



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

DAYANNE TOZATTO WAKIMOTO

**PAPEL DA MIGRAÇÃO CELULAR E DE MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Leishmania sp***

Maringá
2009

DAYANNE TOZATTO WAKIMOTO

**Papel da migração celular e de mediadores inflamatórios na infecção
experimental por *Leishmania sp***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof^a Dr^a Maria Valdrinez Campana Lonardoni

Co-Orientador: Prof^a Dr^a Sandra Mara Alessi Aristides

Maringá
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

DAYANNE TOZATTO WAKIMOTO

Papel da migração celular e de mediadores inflamatórios na infecção experimental por *Leishmania sp*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Profª Drª Maria Valdrinez Campana Lonardoni
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profª Drª Thaís Gomes Verzignasse Silveira
Universidade Estadual de Maringá

Profª Drª Márcia Machado de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Drª Ciomar Aparecida Bersani Amado
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Drª Anita H. Strauss
Universidade Federal de São Paulo

Aprovada em: 18 de dezembro de 2009.

Local de defesa: Anfiteatro do bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pai, pela sabedoria e inspiração.

Aos meus pais, Maria Luiza e Aldo, a minha irmã Gisianne e ao meu noivo Júnior pelo apoio, compreensão, amor, carinho e por sempre acreditarem e depositarem em mim toda confiança de que sou capaz. Sem vocês com certeza eu não teria conseguido.

Aos funcionários, amigos e estagiários do laboratório de Imunologia Clínica – LEPAC, meus sinceros agradecimentos, por tornarem o mestrado mais agradável e alegre, e por todo conhecimento passado durante estes anos de convivência, com certeza fiz amigos que vou levar pra toda vida.

A minha coorientadora, Sandra Mara, por me iniciar na pesquisa científica, pelo apoio emocional, pela amizade, carinho e confiança depositados em mim. Com toda certeza hoje tenho mais que uma professora, tenho uma amiga.

E finalmente a minha orientadora, Valdrinez, toda minha gratidão e admiração. Obrigada pelos conhecimentos científicos, pelos ensinamentos de vida, dedicação e confiança transmitidos no decorrer desses aninhos de convivência. Muito obrigada pelas oportunidades oferecidas a mim.

EPÍGRAFE

"A compaixão pelos animais está intimamente ligada a bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem."

ARTHUR SCHOPENHAUER

Papel da migração celular e de mediadores inflamatórios na infecção experimental por *Leishmania sp*

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, é endêmica no Brasil e no Estado do Paraná. A LTA é uma doença que preocupa principalmente pelo desenvolvimento de lesões mutilantes na mucosa nasal, bucal e faríngea. Uma vez dentro dos macrófagos os antígenos processados e apresentados às células T, na dependência da espécie de *Leishmania* e da suscetibilidade do hospedeiro, determinarão uma resposta do tipo Th1 ou Th2, que resultará na produção de determinadas citocinas. O objetivo deste trabalho foi investigar *in vivo*, após a inoculação de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em camundongos BALB/c, a participação de imunomoduladores no recrutamento de leucócitos e estabelecer uma relação entre a migração celular e a produção de mediadores inflamatórios frente à infecção por duas espécies distintas de *Leishmania sp*. Observou-se que a infecção por *L. (L.) amazonensis* estimulou com maior intensidade a migração de células em relação à infecção por *L. (V.) braziliensis*, com predomínio de neutrófilos, seguido de macrófagos nos grupos infectados com *L. (L.) amazonensis*, e predomínio de eosinófilos nos grupos infectados com *L. (V.) braziliensis*. Além disso, foi verificado que após a inoculação de *L. (L.) amazonensis* a PGE₂ interferiu significativamente com os níveis de óxido nítrico TNF- α e IL-12. Observamos que possivelmente a PGE₂ atuou como um regulador importante da resposta imune na fase inicial da infecção por *Leishmania*, induzindo a produção de óxido nítrico e IL-12, e regulando negativamente a migração celular, num processo cujo mecanismo pode estar interligado com a produção de TNF- α .

Palavras-chave: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Mediadores inflamatórios e Migração celular.

Role of cell migration and of inflammatory mediators in experimental infection by *Leishmania sp*

ABSTRACT

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL), a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, is endemic in Brazil and the State of Paraná. The ACL is a disease that mainly concern by the development of crippling injuries in the nasal mucosa, oral cavity and pharynx. Once inside the macrophage antigens processed and presented to T cells, depending on the species of *Leishmania* and host susceptibility, require a response from Th1 or Th2, resulting in the production of certain cytokines. The objective of this study was investigate *in vivo*, after inoculation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* in BALB/c mice, the involvement of immunomodulators in the recruitment of leukocytes and establish a relationship between cell migration and production of mediators inflammatory front infection by two distinct species of *Leishmania sp*. It was observed that infection caused by *L. (L.) amazonensis* stimulated more the migration of cells in relation to infection by *L. (V.) braziliensis*, with a predominance of neutrophils followed by macrophages in the groups infected with *L. (L.) amazonensis*, and eosinophils in the groups infected with *L. (V.) braziliensis*. Furthermore, it was found that after inoculation of *L. (L.) amazonensis* PGE₂ interfered significantly with the levels of nitric oxide TNF- α and IL-12. We found that PGE₂ possibly served as an important regulator of immune response in the initial phase of *Leishmania* infection, inducing the production of nitric oxide and IL-12 and negatively regulates cell migration, a process whose mechanism may be linked to the production of TNF- α .

Keywords: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, inflammatory mediators and cell migration.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas:

Artigo 1: aceito para publicação no “*The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*” - ISSN 1678-9199 e disponível em:

<http://www.jvat.org.br/>

Artigo 2: a ser enviado para a revista *Parasite Immunology*

(<http://www.wiley.com/bw/journal.asp?ref=0141-9838>)

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	10
Descrição do problema de pesquisa	10
Histórico	11
Leishmaniose	12
Recrutamento celular	13
Mediadores Inflamatórios	14
Fator de necrose tumoral (TNF- α)	15
Interleucina 8 (IL-8)	16
Reativos do Oxigênio (ROS)	16
Óxido nítrico (NO)	17
Leucotrineos (LTs)	18
Prostaglandinas (PGE)	19
Objetivos	20
Objetivo principal	20
Objetivos específicos	21
Referências Bibliográficas	21
2. CAPÍTULO II	30
Artigo 1: CELL MIGRATION INDUCED BY <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , <i>Leishmania (Leishmania) major</i> AND <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> INTO THE PERITONEAL CAVITY OF BALB/C MICE	31
Artigo 2: DISTINTOS PADRÕES DE RECRUTAMENTO CELULAR E PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA FASE INICIAL DE INFECÇÃO POR <i>L. (L.)</i> <i>amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	40
3. CAPÍTULO III	60
Conclusões	61
Perspectivas futuras	62

CAPÍTULO I

1. DESCRIÇÃO DO PROBLEMA DE PESQUISA

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), causada por protozoários do gênero *Leishmania* é doença endêmica em vários Estados do Brasil, com número crescente de notificações nos últimos anos ⁽¹⁾. No ano de 2008, 19.542 novos casos de LTA foram notificados, sendo 625 na região Sul e 540 no Estado do Paraná, onde a região Norte/Noroeste tem apresentado número crescente de notificações ⁽²⁾⁽³⁾. A LTA constitui um problema de saúde pública, não somente pela alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também pela possibilidade das lesões assumirem formas destrutivas, desfigurantes e incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo ⁽¹⁾, além do tratamento ser dispendioso para o Estado. Badolato et al. (4) e Rodriguez-Soza et al. (5) relataram que as lesões produzidas por *Leishmania* são caracterizadas, na fase inicial da infecção, pelo recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e monócitos sanguíneos, através da expressão de receptores de quimiocinas CC, como o CCR1 e o CCR2, por estas células. Sabe-se também que enquanto a saliva do inseto transmissor (flebotomíneo) aumenta a quimiotaxia de macrófagos de camundongos ⁽⁶⁾, a lipofosfoglicana (LPG), principal componente de superfície da *Leishmania*, reduz a migração celular, enfatizando a propriedade desta molécula de prejudicar a resposta de fagócitos ⁽⁷⁾. Em experimentos *in vivo*, usando modelos de “air pouch”, foi observado que a injeção de *Leishmania major* e *Leishmania donovani*, leva a um rápido e transitório acúmulo de leucócitos ⁽⁸⁾. Nesse mesmo estudo os autores verificaram uma secreção aumentada de fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL-1 β após inoculação de *L. major* quando comparada com a inoculação de *L. donovani*. Estudos vem sendo realizados com o intuito de analisar a participação de moléculas de quimiocinas e integrinas no recrutamento de monócitos durante a inflamação em resposta a infecção por *Leishmania* ⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾.

Na fase inicial da infecção por *Leishmania*, como nas infecções em geral, existe uma complexa rede de imunomoduladores, tais como IL-8, IFN- γ , TNF- α , NO, IL-12, IL-4 e PGE₂ que podem atuar em conjunto ou separadamente no recrutamento celular e no direcionamento da resposta imunológica, seja ela Th1 ou Th2. Nesta fase, mediadores inflamatórios possuem papel importante no controle ou na progressão da doença. Os mecanismos que controlam a migração leucocitária para o reconhecimento e processamento do antígeno durante a infecção

ainda são indefinidos ⁽¹¹⁾. Compreender melhor como funciona a complexa relação entre liberação de mediadores inflamatórios, recrutamento celular e espécie de *Leishmania* são fundamentais para esclarecer como ocorre o direcionamento da resposta inflamatória e, quem sabe, buscar alternativas para o tratamento da doença.

2. HISTÓRICO

A LTA é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o séc. I d.C. ⁽¹²⁾⁽¹³⁾. No Brasil, a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas, só foi confirmada, pela primeira vez, em 1909, por Lindenberg, que encontrou formas de *Leishmania* idênticas a *Leishmania tropica*, leishmaniose do Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo ⁽¹⁴⁾. Em 1922, demonstrou-se pela primeira vez o papel do flebotômíneo na transmissão da LTA. Gaspar Vianna, por considerar o parasito diferente da *L. tropica*, o denominou de *L. braziliensis*, considerado o agente etiológico da "úlceras de Bauru", "ferida brava" ou "nariz de tapir" ⁽¹⁵⁾.

No Brasil, até a década de setenta, todos os casos de LTA eram atribuídos a *L. braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas, sendo registradas até o momento seis espécies causadoras da LTA ⁽¹²⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾. Entre estas, as mais importantes são a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, sendo que a *L.(V.) braziliensis* é a que ocupa a maior área geográfica ⁽¹⁸⁾.

Em 1993 a Organização Mundial de Saúde, considerou as leishmanioses como a 2ª doença, causada por protozoários de importância na saúde pública. A LTA é doença endêmica em todos os Estados do Brasil com número crescente de notificações nos últimos anos ⁽¹⁾. No Estado do Paraná, esta dermatose também é endêmica, atingindo proporções epidêmicas em quase todos seus municípios, especialmente das regiões Norte/Noroeste ⁽²⁾. No Paraná as espécies freqüentemente encontradas nas lesões de pacientes são em sua maioria *L. (Viannia) braziliensis* e, em poucos casos *L. (Leishmania) amazonensis*.

3. LEISHMANIOSE

A LTA é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas; é primariamente uma infecção zoonótica, afetando outros animais além do homem, o qual podem estar envolvido secundariamente. O modo de transmissão habitual é através da picada de insetos que pode pertencer a várias espécies de flebotomíneos, de diferentes gêneros (*Psychodopygus*, *Lutzomya*). Os parasitos, do gênero *Leishmania*, são dimórficos, tendo a forma promastigota, extracelular, encontrada no inseto transmissor, convertendo-se em amastigota, forma intracelular, no macrófago. Promastigotas flagelados são inoculados no sítio da infecção através da picada do flebótomo e são englobados por células mononucleares perdendo seu flagelo e se transformando em amastigotas. As amastigotas sobrevivem e se replicam dentro dos fagolisossomos, podendo eventualmente causar manifestações clínicas da leishmaniose, como a formação de úlceras cutâneas até doenças viscerais potencialmente fatais. A LTA inclui a leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa. Na apresentação cutânea da LTA, as lesões de pele podem caracterizar a forma localizada (única ou múltipla), a forma disseminada (lesões muito numerosas em várias áreas do corpo) e a forma difusa. Na maioria das vezes a doença apresenta-se como uma lesão ulcerada única. A apresentação mucosa da LTA é na maioria das vezes secundária às lesões cutâneas, surgindo geralmente, meses ou anos após a resolução das lesões de pele. Às vezes, porém, não se identifica a porta de entrada supondo-se que as lesões sejam originadas de infecção subclínica ⁽¹⁷⁾.

Os macrófagos possuem mecanismos antimicrobianos e por isso alguns organismos intracelulares necessitam evadir-se para sobreviver. Durante a leishmaniose interações microbidas entre parasita e células de defesa ocorrem em dois estágios. Primeiro, durante a fagocitose inicial de promastigotas o macrófago apresenta uma resposta oxidativa estimulada pelo evento fagocítico. Segundo, uma vez que a infecção pelas amastigotas foi estabelecida, a quiescência dos macrófagos pode ser ativada para potencialmente destruir a *Leishmania* intracelular ⁽¹⁹⁾. O interesse dos imunologistas em desvendar a susceptibilidade e/ou resistência a leishmaniose, estão nos estudos de infecção de macrófagos, infecção de *L. major* em camundongos resistentes e susceptíveis a infecção, definição de funções protetoras e não protetoras (citocinas, células Natural Killer, linfócitos Th1 e Th2, linfócitos B e certos antígenos) e capacidade de persistência no hospedeiro após a cura clínica. Para isto é extremamente importante conhecer os eventos que ocorrem inicialmente à infecção por

Leishmania, o recrutamento inicial de células para o sítio de inoculação do parasito e os mediadores inflamatórios envolvidos neste processo.

4. RECRUTAMENTO CELULAR

A resposta inicial, que tem início com a inoculação do parasito no sítio de infecção, pode direcionar a resposta imune local gerando diferentes formas clínicas da doença. A inflamação aguda pode ter destinos programados, incluindo progressão para fibrose crônica dos tecidos ou para a completa resolução da doença ⁽²⁰⁾. Do ponto de vista imunopatogênico, a *Leishmania* ao ser introduzida na pele, pela picada do inseto, é rapidamente fagocitada pelos macrófagos através da interação com receptores CR3 e de glicoproteínas e açúcares, tais como a GP63 e o LPG, que estão presentes na membrana do parasito. Uma vez dentro dos macrófagos os antígenos processados e apresentados às células T, na dependência da espécie de *Leishmania* e da suscetibilidade do hospedeiro, determinarão uma resposta do tipo Th1 ou Th2. Portanto, um perfil de citocinas tipo Th1, como IL-2, IFN- γ , IL-12, estará presente em quantidades suficientes para regular a resposta imunológica, ativar os macrófagos e controlar a infecção ainda na pele. Todavia, se quantidades excessivas de citocinas tipo Th2 são produzidas, tais como IL-4 e IL-10, haverá uma menor ativação macrofágica e conseqüentemente aparecerão as formas clínicas da doença ⁽²¹⁾.

Os neutrófilos são uma das primeiras células do sistema imunológico natural inato a infiltrar o tecido, seguindo um gradiente quimioatático, dos capilares periféricos para os tecidos, num processo denominado *diapedesis*. Estas substâncias quimiotáticas consistem em mediadores lipídicos endógenos, como os leucotrienos, e mediadores protéicos, incluindo as quimiocinas e citocinas ⁽²²⁾. Em locais de infecção os macrófagos que encontram microorganismos produzem citocinas que ativam as células endoteliais das vênulas a produzirem moléculas de adesão (selectinas, integrinas) e quimiocinas. Os neutrófilos, monócitos e linfócitos sanguíneos utilizam essencialmente os mesmos mecanismos para migrar para os locais de infecção. Os fagócitos têm importante papel na defesa inicial, e seu recrutamento para o tecido infectado pode ser um evento crucial no controle de infecções como as leishmanioses ⁽²³⁾.

Estudos experimentais demonstraram que a infecção por *Leishmania* aumenta a sobrevivência de polimorfonucleares (PMN), inibindo a apoptose espontânea. A atração inicial de PMN para o sítio de infecção pode estar associada com o desenvolvimento de doença

promovida por resposta Th2 em camundongos susceptíveis a *L. major* ⁽²⁴⁾. O mecanismo do recrutamento inicial de PMN para o sítio de infecção não é bem compreendido. Tem sido demonstrado que promastigotas de *Leishmania* liberam fatores quimiotáticos solúveis que atraem PMN humanos, mas não células natural killer (NK) ou macrófagos. Além do mais, foi demonstrado que o contato com *Leishmania* induz a liberação de IL-8 por PMN, mas inibe a capacidade de PMN em produzir a quimiocina IP-10 (molécula associada com a atração e ativação de Ly Th1)⁽²⁵⁾. As células NK têm papel importante na defesa do organismo contra a infecção por *Leishmania*. Na fase inicial da infecção, a ativação dessas células com a produção de IFN- γ , promove o efeito protetor da resposta Th1 mediada por imunidade celular ⁽²⁶⁾.

O recrutamento celular na fase inicial da infecção por *Leishmania* é crucial no direcionamento da resposta imunológica do hospedeiro. Nesta fase, mediadores pró-inflamatórios possuem papel essencial no controle ou na progressão da doença. No entanto, existem poucos estudos mostrando a participação de tais imunomoduladores na fase inicial da infecção por *Leishmania*.

5. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS:

As citocinas para desempenharem suas funções dependem da ligação com receptores específicos na membrana celular. Normalmente, há a necessidade da ação de mais de uma citocina para o desenvolvimento de uma resposta imune, indicando que elas atuam em conjunto, formando uma rede complexa, na qual a produção de uma citocina influenciará a produção ou a resposta de outras.

A resolução da inflamação é acompanhada pela atividade de mediadores predominantes no exsudato. Inicialmente, mediadores, como as prostaglandinas e leucotrienos são gerados, ativando e amplificando sinais cardinais da inflamação ⁽²⁸⁾. Células T exercem atividade anti-leishmania através da produção de linfocinas como o TNF α e IFN γ ⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾⁽³¹⁾⁽³²⁾. Em modelos de infecção experimental, a incapacidade de controlar a doença correlaciona-se com defeitos na produção de INF- γ pelas células T e na falha em ativar macrófagos para destruir amastigotas intracelulares através de TNF- α , reativos do oxigênio (ROI) e óxido nítrico (NO)⁽³³⁾. Em resposta ao sinal iniciado pela ativação destes fatores, células infectadas produzem moléculas microbicidas, como os intermediários reativos de oxigênio (ROI) e óxido nítrico (NO) ⁽³⁴⁾.

O principal mecanismo de morte para as leishmânias, como também para outros parasitas intracelulares, depende da indução da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) com a consequente produção de óxido nítrico. Muitos estudos têm mostrado que citocinas da resposta Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-18) induzem a expressão de NOS⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾. Contrariamente, citocinas Th2 (IL-14, IL-13 e IL-10) diminuem a atividade leishmanicida de macrófagos humanos e de camundongos devido à baixa regulação da expressão de NOS⁽³⁷⁾.

Estes dados revelam a importância dos mediadores pró-inflamatórios no direcionamento do tipo de resposta celular frente à leishmaniose. Será abordado o papel de alguns dos mais importantes mediadores pró-inflamatórios e sua função na resposta a infecção por *Leishmania*.

5.1 Fator de necrose tumoral (TNF- α). O fator de necrose tumoral faz parte do grupo das citocinas que estimulam a reação de fase aguda. O TNF- α causa a morte apoptótica da célula e ainda relaciona-se com a inflamação, proliferação e diferenciação celular, sendo que seu papel mais importante é a regulação das células envolvidas na fase inicial do processo inflamatório. O TNF- α é produzido por diferentes células da linhagem monocítica/macrofágica, em resposta a determinados estímulos tóxico-infecciosos, induzindo a ativação e a estimulação celular, modulando mediadores inflamatórios, enzimas, proteínas de fase aguda, e ainda outras citocinas como as interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8⁽³⁸⁾. Uma vez liberado nos tecidos ou na circulação, o TNF- α age sobre os neutrófilos aumentando à atividade fagocítica, a citotoxicidade e a produção do ânion superóxido e de H₂O₂, além de estimular a degranulação e a aderência dessas células ao endotélio⁽³⁸⁾. Ativa a fosfolipase A₂ e desencadeia a produção de fator ativador de plaquetas (PAF), aumenta a síntese de catecolaminas, induz a febre e a expressão de antígenos de superfície das células endoteliais⁽³⁹⁾.

O locus gênico do fator de necrose tumoral, incluindo os genes que codificam o TNF- α e TNF- β , vem sendo associado com inúmeras doenças, incluindo malária e leishmaniose. Foi demonstrado que o TNF- α pode mediar proteção inicial em modelos experimentais murinos como leishmaniose cutânea⁽³²⁾. Liew & Millott (40), mostraram que a atividade leishmanicida do TNF- α está diretamente relacionada com os níveis de nitrato (NO₂⁻) no sobrenadante de culturas de macrófagos murinos incubados com *Leishmania major*. Neste mesmo estudo, relataram que o TNF- α , na presença de LPS, induz atividade leishmanicida de macrófagos e a produção de NO. Em macrófagos murinos, a atividade da NOS é induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS), ou por citocinas como IFN- γ e TNF- α . O fator de necrose tumoral- α

tem mostrado ser o maior modulador da produção de NO por macrófagos infectados com *T. cruzi*⁽⁴¹⁾.

5.2 Interleucina 8 (IL-8). A interleucina 8 é produzida por uma enorme variedade de células (monócitos, linfócitos, células do endotélio ou epitélio, fibroblastos) em resposta a diferentes estímulos como o lipopolissacarídeo de bacilos gram-negativos e outras citocinas (TNF- α , IL1- β). A IL-8 é um potente quimiotático e ativador de neutrófilos. A infecção de monócitos humanos *in vitro* com *L. major*, na primeira hora de infecção, mostra grande produção de fatores quimiotáticos por monócitos e PMN, principalmente de IL-8 e MCAF (fator ativador quimiotático de monócito). A ativação seletiva de monócitos pela produção de quimiocinas sugere mecanismos de recrutamento celular durante o primeiro estágio de infecção pelo parasito⁽⁴⁾.

Peruhype-Magalhães et al. (42) mostraram aumento nos níveis plasmáticos de IL-8 em pacientes com leishmaniose visceral ativa, mostrando que a migração de diferentes subpopulações de leucócitos no desenvolvimento da resposta inflamatória na doença ativa pode ser devido à produção desta quimiocina. A IL-8, além de ser quimiotática para neutrófilos e participar da ativação de outras citocinas, ela também tem sido associada com a função anti-apoptótica de neutrófilos induzida pela *Leishmania*. A indução de apoptose tanto na resposta imune inata como na adaptativa parece ser uma maneira de escape da defesa antimicrobiana do hospedeiro. Patógenos como *Escherichia coli*⁽⁴³⁾ e *Cândida albicans*⁽⁴⁴⁾ encontraram uma forma de induzir a apoptose de PMN. Em contraste, a inibição da apoptose de neutrófilos por patógenos intracelulares como o *Toxoplasma*⁽⁴⁵⁾ e a *Theileria*⁽⁴⁶⁾ podem conferir um “ninho”, uma maneira de driblar o sistema mediado por células e prolongar sua vida. A produção aumentada de IL-8 durante a fase inicial da infecção por *Leishmania* pode ser um dos mecanismos de ação usado pelo protozoário para inibir a apoptose espontânea de PMN. Os mecanismos moleculares que inibem o processo de apoptose ainda não é bem conhecido, no entanto vem sendo demonstrado que a *L. major* pode, após ser fagocitada por PMN, sobreviver intracelularmente nestas células⁽⁴⁷⁾, e que a IL-8 tem um papel importante nesta função⁽⁴⁸⁾.

5.3 Reativos do Oxigênio (ROS). Durante a respiração mitocondrial, várias espécies reativas do oxigênio (ROS), principalmente o ânion superóxido (O_2^-), são formadas⁽⁴⁹⁾. Baixas concentrações de ROS estão geralmente presentes nas células e parecem estar implicadas em processos fisiológicos. Contudo, a superprodução de intermediários tóxicos do oxigênio pode danificar proteínas, lipídios e DNA, os quais eventualmente estão ligados com a morte

programada de células ou necrose celular ⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾. Estudos têm demonstrado que a estimulação por ligantes em células não fagocíticas resulta no aumento intracelular de espécies reativas do oxigênio (ROS). Este fenômeno vem sendo observado em uma grande variedade de células e é estimulado por diversos ligantes, incluindo citocinas ⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾. Nas células fagocitárias, a proteína GTP-ligante Rac2 parece ter um papel importante na função como oxidase ⁽⁵⁴⁾. Similarmente, o requerimento de GTPases, incluindo Ras e Rac1, tem sido mostrado pela geração de ROS seguido pela estimulação por citocinas e fatores de crescimento ⁽⁵⁵⁾. Os reativos de oxigênio podem participar de alguns aspectos da morte celular programada. Neste sentido, está sendo observada que a estimulação com o ligante Fas resulta em apoptose através da geração de O_2^- ⁽⁵⁶⁾.

Promastigotas de *Leishmania* são sensíveis a morte quando expostas ao superóxido (O_2^-), e ao radical hidroxil (-OH) gerado a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾. Dois importantes oxidantes derivados de macrófagos têm sido identificados como moléculas essenciais no controle da infecção por *Leishmania*. Durante o primeiro estágio da infecção é produzido superóxido (O_2^-) como parte do produto respiratório de macrófagos humanos e murinos em resposta a fagocitose ⁽⁵⁹⁾⁽⁶⁰⁾. O segundo oxidante anti-leishmania produzido por macrófagos em resposta ao TNF- α e IFN- γ é o NO, comentado anteriormente, mais efetivo contra amastigotas intracelulares. A produção de O_2^- é catalisada por NADPH oxidase, através da transferência de elétron do NADPH para a molécula de oxigênio. Macrófagos contendo amastigotas intracelulares de *L. donovani* possuem respostas antimicrobianas danificadas, assim como a sinalização e expressão de marcadores na superfície celular ⁽⁶¹⁾. Isto pode ser explicado, em parte, pela ineficiente mobilização de Ca^{+2} e a danificação da fosforilação da proteína quinase C (PKC), eventos essenciais para ativação da NADPH oxidases e da fagocitose ⁽⁶²⁾. Isto pode explicar a baixa produção de reativo de oxigênio em células infectadas, uma vez que, foi visto que a produção de O_2^- depende da ativação da NADPH oxidase. A superóxido dismutase (SOD) é responsável por transformar O_2^- em H_2O_2 e O_2 , e a catalase e a glutathione peroxidase é responsável pela conversão de H_2O_2 em água e oxigênio molecular ⁽⁶³⁾. Paramchuk et al. (64), relataram que a superexpressão de SOD em parasitas, como a *L. chagasi*, confere reforço na proteção contra a geração de radicais livres do oxigênio.

5.4 Óxido nítrico (NO). O óxido nítrico é um radical livre sintetizado endogenamente por vários tipos celulares. Apresenta um amplo espectro de ações fisiológicas entre as quais, ação parácrina no relaxamento da musculatura lisa, atividade neurotransmissora em vários sistemas

e envolvimento no processo inflamatório ⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁶⁾. O NO é sintetizado pela conversão de L-arginina em L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) ⁽⁶⁷⁾. O iNOS, forma induzível, é a molécula que relacionada com o processo inflamatório ⁽⁶⁸⁾.

O NO gerado pela ativação de macrófagos murinos, é citotático ou citotóxico para uma variedade de patógenos, incluindo *Leishmania major* ⁽⁶⁹⁾. A supressão da produção de NO durante a infecção por parasitas é comumente encontrada ⁽⁷⁰⁾. O NO regula a resposta inflamatória e age como molécula efetora da citotoxicidade de macrófagos invadidos por parasitas. Ao mesmo tempo, se produzido em excesso pode ser citotóxico não apenas para os parasitos invasores, mas pode atacar também células normais do próprio organismo. O balanço entre NO e citocinas é crucial na determinação do efeito do NO na defesa do organismo, pois a indução da expressão de iNOS é preferencialmente induzida por citocinas pró-inflamatórias. Os parasitos, em indivíduos resistentes, induzem a produção de citocinas, como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , e os produtos de patógenos como os glicofosfatidilinositol (GPI), podem estimular a expressão de iNOS em células infectadas ⁽⁷¹⁾. Estes achados sugerem que o NO é parte integral da cascata de sinalização pela IL-12 e essencial para as funções da IL-12 na resposta imune inata. A rápida produção de NO, em resposta aos parasitos, pode capacitar a célula NK a responder a IL-12 e IFN- α/β levando a liberação de INF- γ e a citotoxicidade ⁽⁷⁰⁾. Assreuy et al. (34), mostraram que a geração de NO por macrófagos murinos é essencial na morte da *L. major*. Os autores também mostraram que o tratamento com superóxido dismutase (SOD) e catalase proporcionou aumento nos níveis de NO₂⁻, e aumento na tendência de morte de *L. major*. Existe diferença qualitativa entre macrófagos murinos e humanos, no entanto, os resultados obtidos mostraram claramente o envolvimento do NO na atividade citotóxica de macrófagos frente à infecção parasitária.

5.5 Leucotrineos (LTs). Os leucotrienos pertencem a classe dos eicosanóides, derivados do metabolismo do ácido araquidônico pela ação da 5-lipoxigenase e outras enzimas. Possui várias atividades pró-inflamatórias, incluindo aumento da migração celular e broncoconstrição ⁽²⁸⁾. Estes compostos foram assim chamados por terem sido identificados em leucócitos e por possuírem um grupamento trieno na sua estrutura. São formados a partir de um hidroperóxido (5-HPETE) o qual é transformado em LTA₄ com a formação de um grupamento epóxido (oxigênio ligando os carbonos 5 e 6). Este é instável e pode sofrer hidrólise enzimática gerando o LTB₄ ou então receber um resíduo de glutatona gerando o leucotrieno C₄ (LTC₄).

Ford-Hutchinson et al. (72), demonstraram que o LTB₄ tem capacidade quimiotática para neutrófilos. Além da atividade quimiotática, o LTB₄ também propicia aumento no número de polimorfonucleares em tecidos por inibir a apoptose⁽⁷³⁾. O LTB₄ estimula várias funções de leucócitos, incluindo aderência, fagocitose⁽⁷⁴⁾, secreção de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas lisosomais⁽⁷⁵⁾. A síntese de quimiocinas precisa de algumas horas para ser iniciada (devido à ativação transcripcional), já o LTB₄ pode ser formado dentro de segundos a minutos após a ativação celular⁽⁷⁶⁾, pois as enzimas necessárias para sua síntese são expressas constitutivamente. Os trabalhos realizados por Goodarzi et al. (77) e Tager et al. (78) mostram claramente que o LTB₄ está envolvido no recrutamento inicial tanto de células que participam da resposta imunológica inata como da adaptativa *in vivo*.

In vitro, microorganismos são capazes de induzir a síntese de LTs pelos macrófagos e PMNs⁽⁷⁹⁾⁽⁸⁰⁾⁽⁷⁴⁾. O LTB₄ exógeno aumenta a fagocitose/morte de bactérias por fagócitos *in vitro*. Considerando que o LTB₄ promove a migração de leucócitos, fagocitose e secreção de oxidantes e óxido nítrico⁽⁸¹⁾⁽⁸²⁾ seria esperado que facilitasse a eliminação dos patógenos. A adição de LTB₄ aumenta a capacidade microbicida de macrófagos em modelos de infecção por *T. cruzi*⁽⁸³⁾⁽⁸¹⁾. Em outro trabalho, Wirth & Kierszenbaum (84) relataram que tanto LTB₄ quanto LTC₄ aumentam a fagocitose e a morte de *Trypanosoma cruzi* de macrófagos peritoneais. A morte de *Toxoplasma gondii* por monócitos humanos mediada por IFN- γ mostra-se dependente da biosíntese de leucotrienos⁽⁸⁵⁾. Além do mais, Talvani et al. (81) mostraram que durante a infecção com *T. cruzi*, o LTB₄ é capaz de promover a liberação de NO e morte do parasito. Serezani et al. (86) mostraram que após infecção com *Leishmania amazonensis*, macrófagos de camundongos resistentes produziam altos níveis de LTB₄, quando comparado com a produção por macrófagos de camundongos susceptíveis e o efeito era mediado pelo aumento da expressão de iNOS e a geração de NO. Assim os LTs poderiam ser mediadores relevantes no controle da infecção por *Leishmania* e poderiam ser clinicamente importantes como metas para a terapia com imunomoduladores.

5.6 Prostaglandinas (PGE). As prostaglandinas (assim como os leucotrienos) têm sua síntese desencadeada por estímulos nas membranas celulares, que podem ser de natureza fisiológica, farmacológica ou patológica. Elas são mediadores e possuem uma série de efeitos fisiológicos. São sintetizadas a partir do ácido araquidônico por ação de enzimas como a ciclooxigenase (COX), o citocromo P-450, peroxidases, etc. A via pela qual o ácido araquidônico é metabolizado a eicosanóides depende do tecido, do estímulo, da presença de indutores ou

inibidores endógenos e farmacológicos, entre outros. Este derivado do ácido araquidônico tem sido descrito como um regulador negativo, capaz de inibir várias atividades de macrófagos, incluindo a citotoxicidade de células tumorais, fator de inibição da resposta para migração celular, expressão do TNF- α , IL-1, lipoproteína lípase ⁽⁸⁷⁾⁽⁸⁸⁾.

Guimarães et al. (89), investigando o papel da IL-4 e da PGE₂ na infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c, observaram que estes mediadores são fatores de susceptibilidade à infecção por esta espécie de *Leishmania*. Mostraram também que o tratamento com indometacina, um inibidor da síntese de PGE₂, diminuía o tamanho das lesões e a carga parasitária de camundongos BALB/c IL-4 (+/+) quando comparado com o grupo controle. Em estudo *in vitro*, Soares et al. (90) mostraram produção mais elevada de PGE₂ por células T, em camundongos (BALB/c) susceptíveis a infecção por *L. major*, quando comparada com os níveis produzidos por camundongos resistentes (CBA), sugerindo que a produção aumentada de tal molécula por camundongos BALB/c é, em parte, responsável pelo desenvolvimento de resposta Th2 nestes animais. O exato papel da PGE₂ na leishmaniose ainda não está esclarecido, no entanto, ela parece ter papel fundamental na susceptibilidade a infecção por *L. major* ⁽⁹¹⁾. Estes achados podem indicar que a PGE₂ tem a capacidade de estimular diretamente ou indiretamente a produção de citocinas antiinflamatórias, contribuindo para a desativação de macrófagos e a disseminação parasitária.

Os mediadores inflamatórios citados fazem parte de um grupo de agentes imunomoduladores que atuam durante a fase inicial da resposta inflamatória durante a infecção por *Leishmania*. É importante salientar que eles atuam em conjunto, e que o entendimento de sua função individual pode auxiliar na compreensão da complexa relação entre eles e da susceptibilidade e ou resistência do hospedeiro frente a infecção com as várias espécies de *Leishmania*.

6. OBJETIVOS:

6.1 Objetivo principal:

Pretendemos verificar se *in vivo*, pela inoculação de *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis*, ocorre modulação do recrutamento celular durante a fase inicial de infecção em camundongos BALB/c, e ainda, verificar a produção de imunomoduladores como: TNF- α , PGE₂ e NO₂, para tentar estabelecer uma correlação espécie-específica de *Leishmania* com a secreção de mediadores.

6.2 Objetivos específicos:

Estabelecer relação entre a migração celular e:

- a) a produção de TNF- α , NO e PGE₂;
- b) a infecção experimental por *Leishmania (Viannia) braziliensis*;
- c) e a infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Gontijo B & Carvalho LR. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.36, p. 71-80, 2003.
2. Silveira TGV, Teodoro U, Arraes SMAA, Bertolini DA, Lonardonni MCV, Ramos M, Sobrinho NA, Roberto ACBS, Ishikawa E & Shaw J. Observações sobre o diagnóstico laboratorial de leishmaniose cutânea e sua relação com a epidemiologia da doença no Estado do Paraná, sul do Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.32, n.4, p.413-23, 1999.
3. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde; 2006. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmaniose_2006.pdf - acessado em maio, 26/2008.
4. Badolato R, Sacks DL, Savoia D, Musso T. *Leishmania major*: Infection of Human Monocytes Induces Expression of IL-8 and MCAF. Experimental Parasitology, v.82, p.21-26, 1996.
5. Rodriguez-Soza M, Rosas LE, Terrazas LI, Lu B, Gerard C & Satoskar AR. CC chemokine receptor 1 enhances susceptibility to *Leishmania major* during early phase of infection. Immunology and Cell Biology, v. 81, p. 114-120, 2003.
6. Anjili CO, Mbatia PA, Mwangi RW, Githure JI, Olobo JO, Robert LL & Koech DK. The chemotatic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Díptera: Psychididae) salivary gland lysates to murine monocytes. Acta Tropica, v. 60, p. 97-100, 1995.
7. Panaro MA, Puccini V, Faliero SM, Marzio R, Marangi A, Lisi S & Brandonisio O. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan (LPG) inhibits respiratory burst and chemotaxis of dog phagocytes. New Microbiology, v.19, n.2, p.107-112, 1996.
8. Matte C & Olivier M. *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. The Journal of Infectious Diseases, v. 185, p. 673-681, 2002.

9. Issekutz TB. In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1 alpha, TNF-alpha, IFN-gamma, and C5a utilizes LFA-1, Mac-1, and VLA-4: the relative importance of each integrin. *Journal Immunology*, v.154, p. 6533-6540, 1995.
10. Le Borgne M, Etchart N, Goubier A. Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. *Immunity*, v. 24, p. 191-201, 2006.
11. León B & Ardavín C. Monocyte migration to inflamed skin and lymphonodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1. *Blood*, v. 111, p. 3126-3130, 2008.
12. Lainson R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina*, v.11, p. 29-40, 1997.
13. Camargo LMA & Barcinski MA Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura*, v.1, p. 34-37, 2003.
14. Pessôa SM. *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.
15. Silveira FT, Lainson R, Brito AC, Oliveira MRF, Paes MG, Souza AAA, Silva BM. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão RNQ. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*. Belém: Editora CEJUP; 1997.
16. Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil (As Leishmanioses Tegumentares). *The International Journal of Biological Markers*, v.63, p. 81-105, 1992.
17. Ministério da Saúde do Brasil. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília; 2000.
18. Grimaldi J.G., Tesh R.B, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.41, p.687-725, 1989.
19. Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jerônimo SMB, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *The American Association of Immunologists*, v.167, p.893-901, 2001.
20. Majno G & Joris I. *Cells, Tissues, and Disease: Principle of General Pathology*. Oxford University, New York, 2004.
21. Ferreira AW & Ávila SLM. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*, 2º ed., 2001.
22. Luster AD, Alon R & von Adrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature Immunology*, v. 6, p. 1182-1190, 2005.

23. Monteiro MC, LIMA HC, SOUZA AAA, TITUS RG, ROMÃO PRT, CUNHA FQ. Effect of *Lutzomyia Longipalpis* salivary gland extracts on leukocyte migration induced by *Leishmania major*. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 76, p. 88-94, 2007.
24. Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, Milon G, Louis JA. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. Journal Immunology, v.165, p.2628-2636, 2000.
25. van Zandbergen G., Hermann N., Laufs H., Solbach W., Laskay T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. Infection and Immunity, v. 70, n.8, p.4177-4184, 2002.
26. Laskay T, Rollinghoff M, Solbach W. Natural Killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. European Journal of Immunology, v.23, p. 2237-2241, 1993.
27. Collins T. Inflamação aguda e crônica. In: Robbins. Patologia estrutural e funcional. 6a ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, p. 45-78, 2000.
28. Serhan CN, Chinag N, van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nature Publishing Group, v.8, p. 349-361, 2008.
29. Murray HW, Stern JJ, Welte K, Rubin BY, Carriero SM, Nathan CF. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon- γ , tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon- γ . The Journal of Immunology, v.138, p.2290-2297, 1987.
30. Squires KE, Schreiber RD, McElrath JJ, Rubin BY, Anderson SL, Murray HW. Experimental visceral leishmaniasis: Role of endogenous interferon- γ in host defense and tissue granulomatous response. The Journal of Immunology, v.143, p.4244-4249, 1989.
31. Liew FY. & Millott S. Tumor necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. TNF- α -induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. Immunology, v.71, p.556-559, 1990.
32. Titus RG, Sherry B, Cerami A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. The Journal of Experimental Medicine, v.170, p.2097-2101, 1989.
33. Bodgan C, Gessner A, Solbach W, Rollinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. Curr Opin Immunology, v.8, p. 517-525, 1996; Reiner, SL;

- LOCKSLEY, RM. The regulation of immunity to leishmania major. Annual Review of Immunology, v.13, p.151-177, 1995.
34. Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. European Journal of Immunology, v.24, p.672-676, 1994.
35. Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie QW, Nathan C. Traces of bacterial lipopolysaccharide suppress IFN-gamma-induced nitric oxide synthase gene expression in primary mouse macrophages. Journal Immunology, v.151, p. 301-309, 1993.
36. Liew FY & O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis. Advances in Parasitology, v.32, p. 161-259, 1993.
37. Vouldoukis I, Becherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debre P, Mazier D, Mossalayi MD. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. European Journal of Immunology, v.27, p. 860-865, 1997.
38. Beyaert R, Fiers W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: MIRE-SLUIS, A., THORPE, R. (Eds). *Citokines*. California: Academic, p.335-360, 1998.
39. Barton MH, Collatos C, Moore JN. Endotoxin induced expression of tumor necrosis factor, tissue factor and plasminogen activator inhibitor activity by peritoneal macrophages. Equine Veterinary Journal, v.28, p.382-389, 1996.
40. Liew FY. & Millott S. Tumor necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. TNF- α -induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. Immunology, v.71, p.556-559, 1990
41. Munoz-Fernandes MA, Fernandez MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and INF-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. Immunology, v. 33, p.35-40, 1992.
42. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva L De A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, Figueiredo RM, Guimarães-Carvalho SF, Ferrari TCA, Van Weyenbergh J, Correa-Oliveira R. Mixed Inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- γ and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- α + monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. Clinical and Experimental Immunology, v.146, p.124-132, 2006.
43. Watson RW, Redmond HP, Wang JH, Condron C, Bouchier-Hayes D. Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. The Journal of Immunology, v.15, p.3986, 1996.

44. Rotstein D, Parodo J, Taneja R, Marshall JC. Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. *Shock*, v. 14, p.278, 2000.
45. Nash, PB, Purner MB, Leon RP, Clarke P, Duke RC, Curiel TJ. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *The Journal of Immunology*, v.160, p.1824, 1998.
46. Heussler VT, Machado J, Fernandez Jr PC, Botteron C, Chen CG, Pearse MJ, Dobbelaere DA. The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.96, p.7312, 1999.
47. Laufs H, Muller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection and Immunity*, v.70, p.826, 2002.
48. Aga E, Katschinski DM, Zandbergen GV, [Laufs H](#), [Hansen B](#), [Müller K](#), [Solbach W](#), [Laskay T](#). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, v.169, p.898–905, 2002.
49. Brookes OS. Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: an odd couple. [Free Radical Biology & Medicine](#), v.38, n.1, p.12, 2005.
50. Samali A, Nordgren H, Zhivotovsky B, Peterson E, Orrenius S. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.255, n.1, p.6-11, 1999.
51. Tiwari BS, Belenghi B, Levine A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. [Annual Review of Plant Physiology](#), v.128, n.4, p.1271-1281, 2002.
52. Meir B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, Habermehl GG. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor- α . *The Biochemical Journal*, v.263, p.539-545, 1989.
53. Lo YYC & Cruz TF. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *The Journal of biological chemistry*, v.270, p.11727-11730, 1995.
54. Bokoch GM. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, v.6, p.212-218, 1994.
55. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T. regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblastic by rac1. *The Biochemical Journal*, v.318, p.379-382, 1996.

56. Gulbins E, Brener B, Schlottmann K, Welsch J, Heinle H, Koppenhoefer U, Linderkamp O, Coggeshall M, Lang F. Fas-induced programmed cell death is mediated by a Ras-regulated O_2^- synthesis. *Immunology*, v.89, p.205-212, 1996.
57. Zarley JH, Britigan BE, Wilson ME. Hydrogen peroxide mediated toxicity for *Leishmania donovani chagasi* promastigotes: role of hydroxyl radical and protection by heat shock. *The Journal of Clinical Investigation*, v.88, p.1511, 1991.
58. Miller MA, McGowan SE, Gantt KR, Champions M, Novick S, Andersen KA, Bacchi CJ, Yarlett N, Britigan BE, Wilson ME. Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. *The Journal of Biological Chemistry*, v.275, p.33883, 2000.
59. Murray HW. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *The Journal of Immunology*, v.129, p.351, 1982.
60. Channon JY, Roberts MB, Blackwell JM. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology*, v.53, p.345, 1984.
61. Reiner NE, Ng W, Mc Máster R. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *The Journal of Immunology*, v.138, p.1926, 1987.
62. Olivier M, Brownsey RW, Reiner. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.89, p.7481, 1992.
63. Alzate JF, Arias AA, Moreno-Mateos D, Álvarez-Barrientos A, Jiménez-Ruiz A. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.152, p.192-202, 2007.
64. Paramchuk WJ, Ismail SO, Bhatia A, Gedamu L. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 90, p.203-221, 1997.
65. Ignarro LJ & Buga GM. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.84, p.9265-9269, 1987.
66. Palmer RMJ, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 327, p.524-526, 1987.

67. Marín J & Rodríguez-Martínez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacology & Therapeutics*, v.75, p.111-134, 1997.
68. Salas A, Gironella M, Salas A, Soriano A, Sans M, Iovanna J, Piqué JM, Panès J. Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Laboratory Investigation*, v.82, p. 597-607, 2002.
69. Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Becherel P, Debre P, Moncada S, Mossalayi MD. The Killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by oxid nitric induced after ligation of the FcεRII/CD23 surface antigen. *Immunology*, v.92, p.7804-7808, 1995.
70. Brunet, LR. Nitric Oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology*, v.1, p.1457-1467, 2001.
71. Almeida IC, Camargo MM, Procopio DO, Silva LS, Mehlert A, Travassos LR. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *The EMBO journal*, v.19, p. 1476-1485, 2000.
72. Ford-Hutchinson AW, Bray WA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*, v.286, n.5770, p.264-265, 1980.
73. Hebert MJ, Takano T, Holthöfer H, Brady HR. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *The Journal of Immunology*, v.157, n.7, p.3105-15, 1996.
74. Mancuso P, Standiford TJ, Marshall T, Peters-Golden M. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, v.66, n.11, p.5140-6, 1998.
75. Serhan CN, Radin A, Smolen JE, Korchak H, Samuelsson B, Weissmann G. Leukotriene B4 is a complete secretagogue in human neutrophils: a kinetic analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.107, p.1006-12, 1982.
76. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, v.294, n.5548, p.1871-5, 2001.
77. [Goodarzi K](#), [Goodarzi M](#), [Tager AM](#), [Luster AD](#), [von Andrian UH](#). Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nature Immunology*, v.4, n.10, p.965-973, 2003.
78. [Tager AM](#), [Bromley SK](#), [Medoff BD](#), [Islam SA](#), [Bercury SD](#), [Friedrich EB](#), [Carafone AD](#), [Gerszten RE](#), [Luster AD](#). Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nature Immunology*, v.4, n.10, p.982-990, 2003.

79. Claesson HE, Lindgren JA, Gustafsson B. Opsonized bacteria stimulate leukotriene synthesis in human leukocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.836, n.3, p.361-7, 1985.
80. Bailie MB, Standiford TJ, Laichalk LL, Coffey MJ, Strieter R, Peters-Golden M. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumonia* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *The Journal of Immunology*, v.157, n.12, p.5221-4, 1996.
81. Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, Teixeira MM. Leukotriene B4 induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi* - infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infection and immunity*, v.70, p.4247-4253, 2002.
82. Vivancos M & Moreno JJ. Role of Ca(2+)-independent phospholipase A(2) and cyclooxygenase/lipoxygenase pathways in the nitric oxide production by murine macrophages stimulated by lipopolysaccharides. *Nitric Oxide*, v.6, p.255-262, 2002.
83. Wirth JJ & Kierszenbaum F. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*, v.134, p.1989-1983, 1985.
84. Wirth JJ & Kierszenbaum F. Effects of leukotriene C4 on macrophage association with and intracellular fate of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.15, p.1-10, 1985.
85. Yong EC, Chi EY, Henderson WR Jr. *Toxoplasma gondii* alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon-induced antitoxoplasma activity. *The Journal of Experimental Medicine*, v.180, p.1637-1648, 1994.
86. Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S. Leukotrienes Are Essential for the Control of *Leishmania amazonensis* Infection and Contribute to Strain Variation in Susceptibility. *The Journal of Immunology*, v.177, p.3201-3208, 2006.
87. Snyder DS, Belier DI, Unanue ER. Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. *Nature*, v.299, p.163-165, 1982.
88. Desanctis JB, Varesio L, Radzioch, D. Prostaglandins inhibit lipoprotein lipase gene expression in macrophages. *Immunology*, v.81, p.605-610, 1994.
89. Guimarães ET, Santos LA, Santos RR, Teixeira MM, Santos WLC, Soares MBP. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes and Infection*, v.8, p.1219-1226, 2006.

90. Soares MBP, John RD, Titus RG. An In Vitro Model for Infection with *Leishmania major* That Mimics the Immune Response in Mice. *Infection and Immunity*, v.65, n.7, p. 2837–2845, 1997.
91. Farrell JP & Kirkpatrick CE. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *The Journal of Immunology*, v.38, p.902–907, 1987.

CAPÍTULO II

**Artigo 1: “CELL MIGRATION INDUCED BY *Leishmania (Leishmania) amazonensis*,
Leishmania (Leishmania) major AND *Leishmania (Viannia) braziliensis* INTO THE
PERITONEAL CAVITY OF BALB/C MICE.”**

(Publicado na revista “The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases”- V.16, n.1, p.170-177; 2010)

CELL MIGRATION INDUCED BY *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* INTO THE PERITONEAL CAVITY OF BALB/C MICE

ABSTRACT: In american cutaneous leishmaniasis, the initial phase of infection is characterized by recruitment of neutrophils and monocytes. The migration of these cells in response to *Leishmania*, in the peritoneum of animals, remain undefined. The objective of this study was investigate the cell migration to the peritoneum of BALB/c mice after infection by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) major*. To do this, *Leishmania* spp were intraperitoneally inoculated in five groups with six animals and the cell migration was investigated 0, 3, 6, 12, 24 e 48 hours after infection. Differential cell counts were done with the staining kit, showed a percentage of polymorphonuclears, which was higher than that mononuclears in three species studied. The total cell count showed peak migration for *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) major* at six hours, and for *L. (V.) braziliensis* at 12 hours. These results suggest that factors liberated from different types of cells are probably acting in the attraction of PMNs, with the peak migration probably being dependent on the species of the *Leishmania* inoculated and on the host.

KEY WORDS: BALB/c mice, *Leishmania* spp., American cutaneous leishmaniasis.

CONFLICTS OF INTEREST: There is no conflict.

INTRODUCTION

In the initial phase of infection, american cutaneous leishmaniasis (ACL) lesions are characterized by the recruitment of blood neutrophils and monocytes (1). Leucocytes play an important role in host defense, and their recruitment to infected tissue might be a crucial event in the control of infections such as leishmaniasis. Peters et al. (2) reported that neutrophils are rapidly recruited to sites of sand fly bite, where they fagocytose *L. major* parasites. While the saliva of the transmitter insect increases mouse macrophage chemotaxis (3, 4), lipophosphoglycan (LPG), the principal component of the surface of *Leishmania*, reduces, highlighting the capacity of this molecule to prejudice phagocyte responses (5). Chen et al. (6) reported that neutrophils may play an important role in the development of resistance to *T. cruzi* infection in BALB/c mice, yet neutrophil depletion reduces the degree of infection by *T. cruzi* in C57BL/6 mice, possibly through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different

directions. In other studies (7, 8) showed that neutrophils may contribute to the immunopathology in experimental cerebral malaria. These examples show the paradox and complexity of the roles for neutrophils in the infections.

It is well known that the polymorphonuclears (PMNs) are the first line of defense against infections and have a lifetime prolonged of approximately 6 to 10 hours in the blood stream, after which they undergo spontaneous apoptosis (9). According to Aga et al. (10), these cells have their survival time increased by the inhibition of apoptosis induced by *Leishmania* parasite, predisposing them to serve as hosts to the parasites in the initial phase of infection. Lima et al. (11) have already reported that neutrophils have a leishmanicidal activity by holding back the spread of the parasite at the beginning of the infection. However, the precise immunoregulatory role of PMNs infected with *Leishmania* is not completely understood. These findings document *in vitro* migration, however, in *in vivo* migration, in an air pouch model, the injection of *L. major* and *L. donovani* led to a rapid and transient accumulation of leucocytes (12). Although it seems ideal to use polymorphonuclear and mononuclear infiltrate in the lesional skin to examine the role of these cells, it is almost impossible to obtain enough cells from the local tissues for this purpose (13), then we propose to use *in vivo* migration of these cells in response to *Leishmania* spp in the peritoneum of mice.

The objective of this study was therefore to study the *in vivo* migration of polymorphonuclear and monocyte cells to the peritoneum of BALB/c mice in response the infection by *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) major*.

The procedures followed the regulations established by the Brazilian College of Animal Experimentation (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) and the study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Universidade Estadual de Maringá. The results were analyzed by a non-parametric ANOVA using the Bonferroni test

for multiple comparisons and t-tests, with Welch correction, for dual comparisons. “p” values below 0.05 were considered significant.

In the current study stationary-phase promastigotes (2×10^6 parasites in 0,1 mL of PBS) of *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272) and *L. (L.) major* (LV39) were intraperitoneally inoculated in six BALB/c mice (7 to 12 weeks old) per experimental group. At different times after intraperitoneal inoculation [0 (control), 3, 6, 12, 24, and 48 h], the animals were lethally anesthetized [80 mg/Kg of Ketamine plus 16 mg/Kg of Xylazine (14)], and the peritoneal contents were washed with a total of 5 mL of Hank’s solution to collect leukocytes of the exudates. Two experiments were performed in different days.

The viability of the cells obtained from the peritoneal exudate was verified by trypan blue exclusion (0.1%) and showed that the mean for the different times was 96%. Cellular differentiation between polymorphonuclear and mononuclear cells was performed microscopically in the smears on lamina stained with the Panotico staining kit (Laborclin, Paraná, Brazil). The percentage of polymorphonuclears that migrated to the peritoneum of the mice was greater than that of the mononuclears for the different *Leishmania* species and for the different times. For *L. (L.) major* was no statistical difference when compared with the control group after 3, 6 and 24 hours of infection. Statistical difference was observed to *L. (L.) amazonensis* in the times of 6, 12 and 24 hours. Already with *L. (V.) braziliensis* was observed statistical difference after 12 hours of infection. However, there was no significant difference among the three species of *Leishmania* evaluated (Table 1).

Table 1: Percentage of polymorphonuclears that migrated to the peritoneum of BALB/c mice intraperitoneally inoculated with *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) major* at different times after intraperitoneal inoculation.

	Polymorphonuclears (%; means)					
	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
<i>L.(L.) amazonensis</i>	82.5±6.72	91.5±1.06*	86.5±3.9**	86.5±3.18*	81.5±3.89**	64.0±7.78
<i>L. (V.) braziliensis</i>	78.0±9.19	89.5±1.06	88.5±3.2	86.0±8.49*	78.0±11.3	84.5±4.46
<i>L. (L.) major</i>	73.0±9.9	79.5±9.55	88.0±5.0*	85.0±0.0	82.5±3.89*	82.5±6.01

The values are means ± SEM and are representative of two separate experiments with six mice per group (each time period). *p <0.05 and **p <0,01 compared to control group (0h); (ANOVA followed by Bonferroni's t test).

Recruited cells were counted directly with Turk solution in a Neubauer chamber. A peak in cell migration into the peritoneal cavity of the mice inoculated with *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) major* was observed at 6 hours after inoculation, and at 12 hours after inoculation with *L. (V.) braziliensis*. When the time periods of 3, 6, 12, 24 and 48 hours were compared among the three *Leishmania* species, no statistically significant differences were found. When the controls (0 hour) were compared with the different time periods for *L. (L.) amazonensis*, statistical differences were observed for the times of 6 hours (39×10^6 células/mL), 12 hours (11×10^6 células/mL) and 24 hours (14×10^6 células/mL); for *L. (V.) braziliensis*, statistical differences were observed for the time period of 12 hours (18×10^6 células/mL); and for *L. (L.) major*, statistical differences were observed for the time periods of 3 hours (12×10^6 células/mL), 6 hours (12×10^6 células/mL) and 24 hours ($5,4 \times 10^6$ células/mL) (Table 2).

Table 2: Number of cells that migrated to the peritoneum of BALB/c mice intraperitoneally inoculated with *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) major* at different times v after intraperitoneal inoculation.

Parasite	Total cells (x 10 ⁶ ; means)					
	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
<i>L. (L.) amazonensis</i>	9.1±0.07	3.8±0.78	39±21.9*	11±4.1*	14±6.01*	12±0.71
<i>L. (V.) braziliensis</i>	9.8±0.03	1.8±0.05	6.8±0.08	18±0.46*	1.1±0.04	8.4±0.29
<i>L. (L.) major</i>	3.2±0.14	12±5.44*	12±7.78*	4.1±1.13	5.4±2.8*	15±1.34

The values are means ± SEM and are representative of two separate experiments with six mice per group (each time period). *p <0.05 compared to control group (0h); (ANOVA followed by Bonferroni's t test).

In the present study, the greater number of PMNs, compared to mononuclears, at the beginning of the infection is in agreement with the results obtained *in vitro* (15) using a chemotactic assay of human leucocytes. They are also in agreement with the results from the *in vivo* air pouch model obtained by Matte and Olivier (12), from the paw inoculation of animals (11) and into draining lymph nodes (16), in which it was reported that the PMNs had been found in large numbers in infiltrates in the lesion sites after inoculation with *L. (L.) major* in BALB/c mice.

The migration peaks could be related to the liberation of inflammatory factors at the site of infection, and direct the type of immune response from the host, as well the cellular diversity and accumulation may be associated to the pattern of expression of the chemokine genes (12). In the same way, Romani et al. (17) reported that the production of IL-10 or IL-12 by neutrophils in mice with candidiasis is associated to the development of a Th1 or Th2 response, respectively. The immune response to leishmaniasis can result in a polarization of a subpopulation of T lymphocytes, which leads to a different cell phenotype and results in immune protection or exacerbation of the disease (18). Furthermore, Tacchini-Cottier et al. (19) reported that the influx of neutrophils in the first 24 hours modifies the response of T cells, via production of IL-4, and the susceptibility to infection by *L. major*, developing a Th2

response. In addition, van Zandbergen et al. (15) demonstrated that *Leishmania* promastigotes induce the migration of PMNs by the liberation of *Leishmania* chemotactic factor (LCF), and that the co-incubation of *Leishmania* with PMNs inhibit the CXC chemokine interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), suggesting that *Leishmania* inhibits the activity of Th1 or NK cells and, consequently, interferes with the development of the protective immune response.

Matte and Olivier (12) reported that the inflammatory events of the leishmaniasis that occur at the inoculation site could reflect and direct the type of species-specific pathogenesis that will be developed later. Tacchini-Cottier et al. (19) suggested that the initial accumulation and persistence of PMNs could be linked to the possible immunoregulatory role of these cells, or even better, to the development of the Th2 response that is characteristic of mice susceptible to *L. major*. Furthermore, in resistant mice (C57BL/6), the percentage of neutrophils infected with *L. major* fell from 60% to less than 10%, 72 hours after infection, predisposing the mice to the development of the Th1 response. In the present study the peak at 6 hours coincided with that obtained by Matte and Olivier (12) in the air pouch model, after inoculation with *L. (L.) major*. It was therefore assumed that the largest PMN peak (at 6 hours) in BALB/c mice susceptible to *L. (L.) major* and *L. (L.) amazonensis*, corresponds to the shorter *Leishmania* retention time of the cells. Conversely, in this lineage of mice, which are resistant to *L. (V.) braziliensis*, the peak at 12 hours corresponds to the longer *Leishmania* retention time by the PMNs.

In conclusion, compared with others, these results suggest that factors liberated by different types of cells are acting in the attraction of cells, mainly polymorphonuclears, to the peritoneal exudate of BALB/c mice in the initial phase of infection, predisposing the animals to either susceptibility or resistance to the infection. The migration of a large number of cells to the site of infection, which occurs at 6 hours for *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) major* and

at 12 hours for *L. (V.) braziliensis*, suggests that the liberation of these factors is greater at these times and that they depend on the species of the parasite involved and on the immune response of the host.

REFERENCES

1. Badolato R, Sacks DL, Savoia D and Musso T. *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. *Exp. Parasitol.* 1996;82:21-6.
2. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN and Sacks D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 2008; 321:970-73.
3. Anjili CO, Mbatia PA, Mwangi RW, Githure JI, Olobo JOO, Robert LL and Koech DK. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Tropica.* 1995;60:97-100.
4. Zer R, Yaroslavski I, Rosen L and Warburg A. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int. J. Parasitol.* 2001;31:810-14.
5. Panaro MA, Puccini V, Faliero SM, Marzio R, Marangi A, Lisi S and Brandonisio O. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan (LPG) inhibits respiratory burst and chemotaxis of dog phagocytes. *New Microbiol.* 1996;19:107-12.
6. Chen L, Watanabe T, Watanabe H, Sendo F. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. *Eur. J. Immunol.* 2001;31:265-75.
7. Chen L, Zhang Z, Sendo F. Neutrophil play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 2000;120:125-33.

8. Senaldi G, Vesin C, Chang R, Grau GE, Piguet PF. Role of polymorphonuclear neutrophil leukocytes and their integrin CD11a (LFA-1) in the pathogenesis of severe murine malaria. *Infect. Immun.* 1994;62:1144-49.
9. Squier MKT, Sehnert AJ and Cohen JJ. Apoptosis in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 1995; 57:2-10.
10. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, Solbach W and Laskay, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J. Immunol.* 2002;169:898-905.
11. Lima GMAC, Vallochi AL, Silva UR, Bevilacqua EMAF, Kiffer MMF and Abrahamsohn IA. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 1998;64:145-51.
12. Matte C and Olivier M. *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *J. Infect. Dis.* 2002;185:673-81.
13. Chen L, Zhang Z-H, Watanabe T, Yamashita T, Kobayakawa T, Kaneko A, Fujiwara H and Sendo F. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol. Int.* 2005;54:109-18.
14. Schuchman SM. The individual care and treatment of rabbits, mice, rats, guinea pigs, hamsters, and gerbils. In R.W. Kirk (Eds.), *Current Veterinary Therapy Small Animal Practice*. 1989; 10th ed. Philadelphia W.B. Saunders, pp.738.
15. van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W and Laskay T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect. Immun.* 2002;70:4177-84.

16. Santos MST, Cardoso LPV, Nascimento GR, Lino RSJ, Dorta ML, Oliveira MAP and Ribeiro-Dias F. *Leishmania major*: Recruitment of Gr-1+ cells into draining lymph nodes during infection is important for early IL-12 and IFN production. *Exp. Parasitol.* 2008;119:403-10.
17. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Del Sero G, Nicoletti I, Trinchieri G, Bistoni F and Puccetti P. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. *J. Immunol.* 1997;158:5349-56.
18. Hoffmann JL. Experimental infection of *Leishmania chagasi* in immunosuppressed Balb/c mice: cellular immune response and parasite burden. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2008;14(4):751.
19. Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, Milon G and Louis JA. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD41 Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major* *J. Immunol.* 2000;165:2628-36.

**Artigo 2: DISTINTOS PADRÕES DE RECRUTAMENTO CELULAR E DE
PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA FASE INICIAL DE
INFECÇÃO POR *L. (L.) amazonensis* E *L. (V.) braziliensis***

DISTINTOS PADRÕES DE RECRUTAMENTO CELULAR E DE PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA FASE INICIAL DE INFECÇÃO POR *L. (L.) amazonensis* E *L. (V.) braziliensis*

RESUMO: Neste estudo foi investigada a habilidade de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, espécies causadoras de leishmaniose tegumentar americana, em recrutar leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, também foram estudados os mediadores imunes e inflamatórios envolvidos na fase inicial de infecção por estas espécies. Para isso foi utilizado o modelo de infecção intraperitoneal para analisar a migração celular, bem como a produção de óxido nítrico, TNF- α , IL-12 em grupos de animais tratados e não tratados com indometacina, droga que inibe a produção de PGE₂. Observou-se que a infecção por *L. (L.) amazonensis* estimulou com maior intensidade a migração de células em relação à infecção por *L. (V.) braziliensis*, com predomínio de neutrófilos, seguido de macrófagos nos grupos infectados com *L. (L.) amazonensis*, e predomínio de eosinófilos nos grupos infectados com *L. (V.) braziliensis*. Além disso, foi verificado que após a inoculação de *L. (L.) amazonensis* a PGE₂ interferiu significativamente com os níveis de óxido nítrico, TNF- α e IL-12. Observamos que a PGE₂ atuou como um regulador importante da resposta imune na fase inicial da infecção por *Leishmania*, induzindo a produção de óxido nítrico e IL-12, e regulando negativamente a migração celular, num processo cujo mecanismo pode estar interligado com a produção de TNF- α .

Palavras chave: TNF- α , PGE₂, IL-12, óxido nítrico e *Leishmania*.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses, tradicionalmente, são separadas em dois grupos, leishmaniose do velho mundo e do novo mundo. Estas categorias se referem à região geográfica onde a doença é adquirida. Leishmaniose do “velho mundo” se refere à doença causada por espécies encontradas no Mediterrâneo, Oriente Médio e África, como *Leishmania major* e *Leishmania tropica*. Já a doença no “Novo Mundo” se refere à infecção por espécies encontradas no México, América Central e América do Sul, como *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*. A virulência, patogenicidade e manifestações clínicas dependem da espécie infectante (David & Craft, 2009).

Inúmeros estudos mostram que na infecção por *Leishmania* a suscetibilidade e a resistência são determinadas pela distinta expressão de células do tipo Th1 ou Th2. No caso de estimulação de células Th1, as principais citocinas produzidas (IL-2, IL-12, INF- γ e TNF- α) irão promover a ativação de macrófagos e, conseqüentemente, a eliminação do parasito. Já no caso de estimulação do tipo Th2, serão produzidas citocinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) que inibirão a ativação de macrófagos, contribuindo para a sobrevivência do parasito (Sacks et al., 2002; Heinzel et al., 1989; Scott et al., 1991). Nos últimos 30 anos foram estabelecidos

modelos de infecção experimental em camundongos, especialmente com *L. major*, que têm sido amplamente utilizados para estudar os tipos celulares, citocinas, cascatas de transdução de sinais e mecanismos leishmanicidas necessários para o controle do parasito, bem como para o controle ou resolução da doença (Liew, et al., 1993; Solbach et al., 2000). No entanto, existem diferenças significativas quanto à resposta das diferentes linhagens de camundongos às distintas espécies de *Leishmania*. Assim, camundongos BALB/c são susceptíveis a infecção por *L. major* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Xin et al., 2007), mas resistentes à infecção por *L. (Viannia) braziliensis*, uma das principais espécies envolvidas na leishmaniose cutânea na América do Sul (Rocha et al., 2007). Além disso, os mecanismos que controlam a migração leucocitária para o reconhecimento e processamento do antígeno durante a infecção por *Leishmania* ainda são indefinidos (Leon & Ardavín, 2008; John & Hanter, 2008), e pouco se conhece da resposta inflamatória inicial frente à infecção por *L. (V.) braziliensis* (Rocha et al., 2007) e *L. (L.) amazonensis* (Guimarães et al., 2006; Xin et al., 2007), agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil.

Sabe-se que após a inoculação de promastigotas de *Leishmania* no hospedeiro pelo inseto vetor infectado, o estabelecimento da infecção envolve a fagocitose e o parasitismo de macrófagos e neutrófilos (Peters et al, 2008; Laskay et al., 2008). Os neutrófilos compõem a primeira linha de defesa contra infecções, com capacidade fagocítica que lhes confere a capacidade para eliminar muitos parasitos, expressando e secretando quimiocinas e citocinas que podem influenciar o microambiente no sítio da infecção e, subsequentemente, a resposta imune à infecção por *Leishmania* (Scapini et al., 2000). Recentes estudos mostram que os neutrófilos são recrutados para o sítio de infecção precocemente após a infecção. Nestes sítios os macrófagos podem ingerir neutrófilos apoptóticos infectados com *Leishmania*, facilitando o seu transporte para novos macrófagos, células hospedeiras finais, onde estes parasitas se multiplicam nos vacúolos parasitóforos (Charmoy et al., 2010; Peters et al, 2006). Este seria um mecanismo de invasão silenciosa, conforme o modelo “Trojan horse” proposto por van Zandbergen et al., 2007. Na verdade, estudos visualizando a interação *in vivo* entre neutrófilos e macrófagos revelaram que neutrófilos contendo *Leishmania* não são diretamente fagocitados por macrófagos, mas que os neutrófilos liberam os parasitos, que subsequentemente invadem os macrófagos (van Zandbergen et al., 2004; Peters et al., 2008). Estes dados mostram a complexidade das interações entre *Leishmania* e células hospedeira, de modo que o curso da infecção dependerá tanto das características imunogenéticas associadas à resposta de células T, como a antigenicidade da espécie de *Leishmania* infectante.

No presente estudo foi investigada a habilidade de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em recrutar leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, com o objetivo de estudar os possíveis mediadores imunes e inflamatórios envolvidos na fase inicial de infecção por estas espécies. Embora pareça ideal a análise do infiltrado de neutrófilos e macrófagos na pele lesionada, sítio de infecção para *Leishmania*, para o estudo da produção de citocinas, é quase impossível obter células em quantidades suficientes neste tecido. Por outro lado, a produção de citocinas por células do exsudato peritoneal pode refletir a resposta de mediadores inflamatórios liberados na corrente sanguínea, o que torna interessante o estudo desta população de células (Chen et al., 2005; Monteiro et al., 2007).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais. Camundongos BALB/c fêmeas, com 7 a 12 semanas de idade foram obtidos do biotério central da Universidade Estadual de Maringá. O uso dos animais obedeceu as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e o protocolo de experimentação foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (no parecer de número 078/2008).

Materiais. Lipopolissacarídeo (LPS; Salmonella entérica serotype typhimurium; Sigma, Steinheim-Germany). Indometacina (Sigma, Steinheim-Germany).

Cultura de parasitas. Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272) foram cultivadas em meio 199 (Gibco Laboratories[®], Grand Island, USA) e suplementadas com 1% de L-glutamina, 1% urina humana e 10% de soro bovino fetal para cada 100 mL de meio 199 até fase exponencial de crescimento.

Infecção e Obtenção do exsudato peritoneal.

Os parasitos foram lavados três vezes em PBS e uma suspensão contendo 2×10^8 parasitas/mL de cada espécie foi preparada e a infecção foi realizada com a inoculação intraperitoneal de 0,1 mL, em uma única dose. Foram constituídos seis grupos com 4 animais por grupo: grupo 1 - infecção com *L. (L.) amazonensis*; grupo 2 - infecção com *L. (V.) braziliensis*; grupo 3 e 4 - tratados com indometacina (5mg/Kg) e infectados após 30 minutos com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, respectivamente; grupo 5 - tratados apenas com indometacina; grupo 6 - tratados apenas com LPS (5µg/mL).

Antes da inoculação dos parasitos e após 3, 6, 12 e 24 h, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e 4 mL de solução de Hanks estéril foram injetados na cavidade peritoneal para a obtenção do exsudato. O exsudato peritoneal foi usado para a contagem de células (total e diferencial) e para a determinação de óxido nítrico, TNF- α e IL-12.

Contagem de leucócitos. O exsudato peritoneal foi usado para a determinação do número total de células por meio da contagem direta em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada pela preparação de lâminas de vidro contendo esfregaços preparados a partir do exsudato, que foram coradas pelo kit de coloração hematológica Panótico (Laborclin, Curitiba, Brasil) e examinadas ao microscópio óptico comum (Olympus, Tokyo-Japan) para a contagem diferencial. As amostras de exsudato peritoneal foram centrifugadas a 250g por 10 minutos para remover as células e o sobrenadante foi armazenado a -70°C até o uso.

Determinação da produção de nitritos. Os níveis de óxido nítrico foram estimados pela determinação da concentração de nitritos no sobrenadante das amostras de exsudato peritoneal, pelo método de Griess descrito previamente (Hall & Titus, 1995). Os resultados foram expressos em μ M, a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) em solução de Hanks.

Determinação dos níveis de TNF- α e de IL-12. As concentrações de TNF- α e IL-12 no exsudato peritoneal foram determinadas empregando-se a técnica de ELISA de captura, utilizando pares de anticorpos da R&D System (Minneapolis-USA). A técnica foi desenvolvida de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante, com pequenas modificações. Resumidamente, microplacas de 96 orifícios (Nunc-MaxiSorp) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-citocina e incubadas por 18 horas, a 4°C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com leite em pó desnatado (Molico) dissolvido em PBS-Tween (0,5 mL de tween-20 por litro) por 2 horas, a 37°C. Em seguida, as amostras foram adicionadas e incubadas por 2-3 horas, a 37°C. Anticorpos policlonais anti-citocina biotinizados, usados como anticorpos de detecção, foram adicionados e incubados por 2 horas. Finalmente, as placas foram incubadas com a solução contendo estreptoavidina-HRP (HorseRadish Peroxidase) na diluição de 1:200 em PBS-Tween, por 1 hora a 37°C. A reação final foi desenvolvida com a adição de TMB-TetraMetilBenzidina (TMB SINGLE SOLUTION CHROMOGEN FOR ELISA). A reação enzimática foi bloqueada com H₂SO₄ 2N. A leitura foi feita em leitor de microplacas em comprimento de onda de 492 nm. As concentrações das citocinas foram determinadas com referência a uma curva padrão obtida com a citocina murina recombinante (R&D System) e os resultados expressos em pg/mL.

Análise Estatística. Os dados obtidos foram apresentados como média dos valores, \pm desvio padrão, de 4 animais avaliados em cada grupo de experimento. Os resultados finais foram analisados pelo teste não paramétrico ANOVA utilizando o teste “t”, com correção de Welch, para duas comparações. Foi considerado significativo valores de “p” menores que 0,05. Para estas análises foi utilizado o “software” Prisma 3.

RESULTADOS

Para estudar a capacidade de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em estimular a migração celular para a cavidade peritoneal, camundongos foram inoculados ip com 2×10^7 parasitas e após 3, 6, 12 e 24 h o exsudato peritoneal foi obtido. Também foram obtidas amostras antes da inoculação dos parasitos. Observou-se que 6 h após inoculação de *L. (L.) amazonensis* ocorreu um aumento no número de leucócitos na cavidade peritoneal (2800 células/mL \pm 194) que, neste mesmo tempo, foi significativamente inferior (366 células/mL \pm 371) nos animais inoculados com *L. (V.) braziliensis* ($p < 0,005$). Curiosamente nos animais inoculados com *L. (V.) braziliensis* o número de total de leucócitos atingiu um máximo somente após 12h (1383 leucócitos/mL \pm 498), quando o número de células no exsudato peritoneal dos animais inoculados *L. (L.) amazonensis* (1034 células/mL \pm 310) começava a diminuir (Figura 1). O número total de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais inoculados com *L. (V.) braziliensis* nunca superou significativamente aqueles dos animais inoculados com *L. (L.) amazonensis*, nos períodos de tempo estudados.

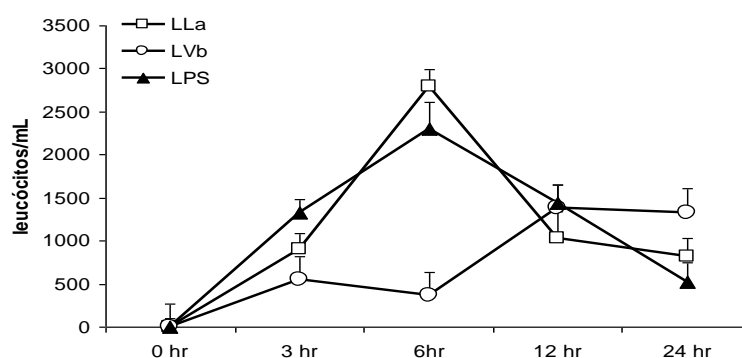


Figura 1 Concentração de leucócitos no exsudato peritoneal após a inoculação de *Leishmania (L.) amazonensis* ou *Leishmania (V.) braziliensis* (2×10^7 promastigotas) ou LPS ($1 \mu\text{g}$); o exsudato foi coletado antes (zero hora), 3, 6, 12 e 24 h após a inoculação ($n=4$). $p < 0,05$ em relação ao controle, em todos os grupos após 3 horas; $p < 0,01$ em relação ao grupo controle e após 6 h da inoculação de LLa e LPS e entre os grupos inoculados com LLa e LVb, após 6 h e 24 h. LVb: *L. (V.) braziliensis*; LLa: *L. (L.) amazonensis*; LPS: Lipolissacarídeo.

A contagem diferencial de células do exsudato peritoneal obtido após a inoculação de *L. (V.) braziliensis* mostrou que a partir de 3 horas (2,8%) houve um aumento significativo de eosinófilos, atingindo um máximo em 24 h (10,8%). Inversamente, após a inoculação de *L. (L.) amazonensis*, embora também ocorresse um aumento do número de eosinófilos a partir de 12 h da infecção, a percentagem destas células foi significativamente inferior, atingindo 3 % após 24 h (Figura 2 A). Em relação ao número de neutrófilos, a infecção com *L. (V.) braziliensis* provocou aumento significativo a partir de 3 horas (27%) que foi constante ao longo do período estudado, atingindo um pico após 12 h (32%). Já a infecção com *L. (L.) amazonensis* provocou um influxo máximo de neutrófilos após 6 horas (40%) da inoculação do parasito e este influxo e foi decaindo a partir de 12 horas (32%), atingindo 26% de neutrófilos após 24 horas da infecção (Figura 2 B). Observou-se que seis horas após a inoculação de *Leishmania* a porcentagem de macrófagos cresceu (Figura 2 C), mas após 24 h os animais inoculados com *L. (L.) amazonensis* apresentavam uma porcentagem significativamente superior destas células que aqueles inoculados com *L. (V.) braziliensis* ($p<0,001$).

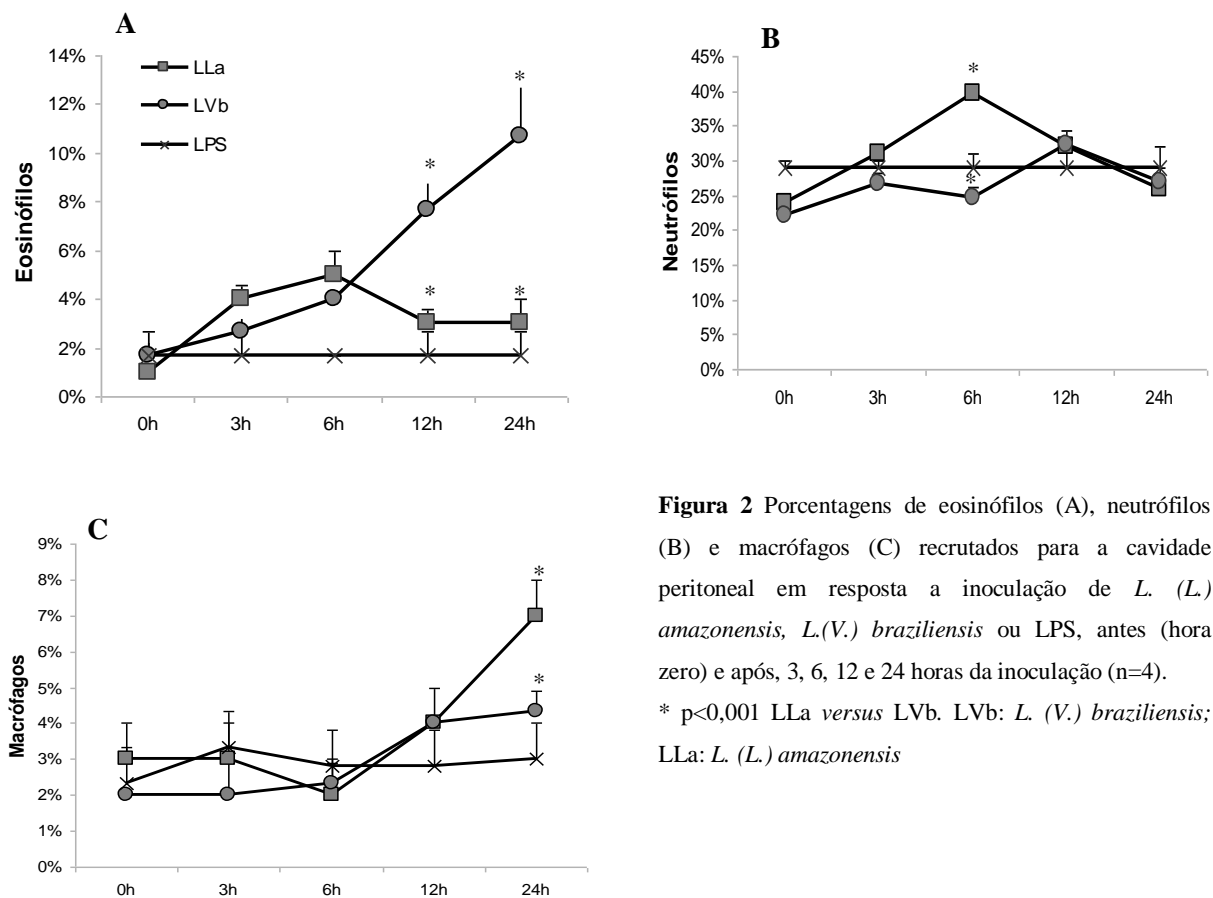


Figura 2 Porcentagens de eosinófilos (A), neutrófilos (B) e macrófagos (C) recrutados para a cavidade peritoneal em resposta a inoculação de *L. (L.) amazonensis*, *L.(V.) braziliensis* ou LPS, antes (hora zero) e após, 3, 6, 12 e 24 horas da inoculação (n=4).
* $p<0,001$ LLa versus LVb. LVb: *L. (V.) braziliensis*; LLa: *L. (L.) amazonensis*

Visto que a migração celular para a cavidade peritoneal ocorreu de forma distinta após o estímulo com as diferentes espécies de *Leishmania*, a participação de PGE₂ no recrutamento celular durante as primeiras horas de infecção com estes parasitos foi estudada. Para isso os animais foram tratados com indometacina (Indo), droga que inibe a síntese de prostaglandinas, 30 minutos antes da inoculação dos parasitos. Observou-se que para ambas as espécies de *Leishmania* em estudo o tratamento com indometacina resultou num aumento significativo da migração celular em relação aos animais não tratados (Figura 3), com um pico após seis horas para *L. (L.) amazonensis* (4683 leucócitos/mL \pm 117) e a partir de 12 horas para *L. (V.) braziliensis* (3584 leucócitos/mL \pm 120). O tratamento com indometacina estimulou principalmente a migração de neutrófilos (Figura 4). Seis horas após o tratamento os neutrófilos representaram 61% das células do exsudato peritoneal nos camundongo inoculados com *L. (L.) amazonensis* e 38% naqueles inoculados com *L. (V.) braziliensis*. Estes resultados sugerem que PGE₂ participa nos mecanismos de recrutamento celular para o local de inoculação de *Leishmania*, especialmente de neutrófilos, regulando negativamente a migração destas células.

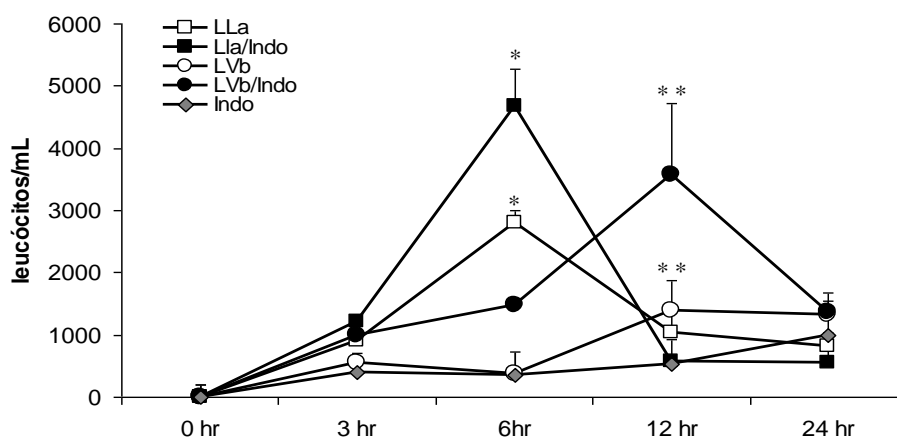


Figura 3 Concentração de leucócitos no exsudato peritoneal em resposta a inoculação de *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, em camundongos tratados ou não com indometacina. O exsudato foi coletado antes (zero hora) e após 3, 6, 12 e 24 h da inoculação (n=4); p<0,01 entre os camundongos não tratados ou tratados com indometacina e inoculados com LLa (*), ou (**) com LVb. LVb: *L. (V.) braziliensis*; LLa: *L. (L.) amazonensis*; Indo: indometacina

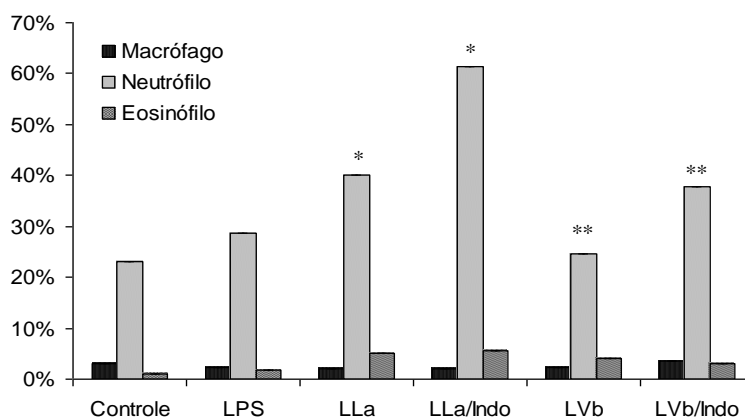


Figura 4 Porcentagem de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos recrutados no exsudato peritoneal após 6 horas da inoculação com *L.(L.) amazonensis*, ou *L. (V.) braziliensis*, ou LPS (1µg) tratados e não tratados com Indo (5mg/Kg) (n= 4). *p<0,01 (LLa x LLa/Indo) e **p<0,01 (LVb x LVb/Indo). LVb: *L. (V.) braziliensis*; LLa: *L.(L.) amazonensis*; Indo: Indometacina.

Considerando a importância do óxido nítrico (NO) no controle da infecção para uma variedade de patógenos, incluindo *Leishmania major* (Vouldoukis et al., 1995) a produção deste mediador foi avaliada em amostras de exsudato peritoneal dos camundongos inoculados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*. Os níveis de NO aumentaram a partir de 3 horas após a inoculação de ambas as espécies de *Leishmania*, atingindo um máximo após 24 horas (Figura 5). No entanto, apesar da capacidade de *L. (L.) amazonensis* induzir doença em camundongos BALB/c, ao contrário de *L. (V.) braziliensis*, observou-se que a infecção por *L. (L.) amazonensis* induziu níveis mais elevados de NO em todos os tempos estudados (Figura 5). Uma vez que a PGE₂ parece estar envolvida na produção de NO (Panaro et al., 2001), investigou-se o papel deste eicosanóide na resposta à inoculação de *Leishmania* na cavidade peritoneal de camundongos. Observou-se que nos animais tratados com indometacina e infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* houve queda nos níveis de NO (Figura 6).

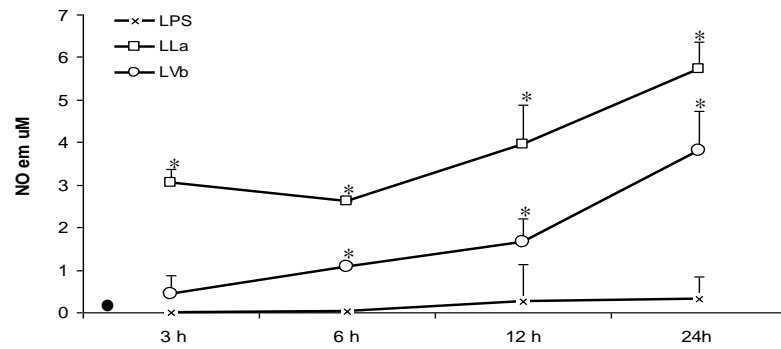


Figura 5 Produção de óxido nítrico em μM , no exsudato peritoneal de camundongos BALB/c, em resposta à inoculação de *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* ou LPS. O exsudato peritoneal foi coletado 3, 6, 12 e 24 horas depois da inoculação (n=4). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, e $p < 0,01$ entre LLa e LVb em todos os tempos estudados. LVb: *L. (V.) braziliensis*; LLa: *L. (L.) amazonensis*; “●”: nível basal de óxido nítrico do grupo controle.

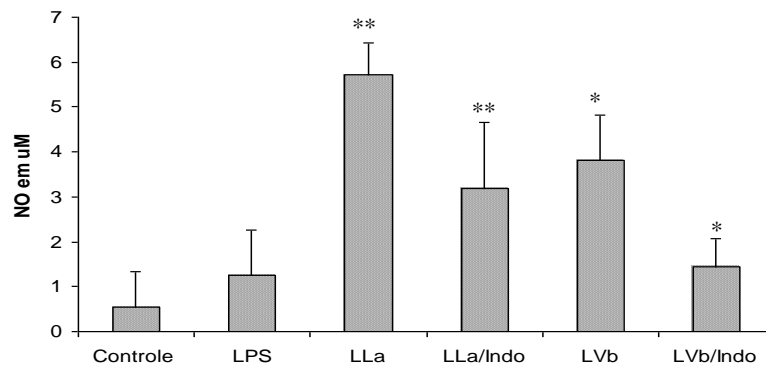


Figura 6 Produção de óxido nítrico em μM no exsudato peritoneal de camundongos após 24 horas da inoculação com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* ou LPS, tratados ou não com indometacina. (n=4). ** $p < 0,005$ para LLa versus LLa/Indo e * $p < 0,01$, para LVb versus LVb/Indo. LVb: *L. (V.) braziliensis*; LLa: *L. (L.) amazonensis*; Indo: Indometacina.

Para estudar o papel de TNF- α no recrutamento celular em resposta à inoculação das diferentes espécies de *Leishmania*, os níveis desta citocina no exsudato peritoneal foram determinados pelo método de ELISA. Ocorreu aumento na produção de TNF- α a partir de três horas após a infecção, tanto com *L. (V.) braziliensis* quanto com *L. (L.) amazonensis* (Figura 7), porém os níveis de TNF- α não foram estatisticamente diferentes entre as duas espécies ($p > 0,05$). Sabe-se que a PGE₂ pode interferir com a liberação de mediadores inflamatórios, incluindo o TNF- α (Panaro et al., 2001). Na tentativa de esclarecer o papel da PGE₂ na regulação da produção de TNF- α os animais foram previamente tratados com indometacina e infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*. Observou-se que entre os animais tratados com indometacina e infectados com uma ou outra das espécies de

Leishmania em estudo, os níveis de TNF- α foram superiores, em todos os tempos estudados, aos dos animais não tratados. Após seis horas da infecção com *L. (L.) amazonensis* (figura 8) a produção de TNF- α foi 2,4 vezes superior ($105 \text{ pg/mL} \pm 1,7$) no grupo de animais tratados com indometacina que nos não tratados.

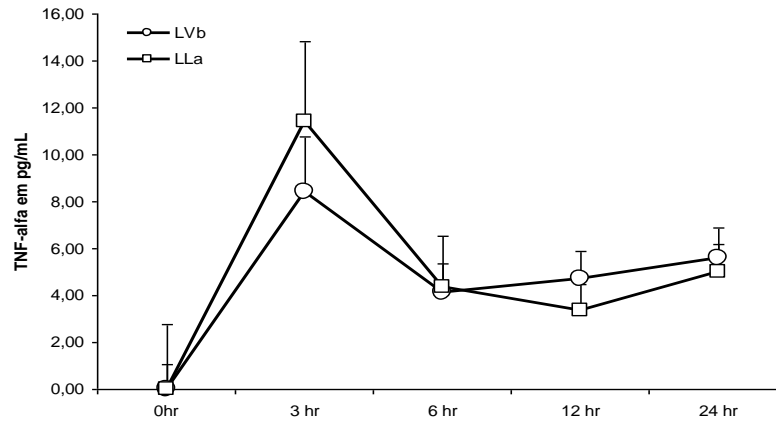


Figura 7 Concentração de TNF- α em pg/mL no exsudato peritoneal de camundongos BALB/c, em resposta à inoculação com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*. Amostras de exsudato foram coletadas nos períodos de 3, 6, 12 e 24 horas (n=4). Para as duas espécies em relação ao grupo controle (0h), obteve-se $p < 0,01$ no tempo de 3 horas, e $p < 0,05$ nos tempos de 6, 12 e 24 horas.

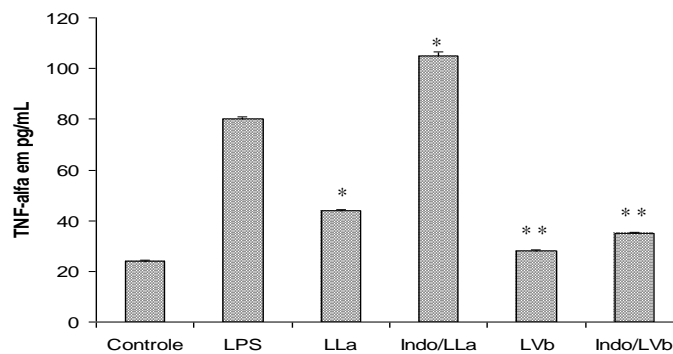


Figura 8 Produção de TNF- α em pg/mL no exsudato peritoneal de animais controle (PBS), estimulados com LPS, inoculados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, tratados ou não com Indometacina (Indo, 5mg/Kg). Amostras de exsudato peritoneal foram coletadas após 6 horas da inoculação (n=4). * $p < 0,01$ (LLa x Indo/LLa) e ** $p < 0,05$ (LVb x Indo/LVb). LVb: *L. (V.) braziliensis*; LLa: *L. (L.) amazonensis*; Indo: Indometacina.

Para esclarecer os mecanismos envolvidos na fase inicial de infecção por *Leishmania* e seu papel na suscetibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania*, foi avaliada a produção de IL-12. A infecção por qualquer das duas espécies de *Leishmania* estudadas resultou em produção de IL-12 detectados às 3 horas, com níveis máximos após 6 horas e retornando aos níveis basais em 24 horas (figura 9). Como esperado, *L. (V.) braziliensis*

estimulou maior produção de IL-12 após 6 e 12 horas ($p < 0,01$). O tratamento com indometacina inibiu a produção de IL-12 nos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* ($p < 0,05$), mas não alterou a produção desta citocina nos animais infectados *L. (V.) braziliensis*, sugerindo que a PGE_2 interfere com a liberação de IL-12 nas primeiras horas da infecção por *L. (L.) amazonensis*.

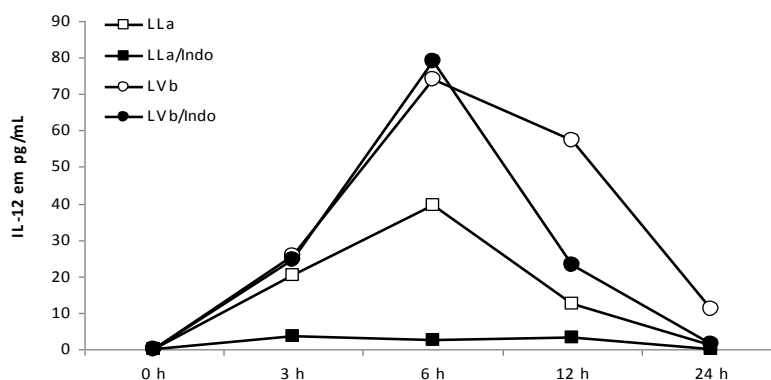


Figura 9 Produção de IL-12 em pg/mL no exsudato peritoneal de camundongos inoculados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, tratados e não com Indometacina (Indo, 5mg/Kg), após 3, 6, 12 e 24 horas ($n=4$). $p < 0,01$ nos tempos de 3, 6 e 12 horas para LLa, LVb e LVb/Indo em relação ao grupo controle (zero hora); $p < 0,01$ entre LLa x LVb e entre LLa x LLa/Indo após 6 horas. LVb: *L. (V.) braziliensis*; LLa: *L. (L.) amazonensis*; Indo: Indometacina.

DISCUSSÃO

Citocinas, quimiocinas e mediadores produzidos durante a infecção por diferentes espécies de *Leishmania* podem modular de forma distinta o recrutamento celular para o sítio de infecção, promovendo a reação inflamatória (Matsushima et al., 1988).

Neste estudo procuramos evidenciar como as diferentes espécies de *Leishmania* influenciam a migração celular para o foco infeccioso. Os resultados mostraram que *L. (L.) amazonensis*, espécie que causa doença cutânea em camundongos BALB/c, estimulou a migração celular mais precocemente e com maior intensidade que *L. (V.) braziliensis*, espécie a qual esta linhagem de camundongo é resistente. A inoculação de *L. (L.) amazonensis* na cavidade peritoneal dos camundongos resultou num influxo, predominantemente de neutrófilos, após 6 horas. Estes resultados sugerem que já nas primeiras horas após a infecção por *L. (L.) amazonensis* são liberados mediadores inflamatórios que estimulam a migração. Müller et al., 2001 sugeriram que a expressão precoce de citocinas e quimiocinas pode regular a migração celular para o sítio específico de infecção por *L. major* e promover a ativação da resposta imune inata nas primeiras horas da infecção.

A maior concentração de neutrófilos observada, nas primeiras horas de infecção com *L. (L.) amazonensis* aponta para a importância destas células na fase inicial da resposta imune. Já na infecção por *L. (V.) braziliensis* a migração de leucócitos foi menos intensa e ocorreu a partir de 12 horas. O aumento da migração de neutrófilos pode estar associado com o desenvolvimento da doença, uma vez que após a fagocitose *L. major* pode inibir a apoptose destas células e, conseqüentemente permanecer mais tempo no hospedeiro (Aga et al., 2002). Allenbach et al., 2006, mostraram que a depleção de neutrófilos antes da infecção por *L. major*, em camundongos BALB/c susceptíveis, induziu uma cicatrização parcial das lesões e modificou o perfil de citocinas secretadas por células TCD4+. Peters et al., 2008, também mostraram que o influxo inicial de neutrófilos e sua persistência após a inoculação da *L. major* pelo vetor, parece fundamental para o desenvolvimento da doença cutânea. Isto está de acordo com o modelo do “Cavalo de Tróia” proposto por van Zandbergen et al., 2007, que postula que a captação de neutrófilos infectados pelos macrófagos é um mecanismo de “entrada silenciosa” do parasito em macrófagos, indicando que os neutrófilos são as primeiras células hospedeiras para uma grande fração de parasitas. Estes estudos mostram que neutrófilos podem participar de alguma forma na promoção da doença.

Neste estudo, observamos que 24 h após a infecção houve um acúmulo maior de macrófagos na cavidade peritoneal de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, do que naqueles infectados com *L. (V.) braziliensis*. A elevação de macrófagos observada após 24 h pode ser responsável pela manutenção da infecção, uma vez que após a fagocitose por macrófagos, a *Leishmania* pode burlar os mecanismos microbicidas destas células, estabelecendo a infecção. De acordo com Soehnlein et al., 2009, a primeira etapa do recrutamento de fagócitos para o local da inflamação inclui o extravasamento de neutrófilos, seguido de uma migração posterior de monócitos, confirmando novamente nossos achados. Foi demonstrado que camundongos neutropênicos apresentaram deficiência no recrutamento de macrófagos, indicando que a relação entre neutrófilos e monócitos é realmente importante na fisiologia da resolução da inflamação (Soehnlein et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que a depleção de neutrófilos no momento da inoculação de *L. major* em camundongos BALB/c pode inibir a produção de IL-4, sugerindo que os neutrófilos podem contribuir na progressão da doença (Tacchini-Cotier et al., 2000; van Zandbergen et al., 2004).

A infecção por *L. (V.) braziliensis*, ao contrário de *L. (L.) amazonensis*, estimulou a migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal, sugerindo que estas células podem estar envolvidas em mecanismos protetores. A presença de eosinófilos tem sido relatada na fase

inicial da infecção por *Leishmania* (Belkaid et al., 2000) e a maior quantidade de eosinófilos encontrada na cavidade peritoneal de camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* pode estar relacionada a uma resposta mais eficiente do hospedeiro a esta espécie de parasita. Saito et al., 1996, relataram que a inoculação intraperitoneal em camundongos, de lisados de promastigotas de *L. amazonensis* e de *L. braziliensis* induzia o acúmulo de eosinófilos e Oliveira et al., 1998, sugeriram que eosinófilos ativados liberam NO, o qual pode estar envolvido na atividade microbicida destas células contra *L. major*. No entanto, é importante ressaltar que a atividade leishmanicida promovida por eosinófilos não é muito eficiente (Chang, 1981; Grimaldi et al., 1984).

Visto que a migração celular para a cavidade peritoneal ocorreu de forma distinta entre as duas espécies, investigamos se a atuaria no recrutamento celular durante as primeiras horas de infecção com estes parasitos. Para isso os animais foram tratados com indometacina, o que resultou num aumento da migração celular nos grupos infectados com *L. (L.) amazonensis* assim como com *L. (V.) braziliensis*, embora nos primeiros esta migração fora significativamente superior. Nossos resultados mostraram que o tratamento com indometacina inibiu a produção de PGE₂ que conseqüentemente agiu modulando negativamente a migração celular, concordando com resultados descritos anteriormente (Snyder et al., 1982; Desanctis et al., 1994; Lehner et al., 2008). O tratamento com indometacina estimulou significativamente a produção de TNF- α nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, quando em comparação com aqueles infectados com *L. (V.) braziliensis*. Estes dados sugerem que a PGE₂ regulou a migração celular por suprimir a produção de TNF- α . Os dados obtidos nestes experimentos não permitiram esclarecer o real papel de ambos mediadores, porém sabe-se que o TNF- α é um potente estimulador da migração de neutrófilos (Matte & Olivier, 2002; Figueiredo et al., 2009; Carregaro et al., 2008).

Foi observado que *L. (L.) amazonensis* provocou maior produção de óxido nítrico do que *L. (V.) braziliensis*. Fato este que pode estar relacionado com a presença de LPG (lipofosfoglicano), presente em maior quantidade nas formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* quando comparado com a *L. (V.) braziliensis*. Kavooosi et al., 2006 mostraram que o LPG isolada da membrana de *L. major* é capaz de induzir a produção de altos níveis de NO por macrófagos murinos. Uma vez que o NO é produzido por macrófagos ativados, sua produção em níveis mais elevados nos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* sugere um estímulo para a fagocitose dos parasitos por macrófagos, favorecendo a sobrevivência e o estabelecimento da infecção (van Zandbergen et al., 2007). Também tem sido demonstrado

que *Leishmania* tem mecanismos próprios que podem interferir com a produção de NO e com isso facilitar sua sobrevivência dentro dos macrófagos (Balestieri et al., 2002). Recentemente, Giudice et al., 2007, demonstraram que a resistência ao efeito do NO tanto na infecção por *L. (L.) amazonensis* como na infecção por *L. (V.) braziliensis*, pode conferir efeito benéfico na sobrevivência dos parasitos dentro dos macrófagos, tendo correlação com a gravidade da leishmaniose cutânea.

Neste modelo, a PGE₂ regulou positivamente a liberação de NO (Panaro et al., 2001) e negativamente a produção de TNF- α , mostrando que a manutenção da infecção por *L. (L.) amazonensis* parece mediada por um mecanismo sequencial envolvendo a produção de altos níveis de PGE₂ os quais regulam negativamente a produção de TNF- α , uma vez que o tratamento com indometacina estimulou a produção de TNF- α que, por sua vez, conduziu a uma elevação do influxo de neutrófilos (Fantone et al., 1997; Canetti et al., 2001) e macrófagos para o sítio de infecção. Segundo Ritter, 2008, a expressão de TNF- α é necessária para promover o desenvolvimento inicial da resposta inflamatória local, mas não é suficiente para promover uma resposta imune de proteção durante a infecção. Estes resultados apontam para a participação do TNF- α e do óxido nítrico na fase inicial de infecção por *L. (L.) amazonensis* assim como na infecção por *L. (V.) braziliensis*, sugerindo que a produção destes mediadores possa ser modulada pela PGE₂.

A resistência à infecção por *L. major* tem sido associada com o desenvolvimento de resposta do tipo Th1, que é dependente da presença de IL-12. A doença por *L. (L.) amazonensis* em camundongos tem sido associada à deficiência tanto na produção de IL-12 como na falha na ativação de células TCD4+, resultando em diminuição da resposta Th1 (Jones et al., 2000; Ji et al., 2002). Em nossos experimentos, como esperado, observamos uma maior produção de IL-12 por camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis*, uma vez que esta espécie de camundongo é resistente a infecção por este parasito e que a IL-12 está relacionada com o direcionamento para resposta Th1. No entanto, o que nos chamou a atenção foi o fato de que após o tratamento com indometacina houve inibição significativa da produção de IL-12 no grupo de animais infectados com *L. (L.) amazonensis*, mostrando que a PGE₂ atuou regulando positivamente a liberação de IL-12p70. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Lehner et al., 2008, que demonstraram que a produção de IL-12 pode ser amplificada pela estimulação de células dendríticas com PGE₂ e INF- γ . Como neste trabalho observamos que o tratamento com indometacina, que inibe a produção de PGE₂, estimulou a produção de TNF- α , acreditamos que, neste modelo, a indução de IL-12 é um mecanismo dependente de TNF- α e de INF- γ (Pinheiro & Rossi-Bergmann, 2007; Ji et al.,

2005). Contrariamente, Pérez-Santos & Talamás-Rohana, 2001 mostraram que a administração *in vitro* de indometacina aumentou a produção de IL-12 e promoveu resposta Th1 em camundongos BALB/c susceptíveis a infecção por *L. mexicana*, mostrando mais uma vez que a resposta celular e os mediadores produzidos numa fase precoce da infecção podem diferir conforme a espécie de *Leishmania* e com as condições experimentais, desencadeando mecanismos protetores ou não.

Com estes dados, podemos sugerir que camundongos BALB/c respondem de forma distinta contra espécies causadoras de LTA, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Sugerimos que a PGE₂ possa ter papel importante no recrutamento celular na fase inicial de infecção por *Leishmania*, atuando principalmente sobre o recrutamento de células neutrofílicas, direcionando a resposta celular e ainda atuando na regulação da produção de mediadores inflamatórios como o óxido nítrico, o TNF- α e a IL-12.

REFERÊNCIAS

1. David CV & Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy* 2009; 22 491–502.
2. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002; 2 845–858.
3. Heinzl FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or IL4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 1989; 169 59-72.
4. Scott P. IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* 1991; 147 3149-3155.
5. Liew FY & O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 1993; 32 161–259.
6. Solbach W & Laskay T. The host response to *Leishmania* infection. *Adv. Immunol.* 2000; 74 275–31.
7. Xin L, Li Y, Soong L. Role of Interleukin-1 β in activating the CD11c^{high} CD45RB⁻ Dendritic Cell Subset and Priming *Leishmania amazonensis* Specific CD4⁺ T Cells In Vitro an In Vivo. *Infection and Immunity* 2007, 75 (10) 5018-5026.
8. Rocha FJS, Schleicher U, Mattner J, Alber G and Bogdan C. Cytokines, Signaling Pathways, and Effector Molecules Required for the Control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Mice. *Infection and Immunity* 2007; 75 (8) 3823–3832.

9. León B & Ardavín C. Monocyte migration to inflamed skin and lymph nodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1. *Blood* 2008; 111 (6) 3126-3130.
10. John B & Hunter CA. Neutrophil Soldiers or Trojan Horses?. *Science* 2008; 321 917-918.
11. Guimarães ET, Santos LA, Santos RR, Teixeira MM, Santos WLC, Soares MBP. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes and Infection* 2006; 8 1219-1226.
12. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science* 2008; 321 970-974.
13. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* 2008; 213 183–191.
14. Scapini PJ, Lapinet-Vera A, Gasperini S. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews* 2000; 177195–177203.
15. Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The Prominent Role of Neutrophils during the Initial Phase of Infection by *Leishmania* Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 10 (in press).
16. Peters N & Sacks D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 2006; 213 159-709.
17. van Zandbergen G, Solbach W, Laskay T. Apoptosis driven infection. *Autoimmunity* 2007; 40 (4) 349-352.
18. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 2004; 173 6521–6525.
19. Chen L, Zhang Z-H, Watanabe T, Yamashita T, Kobayakawa T, Kaneko A, Fujiwara H, Sendo FT. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol Intern* 2005; 54 109– 118.
20. Monteiro MC, Lima HC, Souza AAA, Titus RG, Romão PRT, Cunha F. Effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extracts on leukocyte migration induced by *Leishmania major*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 76 (1) 88-94.
21. Hall LR and Titus RG. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J. Immunol.* 1995; 155 3501-3506.

22. Vouldouskis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Becherel P, Debre P, Moncada S, Mossalayi MD. The Killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by oxid nitric induced after ligation of the FcεRII/CD23 surface antigen. *Immunology* 1995; 92 7804-7808.
23. Panaro MA, Brandonisio O, Sisto M, Acquafredda A, leogrande D, Fumarola L, Mitolo V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E₂. *Clin Exp Med* 2001; 1 137-143.
24. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MNDCF) and the induction of MNDCF mRNA by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1988; 167 1883–93.
25. Müller K, van Zandbergen G, Laufs BHH, 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* 2001; 190 73-76.
24. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, Solbach W, Laskay T. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. *J Immunol* 2002; 169 898–905.
25. Allenbach C, Zufferey C, Perez C, Launois P, Mueller C, Tacchini-Cottier F. Macrophages Induce Neutrophil Apoptosis through Membrane TNF, a Process Amplified by *Leishmania major*. *J Immunol* 2006; 176 6656–6664.
26. van Zandbergen G, Solbach W, Laskay T. Apoptosis driven infection. *Autoimmunity* 2007; 40 (4) 349-352.
27. Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, Milon G, Louis JA. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 2000; 165 2628–2636.
28. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 2004; 173 6521–6525.
29. Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood* 2009; 06 221630.
30. Soehnlein, O, Zerneck A, Eriksson EE, et al. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 2008; 112 (4) 1461-71.

31. Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* 2000; 165 969–977.
32. Saito S., Hamada A., Watanabe N., Obata T., Katakura K., Ohtmo H. Eosinophil chemotactic activity in *Leishmania amazonensis* promastigotes . *Parasitol Res* 1996; 82 (6) 485-489.
33. Oliveira SH, Fonseca SG, Romano PR, Ferreira SH, Cunha FQ. Microbicidal activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway. *Parasite Immunol* 1998; 20 (9) 405-412.
34. Chang KP. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am J Trop Med Hyg* 1981; 30 322-333.
35. Grimaldi G Jr, Soares MJ, Moriearty PL. Tissue eosinophilia an *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1984; 6 397-408.
36. Snyder DS, Beller DI, Unanue ER. Prostaglandins modulate macrophage Ia expression . *Nature* 1982; 299 163-165.
37. Lehner M, Stilper A, Morhart P, Holter W. Plasticity of dendritic cell function in response to prostaglandin E₂ (PGE₂) and interferon- γ (IFN- γ). *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 83 883-893.
38. Matte C & Olivier M. *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *Journal Infec Dis* 2002; 185 673-681.
39. Figueiredo JG, Bitencourt FS, Mota MRL, Silvestre PP, Aguiar CN, Benevides RG, Nascimento KS, de Moura TR, Dal-Secco D, Assreuy AMS, Cunha FQ, Vale MR, Cavada BS, Alencar NMN. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide. *Toxicon* 2009; xxx 1–9.
40. Carregaro V, Valenzuela JG, Cunha TM, Verri WA Jr., Grespan R, Matsumura G, Ribeiro JMC, Elnaiem D-E, Silva JS, Cunha FQ. Phlebotomine salivas inhibit immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE₂/IL-10 sequential pathway. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 84 104-114.

41. Kavooosi G, Ardestani SK, Kariminia A, Tavakoli Z. Production of nitric oxide by murine macrophages induced by lipophosphoglycan of *Leishmania major*. Korean J Parasitol 2006; 44 (1) 35-41.
42. Balestieri FM, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Neto M, Ahamsohn I. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. Mic Inf 2002; 4 23–29.
43. Giudice A, Camada I, Leopoldo TG, Pereira JMB, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, De Jesus AR, Carvalho EM, Almeida R. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. B M C Inf Dis 2007; 7 1–12.
44. Fantone JC. In cytokines in health and disease, ed. Remick D and Friedland JS. Marcel Dekker, New York 1997; 373-380.
45. Canetti C, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B4 mediate the neutrophil migration in immune inflammation. British Journal of Pharmacol 2001; 134 1619-1628.
46. Ritter U, Lechner A, Scharl K, Kiafard Z, Zwirner J, Körner H. TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of *Leishmania major* infection. Med Microbiol Immunol 2008; 197 29–37.
47. Jones DE, Buxbaum LU, Scott P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. J Immunol 2000; 165 364–372.
48. Ji J, Sun J, Qi H, Soong L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. Am J Trop Med Hyg 2002; 66 338–345.
49. Pinheiro RO & Rossi-Bergmann B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2007; 102 (1) 79-82.
50. Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. J Immunol 2005; 174 6147-7153.
51. Pérez-Santos JLM & Talamás-Rohana P. *In vitro* indomethacin administration upregulates interleukin-12 production and polarizes the immune response towards a Th1 type in susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*. Paras Immunol 2001; 23 599-606.

CAPÍTULO III

3.1 CONCLUSÕES

- Diferentes espécies de *Leishmania* modulam de forma distinta a migração celular: *L. (L.) amazonensis*, que causa doença em camundongos BALB/c, estimulou a migração celular mais precocemente que a *L. (V.) braziliensis*.
- Na infecção por *L. (L.) amazonensis* houve predomínio de neutrófilos após 6 horas, os quais podem produzir mediadores que atraem macrófagos.
- A elevação de macrófagos observada após 24h pode ser responsável pela manutenção da infecção por *L. (L.) amazonensis*, uma vez que após a fagocitose por macrófagos, *Leishmania* pode burlar os mecanismos microbicidas destas células, estabelecendo a infecção.
- A infecção por *L. (V.) braziliensis*, ao contrário de *L. (L.) amazonensis*, estimulou a migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal com maior intensidade, sugerindo que estas células podem estar envolvidas em mecanismos protetores.
- *L. (L.) amazonensis* estimulou mais que *L. (V.) braziliensis* a produção de neutrófilos. Este fenômeno pode estar relacionado com a progressão da infecção, uma vez que os neutrófilos podem ativar macrófagos, promovendo a fagocitose e a sobrevivência dos parasitos.
- Neste modelo a PGE₂ regula positivamente a liberação de óxido nítrico e negativamente a produção de TNF- α .
- A manutenção da infecção por *L. (L.) amazonensis* parece mediada por um mecanismo sequencial envolvendo a produção de altos níveis de PGE₂ os quais regulam negativamente a produção de TNF- α , uma vez que o tratamento com indometacina estimulou a produção de TNF- α que, por sua vez, conduziu a uma elevação do influxo de neutrófilos e macrófagos no sítio de inoculação do parasito.
- Como esperado a *L. (V.) braziliensis* estimulou maior produção de IL-12 (Th1 relacionado com resistência) quando comparado aos animais infectados com *L. (L.) amazonensis*.
- A PGE₂ atuou regulando positivamente a liberação de IL-12, possivelmente por um mecanismo dependente de TNF- α .

Através dos resultados obtidos podemos concluir que camundongos BALB/c respondem de forma distinta as espécies causadoras de LTA. Observamos também que a PGE₂ possui papel importante na fase inicial da infecção por *Leishmania*, agindo sobre mecanismos do recrutamento celular e regulando a produção de mediadores inflamatórios como o óxido nítrico, o TNF- α e a IL-12.

3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Conhecer quais mediadores inflamatórios envolvidos com o desenvolvimento de doença na infecção por *Leishmania* pode auxiliar na descoberta de novas formas de tratamento da doença e, até mesmo na produção de vacinas. A demonstração de um papel regulador da prostaglandina E_2 sobre a produção de óxido nítrico, TNF- α e IL-12, induzida por *Leishmania*, é interessante à luz de uma possível regulação farmacológica destes mediadores inflamatórios pela modulação da síntese de PGE_2 . Além do mais, esperamos pesquisar outros mediadores inflamatórios, bem como a expressão de genes de receptores de quimiocinas e citocinas na fase inicial de infecção por *Leishmania*, na tentativa de compreender melhor como atuam tais moléculas na modulação da resposta imunológica, uma vez que, o envolvimento de mediadores pró-inflamatórios na fase inicial de infecção por *Leishmania* é importante no processo de evolução da doença (resposta Th1 ou Th2).