



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

SAYONARA DE MELO VIANA

**PERSISTÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis* EM CAMUNDONGOS
BALB/c MEDIADA POR CITOCINAS E QUIMIOCINAS**

**FORTALEZA
2013**

SAYONARA DE MELO VIANA

**PERSISTÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis* EM CAMUNDONGOS
BALB/c MEDIADA POR CITOCINAS E QUIMIOCINAS**

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
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

V668p Viana, Sayonara de Melo.

Persistência da infecção por *Leishmania braziliensis* em camundongos BALB/c mediada por citocinas e quimiocinas / Sayonara de Melo Viana. – 2013.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2013.
Orientação: Prof. Dra. Maria Jania Teixeira.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Camundongos. 3. Citocinas. 4. Quimiocinas. I.Título.
CDD 616.9364

SAYONARA DE MELO VIANA

**PERSISTÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis* EM CAMUNDONGOS
BALB/c MEDIADA POR CITOCINAS E QUIMIOCINAS**

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. Tatiana Rodrigues de Moura
Universidade Federal de Sergipe

Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu
Universidade Federal do Ceará

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

Aos meus pais, Almeida e Sônia.

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento à pesquisa CNPq e Capes, que deram apoio financeiro sob a forma de bolsas para estudante de iniciação científica e de mestrado, no desenvolvimento do trabalho que compõe esta dissertação.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Jania Teixeira, por ter sido uma mentora para a minha vida acadêmica desde a graduação, e também por ser um importante exemplo pessoal e profissional. Agradeço sua disponibilidade, paciência, e sobretudo a valiosa lição de boa liderança e convivência que oferta diariamente a todos os seus alunos e colegas.

À Profa. Dra. Camila Indiani de Oliveira, ao seu doutorando Kiyoshi Ferreira Fukutani e demais membros do Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fiocruz-BA, em Salvador, que me receberam e cederam seu espaço, tecnologia e material para a realização de parcela crucial deste trabalho.

À Profa. Dra. Cristina de Souza Chaves, chefe do Setor de Estudos em Parasitologia, no DPML, pela oportunidade de trabalhar no laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal – DPML/UFC, em especial a Paula Palácio e Mila Aragão, por sua disponibilidade e eficiência na resolução de todos os assuntos administrativos.

À Coordenação do Mestrado em Patologia/UFC pelo auxílio e presteza, ao longo de meus dois anos de curso.

Aos professores do Mestrado, pelo conhecimento e experiência transmitidos.

Aos colegas que ingressaram juntamente comigo no curso de pós-graduação em Patologia, em 2011.1, pelos momentos compartilhados ao longo desses dois anos.

A todos do Setor de Estudos em Parasitologia do DPML/UFC; professores, mestrandos, graduandos e funcionários, que contribuíram de forma direta ou indireta com este trabalho. À bióloga Mayara Brilhante Araújo, um agradecimento especial por ter sido a principal coautora deste trabalho. Ao amigo Allan Rodrigo Soares Maia por ofertar suas muitas habilidades sempre que necessário, em especial como fotógrafo. Aos amigos Priscila Valera Guerra, João Victor Serra Nunes, Brunna Nery, Rafael Vieira e Rafael Marciano, pelo valioso auxílio sempre que necessário, e pelo companheirismo na convivência diária do laboratório.

Aos colegas e amigos da turma de graduação em Ciências Biológicas, em especial àqueles que continuam próximos.

A toda a família, em especial aos meus queridos pais e irmã, por terem me oferecido um lar equilibrado, com muito amor, respeito e leitura, e por representarem a origem de todas as oportunidades que já tive como ser humano. A Isabel Quintela, por ter me acompanhado durante esse processo, e ter sido a principal pessoa capaz de tornar meus dias mais leves e felizes.

A Deus, por essa existência e os desafios e bênçãos que a rodeiam.

“Não deixaremos de explorar e, ao término da nossa exploração, deveremos chegar ao ponto de partida e conhecer esse lugar pela primeira vez.”

(T. S. Elliot)

RESUMO

A infecção por *Leishmania braziliensis* se distingue por sua latência e cronicidade, podendo persistir em camundongos e nos pacientes após a cura clínica espontânea ou após o tratamento. A persistência da infecção por *L. braziliensis* ainda tem sido pouco estudada, seja em humanos, seja em modelos experimentais. O objetivo deste trabalho, portanto, foi caracterizar a persistência da infecção por *L. braziliensis* utilizando o modelo murino. Foram avaliados em diferentes tempos a espessura da lesão, a carga parasitária e o padrão de citocinas e quimiocinas envolvidas no processo. Para isso, camundongos BALB/c foram infectados com uma cepa de *L. braziliensis* e acompanhados por 90 dias. Os resultados mostraram que os parasitos desapareceram gradativamente da pata, enquanto nos linfonodos a carga parasitária se manteve, mesmo 90 dias pós-infecção (p.i.). Houve pouca expressão de IFN- γ nas patas durante os períodos analisados, enquanto a expressão de TNF- α apresentou-se alta aos 30 dias de infecção. IL-10 e TGF- β apresentaram maior expressão inicialmente e regrediram a partir de 30 dias p.i. Quanto às quimiocinas, observou-se expressão de CCL2, CCL3, CXCL1 e CXCL10 nas patas; aos 30 dias todas as quimiocinas apresentaram máxima expressão, e diminuíram no 60º dia p.i. Através de detecção por ELISA no linfonodo de drenagem, observou-se um pico de concentração de TNF- α aos 15 dias e de IFN- γ aos 30 dias pós-infecção, o que precedeu a redução na espessura da lesão e diminuição da carga parasitária na pata. IL-4 foi predominante aos 15 dias p.i., tendo sua concentração muito diminuída aos 30 dias; a partir desse período a citocina foi pouco detectada. Já a concentração de IL-10 e TGF- β manteve-se alta e estável, a partir dos 30 dias p.i. Nos linfonodos, a expressão de CCL2 e CXCL10 aumentou gradativamente, atingindo pico aos 45 dias p.i., enquanto a expressão de CCL3 apresentou pico aos 30 dias p.i., regredindo depois. Em conclusão, os parasitos persistem no linfonodo de drenagem em períodos crônicos de infecção, quando CCL2, CXCL10, IL-10 e TGF- β continuam sendo expressos/produtados em quantidade. O quadro observado sugere um equilíbrio entre essas citocinas, o que pode ser determinante para a persistência do parasito no linfonodo.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*. Camundongos. Citocinas. Quimiocinas.

ABSTRACT

Leishmania braziliensis is the main causative agent of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. Altough *L. braziliensis* infection is self-limited it is distinguished by its latency and chronicity and can persist in mice and patients even after spontaneous clinical cure or treatment. Little is known about the persistence feature in *L. braziliensis*' infection in humans and mice. Thereby, the aim of this study was to characterize the parasite's persistence in the murine model. The parasite load, lesion thickness and pattern of cytokines and chemokines involved in persistence were evaluated through BALB/c mice infection with a *L. braziliensis* strain and observation for 90 days after infection. The results showed that parasites gradually disappear in the footpad, while the parasite load was sustained in the draining lymph node until 90 days post-infection (p.i.). In the footpad, TNF- α expression was higher at 30 days p.i., followed by the decrease in parasite load and lesion thickness in the site. IL-10 and TGF- β were more expressed at first and decreased after 30 days of infection. A higher concentration of TNF- α and IFN- γ was observed at 15 and 30 days post-infection in the draining lymph node, while IL-4 was significantly increased at 15 days post-infection, and IL-10 and TGF- β were the predominant cytokines after 90 days of infection. CCL2, CCL3, CXCL1 e CXCL10 were expressed in the footpad, with a peak at 30 days p.i. and reduction at 60 days. In the draining lymph node, CCL2 and CXCL10 presented a low expression at first, increasing to a peak at 45 days p.i., while CCL3 was more expressed at 30 days p.i., the same period of the maximum lesion thickness. In our work, we observed that *Leishmania* persists in draining lymph nodes, while CCL2, CXCL10, IL-10 and TGF- β are significantly expressed/produced. These results indicate that these citokynes act synergistically, which can determinate parasite persistence in the draining lymph node.

Key words: Leishmania braziliensis. Mice. Cytokines. Chemokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo	15
Figura 2 - Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 2005	16
Figura 3 - Mecanismos que influenciam a expansão de diferentes células T CD4+ como parte da resposta imunológica adaptativa à infecção por <i>Leishmania major</i>	20
Figura 4 - Aspecto de patas de camundongos BALB/c após 30 dias de infecção com <i>L. braziliensis</i>	34
Gráfico 1 - Evolução da lesão no coxim plantar de camundongos BALB/c após infecção com com <i>L. braziliensis</i>	34
Gráfico 2 - Número de parasitos na pata e no linfonodo de drenagem em camundongos BALB/c após infecção com <i>L. braziliensis</i>	35
Gráfico 3 - Expressão relativa de RNAm de citocinas em patas de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i>	37
Gráfico 4 - Concentração de citocinas em cultura de células mononucleadas do linfonodo de drenagem de lesão de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i>	39
Gráfico 5 - Expressão relativa de RNAm de quimiocinas em patas de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i>	40
Gráfico 6 - Expressão relativa de RNAm de quimiocinas nos linfonodos de drenagem de lesão de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Célula dendrítica
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNAc	DNA complementar
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EP	Erro padrão
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMN	Polimorfonucleares
RNAm	RNA mensageiro
SBF	Soro bovino fetal
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde
TGF	Fator de transformação do crescimento
Th	T <i>helper</i> (T auxiliar)
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	As leishmanioses	13
1.2	Leishmaniose tegumentar americana no Brasil	14
1.3	Manifestações clínicas e imunopatologia da leishmaniose tegumentar causada por <i>Leishmania braziliensis</i>	16
1.4	Modelos de leishmaniose cutânea experimental com <i>L. braziliensis</i>	18
1.5	As quimiocinas, com ênfase em infecções por <i>Leishmania</i>	22
1.6	Imunossupressão e persistência de <i>Leishmania</i>	24
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Desenho Experimental	29
4.2	Meios de cultura	29
4.3	Roedores	30
4.4	Parasitos	30
4.5	Infecção e acompanhamento da evolução da doença	30
4.6	Carga parasitária	31
4.7	Cultura de linfócitos do linfonodo de drenagem	31
4.8	Quantificação de citocinas através de ELISA	31
4.9	Isolamento de RNA e PCR em Tempo Real	32
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS	34
5.1	Curso das lesões em camundongos BALB/c após infecção com <i>L. braziliensis</i>	34
5.2	Carga parasitária no sítio de inoculação e no linfonodo em camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i>	35
5.3	Expressão de citocinas nas patas de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i>	36

5.4	Níveis de IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-10 e TGF-β em cultura de células de linfonodo de drenagem de lesão de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i>	38
5.5	Expressão de quimiocinas nas patas e linfonodos de drenagem de infecção de camundongos BALB/c infectados por <i>L.braziliensis</i>	40
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 As Leishmanioses

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que pertencem ao supergrupo Excavata e subgrupo Kinetoplastea (ADL *et al.*, 2005). Esses parasitos têm ciclo de vida heteroxênico, ocorrendo sob duas formas evolutivas: amastigota e promastigota. A forma amastigota não possui flagelo externo e é encontrada dentro dos fagolisossomos de monócitos e macrófagos, em hospedeiros vertebrados (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Por outro lado, a forma promastigota é extracelular e flagelada, sendo encontrada no trato gastrointestinal das fêmeas de flebotomíneos, vetores da doença (SACKS *et al.*, 1995). Insetos do gênero *Phlebotomus* são responsáveis pela transmissão da doença no Velho Mundo, e aqueles do gênero *Lutzomyia* são os vetores nas Américas (LAISON *et al.*, 1987; LIMA; TITUS, 1996).

As leishmanioses possuem grande diversidade epidemiológica, figurando entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância no mundo, e a segunda causada por protozoários. De fato, constituem um problema de Saúde Pública em vários países, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do Oriente Médio, Sul da Ásia, África e América Latina (OMS/WHO, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO, 2011), há aproximadamente 12 milhões de infectados, 350 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença e cerca de 2 milhões de novos casos ocorrendo a cada ano.

A doença pode apresentar-se sob amplo espectro de formas clínicas, que variam desde uma infecção assintomática até formas tegumentares (cutânea, difusa e/ou mucosa) ou visceral (ROBERTS, 2005). As manifestações clínicas da leishmaniose dependem de interações complexas que abrangem parasito e hospedeiro, tais como: a espécie de *Leishmania*, sua capacidade infectiva e o estado imunológico e nutricional do hospedeiro (PEARSON; SOUSA, 1996). A leishmaniose tegumentar pode manifestar-se como: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM). A LCL é caracterizada por lesões isoladas no local da picada do inseto vetor e pela formação de úlceras com fundo necrótico e bordas elevadas. A LCM se caracteriza por lesões mucosas graves, levando à destruição de tecido epitelial, principalmente das narinas e da cavidade oral (OMS, 2010).

A leishmaniose cutânea difusa caracteriza-se por não apresentar lesões ulceradas. Sua lesão primária é uma pápula, de onde irão se desenvolver lesões satélites que

se disseminarão em nódulos, principalmente na face e nas extremidades. Sua evolução é indolente e pode perdurar por toda a vida do paciente (PEARSON; SOUSA; JERONIMO, 2005).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é a forma mais grave da doença, apresentando índices altos de letalidade quando não tratada adequadamente (COSTA, 2005). Os pacientes com LV podem apresentar febre prolongada, hepatoesplenomegalia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, perda de peso e se não tratados, evoluem para um quadro de caquexia (GONTIJO; MELO, 2004).

1.2 Leishmaniose tegumentar americana no Brasil

No continente americano ocorrem várias espécies de *Leishmania* filogeneticamente distintas, levando a uma grande variedade de manifestações clínicas; mas a maior quantidade de casos sintomáticos da doença ocorre sob as formas cutânea e mucocutânea. A LTA constitui a mais comum expressão de leishmaniose no Brasil e ocorre em quase todo o território nacional (BRANDAO-FILHO, 1999) (Figura 1).

A LTA representa importante problema de saúde pública devido à sua incidência, bem como pelo risco de ocorrência de deformidades no hospedeiro humano e por seu envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que pode ser considerada uma doença ocupacional na maioria dos casos (SVS/MS, 2007).

Nas últimas décadas, as análises epidemiológicas da LTA têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença, inicialmente considerada zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com as florestas. Posteriormente, a doença começou a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas (BASANO & CAMARGO, 2004; SVS/MS, 2007).

No Brasil, observou-se aumento no número de casos a partir do ano de 1985, quando se solidificou a implantação das ações de vigilância e controle da LTA no país. Em 2003 foi confirmada a autoctonia da doença em todos os estados brasileiros, com predominância nas regiões Norte e Nordeste, que representaram respectivamente 40,4% e 31,3% dos casos registrados entre 2001 e 2011 (MS, 2011).

Figura 1 - Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo.

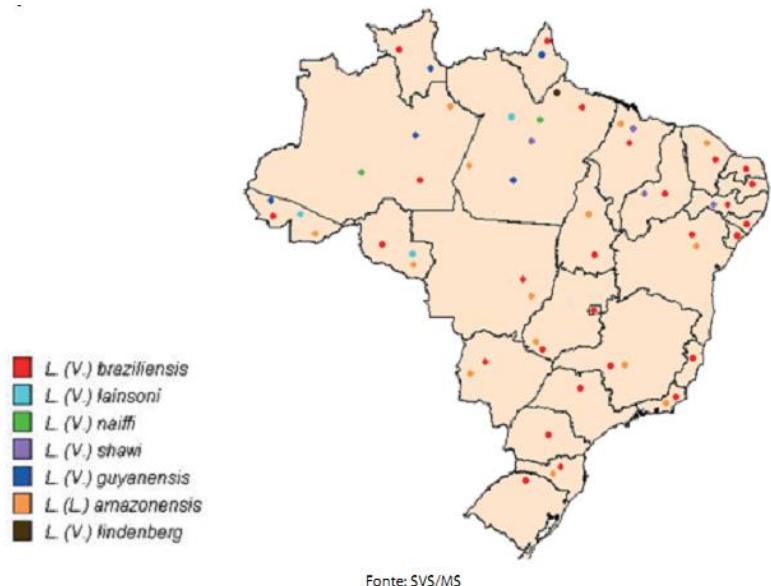


Fonte: OMS, 2010. As áreas de ocorrência das leishmanioses cutânea e mucocutânea nas Américas são indicadas em marrom.

A partir de 2006 o número anual de casos no país diminuiu em relação à média dos últimos 22 anos (1990-2011), avaliada em 26.726 registros. O ano de 2011 representou a maior queda observada, com apenas 15.731 casos notificados, dos quais o estado do Ceará respondeu por apenas 556, o que representa uma queda de quase 55% em relação às notificações do ano anterior. Apesar disso, 18,2% dos casos do Nordeste da última década ocorreram no Ceará (MS, 2012).

As principais espécies causadoras de LTA no Brasil são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Destas, *L. braziliensis* é a espécie predominante nas regiões do Brasil onde a leishmaniose tegumentar (LT) é endêmica, como no estado do Ceará (VASCONCELOS *et al.*, 1988), e ocorre em áreas de colonização antiga e recente (JONES *et al.*, 1987) (Figura 2).

Figura 2 - Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 2005.



Fonte: SVS/MS. Representada em vermelho, *L. braziliensis* tem casos autóctones registrados em todos os estados da federação.

1.3 Manifestações clínicas e imunopatologia da leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania braziliensis*

Várias espécies do gênero *Leishmania* spp. apresentam um elevado grau de polimorfismo intra-espécie e fenotípico, o qual é acompanhado por um espectro de apresentações clínicas no hospedeiro humano infectado. Uma grande variabilidade tem sido reportada para *L. braziliensis* (CUPOLILLO *et al.*, 2003), que pode causar pelo menos três formas bem documentadas de LT: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose disseminada (LD) (COSTA *et al.*, 1986; CARVALHO *et al.*, 1994).

A LCL é a forma mais frequente da doença e é caracterizada por lesões ulceradas, de bordos elevados e circulares, indolores e com pouca secreção. O quadro é normalmente assintomático, predominando em áreas expostas do corpo onde o flebotomíneo pode inocular as promastigotas. Apresenta tendência à cura espontânea e boa resposta ao tratamento (COSTA *et al.*, 1990; MARSDEN *et al.*, 1984). Na LTA causada por *L. braziliensis*, estudos mostraram que linfonodos próximos ao sítio de inoculação do parasito podem tornar-se aumentados dias ou semanas antes do aparecimento das lesões (BARRAL *et al.*, 1995; SOUSA *et al.*, 1995). Essa manifestação, denominada linfadenite granulatosa, em geral, não é

dolorosa e comumente é documentada como um aumento maior que 5 cm de diâmetro do tamanho original do linfonodo (MARSDEN *et al.*, 1984; SOUSA *et al.*, 1995).

A LD é uma variação da forma cutânea e geralmente está associada a pacientes imunossuprimidos. Apresenta úlceras típicas associadas a inúmeras lesões papulares ou de aparência acneiforme, resultantes de uma disseminação hematogênica, podendo acometer a mucosa e vários segmentos corporais, envolvendo, mais comumente, face e tronco. Achados histopatológicos revelam um infiltrado eosinofílico e/ou linfoplasmocítico; parasitos podem ou não ser encontrados na lesão (COSTA *et al.*, 1986; CARVALHO *et al.*, 1994). Essa forma é relativamente rara e pode ser observada em até 2% dos casos. As duas espécies reconhecidas como causadoras desta forma de leishmaniose são *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (VIEIRA *et al.*, 2002; PEARSON & SOUSA, 1996).

A LMC é a forma mais grave do espectro clínico; apresenta significante morbidade, podendo levar a um curso fatal. Seu principal agente etiológico no Brasil é *L. braziliensis* (AMATO *et al.*, 2008), embora *L. amazonensis* (COSTA *et al.*, 1986) e *L. guyanensis* (GUERRA *et al.*, 2011a) também sejam espécies implicadas nessa forma clínica. Na maior parte das áreas endêmicas, estima-se que até 10% dos casos de LCL pode resultar em lesões mucosas mesmo após 1 a 5 anos de cura das lesões cutâneas iniciais. Acredita-se que a metástase na LMC ocorra por disseminação hematogênica ou linfática, e, na ausência de tratamento adequado, a doença evolui com destruição progressiva do septo nasal e dos palatos mole e duro, levando eventualmente à desfiguração facial grave, acompanhada de perturbações respiratórias, dificuldades para a alimentação e a fala (MARSDEN, 1986; BITTENCOURT & BARRAL, 1991; PEARSON *et al.*, 2000). Essas lesões apresentam um número bastante reduzido de parasitos (MARSDEN, 1986; CARVALHO, 1995).

Em todas as formas de leishmaniose, a resolução da infecção é dependente de interações coordenadas entre componentes da resposta imunológica celular e a ativação de células T CD4⁺ de perfil Th1, que também pode prevenir o estabelecimento de uma infecção crônica latente. As células T CD8⁺ parecem estar mais ligadas à geração de memória imunológica do que como células efetoras para a eliminação do parasito (AWASTHI *et al.*, 2004), mas podem ser essenciais para a resolução da infecção primária de camundongos com baixa dose de parasitos (BELKAID *et al.*, 2002b). A infecção por *Leishmania* induz resposta humoral, porém os anticorpos aparentemente não desempenham nenhuma função protetora in vivo (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

A diferenciação em resposta Th1 ou Th2 parece ser multifatorial, envolvendo o tipo de célula apresentadora de antígeno, os níveis de citocinas endógenas e a natureza do

antígeno reconhecido (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Como consenso geral, a diferenciação e proliferação de células Th1 ocorre a partir da produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos, macrófagos e células dendríticas. Linfócitos T CD4⁺ Th1 e CD8⁺ ativados também são responsáveis pela secreção de outras citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (revisado por ALEXANDER & BROMBACHER, 2012). Além de induzir respostas efetoras em células infectadas, a expressão de IFN- γ leva à regulação positiva de CXCR3 (receptor de quimiocinas) nos linfócitos, e à recirculação de células CD4⁺ Th1 para sítio de infecção e linfonodos de drenagem (BARBI *et al.*, 2009). As citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-13) e imunorregulatórias (IL10 e TGF- β) desativam macrófagos e previnem a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (SCOTT, 2005). A resposta Th2 provavelmente evita que ocorra excessiva destruição tecidual, mas por outro lado promove a infecção intracelular (REITHINGER, 2007).

A LCL e LCM representam facetas responsivas da doença, com forte resposta imunológica do tipo Th1 ao antígeno de *Leishmania*, apresentando alta produção de IFN- γ e TNF- α e eficácia diminuída de IL-10 em modular negativamente a produção de IFN- γ (FOLLADOR *et al.*, 2002). Com a progressão da doença, pacientes com LMC tendem a desenvolver reação intradérmica (ou reação de Montenegro) mais forte, melhor resposta proliferativa de linfócitos e maior produção de IFN- γ que pacientes com LCL. A resposta mediada por IFN- γ e TNF- α parece estar envolvida tanto no controle da multiplicação do parasito durante as fases iniciais da infecção por *Leishmania*, quanto no dano tecidual observado na leishmaniose tegumentar (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998).

Pacientes com LD apresentam resposta imunológica permissiva ao crescimento dos parasitos. A cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) obtidas de pacientes com LD produz níveis mais baixos de TNF- α e IFN- γ e mais altos de IL-10, comparados com CMSP de pacientes com LCL (AKUFFO *et al.*, 1997). Leopoldo e colaboradores (2006) observaram, através de cultura de CMSP, que pacientes com LD induzem menor produção de citocinas Th1 (TNF- α e IFN- γ), mas não induzem resposta característica Th2 ou aumento nos níveis de IL-10, como observado em casos de LV ou LCD. Entretanto, torna-se clara a deficiência da resposta imunológica Th1 em indivíduos com LD.

1.4 Modelos de leishmaniose cutânea experimental com *L. braziliensis*

Os modelos de leishmaniose experimental têm trazido uma grande contribuição para o esclarecimento da imunorregulação da doença. Grande parte dos estudos de resistência

e susceptibilidade em leishmaniose cutânea enfoca primariamente a infecção por *L. major* em modelos murinos. Esta espécie é causadora de formas tegumentares da doença no Velho Mundo e, em animais resistentes à sua infecção, como camundongos C57BL/6, a cura depende do desenvolvimento de uma resposta imunológica do tipo CD4⁺ Th1. A ação de linfócitos CD4⁺ Th1 leva à ativação das células infectadas e à regulação positiva de mecanismos efetores antimicrobianos, incluindo a acidificação dos fagolisossomos e a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS), para a produção de óxido nítrico (NO), entre outras moléculas efetoras para a destruição dos parasitos (BOGDAN, 2001; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; DE SOUZA-NETO *et al.*, 2004). Entretanto, em camundongos C57BL/6 infectados por *L. mexicana* ocorre produção de IFN- γ e NO e limitação da infecção de forma independente de IL-12 (BUXBAUM *et al.*, 2002).

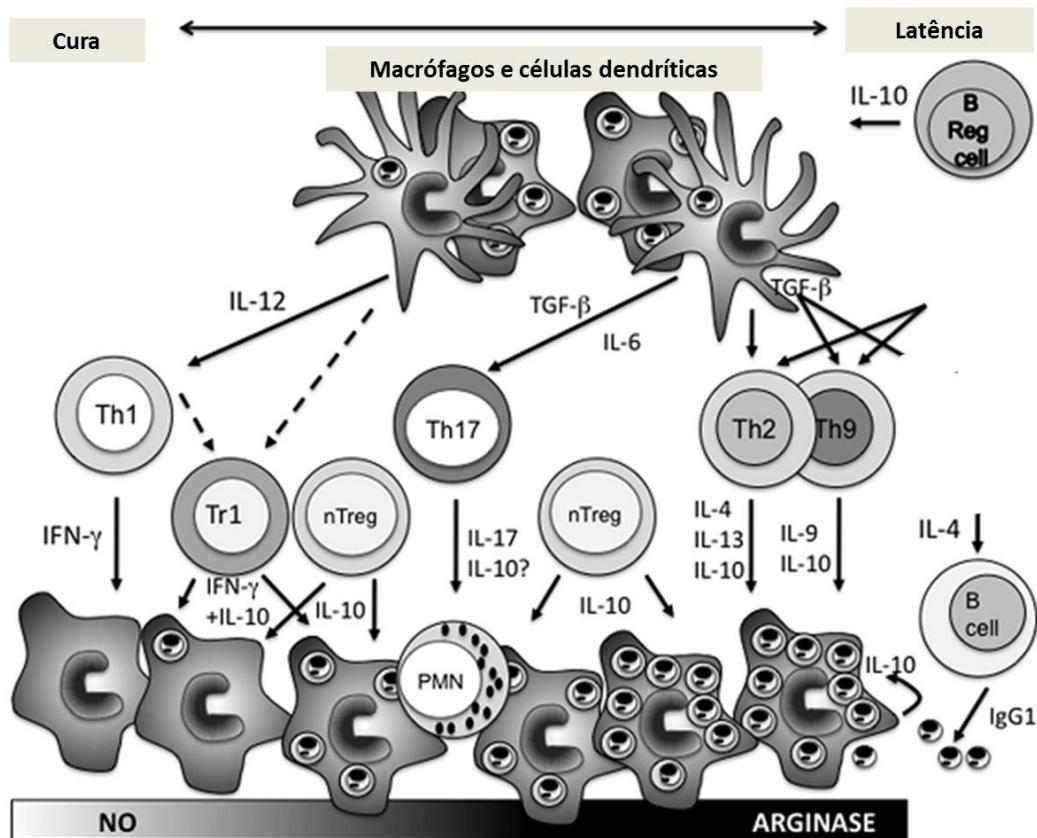
Em infecção experimental com *L. major*, IFN- γ e iNOS se revelaram como principal via efetora para a destruição de amastigotas pelos macrófagos, mediando a conversão de arginina e citrulina em NO leishmanicida (BELKAID *et al.*, 2000; BOGDAN, 2007). Apesar disso, apenas a expressão de iNOS não é suficiente para o controle de *L. major*, como se vê em camundongos deficientes em TNF- α (WILHELM *et al.*, 2001), o que demonstra a importância desta citocina no controle do parasito. Em contrapartida, camundongos suscetíveis à *L. major*, como os BALB/c, predominantemente desenvolvem resposta imunológica do tipo Th2, determinada pela presença de IL-4 e IL-13 entre outras citocinas. Nesse modelo as células infectadas não são ativadas para a destruição de parasitos e, portanto, ocorre progressão da doença (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; VON STEBUT & UDEY, 2004) (Fig. 3).

As células Treg têm como principal papel a homeostase e limitação de inflamação excessiva, via produção de IL-10 em particular (revisado por PETERSON, 2012). Entretanto, o papel destas células na infecção por *Leishmania* pode ser promovendo ou controlando a doença, de acordo com o modelo experimental a ser investigado. Em modelo de infecção por *L. major* de camundongos C57BL/6 resistentes, células Treg CD4⁺CD25⁺ se acumulam nas lesões e em linfonodos de drenagem, e são responsáveis pela persistência de parasitos dependente de IL-10 e por infecção latente. Ao contrário, em camundongos BALB/c suscetíveis, células Treg CD4⁺CD25⁺ podem desempenhar papel significativo no controle da doença, através da regulação de resposta Th2 (XU *et al.*, 2003). A presença de células CD4⁺CD25⁺ expressando marcadores regulatórios tais como Foxp3, GITR, e CD103 foi descrita em infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, onde se observou que a

presença de Tregs CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ não interfere na imunidade a reinfecções (FALCÃO *et al.*, 2012).

As células Th17 também exercem importante papel em infecções por *Leishmania*, atuando na migração, recrutamento e ativação de neutrófilos. Seu desenvolvimento ocorre a partir da influência de TGF-β e IL-6 e/ou IL-21, e as Th17 são caracterizadas pela produção de IL-17 e secreção de IL-21 e IL-22 (revisado por KORN *et al.*, 2009). Evidências sugerem que neutrófilos promovem a infecção de *L. major* em camundongos BALB/c, e a infecção crônica de *L. amazonensis* foi associada à indução de células T CD4⁺ produtoras de altos níveis de Th17 (XIN *et al.*, 2007), levando à atual compreensão de que esse tipo celular desempenha papel exacerbador em leishmanioses cutâneas do Velho e Novo Mundo (revisado por ALEXANDER & BROMBACHER, 2012). Os mecanismos envolvidos na resposta imunológica adaptativa à infecção por *L. major* são relacionados na figura a seguir.

Figura 3 – Mecanismos que influenciam a expansão de diferentes células T CD4⁺ como parte da resposta imunológica adaptativa à infecção por *Leishmania major*.



Fonte: adaptado de Alexander & Brombacher, 2012.

Apesar das espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, como a *L. amazonensis* e a *L. braziliensis*, poderem causar doença na maioria dos modelos experimentais, incluindo camundongos BALB/c e C57BL/6; estes animais, quando infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, não apresentam um clássico fenótipo dominante Th1 ou Th2 (JI *et al.*, 2003; DE OLIVEIRA *et al.*, 2004). Ao contrário do que ocorre com *L. major* e *L. amazonensis*, poucos estudos experimentais foram conduzidos com *L. braziliensis*, provavelmente porque este parasito não induz lesões em muitas linhagens de camundongos (NEAL & HALE, 1983; CHILDS *et al.*, 1984). Camundongos BALB/c são considerados os mais susceptíveis a *L. braziliensis*, e apesar de não apresentarem lesões cutâneas graves e evoluírem para a cura espontânea (CHILDS *et al.*, 1984), são bons modelos para o estudo da patogênese e da resposta imunológica, principalmente, na fase inicial da doença (DE OLIVEIRA *et al.*, 2004).

O primeiro trabalho a analisar a resposta imunológica neste modelo mostrou que camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* produziam menos IL-4 do que quando infectados por *L. major*. Além disso, animais infectados por *L. braziliensis* e tratados com anti-IFN- γ tinham suas lesões significativamente aumentadas e a infecção não se resolia (DEKREY *et al.*, 1998). Foi então sugerido que um mecanismo dependente de IFN- γ seria responsável pela morte de *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, e que a fraca infectividade do parasito nesta linhagem de camundongo seria causada pela incapacidade do mesmo em promover uma produção forte e sustentada de IL-4, diferentemente do que acontece com a infecção por *L. major* (DEKREY *et al.*, 1998).

Trabalhos mais recentes vêm corroborar a relação de controle versus susceptibilidade ao parasito, atribuída às citocinas IFN- γ e IL-4, respectivamente, neste modelo. Observou-se que o tratamento com anti-IFN- γ em camundongos C57BL/6 infectados com *L. braziliensis* leva à formação de lesões rápidas e progressivas, comprovando que a presença desta citocina é essencial no controle da infecção por esse parasito (ROCHA *et al.*, 2007; BOGDAN, 2007). Por outro lado, Costa e colaboradores (2011) mostraram que isolados de *L. braziliensis* provenientes de paciente resistente ao tratamento foram capazes de induzir maior produção de IL-4 e de Arginase I em camundongos BALB/c, contribuindo para a maior virulência da cepa, e gravidade da doença no paciente e neste modelo animal.

Entretanto, essas não são as únicas citocinas envolvidas no cenário da infecção de BALB/c com *L. braziliensis*. A infecção leva a forte expressão de antígenos indutores de IL-12 (BORGES, 2001) e esta citocina, assim como IFN- γ , pode estar relacionada ao controle do parasito, visto que *L. braziliensis* induz apenas lesões pequenas e passageiras em camundongos BALB/c, em contraste com camundongos infectados com *L. major*, que

apresentam úlceras progressivas. TNF- α também contribui para o controle do parasito durante a fase aguda da infecção, já que se observou que camundongos *knockout* para esta citocina e infectados por *L. braziliensis* apresentaram número aumentado de parasitos na pele, linfonodos e baço (ROCHA *et al.*, 2007).

Em modelo de infecção intradérmica por *L. braziliensis*, os camundongos BALB/c desenvolveram lesões ulceradas com cura espontânea, e foi observada uma resposta imunológica mista Th1/Th2, caracterizada pela presença de células secretoras de IFN- γ , IL-4 e IL-10, confirmando a ausência de dominância de resposta Th2 observada em infecções por *L. major* em animais susceptíveis (DE MOURA *et al.*, 2005). Na infecção por *L. braziliensis* em humanos, tem sido mostrado que o equilíbrio entre citocinas como IFN- γ e IL-10 é determinante para a cura das lesões e também para a persistência do parasito (GOMES-SILVA *et al.*, 2007; SALHI *et al.*, 2008).

1.5 As quimiocinas, com ênfase em infecções por *Leishmania*

As quimiocinas são pequenas citocinas 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. Podem ser secretadas por células epiteliais, endoteliais e leucócitos, dentre outros tipos celulares (ROT & VON ANDRIAN, 2004; MOSER *et al.*, 2004).

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 pró-inflamatórias em sua maioria, além de quimiotaxia dependente dos receptores a que se ligam (RITTER & KORNER, 2002).

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).

A infecção com *Leishmania* induz expressão de vários genes de quimiocinas no hospedeiro (ANTONIAZI *et al.*, 2004; RITTER & KORNER, 2002), sendo essas moléculas

críticas para a definição da composição do infiltrado celular inicial, e no eventual estabelecimento da doença, atuando como moléculas reguladoras e quimioatrativas (TEIXEIRA *et al.*, 2006; PIRMEZ *et al.*, 1990). A progressão da infecção por *Leishmania* ocorre a partir do recrutamento de monócitos, já que os macrófagos e células dendríticas do sítio de infecção são incapazes de suprir a multiplicação parasitária. Neutrófilos residentes produzem quimiocinas como CCL3 e CXCL1, que atuam atraindo mais monócitos e neutrófilos, entre outras células inflamatórias, para o sítio de invasão do parasito na pele (CHARMOY *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Parece haver uma associação entre quimiocinas e os perfis de resistência e susceptibilidade. A infecção por *L. major*, em camundongos resistentes C57BL/6 e susceptíveis BALB/c, induz expressões significativamente diferentes de várias quimiocinas (VESTER *et al.*, 1999). Em estudo com essas duas linhagens de camundongos, linfonodos de animais resistentes infectados com *L. major* induziram significativamente mais RNAm de CCL2, CXCL10 e CXCL1 quando comparados com aqueles de camundongos susceptíveis, indicando que estas quimiocinas podem ter um papel importante no desenvolvimento da imunidade do hospedeiro contra *L. major*. No mesmo estudo, a administração de CXCL10 recombinante em camundongos BALB/c aumentava a atividade das células NK e a resistência contra *L. major* (SANTIAGO *et al.*, 2004).

O envolvimento das quimiocinas na LT humana foi investigado inicialmente em LCL e LCD causadas por *L. mexicana*. As lesões de indivíduos com LCL continham altos níveis de CCL2, CXCL9 e CXCL10; ao contrário, lesões de indivíduos com LCD expressavam predominantemente CCL3. Nesse estudo, os autores sugerem que, em LCL, a produção de CCL2 seria responsável pelo recrutamento de macrófagos mais maduros e/ou ativados, que por sua vez eliminariam os parasitos e controlariam a doença. Por outro lado, em LCD, CCL3 induziria a migração de células mais imaturas ou desativaria estas células, favorecendo a progressão da doença (RITTER *et al.*, 1996). Campanelli e colaboradores (2010) não observaram diferentes quantidades de CCL2 e CCL5 em lesões de indivíduos com LCL e LCD, mas verificaram que as lesões de LCD apresentavam expressão muito baixa de CCR5; o que poderia explicar a falta de neutrófilos nessas lesões, em contraste com as de pacientes de LCL.

Como mostrado por Teixeira e colaboradores (2005), o próprio parasito é ativamente implicado no ambiente de quimiocinas gerado por sua infecção. Nesse trabalho, dois isolados de *L. braziliensis* induziram níveis diferentes de expressão de quimiocinas, levando a um recrutamento celular e resposta inflamatória distintos.

1.6 Imunossupressão e persistência de *Leishmania*

Muitos patógenos, em sua evolução, desenvolvem mecanismos para manipular as estratégias regulatórias da imunidade do hospedeiro a seu favor, gerando condições para sua sobrevivência por longos períodos. Um desses mecanismos compreende a indução de respostas regulatórias, normalmente associadas à finalização da resposta imunológica efetora do hospedeiro; por exemplo, indução de citocinas regulatórias tais como IL-10 e TGF- β , que podem ser produzidas por células regulatórias específicas ou por células da imunidade inata, em resposta a moléculas derivadas do patógeno (SACKS & SHER, 2002; BELKAID, 2007; BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; BARRAL *et al.*, 1995).

As células T regulatórias (Treg) são as principais efetoras de imunorregulação, e podem ser de dois tipos principais: células Treg CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$, que ocorrem no hospedeiro antes da exposição ao patógeno; e Treg induzidas, que se desenvolvem a partir de células T CD4 $^{+}$ convencionais, após a exposição a sinais como citocinas regulatórias ou células apresentadoras de抗ígenos condicionadas por produtos microbianos (BELKAID *et al.*, 2006). Mesmo quando células Treg têm sucesso em controlar a resposta imunológica excessiva devido a infecções, podem ocorrer efeitos colaterais: sobrevivência e persistência do parasito por longos períodos (BELKAID, 2007). Em modelo de infecção experimental por *L. major* em camundongos resistentes, os animais permanecem cronicamente infectados no sítio de infecção primária, onde células Treg CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ acumulam-se. Estas células regulam a função das células efetoras locais, a partir de mecanismos dependentes e independentes de IL-10 (BELKAID *et al.*, 2002). Em pacientes, verificou-se a presença de células Treg CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ em lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis*, com evidências de que essas células produziam IL-10 e TGF- β localmente (CAMPANELLI, 2006). Em modelo de infecção de BALB/c por *L. braziliensis*, Costa e colaboradores (2011) e Falcão e colaboradores (2012) também verificaram o recrutamento de células Treg CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ para o sítio de inoculação do parasito.

A infecção causada por *L. braziliensis* distingue-se por apresentar capacidade de metástase, latência e cronicidade. Pode persistir em camundongos e nos pacientes após a cura clínica espontânea ou mediada por quimioterapia, indicando o sucesso que alguns parasitos têm em escapar da resposta imunológica efetora. Mesmo após a resolução da infecção um número pequeno de parasitos ainda pode ser detectado e pacientes mantém resposta imunológica específica, sugerindo que mecanismos imunorregulatórios permitem a

sobrevivência de *L. braziliensis* (MENDONÇA *et al.*, 2004; RAMIREZ & GUEVARA, 1997).

Este fenômeno foi observado em modelos experimentais de infecção por *L. braziliensis* na pata e na derme da orelha de camundongos BALB/c; nos dois modelos os parasitos persistiram nos linfonodos de drenagem da infecção, apesar de haver resolução da lesão e eliminação dos parasitos do sítio de inoculação (DE MOURA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2011). Em infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, Falcão e colaboradores (2012) verificaram a presença de células CD4⁺CD25⁺ capazes de suprimir a proliferação de células CD4⁺CD25⁻ em orelhas infectadas e linfonodos de drenagem de infecção. Além disso, esse trabalho mostrou que camundongos BALB/c curados de uma infecção inicial não desenvolviam lesão quando reinfectados e apresentavam menor carga parasitária no linfonodo de drenagem da lesão; entretanto, a taxa de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ permanecia a mesma nos dois sítios (infecção primária e secundária), não exercendo papel sobre a imunidade à reinfecção (FALCÃO *et al.*, 2012).

Alguns trabalhos têm sugerido que a persistência de *L. major* em camundongos resistentes à infecção está relacionada à produção de IL-10, visto que esta citocina atua como mecanismo homeostático no controle de uma resposta Th1 poderosa, evitando danos ao hospedeiro. Neste modelo, IL-10 foi produzida por células T CD4⁺ e CD8⁺ que se acumulam no sítio da infecção e no linfonodo de drenagem (BELKAID *et al.*, 2001). Este e outros trabalhos têm relatado o efeito terapêutico de anti-IL-10 na cura estéril da leishmaniose cutânea experimental causada por *L. major* (BELKAID *et al.*, 2001) e seu papel decisivo na persistência da infecção (KANE & MOSSER, 2001; COSTA *et al.*, 2002).

Diversos tipos celulares podem produzir IL-10 em resposta a *Leishmania*, incluindo macrófagos (MILES *et al.*, 2005), neutrófilos (MC FARLANE *et al.*, 2008), células NK (MAROOF *et al.*, 2008), células dendríticas regulatórias (SVENSSON *et al.*, 2004), células T CD4⁺ Th1 e Th2 (NYLEN *et al.*, 2007), T CD8⁺ (BELKAID *et al.*, 2001), células B (RONET *et al.*, 2010) e células Treg (BELKAID *et al.*, 2002). IL-10 parece representar a principal citocina desativadora de macrófagos, estando presente em diversas apresentações clínicas de leishmaniose humana. Esta citocina também bloqueia respostas imunológicas mediadas por linfócitos em indivíduos infectados por *Leishmania* (GHALIB *et al.*, 1993), através da inibição da produção de TNF- α , intermediários reativos de oxigênio (ROI), IL-12 e, em menor escala, intermediários reativos de nitrogênio (RNI) por macrófagos e CDs (BOGDAN *et al.*, 1992).

A função de supressão ou desativação celular atribuída a IL-10 também tem sido bem descrita in vitro; a citocina inibiu a apresentação de抗ígenos (MITRA *et al.*, 1995), a proliferação específica de células T e a produção de citocinas Th1 (TAGA & TOSATO, 1992), além de tornar macrófagos refratários à ativação por IFN- γ , impossibilitando a destruição intracelular de parasitos (KANE & MOSSER, 2001). Em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, foi observado que o equilíbrio entre as taxas de IFN- γ e IL-10 parece ser necessário para menor morbidade da doença, pois levaria ao controle do parasito sem, no entanto, mediar dano tecidual excessivo (GOMES-SILVA *et al.*, 2007).

TGF- β é outra citocina supressora que parece ser importante para a sobrevivência e persistência dos parasitos, sendo capaz de regular certas funções de macrófagos. É produzida em macrófagos presentes em lesões de camundongos infectados com *L. amazonensis* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992), e também por macrófagos humanos após infecção por *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* (BARRAL *et al.*, 1995). Sabe-se que a adição dessa citocina a culturas de macrófagos infectados por *L. braziliensis* leva a aumento no número de parasitos, comparando-se com culturas não tratadas (BARRAL *et al.*, 1995).

O mecanismo da persistência da infecção por *L. braziliensis* ainda tem sido pouco estudado, seja em humanos, seja em modelos experimentais. Não se sabe também até que ponto a manutenção do parasito em órgãos linfóides secundários e mesmo na pele pode ser importante para a manutenção de resposta imunológica a reinfecções. Neste trabalho, portanto, objetivou-se caracterizar a persistência da infecção por *L. braziliensis* no modelo murino, avaliando em diferentes tempos a espessura da lesão, a carga parasitária e o padrão de algumas citocinas envolvidas no processo.

2. JUSTIFICATIVA

L. braziliensis pode induzir manifestações metastáticas, e mesmo um paciente tratado e aparentemente curado pode sofrer reincidência de infecção, que pode se apresentar sob formas mais graves do que a infecção inicial. A persistência do parasita em órgãos linfóides secundários e mesmo na pele pode ser importante para a manutenção de resposta imunológica à reinfecções. Entretanto, os mecanismos e/ou fatores que favorecem a persistência da infecção por *L. braziliensis* têm sido pouco estudados, tanto em humanos como em modelos experimentais. Uma vez que as relações entre a persistência e a imunopatogênese da infecção por *L. braziliensis* ainda não estão completamente elucidadas, novos conhecimentos sobre a resposta imunorregulatória desta infecção são importantes e de grande relevância.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

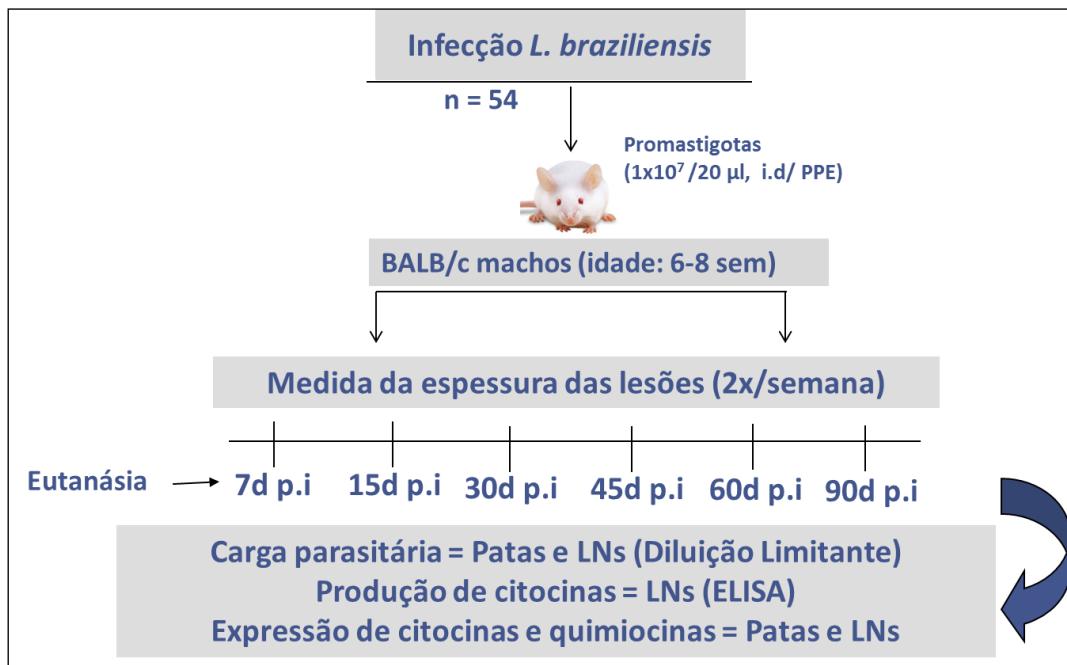
- Caracterizar citocinas e quimiocinas envolvidas na persistência da infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a cinética das lesões causadas pela infecção por *L. braziliensis*;
- Quantificar a carga parasitária no sítio de inoculação do parasito (pata) e no linfonodo de drenagem da lesão;
- Verificar a concentração das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em sobrenadantes de cultura de células do linfonodo de drenagem da lesão;
- Determinar a expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β e das quimiocinas CCL2, CCL3, CXCL1 e CXCL10 no sítio de inoculação do parasito, assim como a expressão dessas quimiocinas nos linfonodos de drenagem da lesão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental



Fonte: elaborado pelos autores.

4.2 Meios de cultura

Três meios de cultura foram utilizados neste trabalho:

- Meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)

Suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – Gibco, Grand Island, NY), 50 µM de 2-mercaptoetanol, 2 mM 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, St Louis, MO)

O meio Schneider foi suplementado com 10 ou 20% de SBF, urina humana estéril a 2% e antibióticos (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). Será mencionado como ‘Schneider suplementado’ o meio contendo os componentes conforme descrito acima, variando-se apenas a quantidade de SBF, que será explicitada, e como Schneider aquele utilizado sem suplementos.

- Meio Neal, Novy & Nicolle (N.N.N).

Meio ágar sangue a 10%, foi suplementado com meio Schneider e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina).

4.3 Roedores

Para os experimentos, foram utilizados 54 camundongos BALB/c, machos, com 6-8 semanas de vida, e para a manutenção da virulência da cepa de *L. braziliensis* foram utilizados hamsters dourado, machos, com até 8 semanas de vida. Os animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (DPML/FAMED/UFC). Durante todo o período de experimento, os roedores foram mantidos em biotério, à temperatura de 25º C, com ração comercial apropriada e água ad libitum. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa em Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, registro no. 60/12.

4.4 Parasitos

A cepa de *L. braziliensis* (MHOM-BR-94-H3227) utilizada foi isolada de paciente com leishmaniose cutânea do Estado do Ceará e caracterizada previamente por PCR e anticorpos monoclonais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2004). A virulência da cepa foi mantida através de passagem regular em hamster dourado. Após serem recuperados através de aspirado do linfonodo de drenagem da lesão, os parasitos foram cultivados a 25°C em meio N.N.N, contendo meio Schneider suplementado. Para garantir a virulência da cepa, os parasitos só foram utilizados até a 5^a passagem em cultura.

4.5 Infecção e acompanhamento da evolução da doença

Promastigotas na fase estacionária foram inoculadas por via subcutânea no coxim plantar da pata posterior esquerda dos camundongos, na concentração de 1×10^7 parasitos em 20 µl de salina. O tamanho da lesão foi acompanhado a cada 7 ou 10 dias utilizando um paquímetro de escala circular (Mitutoyo, Japão) por um período de 90 dias, equivalente a 12 semanas de infecção. A espessura da lesão foi representada pela diferença entre a pata infectada e a contralateral não infectada. Os camundongos (n=36) foram separados em grupos

de 6 animais e eutanasiados aos 7, 14, 30, 45, 60 e 90 dias após a infecção, utilizando inalação por Halotano (Sigma).

4.6 Carga parasitária

Foi determinada utilizando o Ensaio de Diluição Limitante como descrito por Titus e colaboradores (1985). Resumidamente, o linfonodo de drenagem e a pata infectada foram retirados assepticamente, macerados e homogeneizados em placa de Petri com 1 mL de meio Schneider (Sigma-Aldrich). Após a homogeneização, o material foi diluído para 8 concentrações diferentes ($10, 50, 100, 500, 10^3, 10^4, 10^5$ e 10^6) em meio Schneider suplementado 10% SBF. Cem microlitros destas diluições foram distribuídos em placas de 96 poços, fundo chato, contendo meio ágar-sangue N.N.N., em sextuplicatas (6 poços/diluição). As placas foram incubadas a 25°C e observadas em microscópio invertido de 3 em 3 dias, até um máximo de 30 dias, para o registro das diluições que continham parasitos. O número final de parasitos foi determinado utilizando-se o programa ELIDA (TASWELL, 1984).

4.7 Cultura de linfócitos do linfonodo de drenagem

Foram retirados os linfonodos de 3 animais infectados por cada período de tempo estudado. Os linfonodos foram macerados assepticamente e cultivados na concentração de 1×10^6 células/mL em RPMI suplementado (200 μL /poço), em placas de 96 poços, fundo chato. As células foram reestimuladas ou não com promastigotas de *L. braziliensis* (concentração de 1×10^7 células/mL). Após 48 h de incubação a 4°C , 5% CO_2 , os sobrenadantes das culturas foram coletados para a dosagem de citocinas.

4.8 Quantificação de citocinas através de ELISA

Os níveis de IFN- γ (BD Biosciences, San Diego, CA), IL-10 (BioLegend, San Diego, CA), IL-4 (Invitrogen, Camarillo, CA), TNF- α (R&D Systems) e TGF- β (eBiosciences, San Diego, CA) foram determinados nos sobrenadantes das culturas de células do linfonodo de drenagem utilizando a técnica ELISA, como recomendado pelos fabricantes. Brevemente, placas de 96 poços, fundo chato (TPP, Switzerland), foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-citocina purificado, na concentração determinada pelo fabricante, por 12 a 18h a 4°C . As placas foram lavadas utilizando a solução de lavagem recomendada

(PBS com Tween 20 a 0,05%); foi realizado bloqueio com PBS e soro bovino fetal (SBF 10%) ou solução fornecida pelo fabricante, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS + Tween 20, foram adicionados 50 µL das amostras e das diluições do padrão da citocina (para a elaboração de curva-padrão). As amostras para TGF-β foram ativadas conforme descrito pelo fabricante do kit. Todas as amostras e diluições foram avaliadas em duplicata. A placa foi incubada por mais 2 h à temperatura ambiente e em seguida lavada, e então as amostras foram incubadas por 1 hora com anticorpo de detecção ligado à enzima peroxidase. Após esse passo, a placa passou por nova lavagem e em seguida a solução substrato foi adicionada. Depois da incubação final, por 30 minutos à temperatura ambiente, a reação foi parada com ácido fosfórico (1:20) e a densidade óptica foi avaliada no comprimento de onda de 450 nm, utilizando-se o software Softmax® Pro (Version 5; Molecular Devices).

4.9 Isolamento de RNA e PCR em Tempo Real

A expressão de RNA mensageiro que codifica para IFN-γ, TNF-α, IL-10, TGF-β, CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL10 e GAPDH foi avaliada pela técnica de RT-PCR em tempo real, realizada no Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fiocruz/Bahia. Esta expressão foi determinada em amostras de pata e linfonodo de drenagem de animais infectados aos 7, 30, 45 e 60 dias pós-infecção. A expressão das citocinas e quimiocinas foi avaliada nas patas que haviam sido infectadas por 7, 30 e 60 dias. As amostras de linfonodos foram avaliadas quanto à expressão apenas das quimiocinas citadas acima, para os períodos de 7, 30 e 45 dias pós-infecção.

O RNA total foi extraído a partir de amostra de tecido de pata (triplicatas) e linfonodos (*pool*) utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), conforme as instruções do fabricante. O RNA obtido foi eluído em 20µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), quantificado e mantido a -70 °C até o uso.

A síntese de DNA complementar (DNAc) para detecção de RNA mensageiro (RNAm) de citocinas e quimiocinas foi realizada após transcriptase reversa (sistema de transcriptase reversa Im Prom-II™). As corridas de PCR em tempo real foram realizadas em equipamento ABI 7500 utilizando o software SDS 2.0 (Applied Biosystems - EUA) e a termociclagem padrão do sistema ABI 7500: incubação inicial de dois minutos a 50 °C, desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida de 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto cada.

Os controles negativos foram constituídos por patas e linfonodos de animais não infectados. As amostras de pata (infectadas e controle) foram analisadas em triplicata para cada corrida, enquanto as amostras de tecido de linfonodo (infectados e controle) foram analisadas em *pool*, ou seja, sem replicatas. O método comparativo foi utilizado para analisar a expressão dos genes-alvo, e os valores de “cycle threshold” (Ct) de citocinas e quimiocinas foram normalizados à expressão de GADPH como determinado por $\Delta Ct = Ct_{\text{(gene alvo)}} - Ct_{\text{(gene GADPH)}}$. A quantificação relativa foi determinada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{(alvo)}} - \Delta Ct_{\text{(controle)}}$, de acordo com o descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os seguintes iniciadores foram utilizados: GAPDH (Forward: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'; Reverso: 5'-CCTGC-TTCACCACCTTCTTGA-3'); CCL2 (Forward: 5'-CAGGTCCCTGTCATGCTTCTG-3'; Reverso: 5'-GAGCCAACACGTGGATGCT-3'); CCL3 (Forward: 5'-TCTTCTCA-GCGCCATATGGA-3'; Reverse: 5'-CGTGGAAATCTTCCGGCTGTA-3'); CXCL1 (Forward: 5'-CCGAAGTCATAGCCACACTCAA-3'; Reverse: 5'-AATTTCTGA-ACCAAGGGAGCTT-3'); CXCL10 (Forward: 5'-GGACGGTCCGCTGCAA-3'; Reverse: 5'-CCCTATGG-CCCTCATTCTCA-3'); IFN- γ (Forward: 5'-CTACACACT-GCATCTGGCTTG-3'; Reverse: 5'-TGACTGCCTGGCAGTA-3'); TNF- α (Forward: 5'-GGTCCCCAAAGGGATGAGAA-3'; Reverse: 5'-TGAGGGTCT GGGCCATAGAA-3'); IL-10 (Forward: 5'-CAGCCGGGAAGACAATAACTG-3'; Reverse: 5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3') e TGF- β (Forward: 5'-ATCGACATGGAGCTGGTAAA-3'; Reverse: 5'-GAGCCTTAGTTGGACAGGA TCTG-3'). Estes iniciadores foram desenhados utilizando o programa *Primers Express* (Applied Biosystems).

4.10 Análise estatística

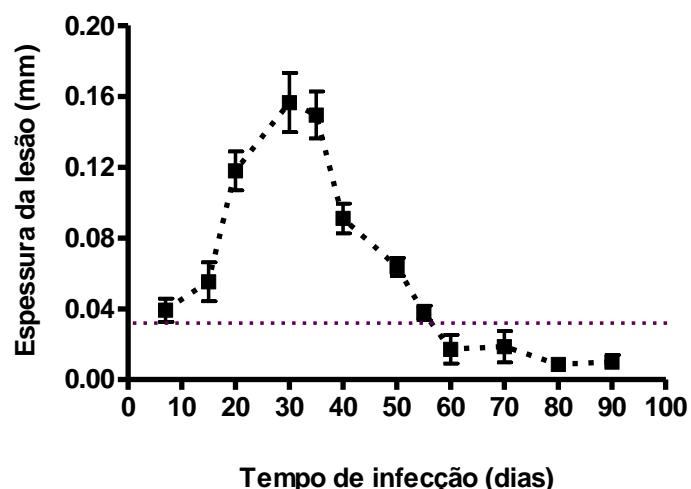
Os dados obtidos são apresentados como média aritmética \pm erro padrão (EP). O número de parasitos presentes nas lesões e linfonodos foi determinado pela análise do qui-quadrado mínimo, aplicada à distribuição de Poisson utilizando o programa ELIDA (TASWELL, 1984). Os resultados do estudo tiveram sua significância calculada pelo teste-*t* de Student ou análise de variância (ANOVA), seguida por pós-teste Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism version 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e em todos os testes utilizados, a significância mínima foi aceita quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Curso das lesões em camundongos BALB/c após infecção com *L. braziliensis*

Lesões não ulceradas foram detectadas a partir do 7º dia após a infecção e aumentaram progressivamente até atingir seu tamanho máximo aos 30 dias pós-infecção ($0,16 \text{ mm} \pm 0,017 \text{ mm}$). Após esse período as lesões começaram a regredir e, a partir dos 60 dias de infecção, as patas voltaram à sua espessura normal, denotando ausência de lesão (GRÁFICO 1).

Gráfico 1 - Evolução da lesão no coxim plantar de camundongos BALB/c após infecção com *L. braziliensis*.



Fonte: Elaborado pelos autores. Camundongos BALB/c foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. braziliensis* na pata posterior esquerda e acompanhados até o 90º dia de infecção. A espessura da lesão foi avaliada com medições a cada 10 dias. Os dados representam as médias aritméticas \pm EP de 6 animais por cada tempo. A linha tracejada significa a espessura de patas de camundongos não infectados.

Figura 4. Aspecto de patas de camundongos BALB/c após 30 dias de infecção com *Leishmania braziliensis*.



Fonte: Elaborado pelos autores. As duas patas pertencem ao mesmo animal e foram fotografadas no 30º dia de infecção. Pata posterior esquerda infectada (A) e pata contralateral (direita) não infectada (B).

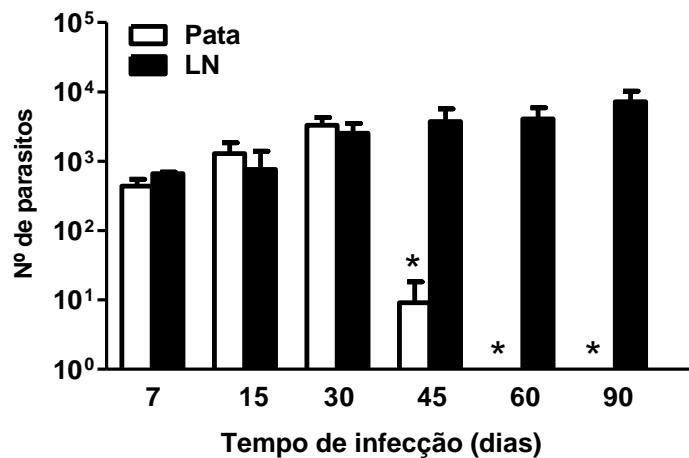
5.2 Carga parasitária no sítio de inoculação e no linfonodo em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*

A quantidade de parasitos foi avaliada, de forma a relacionar o comportamento da infecção na pele e no linfonodo de drenagem à resposta imunológica nestes sítios. Os resultados mostraram que a carga parasitária se comporta de maneira diferente nos dois compartimentos avaliados.

Na pata, já aos 7 dias de infecção, foram detectados em média $4,38 \times 10^2$ parasitos/lesão, que se expandiram até um pico médio de $3,29 \times 10^3$ parasitos/lesão aos 30 dias. Aos 45 dias de infecção, ocorreu drástica queda da carga parasitária (9 parasitos/lesão) e, a partir do 60º dia pós-infecção, não foram mais detectados parasitos nas patas.

No linfonodo de drenagem da lesão, a cinética da carga parasitária ocorreu diferentemente da observada na lesão da pata. Enquanto, na pata, o número de parasitos declinava a partir de 30 dias de infecção, no linfonodo a carga parasitária permaneceu crescente até o último período avaliado. Aos 7 dias de infecção apresentava média de $6,63 \times 10^2$ parasitos/linfonodo, e $7,24 \times 10^3$ parasitos/linfonodo aos 90 dias de infecção, como observa-se a seguir.

Gráfico 2 - Número de parasitos na pata e no linfonodo de drenagem em camundongos BALB/c, após infecção com *L. braziliensis*.



Fonte: Elaborado pelos autores. Camundongos BALB/c foram infectados e acompanhados como descrito no gráfico 1. Os animais foram eutanasiados em diferentes períodos de infecção e a carga parasitária determinada por diluição limitante. Os dados representam as médias aritméticas \pm EP de 6 animais por cada tempo. Diferenças significantes foram determinadas pelo teste *t* de Student (* $p < 0,05$).

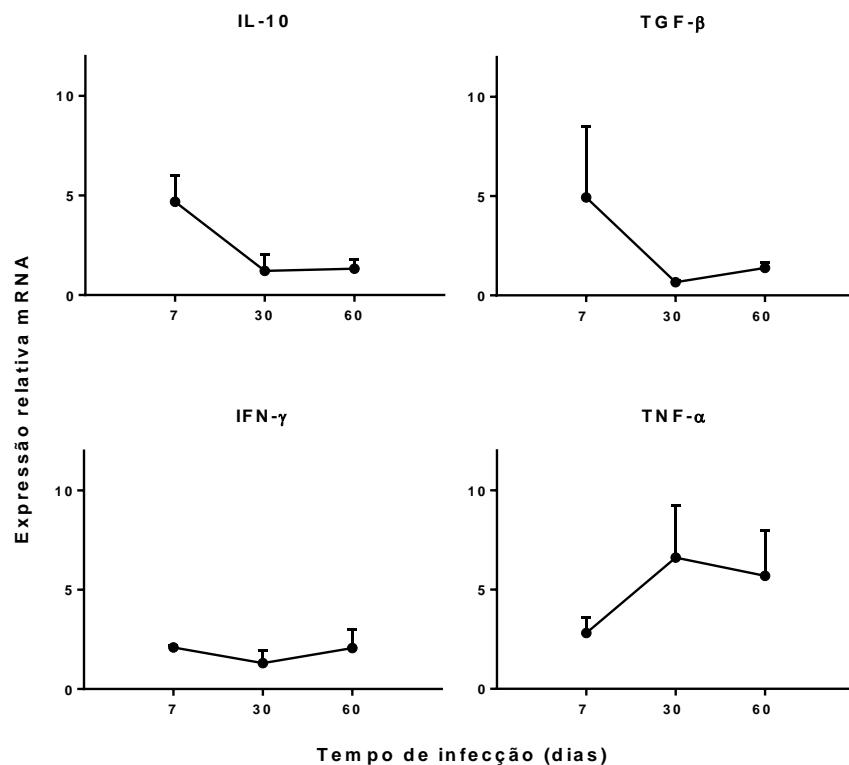
5.3 Expressão de citocinas nas patas de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*

Para estudar a expressão das citocinas, patas de camundongos infectados por *L. braziliensis* foram processadas para a extração e quantificação de RNAm através de PCR em tempo real.

A expressão de IFN- γ permaneceu menor que a das demais citocinas durante os três períodos de infecção analisados, com tendência de queda aos 30 dias p.i. Por outro lado, a expressão de TNF- α aumentou $2,8 \pm 0,77$ vezes em relação a expressão basal aos 7 dias de infecção, atingiu seu máximo aos 30 dias ($6,6 \pm 2,6$ vezes) e se manteve semelhante aos 60 dias p.i ($5,7 \pm 2,3$).

Em relação às citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β , ambas seguiram padrão de expressão semelhante. Foram expressas em maior quantidade aos 7 dias p.i ($4,7 \pm 1,3$ e $4,9 \pm 3,6$ vezes a expressão basal, respectivamente), e reduziram-se aos 30 e 60 dias após a infecção. No período final de infecção, IL-10 e TGF- β atingiram, respectivamente, as seguintes taxas de expressão: $1,3 \pm 0,5$ e $1,4 \pm 0,3$, como mostra o gráfico 3.

Gráfico 3 - Expressão relativa de RNAm de citocinas em patas de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*.



Fonte: Elaborado pelos autores. Camundongos BALB/c foram infectados como descrito no gráfico 1. Após 7, 30 e 60 dias o RNA total foi obtido de patas de camundongos infectados (n=3), e o nível basal de expressão de citocinas foi determinado utilizando patas de camundongos não infectados (n=3). O RNA total foi utilizado em RT-PCR em tempo real para a amplificação de TNF- α , IFN- γ , IL-10, TGF- β e GAPDH.

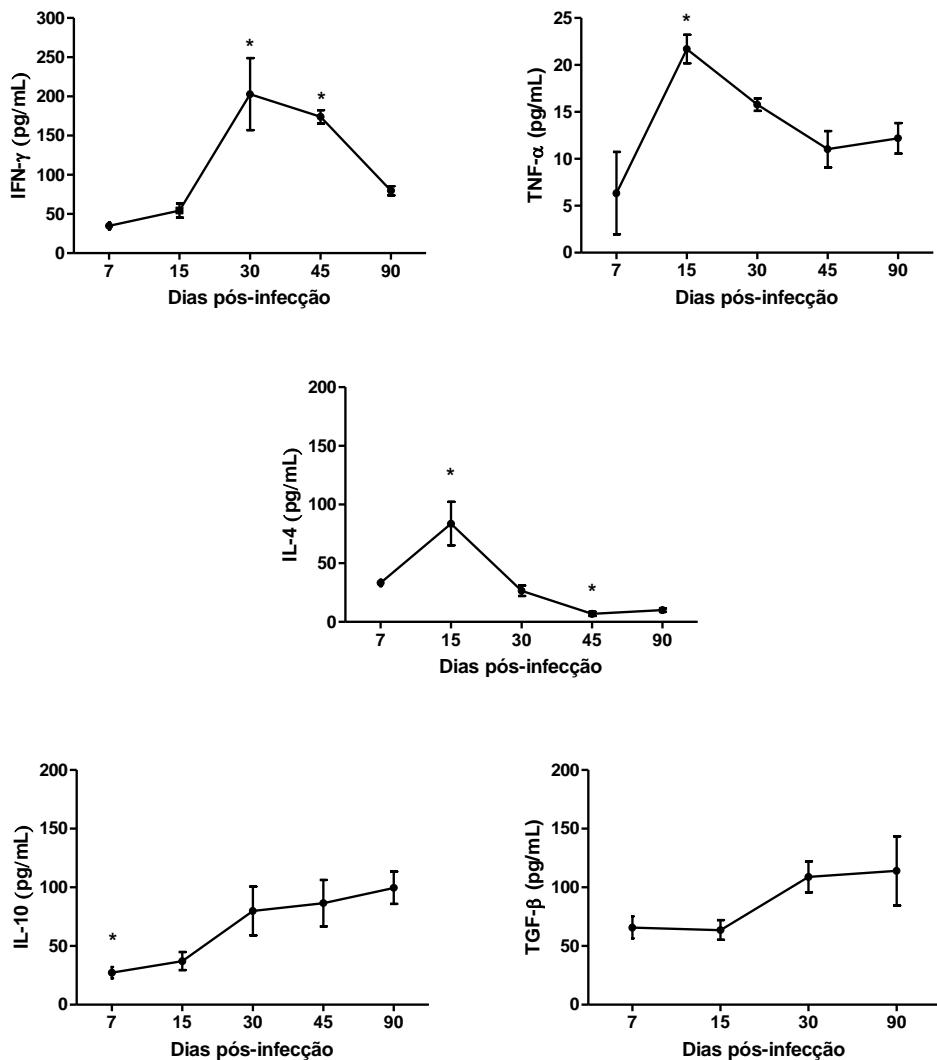
5.4 Níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em cultura de células de linfonodo de drenagem de lesão de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*

Ao avaliar o perfil das citocinas inflamatórias observou-se que a concentração de IFN- γ começou a aumentar a partir do 15º dia ($54,3 \pm 9,2$; pg/mL) e alcançou sua produção máxima no 30º dia de infecção ($203,0 \pm 23,0$; pg/mL), diminuindo no 45º dia de infecção ($174,0 \pm 8,69$; pg/mL). No último período avaliado, os níveis de IFN- γ estavam aproximadamente 3 vezes menores em relação ao máximo, encontrado no 30º dia (de 203,0 pg/mL para 80,0 pg/mL, respectivamente; $p < 0,05$). A outra citocina inflamatória analisada, TNF- α , não foi produzida em grande quantidade durante os períodos avaliados, mas apresentou um pico de concentração aos 15 dias p.i ($21,7 \pm 1,5$; pg/mL), que foi显著mente maior que os níveis observados no 7º dia de infecção ($6,4 \pm 3,1$; $p < 0,05$). Em seguida, a concentração de TNF- α diminuiu aos 45 dias de infecção ($11,0 \pm 1,9$; pg/mL), permanecendo semelhante até o último período avaliado.

IL-4 foi a citocina predominante aos 15 dias de infecção ($74,0 \pm 23,0$; pg/mL), quando apresentou seu pico de produção em relação aos demais períodos analisados ($p < 0,05$). Aos 30 dias de infecção a concentração de IL-4 decaiu expressivamente, e esta citocina foi pouco detectada até o último período avaliado (GRÁFICO 4).

A concentração de IL-10 aumentou progressivamente durante os períodos avaliados, atingindo sua produção máxima aos 90 dias de infecção ($99,6 \pm 13,71$; pg/mL), e isso foi significante em relação aos níveis encontrados aos 7 dias p.i. ($p < 0,05$) (GRÁFICO 4). TGF- β apresentou concentrações mais elevadas que as demais citocinas no início da infecção (7 dias p.i.) e teve seus níveis aumentados no 30º e 90º dias p.i, sendo o último período correspondente ao pico de concentração ($114,1 \pm 29,5$; pg/mL). Apesar disso, não houve diferença significativa entre as concentrações observadas de TGF- β durante os períodos de tempo analisados, como se vê no gráfico a seguir.

Gráfico 4 - Concentração de citocinas em cultura de células mononucleadas do linfonodo de drenagem de lesão de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*.



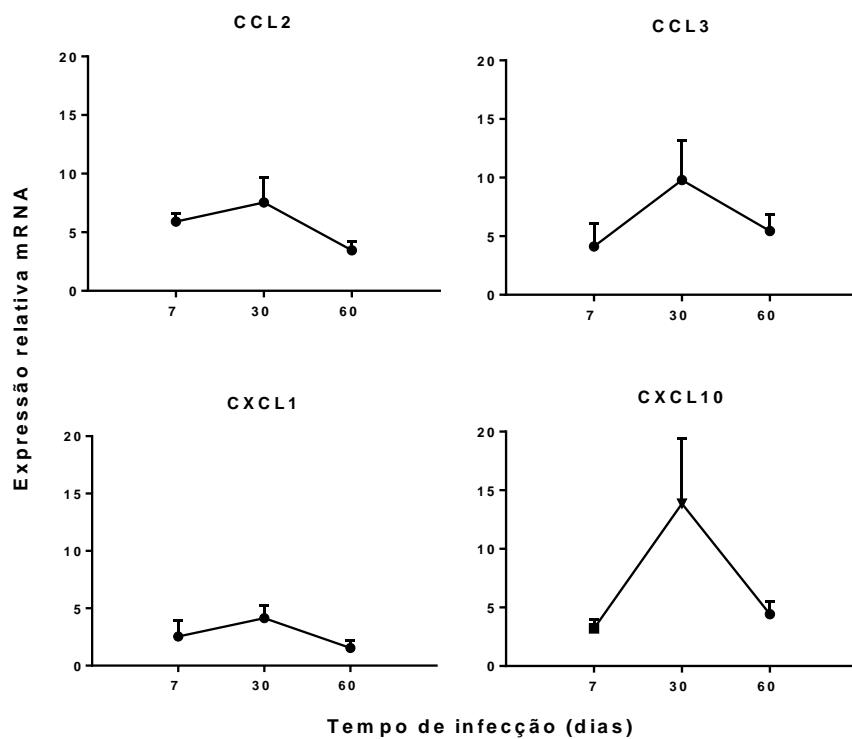
Fonte: Elaborado pelos autores. Camundongos BALB/c foram infectados e acompanhados como descrito no gráfico 1. Após a eutanásia, células mononucleadas do linfonodo de drenagem da lesão foram cultivadas na presença de promastigotas vivas de *L. braziliensis* por 48 horas. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e analisados para determinar a produção de citocinas por ELISA. Os dados representam as médias aritméticas \pm EP de 3 animais por cada tempo. Diferenças significantes foram determinadas pelo teste ANOVA e pós-teste Tukey. Para a produção de INF-γ os períodos de 30 e 45 dias p.i. foram significativamente diferentes dos demais, porém não entre si. Para TNF-α a única diferença significativa foi detectada entre os valores de 7 e 15 dias p.i. Quanto a IL-4, o período de 15 dias foi significativamente diferente dos demais, e os períodos de 7 e 45 dias p.i. também foram diferentes entre si. A diferença na produção de IL-10 comparando-se 7 e 90 dias p.i. foi considerada significante. Por último, não houve diferença significante para a produção de TGF-β durante os períodos avaliados ($p < 0,05$ para todos).

5.5 Expressão de quimiocinas nas patas e linfonodos de drenagem de infecção de camundongos BALB/c infectados por *L.braziliensis*

Para estudar a expressão das quimiocinas, patas e linfonodos de drenagem dos camundongos infectados por *L. braziliensis* foram processados para a extração e quantificação de RNAm através de PCR em tempo real.

Observou-se a expressão de RNAm para todas as quimiocinas avaliadas nas patas, a saber: CCL2, CCL3, CXCL1 e CXCL10. As quatro quimiocinas analisadas apresentaram comportamento semelhante: menor expressão aos 7 dias de infecção, aumento aos 30 dias e diminuição no 60º dia de infecção (GRÁFICO 5), correspondendo ao comportamento da espessura da lesão na pata.

Gráfico 5 - Expressão relativa de RNAm de quimiocinas em patas de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*.

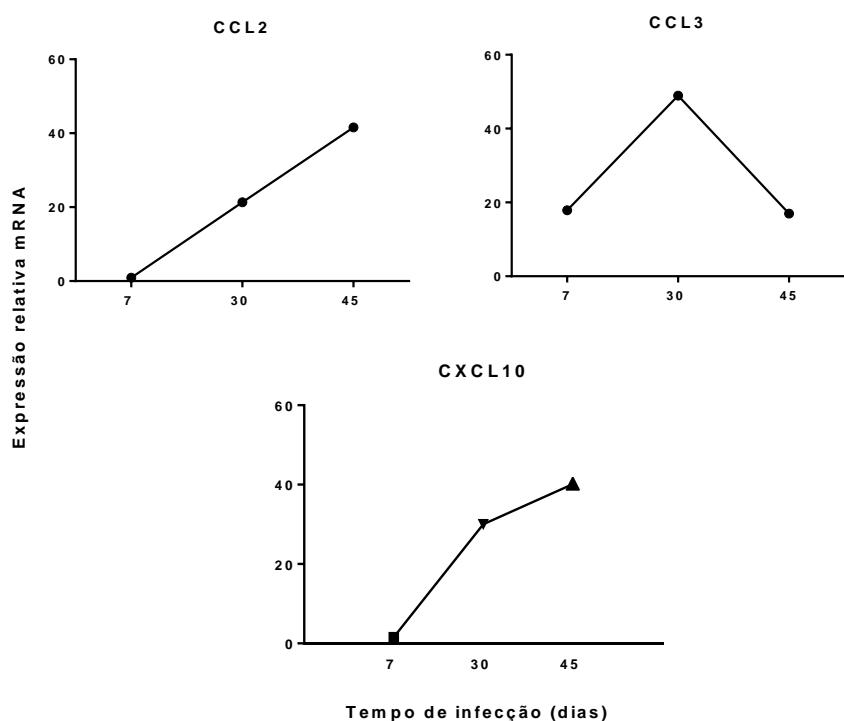


Fonte: Elaborado pelos autores. Camundongos BALB/c foram infectados como descrito no gráfico 1. Após 7, 30 e 60 dias de infecção o RNA total foi obtido de patas de camundongos infectados (n=3), e o nível basal de expressão de quimiocinas foi determinado utilizando patas de camundongos não infectados (n=3). O RNA total foi utilizado em RT-PCR em tempo real para a amplificação de CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL10 e GAPDH.

Nos linfonodos de drenagem, CCL2 e CXCL10 se comportaram de maneira semelhante, sendo expressos em menor quantidade (0.93 e 1.6 vezes o nível basal de

expressão, respectivamente) aos 7 dias de infecção, aumentando sua expressão aos 30 dias e atingindo o máximo aos 45 dias p.i. (41,6 e 40,1 vezes, respectivamente). A expressão de CCL3 obedeceu a um padrão diferente: aos 7 dias p.i. já representava 17,9 vezes a expressão basal, atingiu sua maior detecção aos 30 dias pós-infecção (48,9 vezes), e depois reduziu-se aos níveis iniciais; cerca de 17 vezes a expressão basal, como pode-se observar no gráfico seguinte.

Gráfico 6 - Expressão relativa de RNAm de quimiocinas nos linfonodos de drenagem de lesão de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*.



Fonte: Elaborado pelos autores. Camundongos BALB/c foram infectados como descrito no gráfico 1. Após 7, 30 e 45 dias de infecção o RNA total foi obtido de linfonodos de drenagem de camundongos infectados (n=3), e o nível basal de expressão de quimiocinas foi determinado utilizando linfonodos de camundongos não infectados (n=3). O RNA total foi utilizado em RT-PCR em tempo real para a amplificação de CCL2, CCL3, CXCL10 e GAPDH. Os dados representam o *pool* de linfonodos de três camundongos.

7. DISCUSSÃO

Leishmania braziliensis é o agente causativo mais comum da leishmaniose cutânea na América do Sul. Entre os camundongos, o mais suscetível à infecção por *L. braziliensis* é o BALB/c, que desenvolve lesões pequenas e não ulceradas quando a infecção é produzida na pata, ou lesões ulceradas quando a infecção é produzida na derme da orelha, mesmo utilizando um pequeno inóculo. Em ambos os modelos de infecção em BALB/c, os animais apresentam cura espontânea, e a doença é autolimitada (CHILDS *et al.*, 1984; DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; DE MOURA *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2011). Apesar de se resolver espontaneamente nos modelos animais, a infecção por *L. braziliensis* distingue-se por sua latência e cronicidade, podendo persistir em camundongos e nos pacientes após a cura clínica espontânea ou após o tratamento (RAMIREZ & GUEVARA, 1997; MENDONÇA *et al.*, 2004; DE MOURA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2007).

Como essa característica ainda tem sido pouco estudada na infecção por *L. braziliensis*, o objetivo deste trabalho foi avaliar a persistência da infecção por este parasito nos dois principais sítios de infecção no hospedeiro, pata e linfonodo de drenagem. Os seguintes parâmetros de infecção foram avaliados: espessura da lesão na pata, número de parasitos na pata e linfonodo de drenagem, perfil de citocinas e expressão de quimiocinas no neste linfonodo e, finalmente, expressão de citocinas e quimiocinas no sítio de infecção, em diferentes períodos. Para isso, camundongos BALB/c foram infectados com uma cepa de *L. braziliensis* e acompanhados até 90 dias após a infecção.

Os resultados mostraram que os parasitos desapareceram gradativamente da pata, o sítio de inoculação inicial. Entretanto, a carga parasitária persistiu no linfonodo de drenagem e, mesmo após 90 dias de infecção, os parasitos ainda puderam ser detectados, indicando que são capazes de continuar se multiplicando neste sítio, apesar da resolução da lesão. O linfonodo é conhecido como um importante sítio de proliferação do parasito durante a infecção por *Leishmania*, e um dos primeiros órgãos a ser afetado durante a disseminação sistêmica do parasito (MOLL *et al.*, 1995).

Tem sido relatado que quimiocinas desempenham importante papel no recrutamento celular e na geração de imunidade inata e adquirida contra leishmaniose tegumentar (VESTER *et al.*, 1999; RITTER & MOLL, 2000; VASQUEZ *et al.*, 2006, TEIXEIRA *et al.*, 2006). A infecção com *Leishmania* induz a expressão de diversos genes de quimiocina no hospedeiro (RITTER & KORNER, 2002), o que poderia ser benéfico para o

parasito, através do recrutamento de células hospedeiras as quais o parasito pode infectar, sobreviver e proliferar (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Isso ocorre em infecções por *L. major*, espécie que modifica ativamente o perfil de quimiocinas do sítio de infecção e recruta células que favorecerão o desenvolvimento de infecção persistente (KATZMAN & FOWELL, 2008). Por outro lado, outras espécies de *Leishmania*, tais como *L. donovani* e *L. amazonensis*, devem suas virulências à habilidade de reprimir a indução de genes de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tornando sua entrada menos detectável ao parasito (MATTE & OLIVIER, 2002; JI; SUN; SOONG, 2003).

Em infecção experimental de patas de camundongos BALB/c com duas cepas de *L. braziliensis* (H3227 e BA788), observou-se expressão precoce de quimiocinas dos tipos C, CC e CXC nas lesões desenvolvidas (TEIXEIRA *et al.*, 2005). No presente trabalho, a expressão relativa inicial de CCL2 na pata foi em torno de 6 vezes a expressão basal, e diminuiu no último período avaliado. Já no linfonodo de drenagem, a expressão da mesma quimiocina aos 7 dias de infecção foi aproximada à basal e aumentou vertiginosamente ao longo do tempo, atingindo valor máximo (aumento maior que 41 vezes) aos 45 dias p.i, último período investigado para este sítio. Enquanto isso, CCL3 foi expressa nos dois sítios e durante os três períodos avaliados, apresentando tendência de maior expressão aos 30 dias p.i em pata e linfonodo.

Sabe-se que CCL2 e CCL3 são potentes moléculas quimioatrativas para monócitos (revisado por CHRISTOPHERSON II & HROMAS, 2001). Sua expressão em BALB/c infectados por *L. braziliensis*, tanto no sítio de inoculação como em linfonodos de drenagem da infecção, pode indicar o recrutamento de células hospedeiras; o que promoveria a multiplicação parasitária, desenvolvimento inicial da lesão e permanência dos parasitos no linfonodo.

Entretanto, há fortes indícios de que CCL2 desempenha papel importante na imunidade contra leishmaniose cutânea, mediando o recrutamento de monócitos, macrófagos, células NK e células T (ALLAVENA *et al.*, 1994; RITTER & MOLL, 2000). Observam-se altas concentrações de CCL2 em pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL) e em lesões que se curam espontaneamente. Por outro lado, pacientes com leishmaniose cutânea difusa (LCD) apresentam baixos níveis desta quimiocina (RITTER *et al.*, 1996).

No presente estudo, o aumento na expressão de CCL2 e CCL3 nas patas de BALB/c aos 30 dias de infecção pode estar relacionado à cura da lesão e controle dos parasitos que ocorreu posteriormente neste sítio, uma vez que ambas as quimiocinas participam na indução de atividade leishmanicida em macrófagos murinos

(BHATTACHARYYA *et al.*, 2002). No linfonodo, CCL3 apresentou sua maior expressão aos 30 dias de infecção, sendo superada por CCL2 após esse período. Este comportamento sugere que CCL3 estaria mais relacionada com o recrutamento inicial dos monócitos, enquanto CCL2 seria importante para a manutenção do recrutamento de células mononucleares para o linfonodo.

Aos 30 dias de infecção, a quimiocina CXCL1 atingiu nível de expressão na ordem de 4 vezes a expressão basal na pata. Esse período corresponde ao máximo de exacerbação da infecção neste sítio. CXCL1 exerce quimiotaxia sobre neutrófilos (CHRISTOPHERSON II & HROMAS, 2001), e é rapidamente produzida na pele após infecção experimental por *L. major* (MULLER *et al.*, 2001). Teixeira e colaboradores (2005) observaram maior expressão de CXCL1, CCL2 e CCL3 em infecção de camundongos BALB/c com a cepa H3227 (a mesma utilizada neste trabalho) do que com BA788, o que provavelmente contribuiu para o maior recrutamento de neutrófilos e macrófagos induzida por aquela cepa no início da infecção.

No presente trabalho, a expressão de CXCL10 nas patas dos camundongos apresentou aumento aos 30 dias de infecção, mesmo período em que a lesão atingiu sua espessura máxima. Nos linfonodos, a expressão desta quimiocina cresceu ao longo dos períodos avaliados, com valor máximo aos 45 dias após infecção. Sabe-se que CXCL10 é induzida por IFN- γ , e exerce quimiotaxia sobre células T CD4 $^{+}$ ativadas e de memória, células CD8 $^{+}$, células NK, macrófagos e alguns subtipos de células dendríticas (CHEN *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2005). Como a resposta imunológica mediada por células T CD4 $^{+}$ Th1 é crítica para o controle de leishmaniose cutânea, esta quimiocina desempenha papel decisivo para o controle do parasito.

O tratamento de camundongos susceptíveis com CXCL10 recombinante reduz significativamente a carga parasitária na infecção por *L. amazonensis* (VASQUEZ & SOONG, 2006). Em modelos in vitro e in vivo de infecção por *L. donovani*, o tratamento com CXCL10 polariza a resposta imunológica para a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , e diminuição da produção de IL-4 e IL-10, que medeiam o controle do parasito (GUPTA *et al.*, 2009). Além disso, CXCL10 é capaz de aumentar a atividade citotóxica de células NK em camundongos infectados por *L. major*, o que pode contribuir para a resistência ao parasito (VESTER *et al.*, 1999).

Ocorreu aumento da expressão de CCL2 e CXCL10 no linfonodo de drenagem de lesão ao longo dos períodos avaliados neste trabalho, seguindo a expansão da carga parasitária do linfonodo. As quimiocinas analisadas (CCL2, CCL3 e CXCL10), conhecidas por serem

capazes de desencadear respostas pró-inflamatórias danosas ao parasito, foram expressas em maior quantidade nos linfonodos de drenagem do que nas patas infectadas. Apesar disso, os linfonodos permaneceram parasitados, enquanto não foram mais detectados parasitos nas patas a partir de 45 dias pós-infecção. Esses dados mostram que o controle do crescimento parasitário ou sua eliminação ocorrem de forma diferente em sítios periféricos e órgãos linfoideos (COSTA *et al.*, 2011), e que apenas a expressão de quimiocinas pró-inflamatórias não determina a eliminação do parasito.

Em leishmaniose visceral causada por *L. donovani*, observa-se que ocorre expressão aumentada de CCL2, CCL3 e CXCL10 no fígado, mas apenas a expressão de CXCL10 se mantém alta durante a fase tardia da infecção nesse órgão, sendo essencial para a resposta inflamatória (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 1999). Entretanto, nas células do baço, em infecção de camundongos por *L. infantum*, há uma expressão sustentada de CCL2 e influxo de macrófagos, ao invés de células T (ROUSSEAU *et al.*, 2001). Essa diferença pode explicar porque o fígado controla a infecção, enquanto os parasitos persistem no baço, em leishmaniose visceral (KAYE *et al.*, 2004). Em nosso modelo experimental, CCL2 e CXCL10 continuam a ser expressas no linfonodo até 45 dias pós infecção, e provavelmente a combinação das duas quimiocinas media a atração de células hospedeiras e células T para este órgão linfoide secundário, levando à persistência da infecção.

Em humanos e, particularmente, em camundongos, a resistência à infecção por *Leishmania* está associada com uma resposta imunológica do tipo Th1, com produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α e o recrutamento de células efetoras como macrófagos, células NK e linfócitos CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ (HEINZEL *et al.*, 1991), enquanto a susceptibilidade é causada por uma resposta regulatória com produção de IL-10 e TGF- β , além de IL-4, citocina de perfil Th2 (BARRAL *et al.*, 1993; KANE & MOSSER, 2001; MURRAY *et al.*, 2002; TRINCHIERI, 2007).

A análise da produção de citocinas nos linfonodos de drenagem mostrou que os níveis de IFN- γ aumentaram significativamente 30 dias após a infecção. Estes dados estão de acordo com os achados da literatura de que a fraca infectividade de *L. braziliensis* em camundongos BALB/c está relacionada com a capacidade destes animais desenvolverem forte resposta Th1 (DEKREY *et al.*, 1998). Ao contrário, na infecção de BALB/c por *L. major*, uma resposta imunológica predominante do tipo Th2 é responsável pela susceptibilidade à doença (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Estudos anteriores relataram que camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*, quando tratados com anti-IFN- γ , apresentaram grandes lesões que não regrediram e altos níveis de IL-4, indicando, portanto,

que a resolução das lesões e a cura da doença nestes animais é dependente de IFN- γ (DEKREY *et al.*, 1998).

Diferentemente da produção de IFN- γ observada através de ELISA, que apresentou pico aos 30 dias de infecção, a expressão desta citocina na pata foi pequena, e semelhante durante os períodos de infecção avaliados. Entretanto, a expressão de CXCL10 em pata vinha aumentando desde os 7 dias de infecção e atingiu seu pico aos 30 dias p.i., o que é um indicativo da presença de IFN- γ neste sítio, já que a quimiocina é induzida pela citocina. Provavelmente ocorreu um rápido consumo de IFN- γ no sítio de infecção aos 30 dias p.i., visto que esse período corresponde a maior espessura de lesão observada, e provavelmente à maior inflamação na pata.

A produção de TNF- α a partir de células recuperadas de linfonodos de drenagem da lesão apresentou pico aos 15 dias pós-infecção, fator que pode ter sido determinante tanto para a inflamação observada aos 30 dias p.i., quanto para o posterior controle da infecção. Observou-se tendência de maior expressão de TNF- α a partir do 30º dia de infecção, o que aponta esta citocina como implicada na manutenção de uma resposta pró-inflamatória no sítio de infecção. Liew e colaboradores (1990) atestam a importância de TNF- α , produzida por macrófagos e linfócitos, no controle de infecções por *Leishmania* spp. Esta citocina é importante para o controle da infecção principalmente durante a fase aguda, como se observou em estudo com camundongos BALB/c *knockout* para TNF- α e infectados por *L. braziliensis*, que apresentaram número aumentado de parasitos na pele, linfonodos e baço (ROCHA *et al.*, 2007). Além disso, sabe-se que pacientes com LMC apresentam maior nível sérico de que aqueles com LCL, e que esses níveis diminuem após o tratamento da doença. A indução exagerada de TNF- α pode estar relacionada à maior inflamação observada em LMC, que tem evolução crônica e destrutiva (DA-CRUZ *et al.*, 1996).

Os dados do presente trabalho corroboram também com outros estudos que mostram que apesar da completa resolução das lesões induzidas por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c e C57BL/6, ambos os camundongos falham em eliminar completamente os parasitos do linfonodo de drenagem da lesão (ROCHA *et al.*, 2007; DE MOURA *et al.*, 2005). 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).

A produção de IL-4 atingiu um pico aos 15 dias p.i e depois regrediu até ser pouco detectada, enquanto TGF- β foi detectada durante todos os períodos analisados. A maior produção de IL-4 e TGF- β na fase inicial da doença possivelmente inibiu o desenvolvimento de uma resposta Th1, o que levou à progressão da doença até o 30º dia de infecção, quando então os níveis de IFN- γ aumentaram e as lesões começaram a regredir.

Alguns trabalhos mostram que existe uma correlação entre a evolução da doença e a natureza da resposta das células T, e isso foi comprovado através de um estudo realizado com camundongos BALB/c infectados por *L. major*, no qual o tratamento com anticorpo anti-IL-4, administrado no momento da infecção, permitiu o desenvolvimento de uma resposta Th1 e a cura, sugerindo que IL-4 é necessária para a diferenciação de células Th em Th2 (SACKS & ANDERSON, 2001). Recentemente e utilizando o modelo de infecção da orelha de camundongos BALB/c, Costa e colaboradores (2011) verificaram que uma cepa de *L. braziliensis* capaz de induzir lesões mais graves em humanos devia sua ação à produção aumentada de IL-4.

Em humanos, estudos relatam que lesões de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL) mostram uma predominância de citocinas Th1 com produção de IFN- γ e baixos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10, enquanto lesões de indivíduos com leishmaniose cutânea difusa (LCD) estão associadas a uma resposta mediada por Th2, com altos níveis de IL-4, IL-5 e da citocina imunorreguladora IL-10. Em pacientes com LCL, a produção de IFN- γ foi capaz de estimular a morte de parasitos por macrófagos e promover a cura, enquanto que a presença de IL-4 em lesões de indivíduos com LCD, associada com a ausência de IFN- γ , favoreceram a progressão da doença (RITTER & MOLL, 2000).

TGF- β é uma citocina capaz de inibir a resposta imunológica do tipo Th1, que tem sido correlacionada com susceptibilidade à infecção tanto por *L. braziliensis* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992) como por *L. major* (STENGER *et al.*, 1994). Esta citocina é produzida por várias células, incluindo linfócitos T e B, células NK e macrófagos ativados. A atividade imunorregulatória de TGF- β pode atuar suprimindo a expressão de NO e IFN- γ em macrófagos, inibindo a habilidade destas células de controlar o crescimento intracelular dos parasitos (BARRAL *et al.*, 1993).

IL-10 também pode inibir a resposta do tipo Th1, uma vez que é capaz de causar a supressão de muitas funções efetoras dos macrófagos, das células T e células NK (FIORENTINO *et al.*, 1991). Muitos tipos celulares podem produzir IL-10, incluindo macrófagos, células dendríticas, células T, Treg, B e NK. Esta citocina pode suprimir a imunidade de várias maneiras: inibindo a produção dos intermediários reativos de nitrogênio

produzidos por macrófagos ativados por IFN- γ (GAZZINELLI *et al.*, 1992; VIETH *et al.*, 1994); reduzindo a produção de IL-12 e TNF- α pelos macrófagos ativados (FIORENTINO *et al.*, 1991; DE WAAL *et al.*, 1991), e diminuindo a expressão de MHC classe II por células apresentadoras de抗ígenos, o que dificultaria a detecção e eliminação do parasito (BELKAID *et al.*, 2001, SALHI *et al.*, 2008).

Neste modelo experimental, observou-se que a expressão de IL-10 e TGF- β detectada nas patas aos 7 dias pós-infecção, foi em torno de 4 vezes os valores basais e que regrediu aos 30 dias p.i, quando as citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias atingiram seu pico. Os níveis de IL-10 e TGF- β detectados em cultura de células do linfonodo dos camundongos infectados com *L. braziliensis* aumentaram significativamente até 30 dias de infecção, e continuaram aumentados ainda aos 90 dias de infecção, correlacionando-se à persistência dos parasitos neste órgão linfoide secundário.

Acredita-se que citocinas e quimiocinas atuem em sinergia, e muitas citocinas induzem a produção de quimiocinas que amplificam sua atividade. Estudos in vitro com macrófagos humanos infectados com *L. infantum* mostram que CCL2 e CCL3 induzem liberação de NO a níveis semelhantes aos induzidos por IFN- γ , e aumentam a atividade anti-*Leishmania* das células (BRANDONISIO *et al.*, 2002). Corroborando a noção de que estas quimiocinas atuam em conjunto com citocinas Th1, observou-se em infecção por *Leishmania* que CCL2 atua juntamente com IFN- γ para a ativação de macrófagos, o que potencialmente leva à morte do parasito, promovendo a cura. Entretanto, este efeito é anulado na presença de IL-4 (RITTER & MOLL, 2000).

Neste trabalho, a expressão de CCL2 e CXCL10 no linfonodo vinha crescendo quase linearmente a partir dos 7 dias p.i., teve sua maior detecção (cerca de 40 vezes a expressão basal) aos 45 dias pós-infecção, período em que IL-10 e TGF- β estavam sendo produzidos de forma estável em quantidade próxima a 100 pg/mL no mesmo sítio. A interação entre os efeitos de CCL2 e CXCL10 e dessas citocinas anti-inflamatórias pode ter resultado na desativação de macrófagos presentes no linfonodo de drenagem, o que levaria à manutenção dos parasitos observada nesse sítio de infecção até o último período analisado (90 dias pós-infecção).

Outros estudos já documentaram que *Leishmania* pode persistir indefinidamente dentro de macrófagos e/ou células dendríticas nos linfonodos de drenagem do sítio de inoculação do parasito, facilitando a modulação e manutenção da memória imunológica (MOLL *et al.*, 1995). *Leishmania* também é capaz de persistir dentro de fibroblastos nos linfonodos, uma vez que estas células apresentam baixa capacidade de produzir NO e,

portanto controlar o crescimento do parasito, mesmo na presença de IFN- γ (BOGDAN *et al.*, 2000). As células dendríticas infectadas podem apresentar os antígenos de *Leishmania* para as células T de memória por longos períodos, mantendo, desta forma, a polarização de Th1 através da produção de IL-12 (VON STEBUT & UDEY, 2004).

Além disso, já foi demonstrado que a produção de IL-10 é crítica para a persistência do parasito em camundongos resistentes (BELKAID *et al.*, 2001). Neste último trabalho, os autores mostraram que a cura e a esterilização do parasito podem acontecer em camundongos deficientes em IL-10, mas esses animais falharam em manter uma imunidade duradoura contra *Leishmania* (BELKAID *et al.*, 2001). Estes dados sugerem que IL-10 tem um papel importante na manutenção da resposta da memória imunológica para esse parasito.

No presente trabalho, a produção de IL-10 provavelmente está envolvida na manutenção da carga parasitária nos linfonodos de drenagem da lesão, mas o papel diferenciado de macrófagos e células dendríticas nos dois microambientes (sítio de lesão e linfonodo) também pode contribuir para a persistência. A população de macrófagos atua majoritariamente como células efetoras da destruição do parasito em sítios periféricos; mas nos órgãos linfoideos podem, em grande parte, mudar seu perfil para células apresentadoras de antígeno, o que pode resultar em sobrevivência aumentada de *Leishmania* nos linfonodos (LÓPEZ-BRAVO & ARDAVÍN, 2008; AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMAN, 2009).

Estudos têm demonstrado que células T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ regulatórias são capazes de controlar a resposta Th1 protetora, permitindo a sobrevida do parasito e manutenção da resposta de memória imunológica em camundongos resistentes (BELKAID *et al.*, 2002a). Tanto no homem como no camundongo, as células T regulatórias CD25 $^{+}$ secretam altos níveis de IL-10 e TGF- β , que são pelo menos parcialmente responsáveis pela capacidade destas células suprimirem certas respostas patológicas ou imunoprotetoras *in vivo* (O'GARRA & VIEIRA, 2004; TRINCHIERI, 2007).

A persistência dos parasitos é importante para a manutenção de células de memória, que protegem o hospedeiro em um segundo contato com *Leishmania*. Um trabalho mostrou que, com a destruição das células Treg, responsáveis por manter parasitos vivos no sítio de infecção, camundongos resistentes a *L. major* tornaram-se mais resistentes à infecção primária, e mais suscetíveis a uma segunda infecção (BELKAID *et al.*, 2002a). Em infecção secundária de BALB/c por *L. braziliensis*, observou-se o desenvolvimento de imunidade, já que não houve lesão aparente do sítio de infecção, e que foi verificada menor carga parasitária no linfonodo de drenagem, em relação à infecção inicial. Entretanto, a porcentagem de células Treg CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ permaneceu semelhante nos sítios de infecção primária e

secundária, indicando que estas não têm papel especial na regulação da resposta efetora de infecção secundária (FALCÃO *et al.*, 2012).

Apesar de a citocina IL-10 secretada por Treg e por outras células ser crítica para a prevenção da eliminação total dos parasitos na pele (SUFFIA *et al.*, 2005), a persistência do parasito pode ser mediada por outros mecanismos, ou através da secreção de outras citocinas supressoras, como TGF- β (BELKAID *et al.*, 2002a).

Em suma, no presente estudo evidenciou-se que a maior produção de IL-4, TGF- β , CCL2 e CCL3 na fase inicial da infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, levaria à progressão da doença até o 30º dia de infecção, quando então os níveis de IFN- γ e CXCL10 sobem e as lesões começam a regredir, ao que se segue o desaparecimento dos parasitos na pata. Por outro lado, os parasitos persistem no linfonodo de drenagem em períodos crônicos de infecção, quando CCL2, CXCL10, IL-10 e TGF- β continuam sendo expressos/produzidos em quantidade. O quadro observado sugere um equilíbrio entre essas citocinas, o que pode ser determinante para a persistência do parasito no linfonodo.

8. CONCLUSÃO

Em camundongos BALB/c infectados por *Leishmania braziliensis* e acompanhados por 90 dias, é possível concluir que:

- Na fase inicial, há maior produção de IL-4 e TGF- β , sugerindo que a susceptibilidade à infecção é influenciada por estas citocinas;
- A resolução da lesão no sítio de inoculação do parasito está relacionada à expressão aumentada de CCL3 e CXCL10 e à produção de IFN- γ e TNF- α no linfonodo;
- A expressão/produção continuada de CCL2, CXCL10, IL-10 e TGF- β no linfonodo sugere que a persistência do parasito seja mediada pela produção dessas citocinas.

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.; et. al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **J. Euk. Microb.** 52(5):399-451; 2005.
- AKUFFO, H.; MAASHO, K.; BLOSTEDT, M.; HOJEBERG, B.; BRITTON, S.; BAKHET, M. *Leishmania aethiopica* derived from diffuse leishmaniasis patients preferentially induce mRNA for interleukin-10 while those from localized leishmaniasis patients induce interferon- γ . **J. Infect. Dis.** 175:737-741; 1997.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? **Front. Immunol.** 3:80. doi: 10.3389; 2012.
- ALLAVENA, P.; BIANCHI, G.; ZHOU, D.; VAN DAMME, J.; JILEK, P.; SOZZANI, S.; MANTOVANI, A. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. **Eur. J. Immun.** 24:3233-3236; 1994.
- ALMEIDA, R.P.; CARVALHO, E.M. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clin. Infect. Dis.** 34:54-58; 2002.
- AMATO, V.S.; TUON, F.F.; BACHA, H.A.; NETO, V.A.; NICODEMO, A.C. Mucosal leishmaniasis: Current scenario and prospects for treatment. **Act. Trop.** 105(1):1-9; 2008.
- ANTONIAZI, S.; PRICE, H.P.; KROPF, P.; FREUDENBERG, M.A.; GALANOS, C.; SMITH, D.F.; MULLER, I. Chemokine gene expression in toll-like receptor-competent and -deficient mice infected with *Leishmania major*. **Infect. Immun.** 72:5168-5174; 2004.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M.H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.** 27:669-692; 2009.
- AWASTHI, A; MATHUR, R.K; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res.** 119(6):238-58; 2004.
- BADOLATO, R.; SACKS, D.L.; SAVOIA, D.; MUSSO, T. *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. **Exp. Parasitol.** 82:21-26; 1996.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **J. Intern. Med.** 250: 91-104; 2001.
- BARBI, J.; SNIDER, H.M.; BHARDWAJ, N.; LEZAMA-DÁVILA, C.M.; DURBIN, J.E.; SATOSKAR, A.R. Signal transducer and activator of transcription 1 in T cells plays an indispensable role in immunity to *Leishmania major* by mediating Th1 cell homing to the site of infection. **Faseb J.** 23:3990-3999; 2009.
- BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDIZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor b as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 90:3442-3446; 1993.
- BARRAL, A.; GUERREIRO, J.; BOMFIM, G.; CORREIA, D.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 53: 256-259; 1995.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C.E.; SKEIKY, Y.A.; ELLINGSWORTH, L.R.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**. 257:545-548; 1992.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.** 3(7): 328; 2004.

BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nature Immunol.** 7:875-888; 2007.

BELKAID, Y.; HOFFMAN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M.C.; WYNN, T.A.; SACKS, D.L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J. Exp. Med.** 194:1497-1506; 2001.

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

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

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.** 185:1704-1708; 2002.

BITTENCOURT, A.L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classification of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 86:51-56; 1991.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunol.** 2:907-916; 2001.

BOGDAN, C. Phagocyte effector functions against *Leishmania* parasites. In: DENKERS, E.Y.; GAZINELLI, R.T. Protozoans in macrophages. **Landes Bioscience**, Austin, Texas, pp. 193-206; 2007.

BOGDAN, C., DONHAUSER, N., DÖRING, R., RÖLLINGHOFF, M., DIEFENBACH, A., RITTIG, M. G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. **J. Exp. Med.** 191:2121-2129; 2000.

BOGDAN, C.; PAIK, J.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor- β and interleukin-10. **J. Biol. Chem.** 267: 23301-23308; 1992.

BORGES, M.M.A.; CAMPOS-NETO, P.; SLEATH, K.H.; GRABSTEIN, P.J.; MORRISSEY, P.J.; SKEIKY, Y.A.W.; REED, S. G. Potent stimulation of the innate immune system by a *Leishmania brasiliensis* recombinant protein. **Infect. Immun.** 69: 5270-5277; 2001.

BRANDAO-FILHO, S.P.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; BRITO, M.E.F.; SHAW, J. J.; DAVIES, C.R. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in northeast Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 93: 488-494; 1999.

BRANDONISIO, O., PANARO, M.A., FUMAROLA, L., SISTO, M., LEOGRANDE, D., ACQUAFREDDA, A., SPINELLI, R. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 α induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. **Clin. Exp. Med.** 2:125-129; 2002.

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.** 2(3):125-9; 2002.

BUXBAUM, L.U.; UZONNA, J.E.; GOLDSCHMIDT, M.H.; SCOTT, P. Control of new world cutaneous leishmaniasis is IL-12 independent but STAT 4 dependent. **Eur. J. Immunol.** 32:3206-3215; 2002.

CAMPANELLI, A.P.; BRODSKYN, C.I.; BOAVENTURA, V.; SILVA, C.; ROSELINO, A.M.; COSTA, J.; SALDANHA, A.C.; DE FREITAS, L.A.; DE OLIVEIRA, C.I.; BARRAL-NETTO, M.; SILVA, J.S.; BARRAL, A. Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. **Hum. Immunol.** 71(12):1220-1227; 2010.

CAMPANELLI, A.P.; ROSELINO, A.M.; CAVASSANI, K.A.; PEREIRA, M.S.; MORTARA, R.A.; BRODSKYN, C.I.; GONCALVES, H.S.; BELKAID, Y.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; *et al.* CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **J. Infect. Dis.** 193(9):1313-1322; 2006.

CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R.L.; REED, S.G. Restoration of INF- γ production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.** 152:5949-56; 1994.

CARVALHO, L.P.; PEARCE, E.J.; SCOTT, P. Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania braziliensis*: infected cells produce high levels of TNF α , whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell responses. **J. Immunol.** 181:6473-6480; 2008.

CHARMOY, M.; BRUNNER-AGTEN, S.; AEBISCHER, D.; AUDERSET, F.; LAUNOIS, P.; MILON, G.; PROUDFOOT, A.E.; TACCHINI-COTTIER, F. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. **PLoS Pathog.** 6(2):e1000755; 2010.

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. **Eur. J. Immunol.** (34): 2885-2894; 2004.

CHILDS, G. E., LIGHTNER, L., MCKINNEY, M.G., GROVES, E. E., PROICE, L. D., HENDRICK, I. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana* and *L. aethopica*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 78:25-34; 1984.

CHRISTOPHERSON II, K.; HROMAS, R. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. **Stem Cells.** 19:388-396; 2001.

COSTA, A.V.; HUERRE, M.; DELACRE, M.; AURIAULT, C.; CORREIA COSTA, J.M.; VERWAERDE, C. IL-10 leads to a higher parasite persistence in a resistant mouse model of *Leishmania major* infection. **Parasitol. Int.** 51(4):367-379; 2002.

COSTA, D.L.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D.S., SILVA, N.M.; MILANEZI, C.M.; CARDOSO, C.R.; GIUDICE, A.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P. *et al.* BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 1;5(3):e965; 2011.

COSTA, J.M.; MARSDEN, P.D.; LLANOS-CUENTAS, E.A.; NETTO, E.M.; CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; ROSA, A.C.; CUBA, C.C.; MAGALHÃES, A.V.; BARRETO, A.C. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **J. Trop. Med. Hyg.** 89:319–323; 1986.

COSTA, J. M., VALE, K. C., FRANCA, F., SALDANHA, A. C., DA SILVA, J. O., LAGO, E. L., MARSDEN, P. D., MAGALHÃES, A. V., SILVA, C. M., SERRA NETO, A. Spontaneous healing of leishmaniasis caused by *Leishmania Viannia braziliensis* in cutaneous lesions. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.** 23:205-208; 1990.

COSTA, J.M.L. Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil. **Gazeta Médica da Bahia.** 75(1):3-17; 2005.

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.** 29(1):203-114; 1999.

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L.R.; TOALDO, C.B.; DE O LIVEIRA-NETO, M.P.; DE BRITO, M.E.; FALQUETO, A.; DE FARIAS NAIFF, M.; GRIMALDI, G. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **J. Clin. Microbiol.** 41:3126–3132; 2003.

DA-CRUZ, A.M.; DE OLIVEIRA, M.P; DE LUCA, P.M; MENDONÇA, S.C.; COUTINHO, S.G. Tumor necrosis factor- α in human American tegumentary leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 91(2); 1996.

DE MOURA, T.R., NOVAIS, F.O., OLIVEIRA, F., CLARENCO, J., NORONHA, A., BARRAL, A., BRODSKYN, C., DE OLIVEIRA, C.I. Towards a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.** 73:5827-5834; 2005.

DE OLIVEIRA, C. I., TEIXEIRA, M. J., TEIXEIRA, C. R., DE JESUS, J. R., ROSATO, A. B., DA SILVA, J. S., BRODSKYN, C., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. **Microbes. Infect.** 6, 977–984; 2004.

DE TREZ, C.; MAGEZ, S.; AKIRA, S.; RYFFEL, B.; CARLIER, Y.; MURAILLE, E. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. **PLoS Pathog.** 5(6): e1000494; 2009.

DE WAAL, R.M., ABRAMS, J., BENNETT, B., FIGDOR, C. G., DE VRIES, J. E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.** 174:1209–1220; 1991.

DEKREY, G.K., LIMA, H.C., TITUS, R.G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.** 66:827-82; 1998.

DORNER, B.G.; SCHEFFOLD, A.; ROLPH, M.S.; HÜSER, M.B.; KAUFMANN, S.H.E.; RADBRUCH, A.; FLESCH, I.E.A.; KROCZEK, R.A. MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN- γ as type 1 cytokines. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 99(9): 6181–6186; 2002.

FALCÃO, C. S.; DE MOURA, T.R.; CLARÊNCIO, J.; BRODSKYN, C.; BARRAL, A.; DE OLIVEIRA, C.I. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. **Int. J. Parasitol.** 42(8):771-80; 2012.

- FIORENTINO, D. F., ZLOTNIK, A., VIEIRA, P., MOSMANN, T. R., HOWARD, M., MOORE, K. W., O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.** 146:3444-3451; 1991.
- FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; BACELLAR, O.; ARAUJO, C.B.; CARVALHO, L.P.; ALMEIDA, R.P.; CARVALHO, E.M. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clin. Infect. Dis.** 34: E54-58; 2002.
- GAZZINELLI, R. T., OSWALD, I. P., JAMES, S. L., SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. **J. Immunol.** 148:1792-1796; 1992.
- GHALIB, H.W.; PIUVEZAM, M.R.; SKEIKY, Y.A.; SIDDIQ, M.; HASHIM, F.A.; EL-HASSAN, A.M.; RUSSO, D.M.; REED, S.G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Invest.** 92(1):324-329; 1993.
- GOMES-SILVA, A.; DE CÁSSIA BITTAR, R.; DOS SANTOS NOGUEIRA, R.; AMATO, V.S.; DA SILVA MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; COUTINHO, S.G.; DA-CRUZ, A.M. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clin Exp Immunol.** 149(3):440-444; 2007.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana - American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 36(1); 2003.
- GONTIJO, F.C.M.; MELO, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol.** 7(3):338-349; 2004.
- GUERRA, J.A.; BARBOSA, M.G.V.; PAES, M.G.; SOUSA, R.T.; GAMA, P.; SILVA, M.J.; MACIÃO, A.R.; CARVALHO, R.S.; COELHO, L.I.; FERREIRA, L.C.L. Community medicine & health education Mucosal Leishmaniasis – clinical and epidemiological aspects of 234 cases treated in a tertiary reference center in the Brazilian Amazon. **J. Commun. Med. Health Edu.** 2:2-5; 2011b.
- GUERRA, J.A.; PRESTES, S.R.; SILVEIRA, H.; COELHO, L.I.; GAMA, P.; MOURA, A.; AMATO, V.; BARBOSA, M.G.V.; FERREIRA, L.C.L. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 5: e980; 2011a.
- GUPTA, G.; BHATTACHARJEE, S.; BHATTACHARYYA, S.; BHATTACHARYA, P.; ADHIKARI, A.; MUKHERJEE, A.; MAJUMDAR, S.B.; MAJUMDAR, S. CXC Chemokine-Mediated Protection against Visceral Leishmaniasis: Involvement of the Proinflammatory Response. **J. Infect. Dis.** 200:1300-1310; 2009.
- HEINZEL, F.P.; SCHOENHAUT, D.S.; RERKO, R.M.; ROSSER, L.E.; GATELY, M.K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.** 177(5):1505-1509; 1993.
- HOLADAY, B.J.; POMPEU, M.M.; EVANS, T.; BRAGA, D.N.; TEIXEIRA, M.J.; SOUSA ADE, Q.; SADICK, M.D.; VASCONCELOS, A.W.; ABRAMS, J.S.; PEARSON, R.D.; et al. Correlates of Leishmania-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.** 167:411-417; 1993.
- JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.** 71:4278-4288; 2003.

JONES, T.C., JOHNSON, W.D., BARRETTO, A.C., LAGO, E., BADARO, R., CERF, B., REED, S.G., NETTO, E.M., TADA, M.S., FRANCA, T.F., et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **J. Infect. Dis.** 156(1):73-83; 1987.

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in Leishmaniasis. **J. Immunol.** 166:1141-1147; 2001.

KATZMAN, S.D.; FOWELL, D.J. Pathogen-imposed skewing of mouse chemokine and cytokine expression at the infected tissue site. **J. Clin. Invest.** 118:801-811; 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.** 201:239-253; 2004.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. IL-17 and Th17 Cells. **Annu. Rev. Immunol.** 27:485-517; 2009.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: W. Peters and R. Killick-Kendrick, eds.; "The Leishmanias in Biology and Medicine", London, **Acad. Press.** 1:1-119; 1987.

LAUFS, H.; MÜLLER, K.; FLEISCHER, J.; REILING, N.; JAHNKE, N.; JENSENIUS, J.C.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infect. Immun.** 70:826-835; 2002.

LEON, B.; LOPEZ-BRAVO, M.; ARDAVIN, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. **Immun.** 26:519-531; 2007.

LEOPOLDO, P.T.G.; MACHADO, P.R.L.; ALMEIDA, R.P.; SCHRIEFER, A.; GIUDICE, A.; DE JESUS, A.R.; HO, J.L.; GUIMARÃES, L.H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. **BMC Infect. Dis.** 6:75; 2006.

LIEW, F.Y.; PARKINSON, C.; MILLOTT, S.; SEVERN, A.; CARRIER, M. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunol.** 69:570-573; 1990.

LIMA, H.C., TITIUS, R.G. Effects of sandfly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Am. Soc. Microbiol.** 64:5442-5445; 1996.

LIU, L.; CALLAHAN, M.K.; HUANG, D.; RANSOHOFF, R.M. Chemokine receptor CXCR3: an unexpected enigma. **Curr. Top. Dev. Biol.** 68:149-181; 2005.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods.** 25:402-408; 2001.

LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. In vivo induction of immune responses to pathogens by conventional dendritic cells. **Immun.** 29:343-351; 2008.

MACHADO-COELHO, G.L.; CAIAFFA, W.T.; GENARO, O.; MAGALHÃES, P.A.; MAYRINK, W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 99: 55-61; 2005.

MAROOF, A., BEATTIE, L., ZUBAIRI, S., SVENSSON, M., STAGER, S., KAYE, P. M. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. **Immun.** 29:295–305; 2008.

MARSDEN, P.D.; LLANOS-CUENTAS, E.A.; LAGO, E.L.; Cuba, C.C.; BARRETO, A.C.; COSTA, J.M.L.; JONES, T. C. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. III - Mucosal disease presentation and initial evolution. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 17:179-186; 1984.

MATTE, C.; OLIVIER, M. Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. **J. Infect. Dis.** 185:673–681; 2002.

MCFARLANE, E., PEREZ, C., CHARMOY, M., ALLENBACH, C., CARTER, K.C., ALEXANDER, J., TACCHINI-COTTIER, F. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infect. Immun.** 76:532–541; 2008.

MENDONÇA, M.G., BRITO, M.E., RODRIGUES, E.H., BANDEIRA, V., JARDIM, M.L., ABATH, F.G. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **J. Infect. Dis.** 189:1018-1023; 2004.

MILES, S. A., CONRAD, S.M., ALVES, R.G., JERONIMO, S.M., MOSSER, D.M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **J. Exp. Med.** 201:747–754; 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/MS. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana: Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2011. **Portal da Saúde**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_casos_de_lta_entre_1990_e_2011.pdf>. Acesso em: 3 novembro de 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/MS. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2^a edição. **Portal da Saúde**. Brasília, 2007. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf. Acesso em: 12 novembro de 2012.

MITRA, R.S.; JUDGE, T.A.; NESTLE, F.O.; TURKA, L.A.; NICKOLOFF, B.J. Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. **J. Immunol.** 154:2668–2677; 1995.

MOLL, H.; FLOHE, S.; BLANK, C. Dendritic cells seclude Leishmania parasites that persist in cured mice – a role in the maintenance of T-cell memory? **Adv. Exp. Med. Biol.** 378:507–509; 1995.

MOSER, B.; WILLIMANN, K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. **Ann. Rheum. Dis.** 63(2):ii84–ii89; 2004.

MULLER, K.; ZANDBERGEN, G; HANSEN, B.; LAUFS, H.; JAHNKE, N.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of Leishmania major infection in mice. **Med. Microbiol. Immunol.** 190: 73–76; 2001.

MURRAY, H.W., LU, C.M., MAUZE, S., FREEMAN, S., MOREIRA, A.L., KAPLAN, G., COFFMAN, R.T. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect. Immun.** 70:6284–6293; 2002.

NEAL, R.A.; HALE, C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. **Parasitol.** 87(1):7-13; 1983.

- O'GARRA, A.; VIEIRA, P.L.; VIEIRA, P; GOLDFELD, A.E. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. **J. Clin. Invest.** 114:1372–1378; 2004.
- PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.** 22(1):1-13; 1996.
- PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q.; JERONIMO, S.M.B. *Leishmania* species: visceral (kala-azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In: _____ Mandell, G. L.; Bennett, J.; Dolin, R. (eds) **Principles and Practice of Infections Diseases**. 5th ed., New York: Churchill Livingston, v.2: 2832-2845; 2000.
- PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M.P.; GERMAIN, R.N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**. 321:970–974; 2008.
- PETERSON, R .A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. **Toxicol. Pathol.** 40:186–204; 2012.
- PIRMEZ, C.; COOPER, C.; PAES-OLIVEIRA, M.; SCHUBACH, A.; TORIGIAN, V.K.; MODLIN, R.L. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. **J. Immunol.** 145:3100-3104; 1990.
- RACOOSIN, E.L.; BEVERLEY, S.M. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. **Exp. Parasitol.** 85:283–295; 1997.
- RAMIREZ, J. L., GUEVARA, P. Persistent infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 92:333-338; 1997.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.** 7:581–596; 2007.
- RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31(1)143–148; 1998.
- 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. **Eur. J. Immunol.** 30:3111–3120; 2000.
- RITTER, U.; KORNER, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.** 24:295–301; 2002.
- RITTER, U.; MOLL, H.; LASKAY, T.; BROCKER, E.; VELAZCO, O.; BECKER, I.; GILLITZER, R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. **J. Infect. Dis.** 173:699–709; 1996.
- ROBERTS, M.T. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **Br. Med. Bull.**, 75-76:115-130; 2005.
- ROCHA, F.J.S., SCHLEICHER, U., MATTNER, J., ALBER, G., BOGDAN, C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infect. Immun.** 75:3823-3832; 2007.
- RONET, C., HAUYN-LA TORRE, Y., REVAZ-BRETON, M., MASTELIC, B., TACCHINI-COTTIER, F., LOUIS, J., LAUNOIS, P. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune

- responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. **J. Immunol.** 184:886–894; 2010.
- ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **A. R. Immunol.** 18:217–242; 2000.
- ROT, A.; VON ANDRIAN, U.H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. **A. R. Immunol.** 22: 891–928; 2004.
- ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; ANJUÈRE, F.; FERRUA, B.; FRAGAKI, K.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. **Eur. Cytokine Netw.** 12(2):340-347; 2001.
- SACKS, D., ANDERSON, C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. **Immunol. Rev.** 201:225-238; 2001.
- SACKS, D., NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.** 2:845–858; 2002.
- SACKS, D.; PIMENTA, P.; MCCONVILLER, M.; SCHNEIDER, P.; TURCO, S. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. **J. Exp. Med.** 181(2):685-97; 1995.
- SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat. Immunol.** 3:1041–1047; 2002.
- SALHI, A., RODRIGUES, V., SANTORO, F., DESSEIN, H., ROMANO, A., CASTELLANO, L.R., SERTORIO, M., RAFATI, S., CHEVILLARD, C., PRATA, A., ALCAIS, A., ARGIRO, L., DESSEIN, A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. **J. Immunol.** 180:6138-6148; 2008.
- SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, C. F.; SANTIAGO, L.; FERRAZ, F. O.; SOUZA, D. G.; DE FREITAS, L. A. R.; AFONSO, L. C. C.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T. Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. **Infect. Immun.** (72): 4918–4923; 2004.
- SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cell Microbiol.** 7: 1707–1713; 2005.
- SOUSA, A.Q.; PARISE, M.E.; POMPEU, M.M.L.; COELHO FILHO, J.M.; VASCONCELOS, I.A.B.; LIMA, J.W.O; OLIVEIRA, E.G.; VASCONCELOS, A.W.; DAVID, J.R; MAGUIRE, J.H. Bubonic Leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceará, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 53(4):380-385; 1995.
- STENGER S, THÜRING H, RÖLLINGHOFF M, BOGDAN C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J. Exp. Med.** 180:783-93; 1994.
- SUFFIA, I.; RECKLING, S.K.; SALAY, G.; BELKAID, Y. A role for CD103 in the retention of CD4⁺CD25⁺ Treg and control of *Leishmania major* infection. **J. Immunol.** 174:5444–5455; 2005.
- TAGA, K.; TOSATO, G. IL-10 inhibits human T cell role of IL-10 in chronic *Leishmania major* infection proliferation and IL-2 production. **J. Immunol.** 148:1143-1148; 1992.

- TEIXEIRA, M.J.; FERNANDES, J.D.; TEIXEIRA, C.R.; ANDRADE, B.B.; POMPEU, M.L.; SANTANA DA SILVA, J.; BRODSKYN, C.I.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. **Infect. Immun.** 73(2):1191-1195; 2005.
- TEIXEIRA, M.J.; TEIXEIRA, C.R.; ANDRADE, B.B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends. Parasitol.** 22:32-40; 2006.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J. Exp. Med.** 204:239-243; 2007.
- TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **Med. Microbiol. Immunol.** 51:229-242; 2007.
- VAN ZANDBERGEN, G.; BOLLINGER, A.; WENZEL, A.; KAMHAWI, S.; VOLL, R.; KLINGER, M.; MÜLLER, A.; HÖLSCHER, C.; HERRMANN, M., SACKS, .; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 103:13837-13842; 2006.
- VAN ZANDBERGEN, G; KLINGER, M.; MÜLLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **J. Immunol.** 173:6521- 6525; 2004.
- VASCONCELOS, I.A.; VASCONCELOS, A.W.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G.J.R.; ALENCAR, J.E. Epidemiological studies on American leishmaniasis in Ceara State, Brazil - Molecular characterization of the *Leishmania* isolates. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 82:547-554; 1988.
- VASQUEZ, R.E.; SOONG, L. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against Leishmania amazonensis infection in mice. **Infect. Immun.** 74:6769-6777; 2006.
- VESTER, B.; MULLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. **Infect. Immun.** 67:3155-3159; 1999.
- VIEIRA, M.G.; OLIVEIRA, F.; ARRUDA, S.; BITTENCOURT, A.L.; BARBOSA, A.A. JR; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 97:979-983; 2002.
- VIETH, M., WILL, A., SCHRÖPPEL, K., RÖLLINGHOFF, M., GEISSNER, A. Interleukin-10 inhibits antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. **Scand. J. Immunol.** 40(4):403-409; 1994.
- VON STEBUT, E., UDEY. M. C. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. **Microbes. Infect.** 6:1102-1109; 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO/OMS. Control of the leishmaniasis. **WHO Technical Report Series.** Genebra, 2010.
- XU, D.; LIU, H.; KOMAI-KOMA, M.; CAMPBELL, C.; MCSHARRY, C.; ALEXANDER, J.; LIEW, F.Y. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice. **J. Immunol.** 170:394-399; 2003.