al.*, 2002). Murphy e colaboradores (2001) mostraram que após 10 dias de infecção, animais nocaute para IL-10 apresentaram um aumento na expressão de iNOS em todos os granulomas formados, o mesmo não ocorreu com animais selvagens, o que mostra o papel supressor de IL-10 na via de produção de NO, transformando o interior da célula de Kupffer num ambiente susceptível para *L. donovani* (MURPHY *et al.*, 2001). Neste trabalho, CXCL10 induziu uma diminuição na produção de IL-10 ao longo dos tempos avaliados, enquanto no grupo controle a produção dessa citocina foi aumentando, e isso foi associado com a maior maturação de granulomas no grupo tratado do que no grupo controle.

Coletivamente, os dados deste trabalho sugerem um importante papel leishmanicida de CXCL10 em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum chagasi*, mediado por uma expressiva produção de IFN- γ e supressão das citocinas imunorreguladoras,

IL-10 e TGF- β , abrindo a hipótese se isso não estaria associado a uma diminuição na frequência de células T regulatórias.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- CXCL10 foi capaz de reduzir de maneira expressiva o número de parasitos nos dois órgãos-alvo, fígado e baço, dos animais tratados;
- CXCL10 induziu uma significante produção de IFN- γ e supressão das citocinas imunorreguladoras, IL-10 e TGF- β ;
- CXCL10 induziu o amadurecimento mais precoce de granulomas no fígado.

REFERÊNCIAS

ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.; FARMER, M.A.; ANDERSEN, R.A.; ANDERSON, O.R.; BARTA, J.R.; BOWSER, S.S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R.A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T.Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C.E.; LEWIS, L.A.; LODGE, J.; LYNN, D.H.; MANN, D.G.; MCCOURT, R.M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, O.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.E.; NERAD, T.A.; SHEARER, C.A.; SMIRNOV, A.V.; SPIEGEL, F.W.; TAYLOR, M.F. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. , v.5,n.5, p.99-451,2005.

ALBUQUERQUE, P.L.; SILVA JÚNIOR, G.B.; FREIRE, C.C.; OLIVEIRA, S.B.; ALMEIDA, D.M.; SILVA, H.F.; CAVALCANTE, MDO. S.; SOUSA, A.Q. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. , v.26, n.4, p.330-3, 2009.

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

ALEXANDER, J.; CARTER, K.C.; AL-FASI, N.; SATOSKAR, A.; BROMBACHER, F. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. **Eur J Immunol**, v.30, n.10, p.2935-43, 2000.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. , v.20, n.1, p.259-65, 2004.

AMICHAY, D.; GAZZINELLI, R.T.; KARUPIAH, G.; MOENCH, T.R.; SHER, A.; FARBER, J.M. Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo. **J Immunol**,v.157, n.10, p.4511-20, 1996.

ANGIOLILLO, A.L.; SGADARI, C.; TAUB, D.D.; LIAO, F.; FARBER, J.M.; MAHESHWARI, S.; KLEINMAN, H.K.; REAMAN, G.H.; TOSATO, G. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. **J Exp Med**,v.182, n.1, p.155-62, 1995.

ATO, M.; STÄGER, S.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. **Nat Immunol.** ,v.3, n.12, p.1185-91, 2002.

BADARÓ, R.; JONES, T.; LOURENÇO, R.; CERF, B.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JR, W. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.35, p.72-8, 1986.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **Journal of Internal Medicine**, v.250, p.91-104; 2001.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for Leishmania braziliensis. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.90, n.8, p.3442-6, 1993.

BHATTACHARYYA, S.; GHOSH, S.; DASGUPTA, B.; MAZUMDER, D.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. **J Infect Dis.**, v. 185, n.12, p.1704-8, 2002.

BHATTACHARYYA, S.; GHOSH, S.; JHONSON, P.L.; BHATTACHARYA, S.K.; MAJUMDAR, S. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. **Infect Immun.**, v.69, n.3, p.1499-507, 2001.

BORGES, B.K.A.; SILVA, J.A.; HADDAD, J.P.A.; MOREIRA, E.C.; MAGALHÃES, D.F.; RIBEIRO, L.M.L.; FIÚZA V.O.P. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.5, p.1035-1043, 2009.

BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A.; FUMAROLA, I.; SISTO, M.; LEOGRANDE, D.; ACQUAFREDDA, A.; SPINELLI, R.; MITOLO, V. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. **Clin Exp Med.**, v. 2, n.3, p.125-9, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral**. Brasília, 2006. 19 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31941 <...>. Acesso em 08 nov. 2011.

CALDAS, A.; FAVALI, C.; AQUINO, D.; VINHAS, V.; VAN WEYENBERGH, J.; BRODSKYN, C.; COSTA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infect Dis.**, v.5, n.113, 2005.

CAMPANELLA, G.S.; TAGER, A.M.; EL KHOURY, J.K.; THOMAS, S.Y.; ABRAZINSKI, T.A.; MANICE, L.A.; COLVIN, R.A.; LUSTER, A.D. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.105, n.12, p.4814-9, 2008.

CARRIÓN, J.; NIETO, A.; IBORRA, S.; INIESTA, V.; SOTO, M.; FOLGUEIRA, C.; ABANADES, D.R.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunol.**, v.28, n.5, p.173-83, 2006

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol.**, v. 5, n.11, p.873-82, 2007.

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

CHEN, J., VISTICA, B.P.; TAKASE, H.; HAM, D.I.; FARISS, R.N.; WAWROUSEK, E.F.; CHAN, C.C.; DEMARTINO, J.A.; FERBER, J.M.; GERY, I. A unique pattern of up- and downregulation of chemokine receptor CXCR3 on inflammation-inducing Th1 cells. **European Journal of Immunology**, v.34, p.2885-2894, 2004.

COSTA, C.H. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad Saude Publica**, v.24, n.12, p.2959-63, 2008.

COTTERELL, S.E.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. **Eur J Immunol.**, v. 29, n.1, p.203-14, 1999.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev.**, v.19, n.1, p. 111-26, 2006.

DE PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M.A.; ALVES, C.R.; BRAZIL, R.P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop.**, v.107, n.1, p.66-9, 2008.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.95, n.3, p.239-43, 2001.

DEY, R.; MAJUMDER, N.; BHATTACHARYYA, MAJUMDAR. S.; BHATTACHARJEE, S.; BANERJEE, S.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. **Scand J Immunol.**, v. 66, n.6, p.671-83, 2007.

DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; RÖLLINGHOFF, M.; YOKOYAMA, W.M.; BOGDAN, C. Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. **Science.**, v. 284, n.5416, p.951-5, 1999.

DOS SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; DE PAIVA, HOFFMANN. M.; DE FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A. Incrimination of Lutzomyia cruzi as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol.**, v.12, n.3, p.315-7, 1998.

DUFOUR, J. H., M. DZIEJMAN, M. T. LIU, J. H. LEUNG, T. E. LANE, AND A. D. LUSTER. IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. **The Journal of Immunology**, v.168, p.3195-3204, 2002.

EL HAG, I.A.; HASHIM, F.A.; EL TOUM, I.A.; HOMEIDA, M.; EL KALIFA, M.; EL HASSAN, A.M. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). **J Clin Pathol.**, v.47, n.6, p.547-51, 1994.

ENGWERDA, C.R.; ATO, M.; COTTERELL, S.E.; MYNOTT, T.L.; TSCHANNERL, A.; GORAK-STOLINSKA, P.M.; KAYE, P.M. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **Am J Pathol.**, v.161, n.2, p.429-37, 2002.

ENGWERDA, C.R.; ATO, M.; KAYE, P.M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v.20, n.11, p.524-30, 2004.

ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. **Immunol Today.**, v.21, n.2, p.73-8, 2000.

EVANS, T.G.; TEIXEIRA, M.J.; MCAULIFFE, I.T.; VASCONCELOS, I.A.B.; VASCONCELOS, A.W.; SOUSA, A.Q.; LIMA, J.W.O.; PEARSON, R.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **J Infect Dis.**, v. 166, p. 1124-1132, 1992.

FERREIRA, J.; HAYDÉE, L.; GENTILA, L.G.; DIASA, S.S.; FEDELIA, C.E.; KATZA, S.; BARBIÉRI, C.L. Immunization with the cysteine proteinase Ldcccys 1 gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant Ldcccys 1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n.5, p. 677-85, 2008.

GOMES, N.A.; DOSREIS, G.A. The dual role of CTLA-4 in *Leishmania* infection. **Trends Parasitol.**, v.17, n.10, p.487-91, 2001.

GOMES, N.A.; GATTASS, C.R.; BARRETO-DE-SOUZA V.; WILSON, M.E.; DOSREIS, G.A. TGF-beta mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar. **J Immunol**, v.164, n.4, p.2001-8, 2000.

GOMES-PEREIRA, S.; RODRIGUES, O.R.; SANTOS-GOMES, G.M. Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. **Immunol Lett.**, v. 95, n.1, p.63-70, 2004

GOTO, H.; PRIANTI, M.G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.**, v. 51, n.5, p.241-6, 2009.

GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **J Immunol.**, v. 145, n.12, p.4290-7, 1990.

GUPTA, G.; BHATTACHARJEE, S.; BHATTACHARYYA, S.; BHATTACHARYA, P.; ADHIKARI, A.; MUKHERJEE, A.; BHATTACHARYYA, MAJUMDAR. S.; MAJUMDAR, S. CXC chemokine-mediated protection against visceral leishmaniasis: involvement of the proinflammatory response. **J Infect Dis**, v.200, n.8, p.1300-10, 2009.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol Rev.**, v. 14, n.2, p.229-43, 2001.

HUYNH, C.; ANDREWS, N.W. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. **Cell Microbiol.**, v. 10, n.2, p.293-300, 2008.

KAYE, P.M.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C.R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol Rev.**, v. 201, p.239-53, 2004.

LANG, T.; LECOEUR, H.; PRINA, E. Imaging *Leishmania* development in their host cells. **Trends Parasitol.**, v. 25,n.10, p.464-73, 2009.

LAUNOIS, P.; MAILLARD, I.; PINGEL, S.; SWIHART, K.G.; XÉNARIOS, I.; ACHADORBEA, H.; DIGGELMANN, H.; LOCKSLEY, R.M.; MACDONALD, H.R.; LOUIS, J.A. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to Leishmania major in BALB/c mice. **Immunity**,v. 6, n.5, p.541-9, 1997.

LEE, E. Y., Z. H. LEE, AND Y. W. SONG. CXCL10 and autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, p.379–383, 2009.

LI, M.O.; WAN, Y.Y.; FLAVELL, R.A. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. **Immunity**,v.26, n.5, p.579-91, 2007.

MAGHAZACHI, A.A.; SKALHEGG, B.S.; ROLSTAD, B.; AL-AOUKATY, A. Interferon-inducible protein-10 and lymphotactin induce the chemotaxis and mobilization of intracellular calcium in natural killer cells through pertussis toxin-sensitive and -insensitive heterotrimeric G-proteins. **FASEB J**, v.11, n.10, p.765-74, 1997.

MANTOVANI, A.; BONECCHI, R.; LOCATI, M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. **Nat Rev Immunol.**, v. 6, n.12, p.907-18, 2006.

MAURÍCIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today.**, v. 16, n.5, p.188-9, 2000.

McELRATH, M.J.; MURRAY, H.W.; COHN, Z.A. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. **J Exp Med.**,v. 167, n.6, p.1927-37, 1988.

MCFARLANE, E.; CARTER, K.C.; MCKENZIE, A.N.; KAYE, P.M.; BROMBACHER, F.; ALEXANDER, J. Endogenous IL-13 plays a crucial role in liver granuloma maturation during *Leishmania donovani* infection, independent of IL-4Ra-responsive macrophages and neutrophils. **J Infect Dis**, v.204, n.1, p.36-43, 2011.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat Rev Immunol.**, v. 5, n.8, p.606-16, 2005.

MEGE, J.L.; MEGHARI, S.; HONSTETTRE, A.; CAPO, C.; RAOULT, D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. **Lancet Infect Dis.**, v.6, n.9, p.557-69, 2006

MELBY, P.C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J.E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **J Immunol.**, v. 166, n.3, p.1912-20, 2001.

MISSAWA, N.A.; VELOSO, M.A.; MACIEL, G.B.; MICHALSKY, E.M.; DIAS, E.S. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by Lutzomyia cruzi in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 44, n.1, p.76-8, 2011.

MOHAN, K.; CORDEIRO, E.; VACI, M.; MCMASTER, C.; ISSEKUTZ, T. B. CXCR3 is required for migration to dermal inflammation by normal and in vivo activated T cells: differential requirements by CD4 and CD8 memory subsets. **European Journal of Immunology**, v.35, p.1702–1711, 2005.

MOHRS, M.; LEDERMANN, B.; KÖHLER, G.; DORFMÜLLER, A.; GEßNER, A.; BROMBACHER, F. Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. **J Immunol**, v.162, n.12, p.7302-8, 1999.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol.**, v.19, p.683-765, 2001

MORENO, A.; MARAZUELA, M.; YEBRA, M.; HERNÁNDEZ, M.J.; HELLÍN, T.; MONTALBÁN, C.; VARGAS, J.A. Hepatic fibrin-ring granulomas in visceral leishmaniasis. **Gastroenterology**, v.95, n.4, p.1123-6, 1988.

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

MULLER, K.; VAN ZANDBERGEN, G.; HANSEN, B.; LAUFS, H.; N. JAHNKE, SOLBACH, W. ; LASKAY, T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v.190, p.73–76, 2001.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v.95, p.3032, 2000.

MURPHY, M.L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E.N.; HUNTER, C.A.; FARRELL, J.P. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **Eur J Immunol**, v.31, n.10, p.2848-56, 2001.

MURRAY, H.W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Int J Exp Pathol.**, v. 82, n.5, p.249-67, 2001.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAIVA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v.366, p.1561-1577, 2005.

MURRAY, H.W.; LU, C.M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A.L; KAPLAN, G.; COFFMAN, R.L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect Immun**, v.70, n.11, p.6284-93, 2002.

MURRAY, H.W.; MONTELIBANO, C.; PETERSON, R.; SYPEK, J.P. Interleukin-12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral Leishmaniasis. **J Infect Dis.**, v. 182, n.5, p.1497-502, 2000.

MURRAY, H.W.; MOREIRA, A.L.; LU, C.M.; DEVECCHIO, J.L.; MATSUHASHI, M.; MA, X.; HEINZEL, F.P. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.**, v. 188, n.3, p.458-64, 2003.

MURRAY, H.W.; SQUIRES, K.E.; MIRALLES, C.D.; STOECKLE, M.Y.; GRANGER, A.M.; GRANELLI-PIPERNO, A.; BOGDAN, C. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. **J Immunol.**, v.148, n.6, p.1858-63, 1992.

NIETO, A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J.A.; DE LA FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Vet Res.**, v. 242, n.1, p.39, 2011.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunol.**, v.28, n.9, p.378-84, 2007.

OGHUMU, S.; LEZAMA-DÁVILA, C.M.; ISAAC-MÁRQUEZ, A.P.; SATOSKAR,A.R. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. **Exp Parasitol.**, v.126, n.3, p.389-96, 2010.

PAREDES, R.; MUÑOZ, J.; DIAZ, I.; DOMINGO, P.; GURGUI, M.; CLOTET, B. Leishmaniasis in HIV infection. **J Postgrad Med**, v.49, p.39-49, 2003.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, p.1-13, 1996.

REINER, N.E.; NG, W.; WILSON, C.B.; MCMASTER, W.R.; BURCHETT, S.K. Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. **J Clin Invest.**, v. 85, n.6, p.1914-24, 1990.

RITTER, U.; H. KORNER. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology.**, v. 24, p.295–301, 2002.

RITTER, U.; MOLL, H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. **European Journal of Immunology**, v.30, p.3111–3120, 2000.

ROSAS, L.E.; BARBI, J.; LU, B.; FUJIWARA, Y.; GERARD, C.; SANDERS, V.M.; SATOSKAR, A.R. CXCR3-/- mice mount an efficient Th1 response but fail to control *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v.35, n.2, p.515-23, 2005.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p.217-242, 2000.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U.H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p.891–928, 2004.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; DE PAIVA, HOFFMANN. M.; DE FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol.**, v. 12, n.3, p.315-7, 1998.

SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G.; VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S.C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. **Parasitol Res.**, v. 103, n.1, p.1-10, 2008.

SARRIS, A.H.; BROXMEYER, H.E.; WIRTHMUELLER, U.; KARASAVVAS, N.; COOPER, S.; LU, L.; KRUEGER, J.; RAVETCH, J.V. Human interferon-inducible protein 10: expression and purification of recombinant protein demonstrate inhibition of early human hematopoietic progenitors. **J Exp Med**, v.178, n.3, p.1127-32, 1993.

SATO, N.; AHUJA, S. K.; QUINONES, M.; KOSTECKI, V.; REDDICK, R. L.; MELBY, P. C.; KUZIEL, W.A.; AHUJA, S. S. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for Langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cell: absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, B cell out growth, and sustained neutrophilic inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v.192, p.205-18, 2000.

SATO, N.; KUZIEL, W. A.; MELBY, P. C.; REDDICK, R. L.; KOSTECKI, V.; ZHAO, W.; MAEDA, N.; AHUJA, S. K. AHUJA, S. S. Defects in the generation of IFN- γ are overcome to control infection with *Leishmania donovani* in CC chemokine receptor (CCR)5-, macrophage inflammatory protein-1- α , or CCR2-deficient mice. **The Journal of Immunology**, v.163, p.5519-25, 1999.

SATOSKAR, A., BLUETHMANN, H.; ALEXANDER, J. Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. **Infect. Immun.**, v. 63, p.4894-4899, 1995.

SAUNDERS, J.; TARBY, C. M. Opportunities for novel therapeutic agents acting at chemokine receptors. **Drug Discovery Today**, v.4, p.80-92, 1999.

SCHLEICHER, U.; LIESE, J.; KNIPPERTZ, I.; KURZMANN, C.; HESSE, A.; HEIT, A.; FISCHER, J.A.; WEISS, S.; KALINKE, U.; KUNZ, S.; BOGDAN, C. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. **J Exp Med.**, v. 204, n.4, p.893-906, 2007.

SOONG.L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. **J Immunol.**, v. 180, n.7, p.4355-60, 2008.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell Press.**, v. 76, p.301–314, 1994.

SQUIRES, K.E.; SCHREIBER, R.D.; MCELRATH, M.J.; RUBIN, B.Y.; ANDERSON, S.L.; MURRAY, H.W. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. **J Immunol.**, v. 143, n.12, p.4244-9, 1989.

STÄGER, S.; ALEXANDER, J.; CARTER, K.C.; BROMBACHER, F.; KAYE, P.M. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. **Infect Immun.**, v.71, n.8, p.4804-7, 2003.

STANLEY, A.C.; ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol Cell Biol.**, v. 85, n.2, p.138-47, 2007.

TASWELL, C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. III. Validity tests for the single-hit Poisson model. **J Immunol Methods.**, 72, n.1, p.29-40, 1984.

TAUB, D.D.; LLOYD, A.R.; CONLON, K.; WANG, J.M.; ORTALDO, J.R.; HARADA, A.; MATSUSHIMA, K.; KELVIN, D.J.; OPPENHEIM, J.J. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. **J Exp Med.**, v.177, n.6, p.1809-14, 1993.

TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, L .R.; ANDRADE, B. B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n.1, p.32-40, 2006.

THELEN, M. Dancing to the tune of chemokines. **Nature Immunology**, v.2, p.129-134, 2001.

TITUS, R.G.; MARCHAND, M.; BOON, T.; LOUIS, J.A.A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol.**, v. 7, n.5, p.545-55, 1985.

VAN ASSCHE, T.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R.A.; MAES, L.; COS, P. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radic Biol Med.**, v.51, n.2, p.337-51, 2011.

VASQUEZ, R.E.; SOONG, L. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, n.12, p.6769-77, 2006.

VASQUEZ, R.E.; XIN, L.; SOONG, L. Effects of CXCL10 on dendritic cell and CD4+ T-cell functions during *Leishmania amazonensis* infection. **Infect Immun**, v.76, n.1, p.161-9, 2008.

VESTER, B.; MULLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, v.67, p.3155–3159, 1999.

VOULDOUKIS, I.; BÉCHEREL, P.A.; RIVEROS-MORENO, V.; AROCK, M.; DA SILVA, O.; DEBRÉ, P.; MAZIER, D.; MOSSALAYI, M.D. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. **Eur J Immunol.**, v. 27, n.4, p.860-5, 1997.

WANG, H.C.; DANN, S.M.; OKHUYSEN, P.C.; LEWIS, D.E.; CHAPPELL, C.L.; ADLER, D.G.;WHITE JR, A.C. High levels of CXCL10 are produced by intestinal epithelial cells in AIDS patients with active cryptosporidiosis but not after reconstitution of immunity. **Infect Immun**,v.75, n.1, p.481-7, 2007.

WHO. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**, Geneva, 2010. 104 p.

WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.; PEARSON, R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microp Pathog**,v.38, n.4, p.147-60, 2005.

WILSON, M.E.; SANDOR, M.; BLUM, A.M.; YOUNG, B.M.; METWALI, A.; ELLIOTT, D.; LYNCH, R.G.; WEINSTOCK, J.V. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. **J Immunol.**, v. 156, n.6, p.2231-9, 1996.

WILSON, M.E.; WEINSTOCK, J.V. Hepatic Granulomas in Murine VisceralLeishmaniasis Caused by *Leishmania chagasi*. **Methods**, v.9, n.2, p.248-54, 1998.

WU, J.; CUNHA, F.Q.; LIEW, F.Y.; WEISER, W.Y. IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. **J Immunol.**, v.151, n.8, p.4325-32, 1993.

ZECCA, C.; NESSI, F.; BERNASCONI, E.; GOBBI, C. Ocular toxoplasmosis during natalizumab treatment. **Neurology.**, v.73, n.17, p.1418-9, 2009.

