

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM MODELOS MURINOS INFECTADOS COM
ISOLADOS DE *LEISHMANIA* DE PACIENTES DA REGIÃO DO TRIÂNGULO
MINEIRO, MG**

Fernanda Agostinho Rocha

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal
de Uberlândia, para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Fevereiro - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM MODELOS MURINOS INFECTADOS COM
ISOLADOS DE *LEISHMANIA* DE PACIENTES DA REGIÃO DO TRIÂNGULO
MINEIRO, MG**

Aluna: Fernanda Agostinho Rocha

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Fevereiro - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM MODELOS MURINOS INFECTADOS COM
ISOLADOS DE *LEISHMANIA* DE PACIENTES DA REGIÃO DO TRIÂNGULO
MINEIRO, MG**

Aluna: Fernanda Agostinho Rocha

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza

Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em ___/___/2007

Profa. Dra. Vera Lucia de Campos Brites
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia - MG
Fevereiro - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM MODELOS MURINOS INFECTADOS COM
ISOLADOS DE *LEISHMANIA* DE PACIENTES DA REGIÃO DO TRIÂNGULO
MINEIRO, MG**

Aluna: Fernanda Agostinho Rocha

Aprovada pela Banca Examinadora em: 16/02/2007

Nota: _____

Dra. Maria Aparecida de Souza

Ms. Eneida Cezar Mastrantoni

Ms. Renata Junqueira Rezende

Uberlândia, 16 de fevereiro de 2007.

**Aos meus pais, Clarete e Jorge, e
irmãos, Wagner e Lucio.**

AGRADECIMENTOS

Sou extremamente grata ao meu Deus que me capacita a ser melhor a cada dia e que confia sua grande misericórdia a mim. À Nossa Senhora, agradeço pelas infinitas graças que derrama sobre mim, e por sempre me acolher nos momentos de cansaço, intercedendo por mim junto a Deus. Ao meu Santo Anjo da Guarda, por me iluminar e me guiar em todos os momentos, principalmente nas horas de dúvida.

Agradeço minha família, meus pais, irmãos, avós, tios e primos, por acreditarem no meu potencial, por me confiarem condições para meu crescimento pessoal e profissional, mas principalmente por me doarem o amor que me sustenta.

Sou grata aos meus amigos, Daniela, Ana, Angélica, “Tia” Silvia, Isabel, Azul, Victor, Rafael e Vinícius, que mesmo próximos ou distantes se mantêm presentes em minha vida e em minha memória, me apoiando, me ajudando, me ouvindo, me aconselhando e tornando minha vida mais agradável. Em especial agradeço à Mariana por ser paciente, crítica e fiel à nossa amizade e aos meus pedidos de ajuda.

Agradeço muito aos meus mais recentes amigos do GOU, Fabiana, Stefânia, Mariana, Carolina, Paulo, Cláudio, Ernani e Roberto, por me mostrarem como a vida é bela, e como nós podemos bem vivê-la. Pelo mesmo motivo agradeço aos meus amigos do GPP, Inês, Tânia, Leiriane, Artelina, Aline, Regiane, Érico, Anderson, Diego e Helton.

Sou grata à minha orientadora e aos meus amigos de laboratório (Cida, Cristiano, Renata, Eneida, Miguel, Alexandre, Camilla, Patrícia, Martha, Sandra, Carla, Janethe, Thelma, Eduardo) que tanto têm contribuído para o meu crescimento profissional.

Por fim, agradeço aos professores, técnicos e estagiários do Laboratório de Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz, RJ, que foram muito prestativos no enriquecimento do meu trabalho, me recebendo com cordialidade e atenção.

Muito obrigada!

RESUMO

Leishmanioses são doenças parasitárias causadas por várias espécies de protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, cujas manifestações clínicas variam em leishmaniose visceral, lesões mucocutâneas e cutâneas. Infecções de camundongos da linhagem BALB/c são considerados resistentes a infecções por parasitos do complexo *Leishmania braziliensis*, principal responsável pela leishmaniose tegumentar americana no Brasil. Essas infecções podem desencadear uma resposta imunológica mista no hospedeiro, caracterizada por citocinas de perfil Th1 e Th2. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as cepas isoladas em nível de espécie, avaliar a expressão de citocinas e verificar a presença de parasitos no baço e no fígado dos camundongos. A técnica de genotipagem por isoenzimas é apropriada para a discriminação de espécies de *Leishmania* e seu uso permitiu a classificação dos parasitos isolados como pertencentes à espécie *Leishmania Viannia braziliensis*. Utilizando-se a técnica de RT-PCR pôde-se avaliar uma resposta imune mista no baço e no fígado dos camundongos. Não havendo detecção de DNA de parasitos *Leishmania braziliensis* nos órgãos analisados por PCR Multiplex, sugere-se que a resposta imune dos camundongos evoluiu para a cura da leishmaniose.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Leishmaniose.....	1
1.2	Classificação das espécies de <i>Leishmania</i>	2
1.3	Ciclo de vida do parasito	3
1.4	Diversidade gênica do parasito	4
1.5	Diagnóstico.....	5
1.6	Genotipagem	6
1.7	Modelos experimentais para <i>Leishmania braziliensis</i>	7
1.8	Mediadores químicos da resposta imune de hospedeiro de <i>Leishmania</i>	7
1.9	Potencial de escape da <i>Leishmania</i>	8
1.10	Justificativa.....	9
2	OBJETIVOS.....	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1	Isolamento e cultivo de <i>L. braziliensis</i>	11
3.2	Preparação da massa parasitária para isoenzimas	11
3.3	Genotipagem por isoenzimas	11
3.4	Infecção experimental de camundongos	12
3.5	Extração de DNA	13
3.6	PCR-Multiplex <i>Leishmania</i>	13
3.7	Extração de RNA	14
3.8	Quantificação de RNA	14
3.9	Síntese de cDNA	15
3.10	Avaliação do perfil de citocinas por RT-PCR (transcrição reversa da reação em cadeia de polimerase).	15
3.11	Leitura em gel de agarose.....	15
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5	CONCLUSÕES	22
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
	LISTA DE TABELAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

O protozoário parasito *Leishmania* foi demonstrado pela primeira vez, separada, mas simultaneamente em 1903, por William Leishman e Charles Donovan em baço de pacientes que apresentavam uma doença semelhante à malária, que ficou conhecida como leishmaniose visceral (LV). O agente causador da LV foi nomeado *Leishmania donovani* em homenagem a seus co-descobridores (AWASTHI et al., 2004).

Leishmania é o agente etiológico de leishmanioses, uma doença parasitária com diversas manifestações clínicas em humanos e outros mamíferos. O mamífero torna-se um hospedeiro parasitado quando o flebótomo, o inseto vetor do parasito, perfura a pele para se alimentar de sangue, injetando promastigotas metacíclicas através da saliva (OLIVEIRA et al., 2004).

As formas clínicas de leishmaniose são particularmente diversas, representando um complexo de doenças (Figura 1): leishmaniose visceral (LV) ou calazar, caracterizada por febre, taquicardia, diarreia e tosse frequentes, hepatoesplenomegalia e hiperpigmentação tardia, normalmente fatal quando não tratada; leishmaniose muco-cutânea (LMC) é uma doença que causa mutilações sob a forma de lesões metastáticas que destroem as cartilagens e mucosas do nariz, boca e garganta; leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma doença tardia devido à deficiência na resposta imune mediada por células e, por fim a leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada por lesões únicas ou múltiplas na pele, tipicamente ulceradas (HARRIS et al., 1998; DESJEUX, 2004; AWASTHI, 2004).

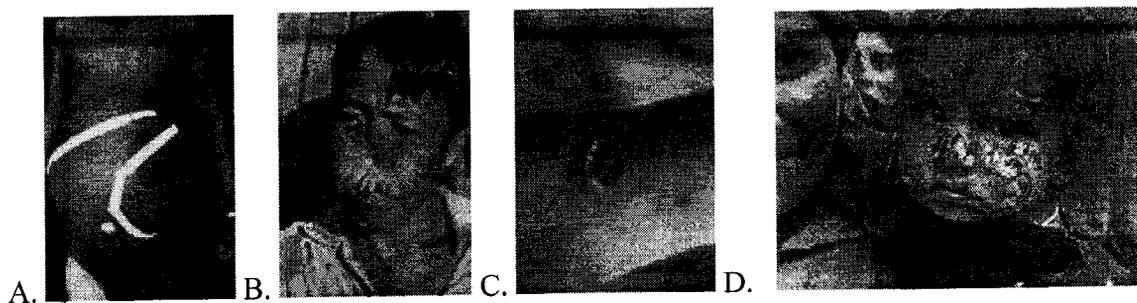


Figura 1: A. Hepatoesplenomegalia causada por leishmaniose visceral; B. Lesão causada por leishmaniose mucocutânea; C. Lesão ulcerada com bordas bem definidas, característica de leishmaniose cutânea; D. Lesões múltiplas causadas por leishmaniose cutânea difusa. Fonte: WHO, 2007.

Leishmanioses são consideradas calamidades tropicais que juntas constituem uma das seis doenças consideradas mais importantes pela World Health Organization/Tropical Disease Research (WHO/TDR). A doença é endêmica em 88 países de 5 continentes, com um total de 350 milhões de pessoas em risco e 12 milhões de casos, e mais de 400 mil novos casos são reportados anualmente. Dos 88 países, 22 situam-se no Novo Mundo e 66 no Velho Mundo com uma incidência estimada de 1-1.5 milhões de casos de LC e 500.000 casos de LV. De todos os casos de LV, mais de 90 por cento são da Índia, Bangladesh, sul do Sudão, Nepal e nordeste do Brasil. Apesar dessa distribuição geográfica difundida, leishmanioses humanas estão geralmente focadas dentro de uma área endêmica, direcionando a “hotspots” de transmissão da doença (SINGH, 2006).

Infecções com o protozoário parasito *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) ou diferentes linhagens são reconhecidas como causadoras de doenças humanas em áreas da América (sub)tropical (no mínimo 15 países), onde constituem um significativo problema de saúde pública (CUPOLILLO, et al., 2003; AVILES, et al., 1999). Essa espécie é responsável pela maioria dos casos de leishmaniose cutânea humana na América do Sul e possui ampla distribuição geográfica no Brasil, ocorrendo nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Ceará, Pará, e provavelmente em outras partes do país (GOMES et al., 1995).

As perspectivas de controle são ainda altamente dependentes de progressivas pesquisas para a obtenção de melhores equipamentos e uma estratégia de custo mais efetivo para administração dos casos e controle do vetor (DESJEUX, 2004).

1.2 Classificação das espécies de *Leishmania*

Aproximadamente 21 espécies de *Leishmania* têm sido identificadas por serem patogênicas a humanos. *Leishmania* é um dos vários gêneros que compõem a família *Trypanosomatidae*, e são protozoários parasitos intracelulares caracterizados por possuírem um cinetoplasto, uma forma única de DNA mitocondrial (SINGH, 2006). As morfologias das várias espécies de *Leishmania* em observação direta em microscópio são muito homogêneas, e este método não pode ser usado para diferenciar as várias espécies (MINODIER, et al., 1997). A presença do cinetoplasto torna-se morfológicamente muito semelhantes, seguindo o mesmo padrão comum de uma célula com um núcleo e um flagelo único que se origina da região do cinetoplasto (SHAW, 1997).

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros *Viannia* e *Leishmania* de acordo com seus desenvolvimentos no inseto vetor. Especificações nos subgêneros dependem de vários fatores como a distribuição geográfica de um isolado, a apresentação clínica da doença, e a epidemiologia do vetor e do animal reservatório (AVILES, et al., 1999).

Parasitas que causam LC no Novo Mundo são agrupados (Tabela 1) nos complexos *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana*, enquanto aqueles que causam LV são agrupados no complexo *Leishmania donovani*. Os agentes etiológicos de LC do Velho Mundo são representados pela *Leishmania tropica*, *Leishmania aethiopica* e *Leishmania major* (TEIXEIRA et al., 2006).

Espécies de *Leishmania* foram originalmente classificadas por suas distribuições geográficas e apresentações clínicas das doenças que elas causam, assim como a epidemiologia, os flebótomos vetores, ou as espécies de animais reservatórios (LAINSON & SHAW, 1987; MARFURT et al., 2003).

1.3 Ciclo de vida do parasito

No ciclo de vida dimórfico da *Leishmania*, o vetor invertebrado díptero do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) torna-se infectado quando alimenta-se de sangue de um indivíduo infectado ou de um animal reservatório (Figura 2). Os parasitos *Leishmania* vivem em macrófagos circulantes sob a forma amastigota. Ao ingerir macrófagos, as amastigotas são liberadas dentro do estômago do inseto. Logo após, as amastigotas transformam-se nas formas promastigotas, que são móveis, alongadas e flageladas. As promastigotas, então, migram para o trato alimentar do díptero, onde vivem extracelularmente e multiplicam-se por divisão binária. Quando o inseto pica novamente um hospedeiro saudável, as formas promastigotas são liberadas na circulação sanguínea do hospedeiro juntamente com a saliva do inseto. As promastigotas são então fagocitadas por macrófagos onde transformam-se em amastigotas não flageladas. Estas se multiplicam e replicam por divisão binária dentro dos macrófagos. Estes, infectados, rompem-se e liberam amastigotas que podem infectar outra população de macrófagos até então não-infectados ou podem ser sugadas pelo mosquito-palha durante a alimentação com o sangue do hospedeiro vertebrado, e essas amastigotas transformam-se novamente em promastigotas metacíclicas dando continuidade ao ciclo (AWASTHI, 2004).

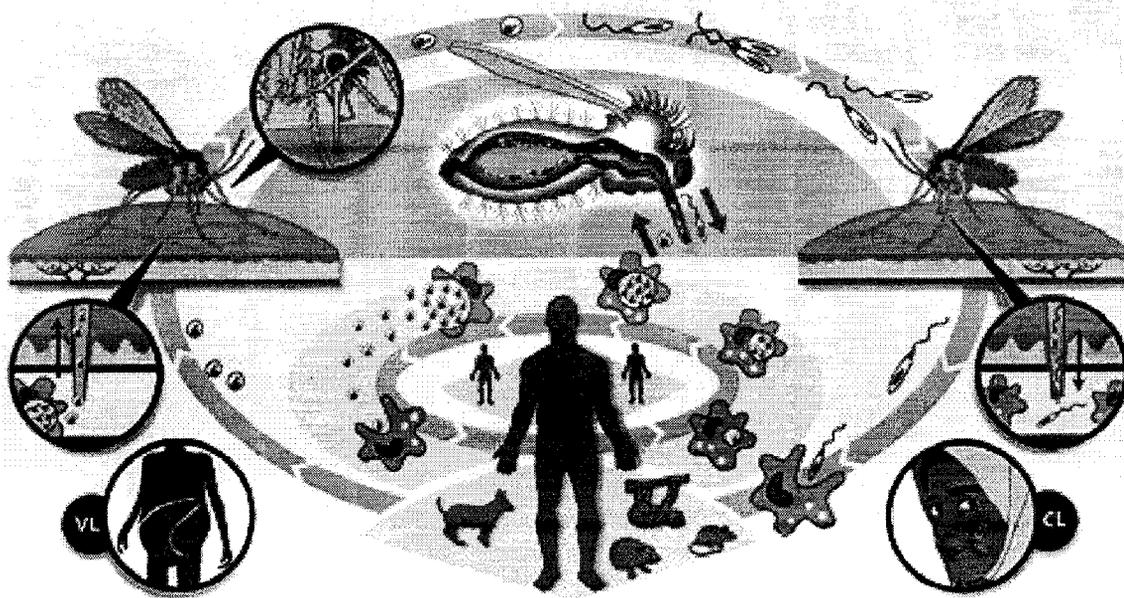


Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Fonte: WHO, 2007.

1.4 Diversidade gênica do parasito

A existência de ciclo urbano envolvendo espécies de flebotomos peridomésticos para *L. (V.) braziliensis* reflete a habilidade destes parasitas e seus vetores de se adaptarem a mudanças em seus habitats com importantes implicações na saúde pública. Estudos utilizando técnicas moleculares para caracterizar populações de *L. (V.) braziliensis* de diferentes regiões mostraram a relação entre o nível de similaridade entre as populações de parasitas (GOMES, et al., 1995) e seus limites geográficos, mas recentes dados indicaram também que a considerável variabilidade detectada entre estes parasitas está mais relacionada aos vetores flebotomos e/ou aos animais reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão (CUPOLILLO et al., 2003).

Diferenças em apresentações clínicas e variedade de leishmanioses são fundamentadas por interações entre moléculas particulares e características biológicas de diferentes espécies de *Leishmania*, além da genética, imunidade do hospedeiro e fatores ambientais. Embora seja geralmente aceito que as principais formas clínicas de leishmaniose cutânea americana (LCA) possam ser causadas por determinadas espécies de *Leishmania*, investigações sobre a relação entre polimorfismos e apresentações clínicas têm provado pouca evidência para fortes associações. Em adição, espécies de *Leishmania* do Novo Mundo divergem geneticamente de

acordo com estudos relatados no Brasil, Colômbia, Guiana Francesa e Peru (CALVOPINA et al., 2006).

Numerosas condições primárias e secundárias de pele são freqüentemente diagnosticadas como lesões iniciais de leishmaniose cutânea em países endêmicos e, em países não-endêmicos, CL são erroneamente diagnosticadas como outras doenças. Algumas das condições mais comuns que deveriam ser diferenciadas de leishmaniose cutânea são úlceras tropicais, impetigo (erupções pustulosas da pele), picadas de insetos infectados, lepra, lupus vulgaris, sífilis terciária, framboesia, blastomicose, câncer de pele, entre outras. Havendo suspeita de leishmaniose, somente métodos laboratoriais podem dar um diagnóstico final. Há vários métodos de diagnósticos de leishmaniose, incluindo parasitológico, imunológico, molecular e por uso de animais experimentais (SINGH, 2006).

Em humanos e outros vertebrados, as leishmanias ocorrem em estágio de minúsculas amastigotas esféricas que podem ser encontradas em úlceras de pele, medula óssea, fluido aspirado, e/ou biópsias de órgãos viscerais. Devido à baixa abundância desses parasitos nas biópsias, diagnósticos baseados na presença de células de leishmanias são difíceis, considerando que diagnósticos histopatológicos e imunológicos não possibilitam a discriminação de espécies, além de possuírem baixa sensibilidade.

Até o momento, a identificação da espécie responsável pela infecção é crítica para tratamento apropriado e medidas de controle, devido aos prognósticos clínicos, protocolos de tratamento e diferentes esquemas de controle para indivíduos leishmania (JIRKU et al., 2006). Uma correta classificação de espécies *Leishmania* infectantes pode proporcionar importantes informações complementares para o clínico que pode resultar em mudanças no prognóstico clínico, bem como o estabelecimento de técnicas terapêuticas direcionadas à espécie. Além do mais, a identificação da espécie infectante é importante no monitoramento terapêutico (MARFURT et al., 2003).

1.5 Diagnóstico

Biologia molecular está tornando-se cada vez mais relevante para diagnóstico e controle de doenças infecciosas. Informações nas seqüências de DNA têm sido extensamente exploradas para o desenvolvimento de técnicas baseadas nas reações em cadeia da polimerase (PCR) para várias aplicações na detecção do parasito e no diagnóstico das doenças. Dentre os métodos usados para diagnóstico clínico, a PCR tem sido a mais sensível e específica técnica, embora limitada a

cuidados terciários de hospitais e laboratórios de pesquisa. A especificidade da PCR pode ser adaptada a necessidades específicas por conservar a região do gene alvo. A amplificação de gene através de PCR tem apresentado diversos avanços comparados a técnicas tradicionais devido à sua sensibilidade extremamente alta, rapidez e a habilidade de ser efetuada com um grande número de espécimes clínicos. Pacientes com CL crônica são geralmente atípicos e apresentam baixo ou nenhum anticorpo contra *Leishmania*, e assim, testes sorológicos não são recomendáveis. Em tais casos, a PCR tem provado ser a mais importante ferramenta para diagnóstico. A sensibilidade da PCR em leishmaniose cutânea tem sido reportada em 100 por cento (SINGH, 2006). Avanços na tecnologia molecular estão facilitando os estudos da ecologia de populações clonais de *Leishmania* pelo fornecimento de informações em fontes de infecção, padrões de transmissão, respostas a tratamento, e a importância da imunidade na prevenção da re-infecção (CUPOLILLO et al, 2003).

Sistemas PCR para detecção de diferentes espécies de *Leishmania* são valiosas ferramentas não apenas para diagnóstico diferencial de doenças que causam úlceras na pele, mas também para investigação da relação entre os agentes causadores e as manifestações clínicas e epidemiológicas da doença (RODRIGUES et al., 2002). Devido à especificidade molecular dessa técnica, a detecção e a caracterização genética de *Leishmania* podem ser realizadas simultaneamente. A PCR sozinha pode ser usada para identificação dos complexos *Leishmania* (BELLI et al., 1998). A discriminação de espécies é importante não somente por razões epidemiológicas, mas também por razões clínicas (MARFURT et al., 2003).

1.6 Genotipagem

Já que a diferenciação morfológica de espécies de *Leishmania* é difícil, uma variedade de critérios bioquímicos, imunológicos ou moleculares têm sido introduzidos para a classificação de espécies patogênicas, como a caracterização por eletroforese de isoenzimas (análise zimodema), por anticorpos monoclonais (serodema) ou por hibridação com ensaios de espécies específicas como de mini-círculo de DNA (MARFURT et al., 2003).

A análise zimodema é um processo longo e de custo elevado que requer cultivo em larga escala de parasitos. Anticorpos monoclonais são úteis para identificação de espécies em cepas cultivadas, entretanto, pouco hábeis para análise direta de espécimes clínicos. Técnicas moleculares, como a PCR, oferecem uma alternativa para a demonstração de parasitas em

amostras clínicas. Devido a sua especificidade molecular, detecção e caracterização genética de *Leishmania* essas técnicas podem ser realizadas simultaneamente. A PCR sozinha pode ser usada para identificação de complexos *Leishmania*, mas ainda não substitui análises zimodema e serodema para caracterização de *Leishmania* a nível de espécie (BELLI et al., 1998).

1.7 Modelos experimentais para *Leishmania braziliensis*

Modelos murinos são úteis para o estudo de patogenias e resposta imunológica do hospedeiro quando infectados com protozoários parasitos, porém, há poucos trabalhos experimentais sendo conduzidos com *L. braziliensis*, provavelmente porque muitas linhagens de camundongos não desenvolvam lesões no local da inoculação de *L. braziliensis*. Esse fenótipo (ausência de lesão) está sendo associado com a incapacidade de manter uma forte resposta imune tipo 2 (OLIVEIRA et al., 2004; MOURA et al., 2005).

A regulação da resposta imune direta contra *Leishmania* é crítica para o estabelecimento do controle efetivo da doença. É provável que alguns tipos de resposta imune contra *Leishmania* possam levar a formas clínicas de leishmanioses mais severas, causando um pobre controle de patógenos e/ou patologia, enquanto outros levam à resolução da infecção com pouca patologia, como em leishmaniose cutânea (ANTONELLI et al., 2004).

Em modelos experimentais de leishmaniose cutânea, a resistência depende do desenvolvimento de uma resposta Th1 predominante, levando ao controle do crescimento do parasito, à cura da lesão e ao desenvolvimento de uma imunidade protetora. A insuficiência neste tipo de resposta resulta na progressão da doença. Camundongos da linhagem BALB/c são relativamente resistentes à infecção com *L. braziliensis* devido à potente resposta imune Th1 que desenvolvem ao longo da infecção caracterizada por altos níveis de INF (interferon)- γ e baixos níveis de IL (interleucina)-4 e IL-10 (MOURA et al., 2005).

1.8 Mediadores químicos da resposta imune de hospedeiro de *Leishmania*

Citocinas são proteínas mediadoras de pequena extensão, com um extenso quadro de ações. Elas são importantes em todos os processos biológicos, incluindo crescimento de células T [IL (interleucina)-2, IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21], inflamação [TNF (fator de necrose tumoral), IL-1,

IL-6 e IFN (interferon)- γ] bem como inibição da inflamação [IL-10, TGF (fator de transformação de crescimento)- β e IL-4] (FELDMANN & STEINMAN, 2005).

Crucial para defesa contra leishmanioses é a habilidade do hospedeiro desencadear uma resposta imune mediada por células capaz de controlar e/ou eliminar o parasito. O recrutamento de células para o sítio de infecção é essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune celular do hospedeiro. O processo é controlado por quimiocinas, que são citocinas quimiotáticas produzidas por leucócitos e células teciduais (TEIXEIRA et al, 2006).

Citocinas estão diretamente envolvidas na produção de quimiocinas e podem também preceder a expressão de algumas quimiocinas, que, ao contrário, induzem a produção de mediadores inflamatórios adicionais. Citocinas exercem um efeito secundário no recrutamento de leucócitos pela indução da expressão de vários genes quimiotáticos (TEIXEIRA et al, 2006).

Estudos com macrófagos murinos mostraram que a indução de quimiocinas após infecção com *Leishmania* é dependente da cepa do parasito utilizada. Além do mais, parece que a virulência da *Leishmania* está ligada à modulação da expressão de quimiocinas pelos macrófagos. A cinética de indução das quimiocinas parece ser mais importante do que a multiplicação do parasito, e este fato pode estar relacionado às diferenças genéticas dos isolados. Diferentes cepas podem induzir diferentes intensidades e/ou velocidades de expressão de quimiocinas, levando a uma diversidade no recrutamento celular e diferentes respostas inflamatórias. Estes fatores podem, por fim, implicar na diversidade de apresentação da doença. Em leishmaniose, citocinas parecem agir sinergicamente com elementos leishmaniais para regular a produção de quimiocina (TEIXEIRA et al., 2005).

1.9 Potencial de escape da *Leishmania*

O macrófago é um fagócito primário que atua como hospedeiro para *Leishmania*. Essas células são especializadas em destruir patógenos invasores e iniciar a resposta imune do hospedeiro (OLIVIER et al., 2005). A ativação do macrófago é um mecanismo primário para eliminar o parasito *Leishmania* presumivelmente mediado por metabólitos tóxicos de oxigênio, que podem incluir o anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico. Uma variedade de estímulos pode induzir as mudanças morfológicas, bioquímicas e funcionais, características de macrófagos ativados. Estes produzem diferentes citocinas como TNF- α , IL-6, IL-18, IL-12 e INF- γ (AWASTHI et al., 2004).

Leishmania desenvolveu diversos e sofisticados mecanismos para subverter as funções normais dos macrófagos. Estes incluem a prevenção da ativação de agente antimicrobianos como óxido nítrico (NO) e também a inibição de muitas das funções dos macrófagos induzidas por citocinas para o desenvolvimentos de uma resposta imune efetiva. Isso permite ao parasito fugir da resposta imune inata e se dividir dentro do fagolisossomo do macrófago infectado, de onde ele pode alastrar e propagar a doença dentro do hospedeiro, modulando o desenvolvimento do macrófago a seu favor (OLIVIER et al., 2005).

Dado a diversidade de patologias causadas pelas *Leishmania* spp., é inevitável que existam diferenças significativas nos mecanismos de manipulação das células do hospedeiro (OLIVIER et al., 2005). As diferenças intraespecíficas e os fatores do hospedeiro contribuem para o desenvolvimento da infecção por *L. braziliensis* (LEOPOLDO et al., 2006).

1.10 Justificativa

O estudo de hospedeiros resistentes a agentes infecciosos permite possíveis descobertas sobre os mecanismos de resposta imune que potencializam o organismo infectado a eliminar o parasito. Assim, o uso de camundongos BALB/c, considerados resistentes a *Leishmania (Viannia) braziliensis* podem ser bons modelos experimentais em pesquisas sobre leishmaniose mucocutânea. Os resultados do presente trabalho podem auxiliar no direcionamento de outros estudos sobre a potencialidade de cura mediada por citocinas ou outros mediadores químicos envolvidos no controle da patologia.

2 OBJETIVOS

- Identificar, em nível de espécie, os isolados de *Leishmania* obtidos a partir de biópsias de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU);
- Analisar a presença de parasitos do complexo *Leishmania braziliensis* no baço e no fígado de camundongos BALB/c inoculados com isolados de *L. (V.) braziliensis*;
- Avaliar o perfil de citocinas expresso no baço e fígado dos camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento e cultivo de *L. braziliensis*

Para o isolamento dos parasitos a partir de biópsias de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos, com 45-50 g de peso corporal, criados e mantidos no biotério do ICBIM-UFU. Biópsias de pacientes com manifestação clínica de leishmaniose foram obtidas de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP: 109/02) e maceradas em salina tamponada com fosfatos foram inoculadas no coxim plantar destes animais. Após 4 semanas de evolução da lesão, os hamsters foram eutanasiados de acordo com as normas do comitê de ética de experimentação animal. Fragmentos das patas infectadas foram coletados e macerados em meio de cultura, para posterior obtenção de formas promastigotas, que foram utilizadas nas reações de PCR. Realizou-se também cultura em meio axênico, para genotipagem por isoenzimas e posterior inóculo em camundongos. As formas promastigotas do parasito foram expandidas, a partir de crio preservados, em meio Schneider suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) contendo 2mM de L-Glutamina e 100µg/ml de Gentamicina.

3.2 Preparação da massa parasitária para isoenzimas

O cultivo de promastigotas de *Leishmania* foi feito em meio bifásico contendo sangue de coelho desfibrinado e estéril com BHI-ágar (NNN) e meio Schneider de *Drosophila* suplementado com 20% de SFB em estufa a 25°C. As células foram observadas por microscopia. Na preparação das amostras, os parasitos (promastigotas na fase log de crescimento em culturas) foram centrifugados (4000 rpm por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado com tampão (0,85% de NaCl e 0,01M de EDTA) e centrifugado nas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e a massa parasitária armazenada a -70°C até o uso.

3.3 Genotipagem por isoenzimas

A análise foi realizada por eletroforese usando géis de agarose. Os géis foram preparados com 50ml de tampão, 50 ml de água destilada e 1g de agarose. Os tampões, diluídos em água destilada, variaram em Tris-Cítrico (ácido cítrico monohidratado a 0,079M e Trizima) pH 8,1, Tris-Fosfato (NaH₂PO₄ e Trizima) pH8,0 e Tris-Maleico (Na₂EDTA a 372,2M; MgCl₂ anidro a

95,21M; ácido maléico a 116,1M e Trizima) pH7,4. Os géis foram montados sobre placas em suporte nivelado e, após polimerizados, foram secos com papel filtro e armazenados a 4°C overnight. Utilizando uma fita de aplicação, aplicou-se corante nas bandas onde seriam posteriormente aplicadas as amostras mantidas em gelo. Esperou-se a absorção das amostras pelo gel e, após retirar a fita, o gel foi colocado em cuba contendo tampão (Tris-Cítrico, Tris-Fosfato ou Tris-Maleico, determinado de acordo com o gel preparado) para a corrida por eletroforese. A revelação foi realizada de acordo com o protocolo de cada enzima. A posição das bandas de enzimas nos géis foi determinada primeiramente para as cepas referência de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e então comparadas com as amostras dos isolados. A corrida dos extratos de leishmania foi feita em experimentos separados, e, similarmente, diferenças de intensidade entre as bandas de idêntica mobilidade eletroforética foram ignoradas.

Cada amostra foi testada para a atividade de enzimas nomeadas como: aconitato hidratase (ACON), fumarato hidratase (FUM), glicose fosfato isomerase (GPI), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), hexoquinase (HK), isocitrato desidrogenase (IDHNAD e IDHNADP), malato desidrogenase (MDH), enzima málica (ME), manose fosfato isomerase (MPI), nucleotidase (NH1 e NH2), prolina dipeptidase (PEPD), leucina peptidase (PEP1), alanina peptidase (PEP3), fosfoglucomutase (PGM), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) e ácido fosfatase (ACP). As condições eletroforéticas e de desenvolvimento para essas enzimas estão especificadas na Tabela 2.

3.4 Infecção experimental de camundongos

Foram utilizados no experimento 16 fêmeas de camundongos BALB/c, com idade entre 6 a 8 semanas. Os animais foram mantidos com água e ração comercial balanceada, no Biotério do Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (LEA-UFU). Cada camundongo foi inoculado no coxim plantar com uma cultura de 10^6 parasitos promastigotas na fase estacionária. Após 10 semanas de infecção, os camundongos foram eutanasiados de acordo com as normas do comitê de ética de experimentação animal.

3.5 Extração de DNA

Biópsias de baço e fígado foram coletadas e armazenadas a -20°C até o momento da extração. Fragmentos das biópsias foram colocados em tubos de 1,5ml e macerados com o auxílio de pistilos. Ao tecido macerado adicionou-se 50 μl de tampão contendo 10mM de Tris HCl pH8,0; 10mM de EDTA e 5,0 μl de proteinase K, contendo 50 μg da enzima. A mistura foi agitada em “vórtex” por 10 minutos e mantida em banho seco a 45°C overnight para ocorrer digestão protéica. Após isso, as amostras foram incubadas a 90°C por 20 minutos para inibir a proteinase K. Posteriormente, adicionou-se 100 μl de solução fenol/clorofórmio e a mistura foi novamente agitada por 10 segundos e depois centrifugada por 2 minutos a 1200 rpm. A parte aquosa superior das duas fases foi cuidadosamente coletada e transferida para outro tubo, e a ela, adicionou-se etanol 100% gelado, correspondendo a 2 vezes o volume da fração aquosa. A mistura foi novamente agitada em vórtex e armazenada a -20°C por 12 horas. Centrifugou-se a amostra por 5 minutos a 12000rpm, desprezou-se o sobrenadante e, ao pellet, foi adicionado e homogeneizado 1ml de etanol 70% conservado à temperatura ambiente. A amostra foi novamente centrifugada e o sobrenadante descartado. O tubo foi invertido sobre papel filtro até a total secagem do pellet, quando a ele foi adicionado de 30 a 100 μl de água Milli-Q estéril, de acordo com o tamanho do pellet formado. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento de uso. Procedimentos foram adotados para evitar possíveis contaminações de instrumentos e área de trabalho, como, por exemplo, uso de hipoclorito diluído e raios ultravioleta. Esses cuidados foram tomados tanto na sala onde foram realizadas as extrações de DNA e RNA, quanto na sala onde foram preparados os mixes para PCR.

3.6 PCR-Multiplex *Leishmania*

A Reação de amplificação por PCR foi preparada em volume final de 25 μl contendo 50 mM de KCl, 10 mM de Tris pH 8,3, 200 μM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl_2 , 5% de dimetil sulfóxido, 50 mM de cloreto de tetrametilamonio, 0,6M de betaina, 1 mM de ditiotreitol, 0,4 μM da sonda 5' LLU-5A, 0,2 μM de cada sonda 3' (LLB-3C, LLM-3A, LLC-3L), 0,04 U de *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase por μl e 5 μl da amostra de paciente / controle, contendo DNA (Tabela 3). O processo de amplificação foi realizado com desnaturação

inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos (95°C por 30 segundos, 54°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos) e extensão final a 72°C por cinco minutos. O produto final da amplificação foi analisado em gel de agarose a 2% preparado em tampão (Tris-EDTA) contendo brometo de etídio a 0,05mg/ml e visualizado em transiluminador. As bandas das amostras foram comparadas às das cepas padrões dos complexos *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. donovani* (Tabela 4).

3.7 Extração de RNA

Biópsias de baço e fígado foram coletadas dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* e armazenadas em tubos contendo RNA later a -20°C até o momento da extração cuja realização foi toda realizada em gelo. Fragmentos das biópsias foram transferidos para tubos de 1,5ml e cada fragmento foi macerado, com o auxílio de um pistilo, em 500µl de TRIZOL. Após completa maceração, adicionou-se 200µl de clorofórmio-álcool isoamílico (49:1). A mistura foi homogeneizada em vórtex e posteriormente incubada por 30 minutos em banho de gelo. Após esse período foi submetida à centrifugação a 10 000 rpm por 20 minutos a 4°C. A fase aquosa foi cuidadosamente coletada e transferida para outro tubo, ao qual adicionou-se 1ml de isopropanol e mantida a 4°C overnight para precipitação do RNA. Centrifugou-se novamente a mistura a 10 000 rpm por 20 minutos a 4°C e desprezou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 500µl de etanol a 70% e centrifugado a 12 000rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento dissolvido em 100µl de água Milli-Q estéril e estocado a -70°C até o uso.

3.8 Quantificação de RNA

Para a quantificação foram adicionados 10µl de RNA em 990µl de água Milli-Q estéril. O RNA foi quantificado por leitura em espectrofotômetro a 260nm. O aparelho foi zerado com água destilada estéril a cada nova leitura. A concentração de RNA foi determinada pela fórmula $[RNA]=A_{260} \times 40 \times \text{fator de diluição da amostra} (100) = \mu\text{g/ml}$.

3.9 Síntese de cDNA

Para obtenção do cDNA foram adicionados, mantendo-se o tubo em gelo, 0,5µl de Oligo (dT)₂₀ a 50µM, 1,0µl de DNTPs a 10µM, 5µg de RNA da amostra e completou-se a mistura para 13µl com água Milli-Q estéril. Essa mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e incubada a 25°C por 15 minutos em termociclador. Durante a incubação foram adicionados, em outro tubo, 4,0µl de tampão Buffer (5x), 1,0µl de ditioneitol (DTT) a 0,1M, 0,5µl de Superase-In, 0,5µl de SuperScript III (200U/µl) e 0,5µl de água Milli-Q estéril. Após os 15 minutos de incubação do cDNA, adicionou-se 7,0µl do mix às amostras que foram incubadas, em termociclador, a 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos, 70°C por 15 minutos e posteriormente armazenadas a -20°C até o uso.

3.10 Avaliação do perfil de citocinas por RT-PCR (transcrição reversa da reação em cadeia de polimerase).

A 2,0µl de cDNA de cada amostra adicionou-se 1,0µl de tampão Buffer (10x), 0,3µl de MgCl₂ a 50mM, 0,2µl de dNTPs a 10mM, 1,0µl de primer (sense/anti-sense), 0,05µl de Taq Polimerase a 5U/µl e 4,42µl de água Milli-Q estéril. O material foi submetido à desnaturação a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de repetição de 94°C por 1 minuto, 57°C para anelamento por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e posterior incubação a 72°C por 10 minutos. A temperatura de anelamento foi aumentada quando observadas bandas inespecíficas no gel, e diminuída quando as bandas não apresentaram intensidade. As amostras foram mantidas a 4°C até o uso.

3.11 Leitura em gel de agarose

Os produtos de PCR foram aplicados, juntamente com tampão a base de glicerol e corante Azul de Bromofenol, em gel de agarose 2% preparado em tampão tris-EDTA contendo brometo de etídio a 0,05mg/ml. As bandas foram visualizadas sobre luz UV em transiluminador e registradas com fotos digitais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dificuldades na identificação de espécies de *Leishmania* devido à similar morfologia das formas amastigotas das diferentes espécies de *Leishmania* têm sido solucionadas com a caracterização por isoenzimas (NIMRI et al., 2002). Através da técnica de genotipagem por isoenzimas foi possível, neste trabalho, comparar as cepas de isolados de pacientes com a cepa referência *Leishmania (Viannia) braziliensis* HOM/BR/75/M2903. As bandas resultantes da reação entre os isolados e as isoenzimas foram semelhantes às formadas utilizando-se a cepa padrão (Figura 2). Com esses dados pôde-se afirmar que as leishmanias isoladas dos pacientes e utilizadas no inóculo dos camundongos pertencem à espécie *L. (V.) braziliensis*.

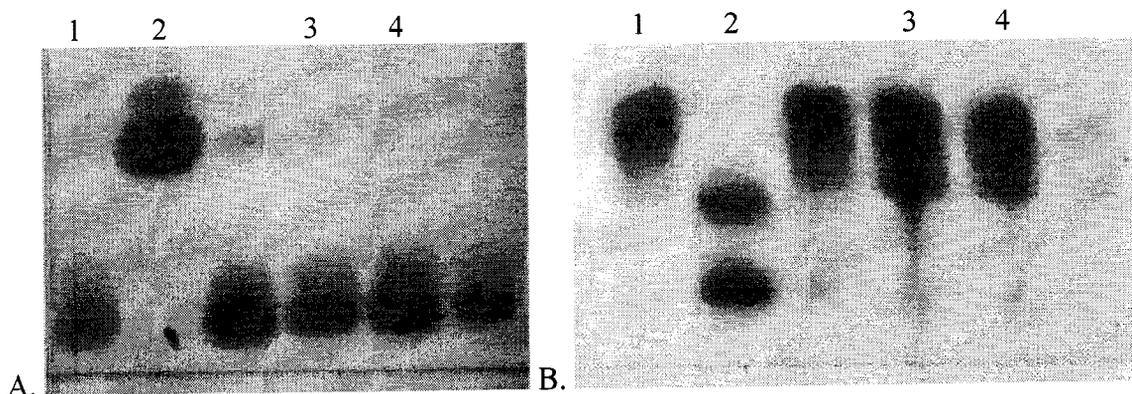


Figura 2. A. Gel revelado com enzima 6PG; B. Gel revelado com enzima G6P; 1. Cepa padrão de *L.(V.) braziliensis*; 2. Cepa padrão de *L. (L.) amazonensis*; 3 e 4. Isolados de *Leishmania* de pacientes cuja posição das bandas assemelham-se às bandas da cepa referência da espécie *L. (V.) braziliensis*.

A PCR permite que o DNA de uma região selecionada do genoma seja amplificado um bilhão de vezes, “purificando” efetivamente este DNA do restante do genoma. Os oligonucleotídeos, também denominados *primers*, são utilizados para iniciar a síntese de DNA nas fitas simples geradas pelo aquecimento do DNA do genoma inteiro (processo de desnaturação). O novo DNA sintetizado é produzido em uma reação catalisada *in vitro* por uma DNA polimerase purificada, e os iniciadores permanecem nas extremidades 5' dos fragmentos finais de DNA que são produzidos. Ao fim da amplificação, o DNA pode ser introduzido em gel de agarose, no qual, após corrida por eletroforese, formam-se bandas específicas que podem ser identificadas quando o DNA é exposto ao corante brometo de etídeo, que fluoresce sob luz ultravioleta quando está ligado ao DNA (ALBERTS et al, 2004).

Segundo Harris e colaboradores (1998), a PCR-Multiplex é uma técnica simples, sensível e específica para a diferenciação de três complexos de *Leishmania* do Novo Mundo (Figura 3).

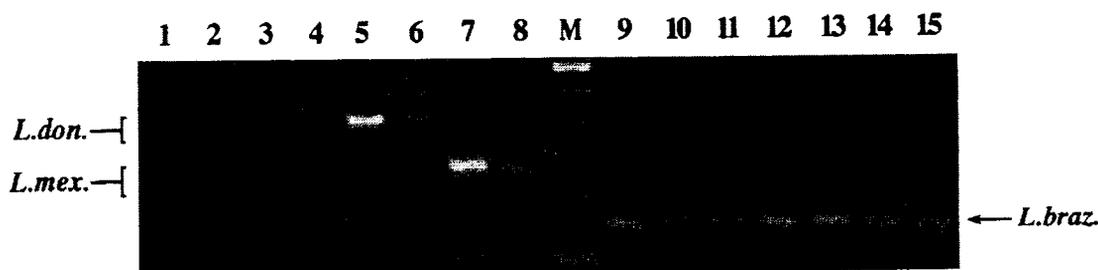


Figura 3. Especificidade da técnica PCR-Multiplex na amplificação de região específica para os complexos *L. donovani*, *L. mexicana* e *L. braziliensis*. Modificado de Harris et al (1998).

Neste trabalho, com a utilização da técnica PCR-Multiplex não foram detectados DNA de parasitos do complexo *L. braziliensis* no baço e no fígado dos camundongos inoculados tanto com a cepa padrão HOM/BR/75/M2903 quanto com parasitos dos isolados. Caso a técnica tenha sido realmente eficiente, provavelmente os camundongos infectados neste experimento desenvolveram a cura promovida através de uma resposta imune eficaz, resultando na possível eliminação do parasito nesses órgãos.

O controle de uma determinada infecção depende da habilidade do organismo do hospedeiro em gerar uma resposta imune eficiente levando ao controle do agente infeccioso. O controle da resposta é essencial para o estabelecimento da patologia ou sua cura. Esta ação coordenada do sistema imune envolve mobilização de mecanismos inflamatórios e antiinflamatórios, e respostas modulatórias. A determinação dos mecanismos envolvidos com o desenvolvimento da patologia permitirá novas possibilidades de intervenções imunológicas para a prevenção da patologia (FARIA et al., 2005).

Parasitos *Leishmania* são patógenos intracelulares obrigatórios que invadem preferencialmente macrófagos ou células dendríticas para replicação. Os eventos iniciais de interação parasito-hospedeiro provavelmente influenciam o futuro curso da doença. Como resultado de uma infecção por *Leishmania* na pele, inicia-se um processo inflamatório local envolvendo o acúmulo de leucócitos no sítio de entrada do parasito. A composição de populações de células recrutadas nesta fase inicial de infecção é essencial para definir o desenvolvimento da doença. Durante este processo, membros da família de quimiocinas tem um papel fundamental na atração específica de subgrupos de leucócitos para o sítio de infecção e então estimulá-los. As

funções das quimiocinas na infecção por *Leishmania* incluem mecanismos de defesa do hospedeiro assim como de recrutamento de leucócitos, participação na imunidade mediada por células, ativação de células e atividade anti-leishmanial (TEIXEIRA et al., 2006). A Tabela 5 resume os principais locais de atuação e as principais atividades biológicas das citocinas cujas expressões foram avaliadas neste trabalho.

Os eventos iniciais da infecção por *Leishmania* são importantes na determinação do controle ou evolução da doença. É bem conhecido que a cura das leishmanioses depende da ativação apropriada de macrófagos por IFN- γ secretado por linfócitos Th1, sob a influência de IL-12 e IL-18. Quando os parasitos encontram condições favoráveis para a produção de citocinas Th2, como IL-4, IL-10 e IL-13, que são antagonistas naturais da resposta imune Th1, a multiplicação da leishmania é aumentada e a infecção desenvolve-se em doença (SOUSA-ATTA et al., 2002).

Citocinas têm sido reconhecidas como elementos chaves na resposta do hospedeiro contra *Leishmania*. Macrófagos, que abrigam *Leishmania* produzem preferencialmente IL-1 β , TNF- α e IL-12, todos produtos que resultam em resposta inflamatória. Células Th1 produzem IFN- γ , e células Th2 produzem IL-4. Outras células são também responsáveis pela produção de citocinas, como as células dendríticas (DC) que produzem IL-12 e células exterminadoras naturais (NK), IFN- γ (TEIXEIRA et al., 2006).

Genes que codificam proteínas correspondem a seqüências de DNA que são transcritas em mRNA. A seleção dessas seqüências pode ser realizada extraindo o mRNA de células e, então, fazendo uma cópia de DNA complementar (cDNA) de cada molécula de mRNA presente. Essa reação é catalisada pela enzima transcriptase reversa de retrovírus, que sintetiza uma cadeia de DNA a partir de um molde de RNA. As moléculas de DNA de fita simples sintetizadas pela transcriptase reversa são convertidas em moléculas de DNA de fita dupla pela DNA polimerase. O cDNA contém apenas regiões do genoma que foram transcritas em mRNA. As células pertencentes a diferentes tecidos produzem conjuntos diferentes de moléculas de mRNA (ALBERTS et al, 2004).

Com a técnica de RT-PCR (transcrição reversa da reação em cadeia de polimerase), foi possível estabelecer no presente trabalho as principais citocinas, proteínas mediadoras da resposta imune presentes nos órgãos (baço e fígado) dos camundongos BALB/c. Neste trabalho utilizou-se o baço por ser um importante órgão linfóide, no qual os antígenos presentes no organismo

interagem com as células competentes do sistema imune, e o fígado, por expressar qualquer alteração sistêmica induzida por patógenos.

Os dados obtidos sobre a expressão das citocinas analisadas no baço e no fígado dos camundongos BALB/c utilizados neste estudo estão sintetizados na Tabela 6. As células do fígado dos animais do grupo não infectado apresentaram expressão constitutiva independente de estímulo para todas as citocinas, com exceção da IL-4. Os baços desses animais não expressaram nenhuma citocina avaliada, podendo, assim, ser considerado um bom grupo controle.

A citocina IL-13 foi expressa tanto no fígado quanto no baço dos três grupos de camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis*. Embora a citocina IL-13 induza a produção de IL-4 e ambas estejam relacionadas ao perfil Th2 da resposta imune dos camundongos, não houve detecção da expressão de IL-4 nos órgãos analisados, com exceção de um animal inoculado com a cepa referência de *L. (V.) braziliensis*. Essa única expressão pode estar relacionada à permanência tardia de uma resposta Th2.

TGF- β está relacionado à desregulação de macrófagos infectados, e este mediador químico apresentou expressão em todos os grupos de BALB/c analisados. A expressão dessas citocinas no baço dos três grupos infectados provavelmente tende à diminuição já que houve o desenvolvimento de cura da leishmaniose nos camundongos utilizados neste estudo.

IL-12 é um adjuvante efetivo e um pré-requisito para resposta imune tipo Th1 em muitas infecções por parasitos intracelulares. A neutralização de IL-12 durante infecção com *Leishmania* torna o camundongo resistente à doença (AWASTHI et al., 2004). Foi observada a expressão de IL-12 no fígado de todos os animais infectados com *Leishmania* e no baço de dois deles. IL-12 é uma citocina Th1 que induz a síntese de INF- γ . Esta síntese, porém, não foi significativa em todos os animais infectados, ao contrário da expressão de TNF- α , observada na maioria dos animais infectados. Citocinas como IL-12, INF- γ e TNF- α são essenciais na resolução de infecções com todas as espécies de *Leishmania*, portanto, a expressão dessas citocinas, principalmente no baço dos animais infectados, caracteriza o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 que tende à resolução da doença e possível cura.

Células NK são conhecidas por produzir INF- γ e podem contribuir para a resistência a *L. (V.) braziliensis*. INF- γ e TNF- α são importantes citocinas para o desenvolvimento da infecção em modelos experimentais de leishmanioses. Respostas imunes tipo 1 são associadas ao controle da

infecção, enquanto as do tipo 2 levam à susceptibilidade para *Leishmania* sp (LEOPOLDO et al., 2006).

A expressão das citocinas não foi quantificada, portanto não é possível avaliar se a resposta Th1 predominou sobre a resposta Th2. A quantificação do perfil das citocinas permitiria conclusões mais precisas sobre o desenvolvimento da infecção.

Ambas, *Leishmania major* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, causam leishmaniose cutânea, mas a infecção por *L. major* leva à morte de camundongos BALB/c enquanto a infecção por *L. (V.) braziliensis* é controlada pelo sistema imune dessa linhagem de camundongos. A letalidade de *L. (V.) braziliensis* ocorre por um mecanismo dependente de INF- γ , potencialmente possível devido à deficiência na produção de IL-4 (DeKREY et al., 1998).

O modelo mais comumente estudado para leishmaniose cutânea é a infecção de camundongos com *Leishmania major*, no qual têm-se observado que certos camundongos (por exemplo, C3H) desenvolvem uma resposta Th1 parasito-específica (altos níveis de INF- γ e baixos níveis de IL-4), que geralmente está associado com a cura, enquanto outros camundongos (BALB/c) desenvolvem uma resposta Th2 (baixos níveis de INF- γ e altos níveis de IL-4), que leva à progressão da doença (DeKREY et al., 1998). Muitos estudos usando *L. major* têm sido interpretados de acordo com o seguinte quadro. A resistência ou a susceptibilidade da doença, em diferentes linhagens de camundongos, é assegurada pelos determinantes genéticos do hospedeiro: resistência é mediada por resposta imune celular tipo Th1, caracterizada pela presença de altos níveis de INF- γ e baixos níveis de IL-4; susceptibilidade é mediada por uma resposta imune celular tipo Th2, caracterizada por baixos níveis de INF- γ e altos níveis de IL-4. Estas citocinas não agem somente nas células parasitadas auxiliando na eliminação do parasito, ou prevenindo sua replicação, mas também contribuem para a ocorrência dos processos inflamatórios no tecido infectado por *Leishmania*. Portanto, variações na patogenicidade do parasito, que são relacionadas a sua diversidade genética é também um importante fator de influência nas características clínicas da leishmaniose (OLIVEIRA et al., 2004).

Em contraste com *L. amazonensis* e *L. major*, o número de trabalhos que têm sido conduzidos com *L. (V.) braziliensis* é consideravelmente menor, apesar dos sérios problemas de saúde pública causados por esta espécie de parasitos na América do Sul. Isto ocorre, provavelmente, porque *L. (V.) braziliensis* apresenta difícil crescimento *in vitro* e sua conversão na fase metacíclica sob

condições padrão de cultura seja ineficiente, requerendo inóculo de grande quantidade de parasitos (10^7 parasitos) para que haja sucesso na infecção (MOURA et al., 2005).

DeKrey (1998) e colaboradores inocularam 10^7 *L. braziliensis* na pata de camundongos BALB/c e observaram que houve uma duplicação deste número uma semana após a infecção e depois disso os parasitos foram gradualmente destruídos, não sendo mais detectados após 42 dias pós-infecção. Macroscopicamente observou-se um modesto aumento (não mais que 50%) na pata que sofreu o inóculo, com lesões nodulares e nunca ulceradas. A fraca infectividade de *L. (V.) braziliensis* para o camundongo pode ser devido à incapacidade do parasito eliciar uma forte e sustentada produção de IL-4 nos animais. De acordo com esse trabalho pôde-se supor que o período de infecção também foi um fator contribuinte para os resultados do presente trabalho. Provavelmente o perfil de resposta imune variou durante a infecção experimental, e apresentaria alterações em relação às expressões obtidas das citocinas caso os animais fossem mantidos vivos por um período inferior às 10 semanas de infecção.

5 CONCLUSÕES

- Parasitos *Leishmania* isolados a partir de biópsias de pacientes atendidos no HC-UFU pertencem à espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* do complexo *Leishmania braziliensis*;
- Houve a detecção de resposta imune mista Th1 e Th2 nos camundongos infectados;
- Os camundongos BALB/c infectados com parasitos isolados dos pacientes evoluíram para a cura

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. Trad. DA VEIGA, A.B.G., et al.; 4.ed., Porto Alegre: Artmed, 1463p., 2004.

ANTONELLI, L.R.V.; DUTRA, W.O., ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K.J. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human Leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clin Exp Immunol**, v.136, p.341–348, 2004.

AVILES, H.; BELLI, A.; ARMIJOS, R.; MONROY, F.P.; HARRIS, E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. **Journal of Parasitology**, v.85, n.2, p.181-187, 1999.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res.**, v.119, n.6, p.238-58, 2004.

BELLI, A., B. RODRIGUEZ, H. AVILES & E. HARRIS. Simplified polymerase chain reaction detection of New World *Leishmania* in clinical of cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.58 p.102-109, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portal da Saúde**. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/saude/>. Acesso em 5 de fevereiro de 2007.

CALVOPINA, M.; ARMIJOS, R.X.; MARCO, J.D.; UEZATO, H.; KATO, H.; GOMEZ, E.A.; KORENAGA, M.; BARROSO, P.A.; MIMORI, T.; COOPER, P.J.; NONAKA, S.; HASHIGUCHI, Y. *Leishmania* isoenzyme polymorphism in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation. **BMC Infectious Diseases**, v.6, p.139-148, 2006.

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L.R.; TOALDO, C.B.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; BRITO, M.E.E.; FALQUETO, A.; NAIFF, M.F.; GRIMALDI-JR, G. Genetic polymorphism and molecular

epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.7, p.3126-3132, 2003.

DEKREY, G.K.; LIMA, H.C.; TITUS, R.G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, v.66, p.827-829, 1998.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.27, p.305-318, 2004.

FARIA, D.R.; GOLLOB, K.J.; JR., J.B.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.R.L.; LESSA, H.; CARVALHO, L.P.; ROMANO-SILVA, M.A.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; DUTRA, W.O. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v.73, n.12, p.7853-7859, 2005.

FELDMANN, M.; STEINMAN, L. Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. **Nature**, v.435, p.612-619, 2005.

GOMES, R. F.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J.; MELO, M.N. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas on Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. **Exp. Parasitology**, v.80, p.681-687, 1995.

HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.7, p.1989-1995, 1998.

JIRKU, M.; ZEMANOVA, E.; AL-JAWABREH, A.; SCHFNIAN, G.; LUKES, J. Development of a direct species-specific PCR assay for differential diagnosis of *Leishmania tropica*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.55, n.1, p.75-79, 2006.

LEOPOLDO, P.T.G.; MACHADO, P.R.L.; ALMEIDA, R.P.; SCHRIEFER, A.; GIUDICE, A.; DE JESUS, A.R.; HO, J.L.; GUIMARÃES, L.H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M.

Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on *in vitro* cytokine production. **BMC Infectious Diseases**, v.6, p.75-81, 2006.

MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C.L.; BECK, H-P.; FELGER, I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.3147-3153, 2003.

MARQUES, M.J.; VOLPINI, A.C.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; MACHADO-PINTO, J.; DA COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; ROMANHA, A.J. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.54, p.37-43, 2006.

MINODIER, P.; PIARROUX, R.; GAMARELLI, F.; JOBLET, C.; DUMON, H. Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35 n.10, p.2551-2555, 1997.

MOURA, T.R.; NOVAIS, F.O.; OLIVEIRA, F.; CLARÊNCIO, J.; NORONHA, A.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, v.73, p.5827-5834, 2005.

NIMRI, L.; SOUBANI, R.; GRAMICCIA, M. *Leishmania* species and zymodemes isolated from endemic areas of cutaneous leishmaniasis in Jordan. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.1, 7p., 2002.

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

OLIVIER, M.; GREGORY, D.J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.2, p.293-305, 2005.

PASTORET, P-P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVAERTS, A. **Handbook of vertebrate immunology**. Academic Press, 673p., 1998.

PIARROUX, R.; AZAIEZ, R.; LOSSI, M.; REYNIER, P.; MUSCATELLI, F.; GAMBARELLI, F.; FONTES, M.; DUMON, H.; QUILICI, M. Isolation and characterization of a repetitive DNA séquence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.49, n.3, p.364-369, 1993.

RODRIGUES, E.H.G.; BRITO, M.E.F.; MENDONÇA, M.G.; WERKHÄUSER, R.P.; COUTINHO, E.M.; SOUZA, W.V.; ALBUQUERQUE, M.F.P.M.; JARDIM, M.L.; ABATH, F.G.C. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.10, p.3572-3576, 2002.

SHAW, J. Ecological and evolutionary pressures on leshmanial parasites. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.123-128, 1997.

SINGH, S. New developments in diagnosis of Leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v.123, p.311-330, 2006.

SOUSA-ATTA, M.L.B.; SALAMÉ, G.S.; D'OLIVEIRA, A.; ALMEIDA, R.P.; ATTA, A.M.; CARVALHO, E.M.. Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, p.101-104, 2002.

TEIXEIRA, M.J.; TEIXEIRA, C.R.; ANDRADE, B.B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Chemokines in host-parasite interactions in Leishmaniasis. **TRENDS in Parasitology**, v.22, p.32-40, 2006.

TEIXEIRA, M.J.; FERNANDES, J.D.; TEIXEIRA, C.R.; ANDRADE, B.B.; POMPEU, M.L.; DA SILVA, J.S.; BRODSKYN, C.I.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. **Infection and Immunity**, v.73, p.1191–1195, 2005.

WHO, World Health Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em 15 de janeiro de 2007.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxonomia de espécies de *Leishmania* encontradas no homem com respectivo tipo de manifestação. (Adaptada de Shaw, 1997).

Espécie	Doença
Subgênero <i>Leishmania</i>	
Complexo <i>L. donovani</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	Visceral
<i>L. (L.) infantum</i>	Visceral infantil
<i>L. (L.) chagasi</i>	Visceral
Complexo <i>L. major</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) major</i>	Cutânea
Complexo <i>L. tropica</i>	
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	Cutânea
Complexo <i>L. aethiopica</i>	
<i>L. (Leishmania) aethiopica</i>	Cutânea difusa
<i>L. (L.) garnhami</i>	Cutânea
Complexo <i>L. mexicana</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	Cutânea
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Cutânea/mucosa/visceral
<i>L. (L.) pifanoi</i>	Cutânea
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	Cutânea
Subgênero <i>Viannia</i>	
Complexo <i>L. braziliensis</i>	
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Cutânea/mucosa
<i>L. (V.) peruvana</i>	Cutânea
<i>L. (V.) colombiensis</i>	Cutânea/visceral
Complexo <i>L. guyanensis</i>	
<i>L. (Viannia.) guyanensis</i>	Cutânea
<i>L. (V.) panamensis</i>	Cutânea
Complexos ainda não especificados	
<i>L. (Viannia.) naiffi</i>	Cutânea
<i>L. (V.) shawi</i>	Cutânea
<i>L. (V.) lainsoni</i>	Cutânea

Tabela 2. Condições usadas para visualização enzimática de *Leishmania* em géis de agarose.

Enzima	H₂O (ml)	Substrato	Co-enzima (40mg/10ml)	Ativador (4g/10ml)	Enzima ligante	Método de visualização
ACON	5	40mg cis-aconitato	1ml NADP	1ml MgCl ₂	0.2U IDH	30mg MTT; 20mg PMS; 10ml agarose 1%
FUM	3	250mg ácido fumárico	2ml NAD	—	200U MDH	Igual ACON
GPI	5	20mg frutose-6-fosfato	1ml NADP	200µl MgCl ₂	2U G6PDH	Igual ACON
G6PDH	4	20mg glicose-6-fosfato	2ml NADP	300µl MgCl ₂	—	Igual ACON
HK	3	100mg glicose 40mg ATP	1ml NADP	200µl MgCl ₂	2U G6PDH	Igual ACON
IDHNADP	5	40mg isocitrato de sódio	1ml NADP	200µl MgCl ₂	—	Igual ACON
IDHNAD	5	40mg isocitrato de sódio	1ml NAD	200µl MgCl ₂	—	Igual ACON
MDH	3	1ml malato de sódio IM	2ml NAD	—	—	Igual ACON
ME	4	1ml malato de sódio IM	1ml NADP	200µl MgCl ₂	—	Igual ACON
MPI	5	40mg manose-6-fosfato	1ml NADP	100µl MgCl ₂	4U G6PDH 7U GPI	Igual ACON
NH	6	30mg inosina	—	—	0.04U xantine oxidase	Igual ACON
PEPD	5	10mg leu-pro	—	20µl MgCl ₂	2mg ácido L-amino oxidase 250U peroxidase	10mg 3-amino-9-etil-carbazole; 1ml etanol 1%; 10ml agarose 1%
PEP2	6	10mg leu-gly	—	20µl MgCl ₂	Igual PEPD	Igual PEPD
PEP3	5	10mg leu-ala	—	20µl MgCl ₂	Igual PEPD	Igual PEPD

Tabela 3. Sondas utilizadas no método Multiplex-PCR.

Sonda	Complexo	Seqüência	Produto de PCR (pb)
LUU-5A	Gênero <i>Leishmania</i>	5':5'-TTT ATT GGT ATG GGA AAC TTC-3'	
LLB-3C	<i>Leishmania braziliensis</i>	3':5'-CGT (C/G)CC GAA CCC CGT GTC-3'	46-149
LLM-3A	<i>Leishmania mexicana</i>	3':5'-GCA CCG CAC CGG (A/G)CC AC-3'	18-240
LLC-3L	<i>Leishmania donovani</i>	3':5'-GCC CGC G(C/T)G TCA CCA CCA T-3'	51-397

Tabela 4. Cepas de referência, de acordo com a Organização Mundial de Saúde.

Cepas Padrões	Referência	Complexos
M2903	(MHOM/BR/75/M2903)	<i>Leishmania braziliensis</i>
PH8	(IFLA/BR/67/PH8)	<i>Leishmania mexicana</i>
DD8	(MHOM/IN/80/DD8)	<i>Leishmania donovani</i>

Tabela 5: Citocinas que influenciam o curso da leishmaniose mucocutânea em camundongos experimentais.

ABREVIÇÃO	CITOCINA	PRINCIPAL CÉLULA PRODUTORA OU LOCALIZAÇÃO	PRINCIPAIS ATIVIDADES BIOLÓGICAS
INF- γ	Interferon gama	Células T Células NK	Monócitos e macrófagos ativados; Induz moléculas do MHC de classe I e II em vários tipos celulares; Exerce atividade antiviral.
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa	Células T Monócitos/macrófagos Fibroblastos Astrócitos Células da micróglia	Indutor de respostas na fase aguda; Seleciona atividade citotóxica; Vários efeitos em diferentes tipos de células por modulação da expressão de gene para outras citocinas, para proteínas da fase aguda, etc.
TGF- β	Fator de crescimento tumoral	Monócitos/macrófagos	Desregula funções citotóxicas e inflamatórias de monócitos e macrófagos;
IL-4	Interleucina-4	Células T Mastócitos Células B Basófilos	Fator de crescimento para células B ativadas e células T; Promove desenvolvimento Th2; Induz expressão de MHC de classe II em células B; Promove IgE.
IL-12	Interleucina 12	Monócitos/macrófagos	Promove o desenvolvimento de resposta imune tipo Th1
IL-13	Interleucina-13	Células T (tipo Th2) Mastócitos	Desregula funções citotóxicas e inflamatórias de monócitos e macrófagos; Induz IL-4 independente de síntese de IgE; Divide muitas de suas ações biológicas com IL-4 e IL-10.

Tabela 6: Expressão de citocinas no fígado e no baço de camundongos BALB/c inoculados com PBS (grupo controle); inoculados com parasitos de isolados de pacientes (1 e 2) e inoculados com parasitos da cepa referência *L. (Viannia) braziliensis* HOM/BR/75/M2903. Detecção da expressão da citocina (+); não-detecção da expressão da citocina (-).

Citocina	Controle não infectado		Isolado 1		Isolado 2		M2903									
	Fígado	Baço	Fígado	Baço	Fígado	Baço	Fígado	Baço								
IL-13	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
IL-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
TGF- β	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-12	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
INF- γ	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
TNF- α	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-