

616

MON
616.993.161
S586L
TES/UFU

VÍVIAN REIS E SILVA FONSECA

616.993.161 S586L /TES/UFU
DIRBI/UFU 07725/95



1000022278

Leishmaniose Visceral no Hamster:
papel da via de inoculação no desenvolvimento
da resposta imune celular.

Dissertação de Mestrado apresentada no
Curso de Pós Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas da
Universidade Federal de Uberlândia.

UBERLÂNDIA
1995

VÍVIAN REIS E SILVA FONSECA

Leishmaniose Visceral no Hamster:
papel da via de inoculação no desenvolvimento
da resposta imune celular.

Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior.

Dissertação de Mestrado apresentada no
Curso de Pós Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas da
Universidade Federal de Uberlândia.

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA-FONSECA, Vivian Reis.

Leishmaniose Visceral no Hamster: papel da via de inoculação no desenvolvimento da resposta imune celular./Vivian Reis e Silva Fonsecã. - Uberlândia: Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, Curso de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, 1995. 51 p.: il.
Orientador : Virmondes Rodrigues Júnior
Dissertação (Mestrado) -

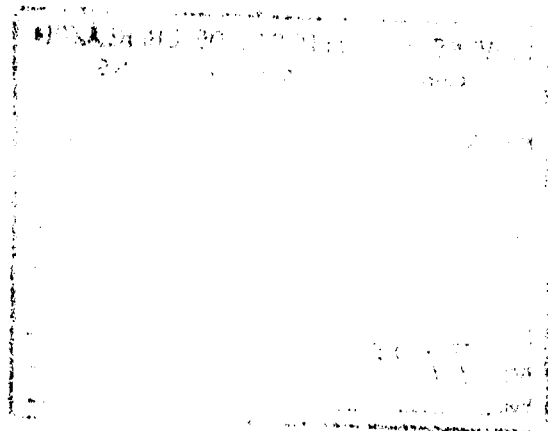
1. Leishmaniose visceral experimental, 2. Leishmania(Leishmania) donovani, 3. Vias de infecção em hamsters, 4. Imunidade celular, 5. II.-2. I. Leishmaniose Visceral no Hamster: papel da via de inocula-

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA	
DIRBI - DIRETORIA DE BIBLIOTECAS	
Procedência.....	
Valor R\$	doação
Rec. em	95
O.P.D.	
N. Fichário	
Reg.	7725/95
Data	16/10/95
Vol.	Ex. 1

FU-00005410-4

“Os deuses não revelaram, no início,
todas as coisas para nós; com o correr do tempo, entretanto, pela
pesquisa, podemos saber mais acerca das coisas.
Contudo, a verdade certa, nenhum homem a conheceu,
nem chegará a conhecer, nem os deuses,
nem mesmo acerca das coisas que menciono.
Pois ainda que, por acaso, viesse a dizer
a verdade final, ele próprio não o saberia;
pois tudo não passa de teia urdida de pressupostos.”

Xenófanes, in Popper, C. (1973).



2015/11

1000-1000-1000

1000

1000

1000-1000-1000

1000

1000

1000

1

1000

1000

À Vânia, Otto e Ricardo pela confiança irrestrita.

À Marcílio, pelo incentivo e companheirismo constantes.

À Daniela e Rafael, com minhas desculpas pelos momentos de convívio perdidos.

À Maria Mota Pirotelli, *in memoriam* por abrir as portas do conhecimento biológico.

À Dra. Elisa Penido, pela iniciação científica rigorosa.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dagmar Diniz Cabral, pelo incentivo inicial.

Ao Prof. Dr. Antonio Campos-Neto, que primeiro me aceitou como orientanda.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, Prof^a. Dr^a. Júlia Maria Costa Cruz e Prof^a. Dr^a. Maria Inês Machado, pela viabilização da aquisição das linhagens celulares necessárias à dosagem de citocinas.

Às técnicas do laboratório de Parasitologia da U.F.U., Sheila Pedrosa Franco Barbosa e Maria do Rosário Gonçalves Pires, pela coloração das lâminas.

À Prof^a. Giselle Marília Gianetti, do laboratório de Imunologia da F.M.T.M., pela amizade, apoio e auxílio na eletroforese do antígeno.

À Prof^a. Eliane Lage, do laboratório de Parasitologia da F.M.T.M., pelos conselhos e ajuda na manutenção dos parasitas.

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Ramires Giraldo, do laboratório de Parasitologia da F.M.T.M., pela leitura crítica e sugestões apresentadas a este trabalho.

À Prof^a. Eloísa Amália Vieira Ferro e ao Prof. Silvio Favoreto Júnior, pelo auxílio na montagem das figuras deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de Imunologia da F.M.T.M., pelo auxílio.

Aos funcionários da Gnesys Informática e Consultoria, pelo suporte de informática a este trabalho.

À Marlene Teodoro Guimarães, da Diretoria de Bibliotecas da UFU, pelo auxílio na revisão bibliográfica.

Aos colegas do Curso de Mestrado, pelo companheirismo e amizade nos momentos difíceis.

Aos colegas da Microbiologia, da Imunologia e da Parasitologia da U.F.U., pela amizade e incentivo.

Ao Conselho e Coordenação do Curso de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pela consideração com que sempre atendeu às minhas solicitações.

Ao CNPq , pelo suporte financeiro.

Ao Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior pela
orientação competente e segura, espírito crítico e
ajuda, minha especial gratidão.

RESUMO.

Os protozoários do gênero **Leishmania**, são responsáveis por doenças de grande importância em áreas tropicais e subtropicais do mundo, com uma incidência de 400.000 novos casos por ano. A prevalência mundial é estimada em 12 milhões de casos .

A infecção por leishmânias pode resultar em doença de caráter espectral, em função da eficiência da resposta imune montada pelo hospedeiro e da espécie do parasita envolvida .

Hamsters infectados por via intra-cardíaca (IC) com espécies viscerotrópicas de leishmânia apresentam parâmetros clínicos e imunológicos semelhantes aos observados em pacientes com calazar e com a infecção pela via intra-dérmica (ID) podem desenvolver infecção auto limitada.

O presente trabalho correlaciona a infecção em hamsters por **L.(L)donovani** 1S, pelas vias IC e ID, com parasitismo esplênico; proliferação de células linfóides frente ao antígeno específico e produção de interleucina 2 (IL-2).

Na infecção pela via IC detectamos parasitismo esplênico associado a ausência de resposta proliferativa ao antígeno e baixa produção de IL-2. Na infecção pela via ID, observamos dois perfis de resposta: um grupo de animais respondeu de forma semelhante aos infectados pela via IC, e outro grupo, pareceu capaz de controlar a infecção, já que não apresentou parasitismo esplênico patente, respondeu positivamente aos ensaios de proliferação celular e produziu altos níveis de IL-2.

Para esta diversidade de respostas poderiam estar contribuindo fatores genéticos individuais, já que os animais utilizados não eram isogênicos, e eventos iniciais de processamento e apresentação dos antígenos de **L.(L)donovani** 1S aos linfócitos T.

Destacamos que a rota de infecção ID nos parece mimetizar melhor o que se observa na infecção natural, e que o hamster pode ser um modelo versátil para estudos imunológicos de leishmaniose visceral, pois permite o estudo de infecção semelhante a observada no calazar, bem como de formas assintomáticas, ou de progressão lenta, apenas pela variação da rota de infecção.

SUMMARY

Protozoa from the **Leishmania** genus are the etiologic agents for very important diseases in tropical and subtropical areas over the world, with the incidence of 400,000 new cases a year. The worldly prevalence is estimated to be about 12 million cases.

The infection caused by *Leishmania* may display a spectrum of clinical manifestation, depending on the efficiency of the immune mechanisms built up by the host in response to the species of the involved parasites.

Hamsters infected with *leishmania* by intra-cardiac (IC) route present similar clinical and immunological parameters as the ones observed in kala-azar patients. However, if the infection is carried out by intra-dermic (ID) route it may develop a self limited infection.

The purpose of the present investigation is to correlate the hamsters' infection by **L.(L)donovani** 1S, by IC and ID routes, to the splenic parasitism, lymphocyte proliferation in the presence of the specific antigen and production of the IL-2.

The result of the experiments performed by IC route showed splenic parasitism associated to the lack of lymphoproliferative response in the presence of antigen and low level of IL-2 production. The experiments performed by ID route showed two response patterns: one group of animals responded in a similar way as that infected by IC route; nevertheless, another group seemed to be able to control the infection as it do not presented evident splenic parasitism. In addition, this latter group of animals responded positively at the cellular proliferation assay and produced high levels of IL-2. This diversity of responses could be caused by individual genetic variations, as the hamsters employed in these experiments were not isogenics. Thus, they might be able to present variations in terms of the initial events related to antigen processing to the T lymphocytes.

We emphasize that infection accomplished by ID route seems to get closer to that observed at the natural infection. Hamsters can be versatile model for immunologic studies of experimental visceral leishmaniasis. This model permits to make inferences to the kala-azar form of disease, as well as the assintomatic or the slow progression forms. These features may be observed by simply carrying out a variation at the route of infection.

ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS.

APC	Célula apresentadora de antígeno.
CHP	Complexo de histocompatibilidade principal.
Con-A	Concanavalina A .
DTH	Hipersensibilidade do tipo tardio.
GM-CSF	Fator estimulador de colônia em granulócito - macrófago.
gp63	Glicoproteína de 63 kDa.
IC	Intra-cardíaca.
ID	Intra-dérmica.
IFN- γ	Interferon gama.
IL	Interleucina.
IRN	Intermediários reativos do Nitrogênio.
IRO	Intermediários reativos do Oxigênio.
L.V.	Leishmaniose visceral.
L.V.A.	Leishmaniose visceral americana.
LCA	Leishmaniose cutânea americana.
LdAg	Antígeno de <i>L.(L)donovani</i> 1S.
LDs	"Leishman-Donovans".
LPG	Lipofosfoglicano.
LPS	Lipofosfossacarídeo.
LVC	Leishmaniose visceral canina.
LVH	Leishmaniose visceral humana.
Mab	Anticorpo monoclonal.
NK	"Natural-killer".
NOS	Óxido nítrico sintetase.
PHA	Phytohemoaglutinina.
PWM	"Pokeweed mitogen".
RIC	Resposta imune celular.
RIH	Resposta imune humoral.
RII	Resposta imune inespecífica.
T $\gamma\delta$	Célula T - TCR gama delta.
TGF- β	Fator de transformação e crescimento beta.
TNF	Fator de necrose tumoral.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	1
II - OBJETIVO	13
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	14
IV - RESULTADOS.....	20
V - DISCUSSÃO.....	29
VI - CONCLUSÃO.....	37
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

I - INTRODUÇÃO

ASPECTOS PARASITOLÓGICOS.

O gênero **Leishmania** abriga um número grande de espécies que são parasitas intracelulares obrigatórios de mamíferos e que são responsáveis por doenças de grande importância em áreas tropicais e subtropicais do mundo, com uma incidência de 400.000 novos casos por ano e uma prevalência mundial estimada em 12 milhões de casos (Modabber, 1987 in Liew e O'Donnell, 1993; Rey, 1991).

A transmissão se dá através da picada de vetores invertebrados, especificamente fêmeas de flebotomíneos dos gêneros **Phlebotomus**, (Velho Mundo) e **Lutzomyia** (Novo Mundo), (Rey, 1991).

As leishmânias são parasitas dimórficos, sendo encontradas nos vetores invertebrados na forma flagelada, denominada promastigota. A infecção se dá em geral pela inoculação direta da forma promastigota através da pele, seguindo-se fagocitose das mesmas por células do sistema monocítico macrofágico do hospedeiro. Dentro dos macrófagos o parasita assume a forma amastigota (aflagelada) onde se multiplica. O retorno à forma promastigota se dá no intestino do vetor, que ao fazer um repasto sanguíneo adquire as formas amastigotas. (Rey, 1991; Liew e O'Donnell, 1993).

A cadeia epidemiológica envolvida é complexa podendo incluir, além dos vetores citados, mamíferos silvestres e domésticos como reservatórios da infecção (Machado, 1978), tendo ainda grande importância o meio físico (Rey, 1991). As leishmanioses, na sua maioria, se caracterizam como zoonoses, sendo o homem infectado apenas de forma secundária, ao invadir o ciclo silvático da doença. (Rey, 1991; Liew e O'Donnell, 1993).

A caracterização das leishmânias a nível de espécie apresenta algumas dificuldades, por serem os parasitas morfologicamente muito semelhantes embora as formas de doença e os fatores epidemiológicos envolvidos sejam distintos. (Rey, 1991). Inicialmente a caracterização a nível de espécie se fazia apenas pelo quadro clínico produzido. Atualmente se utilizam os seguintes critérios: morfologia, comportamento biológico do parasita, demonstração de anticorpos específicos, aspectos bioquímicos, distribuição geográfica e aspectos clínicos da infecção humana (Lainson e Shaw, 1987; Rey 1991). Segundo Rey (1991) a maioria dos autores

concorda em classificar as leishmânias que afetam o homem nos subgêneros **Viannia** ou **Leishmania** e cada subgênero seria ainda subdividido em grupos naturais ou complexos fenotípicos.

O subgênero **Viannia** conteria parasitas com desenvolvimento ao redor do piloro (peripilária) no vetor e dele faria parte o complexo "Leishmania Braziliensis", com organismos de distribuição limitada à Região Neotropical, sem tropismo visceral, determinando a leishmaniose cutânea americana (LCA). As lesões encontradas podem ser simples ou múltiplas, de caráter extensivo e com tendência a metástases. Os componentes do complexo incluem: **L.(V). braziliensis**; **L.(V). guyanensis**; **L.(V). panamensis** e **L.(V). peruviana**. (Rey, 1991).

O subgênero **Leishmania** conteria parasitas cujo desenvolvimento se faria acima do piloro (suprapilária) no vetor. Dele fariam parte dois complexos: 1- "Leishmania Mexicana", de distribuição limitada à Região Neotropical e planície do Golfo do México, determinando lesões benignas da pele. Deste complexo fazem parte : **L.(L). mexicana**; **L.(L). pifanoi**; **L.(L). amazonensis**; **L.(L). venezuelensis** e **L.(L). garnhami**. 2 - "Leishmania Donovanii" com parasitas viscerotrópicos, sendo propostas três espécies para este complexo : **L.(L). donovani**, encontrada em países Asiáticos infectando adultos. **L.(L). infantum**, encontrada no Mediterrâneo, África Oriental, Oriente Próximo, Ásia Soviética e Norte da China, infectando principalmente crianças. **L.(L). chagasi**, encontrada nas Américas, sendo responsável pela leishmaniose visceral americana (L.V.A.). Ainda segundo Rey (1991), há autores que propõem uma assimilação de **L.(L). infantum** e **L.(L). chagasi**. No subgênero **Leishmania**, podem ser agrupadas três espécies de leishmânias causadoras das leishmanioses cutâneas do Velho Mundo, não agrupáveis em nenhum dos dois complexos citados. Estas três espécies produzem infecções limitadas à pele, sem metástase de mucosa ou invasão de vísceras. Duas delas, **L.(L). tropica** e **L.(L). major**, ocorrem na Bacia do Mediterrâneo e na Ásia e na África ocorre a **L.(L). aethiopica** (Rey, 1991).

As diferentes formas de leishmanioses humanas podem ser reunidas em quatro grupos: 1 - leishmaniose cutânea, com formas exclusivamente cutâneas, limitadas, ulceradas ou não. 2 - leishmaniose cutânea difusa, com formas cutâneas disseminadas, extenso espessamento da pele e lesões semelhantes às da lepra lepromatosa. 3 - leishmaniose mucocutânea, com lesões destrutivas da mucosa do nariz, boca e faringe devido a metástase do parasita para as mucosas, a partir de lesão primária ocorrida anteriormente.

4 - leishmaniose visceral ou calazar, afetando o sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides). Na forma grave é geralmente fatal, se não tratada, em função da incapacidade do hospedeiro em montar uma resposta imune protetora (Rey, 1991; Liew e O'Donnell, 1993).

No Brasil a L.V.A. foi diagnosticada pela primeira vez, *in vivo*, no período 1936-1939 por Evandro Chagas, no Pará. Como fruto destes estudos clínicos e epidemiológicos pioneiros detectou-se também a presença de cães infectados e imputou-se o flebotomíneo **Lutzomyia longipalpis**, como o provável vetor (Cunha e Chagas, 1937), tendo-se este como o único vetor de importância epidemiológica nos diversos focos de transmissão do país (Lainson et al., 1990).

A L.V.A. tem sido detectada no Brasil em todos os estados litorâneos, do Pará ao Paraná, e em estados centrais tais como Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso (Ayala, Bergoxe e Anunciação, 1980; Lainson e Shaw, 1987; Grimaldi, Tesh e Mac Mahon-Pratt, 1989). Bahia, Ceará, Minas Gerais, Pernambuco e Piauí, apresentam os mais altos índices de morbidade e mortalidade por L.V.A. no Brasil. Embora predominantemente rural, a L.V.A. ocorre também na periferia de grandes cidades tais como Rio de Janeiro (RJ), São Luiz (MA), Teresina (PI), Sobral (CE) dentre outras. (Deane e Deane, 1955; Alencar, 1977-78; Silva et al., 1983; Falqueto et al., 1991).

A leishmaniose canina é frequente nos focos humanos, sendo os canídeos silvestres **Licalopex vetulus** (Deane e Deane, 1954) e **Cerdocyon thous** (Lainson, Shaw e Lins, 1969; Lainson et al., 1990) e o marsupial **Didelphis albiventris** (Sherlock et al., 1984), descritos como os possíveis reservatórios responsáveis pela infecção dos cães domésticos. (Magalhães et al., 1980; Duarte et al., 1986; Lainson e Shaw, 1987; Lainson et al., 1990; Falqueto et al., 1991).

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS.

Nos vários tipos de leishmaniose observa-se o aparecimento de imunidade duradoura após a cura. Embora as diferentes formas da doença resultem num espectro de respostas imunes, tanto a resposta imune humoral (RIH) quanto a resposta imune celular (RIC) são encontradas (Manson - Bahr et al., 1961; Turk e Bryceson, 1971; Mauel e Behin, 1987).

O comprometimento do sistema imune na leishmaniose visceral humana (LVH) é caracterizado por um aumento dos níveis séricos de imunoglobulinas, com títulos variados de anticorpos anti-**Leishmania** e a antígenos não relacionados, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia (Chaves e Ferri, 1966; Mayrink, Araújo e Magalhães, 1967; Rezai et al., 1978). Formas amastigotas do parasita podem ser encontradas em macrófagos do baço, do fígado, do linfonodo, da pele, do sangue periférico e em aspirados de medula óssea (Meleney, 1925; Andrade e Andrade, 1966).

Pacientes com doença ativa apresentam intradermorreação negativa para antígenos do parasita (Manson-Bahr et al., 1961). Células mononucleares isoladas do sangue periférico destes doentes, não respondem em testes *in vitro* de transformação blástica frente a antígenos de **Leishmania donovani** (Sacks et al., 1987), e apresentam uma resposta diminuída a phiohemoaglutinina (PHA) (Ghose, Haldar e Pal, 1979; Carvalho e Bacelar, 1983). A ausência de RIC está associada a uma inabilidade no controle da infecção, visto que após a implantação de terapêutica específica e cura, há tanto resposta positiva para testes cutâneos quanto para proliferação *in vitro* de linfócitos (Manson-Bahr et al., 1961; Carvalho e Bacelar, 1983).

A resposta imune à leishmânia está bem caracterizada, mas os mecanismos imunes envolvidos não são ainda bem compreendidos. São descritos alguns aspectos relevantes para o seu entendimento, desde fatores intrínsecos do parasita e do hospedeiro até aspectos da interrelação estabelecida entre ambos (Liew e O'Donnell, 1993). Neste contexto, tem sido investigada a importância de características genéticas de hospedeiros experimentais na sensibilidade ou resistência ao parasita, bem como a expressão de moléculas de superfície nas leishmânias.

Em modelos murinos, isogênicos ou não, foram observados dois estágios de regulação genética : susceptibilidade ou resistência inatas e

imunidade adquirida. A susceptibilidade inata é controlada pelo gene Lsh, com dois alelos, R e S, autossômicos, com dominância incompleta de R sobre S, e que mapeia no cromossomo I murino. Este gene permite separar camundongos infectados com **L.donovani** em dois grupos, sensíveis e resistentes, em função do número de parasitas observados no fígado (Bradley et al; 1979). Nos resistentes a expressão do gene Lsh ocorre dois a três dias pós infecção, *in vivo* e *in vitro*, e resulta na inibição da multiplicação parasitária (Crocker, Blackwell e Bradley, 1984; Crocker, Davies e Blackwell, 1987). Embora esta expressão seja independente de célula T (Bonventre e Nickol, 1984; Liew e O'Donnell, 1993), está associada a uma regulação positiva da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) II ; a aumento na resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) e ao interferon gama (IFN- γ) e a aumento na produção do fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina (IL)-1 (Zwilling, Vespa e Massie, 1987; Kaye, Patel e Blackwell, 1988; Blackwell et al., 1989; Kaye e Blackwell, 1989). Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos Lsh^R (resistentes) produzem maiores níveis de óxido nítrico que macrófagos de camundongos Lsh^S (sensíveis) em resposta ao IFN- γ e LPS (Blackwell et al., 1991; Roach, Kiderlen e Blackwell, 1991).

Quanto a imunidade adquirida, seu controle estaria na dependência de três conjuntos gênicos distintos e multialélicos (H-2; H-11 e Ir-2) e que definem três padrões diferentes da doença, em função da carga parasitária observada no fígado: cura precoce, cura ou doença progressiva (Blackwell, Freeman e Bradley, 1980; De Tolla et al., 1980; Ulczak e Blackwell, 1983; Blackwell et al., 1985).

Dentre as moléculas de superfície estudadas em **Leishmania spp** , duas se destacam pela importância que demonstram ter nos processos de adesão, penetração e sobrevivência intracelular do parasita no hospedeiro: o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de peso molecular de 63 kDa (gp63) (Liew e O'Donnell, 1993; Roitt, 1993).

O LPG é o principal glicolípídeo presente em todas as espécies de leishmânia estudadas e é expresso de formas distintas em amastigotas e promastigotas. Consiste em sacarídeos fosforilados ligados, por um núcleo de carboidratos, a uma única âncora lipídica (Handman et al., 1987; Turco, 1988; Glasser et al., 1991; Roitt et al., 1993). Esta molécula modula a produção de radicais livres através da inibição da proteína quinase C (importante na elicitação da explosão respiratória) e inibe a atividade de macrófagos (Mc Neely e Turco, 1987).

A gp63 é a principal glicoproteína encontrada nas formas promastigotas e amastigotas de todas as leishmânias estudadas, sendo uma metalo-proteinase com uma região ligante de zinco (Etges, Bouvier e Bordier, 1986; Bouvier, Etges e Bordier, 1987; Medina - Acosta, 1989; Bouvier et al., 1989; Chaudhuri et al., 1989; Frommel et al., 1990; Roitt et al., 1993). Tem-se observado que nas promastigotas das cepas virulentas esta molécula participa na ligação e penetração do parasita, inibindo também a ação das enzimas lisossomais dos macrófagos (Hall e Joiner 1991).

Na resposta imune inespecífica (RII) do hospedeiro ao parasita estão envolvidos vários mecanismos interativos que se destinam a eliminar o agente agressor. A eficácia destes mecanismos é diminuída tanto pelas estratégias de evasão do parasita quanto pelos mecanismos auto-regulatórios de redução de dano ao organismo propiciados por esta resposta. Alguns aspectos da interação parasita-hospedeiro ligados a RII são conhecidos:

a - resposta da fase aguda - consiste numa série de eventos sequenciais que têm início imediato após infecção ou dano ao organismo. Nesta resposta há componentes locais e sistêmicos que causam modificações fisiológicas, abrangendo desde coagulação e migração celular à febre e aumento de secreção hormonal. Citocinas produzidas na fase local, tais como IL-1 e TNF- α induzem nos hepatócitos a produção de enzimas específicas da fase sistêmica, dentre elas a fibronectina (Stadnik e Gauldie, 1991), a qual é uma proteína interativa e multifuncional, presente em várias matrizes extracelulares, com funções de adesão e migração celular (Yamada, 1991). Wyler, Sypek e McDonald, (1985), demonstram que a fibronectina propicia a adesão e a entrada de *L. mexicana* em macrófagos humanos, e assim, qualquer resposta que aumente a expressão de tais moléculas beneficiaria o parasita. Segundo Liew e O'Donnell (1993), a fibronectina estabeleceria a ligação entre a gp63 da superfície do parasita e proteínas da matriz extracelular que se ligam ao citoesqueleto celular.

b - sistema complemento - a resistência ao complemento em *Leishmania* é variável, já que promastigotas avirulentas são susceptíveis a lise mediada por ele, enquanto que as virulentas não o são (Hall e Joiner, 1991). Segundo Puentes et al., (1989), as promastigotas fixam complemento pela via alternativa na ausência de anticorpos específicos e há depósito de C₃ na superfície do parasita. Porém, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, bem como do seu estágio de desenvolvimento (fase estacionária ou exponencial), o complexo de lise C5b-9 não é formado. Em *L. major* o

~~CONFIDENTIAL~~

LPG impede a inserção de C5b-9 na membrana, evitando a lise do parasita. A existência concomitante de LPG e gp63 na superfície das leishmânias permite a sua entrada nos macrófagos através do sítio receptor CR3 (Roitt et al., 1993). Tem sido sugerido que o LPG se ligaria a um sítio ligante de lectina e a gp63 ao sítio de ligação com C3bi, ambos no CR3 (Hall e Joiner, 1991). O LPG ainda é capaz de ligar C3b, propiciando às promastigotas a entrada através do sítio receptor CR1 (Roitt et al., 1993). A fagocitose através dos receptores CR1 e CR3 protege os parasitas, já que estes receptores não induzem uma explosão respiratória significativa (Wright e Silverstein, 1983).

Quanto a resposta imune humoral (RIH) verifica-se que os anticorpos anti-leishmânia são capazes de lisar promastigotas *in vitro* na presença de complemento, promover fagocitose e induzir "capping" de amastigotas e promastigotas (Pearson e Steigbigel, 1980; Mosser e Edelson, 1984). Há no entanto evidências *in vivo* da pequena importância dos anticorpos para alterar o curso da infecção. Assim, tem sido mostrado em linhagens isogênicas de camundongos uma ausência de associação entre o título de anticorpos e a resolução da infecção (Olobo et al., 1980; Rezai, Farrel e Soulsby, 1980). Camundongos da linhagem BIOZZI AB/L, selecionados geneticamente por baixa resposta humoral, são altamente resistentes a infecção por *L.major* (Liew e O' Donnell, 1993).

Howard et al., (1984) mostram uma ausência de transferência de proteção por soro imune, ou suas frações, em camundongos: quando camundongos BALB/c, sensíveis a *L.major*, são geneticamente depletados de células B, há desenvolvimento de resistência a infecção. Por outro lado, depleção de células B em linhagens geneticamente resistentes leva a uma infecção aumentada em relação aos controles. No entanto, em ambos os casos, não há reversão do efeito por transferência de anticorpo específico, o que levanta a possibilidade de que as alterações observadas ocorram em função da depressão da função apresentadora de antígeno das células B (Liew e O' Donnell, 1993). Assim, a maioria dos autores concorda que os anticorpos não desempenham um papel central no controle *in vivo* da leishmaniose (Liew e O' Donnell, 1993).

Na resposta imune celular (RIC) contra leishmânias, várias células estão envolvidas e há evidências experimentais sobre a importância de algumas delas.

As células NK (“natural killer”) possuem receptores específicos para interleucina 2 (IL-2) e liberam IFN- γ , IL-1 e fator estimulador de colônia em granulócito-macrófago (GM-CSF) (Roitt et al., 1993). Em pacientes com leishmaniose cutânea americana (LCA), as biópsias de pele mostraram um aumento substancial de células (38%) com fenótipo NK (Ridel et al., 1988). Camundongos geneticamente deficientes de NK eliminam a infecção por *L.donovani* com maior dificuldade (Kirpatrick e Farrel, 1982,1984). Em ensaios de proliferação celular, as células NK de indivíduos normais respondem positivamente e produzem IFN- γ quando estimuladas com *L.aethiopica*, o que não acontece quando são utilizadas células de indivíduos infectados (Akuffo, Maasbo e Howe, 1993).

As células T $\gamma\delta$ (células T - TCR $\gamma\delta$) em camundongos correspondem a cerca de 10% da população de células T circulantes, e a maioria dos linfócitos T intra epiteliais, tendo sido descritas com funções protetoras das mucosas contra antígenos bacterianos (Roitt et al., 1993). Foi observado em lesões de pacientes com LCA que 20% das células T encontradas nas lesões eram T $\gamma\delta$, em contraste com 5% observado no sangue periférico, nos casos de leishmaniose mucocutânea e nos infiltrados de hipersensibilidade tardia (Modlin et al., 1989). Células T $\gamma\delta$ também são encontradas no sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral (LV), produzindo altos níveis de citocinas envolvidas na multiplicação e diferenciação de células B, o que poderia contribuir para a ativação policlonal observada na LV (Raziudin, et al., 1992). Entretanto, em camundongos há indícios de que estas células não estariam envolvidas na patogênese da leishmaniose cutânea (Lohoff, Dingfelder e Rollinghoff, 1991).

As células T CD8⁺ estão associadas a aspectos da RIC desenvolvida contra microorganismos intracelulares. A eficiência desta resposta pode ser tanto através de citotoxicidade direta quanto pela produção de citocinas, já que as células CD8⁺ produzem IFN- γ e TNF, ambas implicadas na ativação de macrófagos. (Chiplunkar, De Libero e Kaufmann, 1986; De Libero e Kaufman, 1986; Kaufman, 1988; Brunt, Portnoy e Unanue, 1990).

A função dos linfócitos T CD8⁺ no controle da leishmaniose é controversa. A administração de anticorpos monoclonais (Mab) anti - CD8⁺ à linhagens de camundongos sensíveis ou resistentes a *L.major* exacerba as lesões cutâneas e aumenta o número de parasitas presentes nas mesmas, em

relação aos controles. Entretanto, as linhagens geneticamente resistentes, mesmo depletadas de células T CD8⁺, exibem padrão de cura (Titus et al., 1987). Por outro lado, em camundongos **nude** a capacidade de controlar infecção por **L.donovani** só é conseguida pela transferência conjunta de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Stern et al., 1988). Assim, é possível que células CD4⁺ e CD8⁺ interajam para destruir macrófagos infectados por leishmânias (Liew e O' Donnell, 1993).

Inicialmente controverso, o papel dos linfócitos T CD4⁺ na leishmaniose emergiu a partir dos estudos quanto a heterogeneidade da população T CD4⁺. Trabalhos iniciais demonstraram que as células T CD4⁺ que participam na síntese de anticorpos e as que medeiam hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) são distintas (Liew e Parish, 1974; Silver e Benacerraf, 1974). As evidências para suportar esta heterogeneidade vieram a partir de estudos da resposta imune em **Leishmania**: camundongos geneticamente sensíveis tornavam-se capazes de controlar e curar infecção por leishmânia se fossem tratados previamente com Mab anti-CD4⁺. Esta resistência adquirida podia ser revertida se estes animais recebessem células T CD4⁺ de camundongos da mesma linhagem mas com doença progressiva (Mitchell et al., 1980; Howard, Hale e Liew, 1981; Liew, Hale e Howard, 1982; Titus et al., 1985). Em 1986, Mosmann propôs que as células CD4⁺ murinas podiam ser divididas em pelo menos dois grupos, Thelper 1 (Th1) e Thelper 2 (Th2), tendo como base o padrão de linfocinas secretadas em resposta a um antígeno específico. Alguns clones secretavam IL-2 e IFN- γ sendo denominados Th1; outros produziam IL-4, IL-5 e IL-6 e foram denominados Th2 (Mosmann e Coffman, 1987). O espectro de linfocinas produzidas pelos clones Th1 e Th2 foi ampliado desde então, acrescentando-se as linfocinas IL-10 para o clone Th2 e IL-3, GM-CSF e TNF para ambas subpopulações (Liew e O' Donnell, 1993). Estes padrões de citocinas podem ser observados em murinos infectados com leishmânia e há todo um corpo de evidências experimentais indicando que as células Th1 mediarão a cura da infecção e as Th2 propiciariam a doença progressiva (Locksley e Scott, 1991; Mosmann e Moore, 1991).

Locksley e Scott, (1991) mostraram em murinos que o controle da infecção por **L.major** nas linhagens resistentes se correlaciona com a expansão de células T produtoras de IFN- γ e com o aparecimento de reação de hipersensibilidade tardia à antígenos do parasita; por outro lado, a infecção progressiva nas linhagens sensíveis, está associada a produção de IL-4 e a hipergamaglobulinemia.

Sadick et al., (1990) trabalhando com linhagens isogênicas de camundongos resistentes e sensíveis a **L.major**, investigadas quanto a expressão de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ , mostraram que os linfócitos das linhagens resistentes, obtidos de linfonodos que drenavam as lesões, apresentavam mRNA capaz de transcrever IFN- γ e IL-2; nas linhagens sensíveis, o mesmo procedimento resultou em mRNA para transcrição de IL-4 e IL-10. Linfócitos dos animais sensíveis, tornados resistentes com Mab anti-CD4⁺ antes da infecção, expressavam IL-2 e IFN- γ .

Em humanos, Carvalho e Badaró (1985), observaram que linfócitos de pacientes com leishmaniose visceral ativa, quando cultivados, mostraram ausência de produção de IL-2 e IFN- γ , mas após quimioterapia bem sucedida passaram a produzir ambas citocinas.

Os dados experimentais apontam claramente a existência de uma rede de citocinas no controle da leishmaniose, onde uma determinada citocina pode ter um efeito horizontal - iniciando sua ação numa célula que foi alvo de outra citocina ou preparando-a para a ação de outro produto - ou um efeito vertical, potenciador ou supressor do "status-quo" em que a célula se encontra (Barral-Netto e Barral, 1994). A função das várias citocinas produzidas pelas células Th1 e Th2 na leishmaniose, bem como suas interrelações, ainda não são totalmente conhecidas. Outras citocinas, produzidas por populações celulares diferentes de CD4⁺, parecem ter funções regulatórias importantes tais como IL-1, TNF- α e fator beta de transformação do crescimento (TGF- β) (Titus et al., 1991; Mosmann e Moore, 1991; Locksley e Scott, 1991; Barral-Netto e Barral, 1994).

Locksley e Scott (1991) revendo o tema, enfocam a importância de diferentes epítomos antigênicos, bem como fatores micro ambientais na via de inoculação e dose do antígeno e tipo da célula apresentadora de antígeno (APC) na indução da resposta Th1 ou Th2. A presença do IFN- γ , associado a determinadas frações antigênicas e na dependência de fatores estimulatórios, levaria à indução de células Th1. A IL-4, associada a outras frações antigênicas e a um segundo fator co-estimulatório, induziria clones Th2. Uma vez induzido, a expansão de um determinado sub conjunto leva concomitantemente à sua própria expansão e a inibição do outro. Uma vez expandido um dos clones, estabelece-se o padrão de cura ou de doença progressiva, já que as citocinas induzidas regularão o estado de ativação dos macrófagos. Quanto a este aspecto, o IFN- γ tem sido identificado como o mais potente fator de ativação de macrófagos para destruição de **L.major**, tendo seu efeito potenciado pela presença de IL-2. Já a IL-4, além dos

efeitos inibitórios sobre a IL-2 e o IFN- γ , ainda impede a transcrição de genes codificadores de TNF, citocina também ativadora de macrófagos.

Após a internalização de leishmânias por macrófagos ativados, podem ser elicitados vários mecanismos de destruição das mesmas. Segundo Hughes, (1988) a produção de intermediários reativos do Oxigênio (IRO), especificamente ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, seria um dos mecanismos de destruição intracelular de leishmânias. A fusão do fagossomo, contendo parasita, com lisossomos e a consequente acidificação do meio é outro mecanismo efetor importante Liew e O' Donnell (1993). A produção de intermediários reativos do Nitrogênio (IRN), especificamente óxido nítrico é o mais recente dos mecanismos descritos para inativação de leishmânias. (Liew e Cox, 1991).

As cepas virulentas de **Leishmania** podem evitar a formação de IRO e a acidificação interna devido a componentes antigênicos superficiais. Como citado anteriormente, a gp63 e o LPG propiciam a entrada do parasita por receptores que não induzem a explosão respiratória e a gp63, sendo uma protease ativa em meio ácido, é capaz de desativar as enzimas lisossomais (Liew e Cox, 1991; Roitt et al., 1993).

Liew e O' Donnell (1993) chamam a atenção para as evidências experimentais, *in vitro* e *in vivo*, de que o principal mecanismo efetor responsável pela destruição de amastigotas intracelulares seria o óxido nítrico. A enzima catalisadora da produção de óxido nítrico em macrófagos é a óxido nítrico sintetase (NOS), uma enzima indutível, cuja produção pode ser induzida ou inibida por citocinas, na presença de fatores co-estimulatórios. As citocinas indutoras de NOS são Th1 dependentes e as inibidoras produzidas por Th2, o que demonstra a importância das mesmas também nesta fase efetora final da resposta imune contra **Leishmania spp.**

No estudo da LV tem-se utilizado alguns animais como modelo experimental, principalmente o camundongo e o hamster. No camundongo a infecção por **L.donovani** é autolimitada, ao contrário do que ocorre na infecção humana, que pode cursar com fatalidade na ausência de tratamento.

Hamsters são altamente susceptíveis a ambas as formas de **L.donovani**, desenvolvendo uma infecção semelhante ao calazar, como consequência de infecção por via intra cardíaca (IC). (Farrel, 1976; Nickol e Bonventre, 1985; Gifawesen e Farrel, 1989).

Segundo citação de Nickol e Bonventre (1985), são descritos em hamsters hipergamaglobulinemia e hepatoesplenomegalia (Stauber, Ochs e

Coy, 1954; Stauber, 1955); anemia e deposição de complexo imune nos rins(Agu, Farrel e Soulsby, 1981,1982).

Farrel, (1976) demonstrou que os hamsters são capazes de desenvolver imunidade a infecção de desafio com **L.donovani**.

Campos-Neto e Bunn-Moreno, (1982) e Bunn-Moreno et al., (1985) demonstraram que células esplênicas de hamsters cultivadas em presença de antígenos de diferentes espécies de **Leishmania**, apresentam uma ativação policlonal de linfócitos B *in vitro*, porém, este fenômeno só é observado *in vivo* na infecção por **L.donovani**; os autores relacionam este fenômeno a uma desregulação das células T, uma vez que ele ocorre concomitantemente com uma diminuição da resposta proliferativa a PHA.

Nickol e Bonventre (1985) reportam que, em animais infectados pela via IC, há uma diminuição progressiva da resposta proliferativa de linfócitos esplênicos à mitógenos e antígenos parasitários durante o curso da infecção.

Gifawesen e Farrel (1989) descrevem que após a infecção por via intradérmica (ID), alguns animais podem desenvolver infecção auto limitada e expressar algum grau de resistência ao desafio.

Rodrigues Jr, Da Silva e Campos-Neto (1992), mostraram que as células esplênicas aderentes de hamsters infectados com **L.donovani** eram incapazes de apresentar antígeno às células T específicas, sugerindo um defeito na capacidade apresentadora de antígeno das células aderentes.

II - OBJETIVO

Tendo em vista que os hamsters infectados pela via IC com **L.(L)donovani** desenvolvem uma infecção de forma grave e progressiva, e que os infectados pela via intra-dérmica podem desenvolver uma infecção auto limitada e não visceralizante, nosso objetivo foi estudar a resposta linfoproliferativa e a produção de citocinas em animais infectados por via intra-cardíaca (IC) ou intra-dérmica (ID), e relacionar esta resposta com a visceralização da infecção.

III - MATERIAL e MÉTODOS

Animais.

Foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos ou fêmeas, com dois meses de idade, mantidos no Biotério do Depto. de Ciências Biológicas da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (FMTM) Uberaba.

Parasitas.

Formas promastigotas.

Foi utilizada a cepa LD-1S de *Leishmania (Leishmania) donovani* isolada originalmente no Sudão pelo Dr. D.Dwyer a partir de caso humano de leishmaniose visceral, e cedida pela Dra. Marlene Bunn-Moreno (Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ). As formas promastigotas foram cultivadas em meio líquido B.H.I. (Brain-Heart Infusion, Difco-Bacto), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-BRL; Escócia), 1% de hemoglobina de coelho, 20 µg/ml de ácido fólico (Lederle; Brasil) e 40 µg/ml de gentamicina (Gibco-BRL; Escócia). As formas promastigotas foram cultivadas em frascos de cultura de células de 50 ml (Falcon; EUA), incubados em estufa a 28° C (Fanem; Brasil). As culturas foram observadas em microscópio invertido (Olympus CK 2) a cada 48 horas e contadas em câmara de Neubauer até que atingissem fase estacionária de crescimento. Os cultivos foram então lavados três vezes por centrifugação a 1.200x g, 10° C, 20 minutos (Sorvall - RT 6000B) em solução salina a 10 °C e o sedimento estocado em freezer a -70° C (Forma Scientific).

Formas amastigotas.

Foi utilizada a mesma cepa LD-1S de *L.(L)donovani*, a qual foi mantida por repiques intra-cardíacos periódicos (60-90 dias) em hamsters.

Infecção dos animais.

As formas amastigotas foram obtidas de baço de animais após o 60º dia de infecção. Os hamsters foram sacrificados em câmara de éter sulfúrico, o baço retirado assepticamente, macerado e ressuspensão em meio RPMI 1640 (Gibco-BRL Escócia). O material foi centrifugado a 140 x g por 10 min. a 10°C. A seguir o sobrenadante foi recentrifugado a 1.200 x g por 20 min. a 10°C. O sedimento resultante foi lavado mais duas vezes nas mesmas condições e ressuspensão em meio RPMI 1640. As leishmânias foram contadas em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 5×10^7 leishmanias/ml e cada animal recebeu um inóculo de 100µl por via (IC) ou (ID) no coxim plantar.

Obtenção de células de órgãos linfóides de hamsters.

Os animais foram sacrificados em intervalos regulares de tempo e as células linfóides do baço e dos linfonodos foram usadas nos ensaios de proliferação celular e de produção de citocinas.

Células de baço -

O baço dos animais infectados por via IC foi retirado assepticamente e desbridado em placa de Petri com o auxílio de duas pinças. As células foram lavadas três vezes por centrifugação em meio RPMI 1640 200 x g por 12 min. a 10°C. O sedimento foi ressuspensão em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, e 40 µg/ml de gentamicina (Gibco-BRL; Escócia) (RPMI completo). As células foram contadas e a concentração ajustada de acordo com cada ensaio.

Células de linfonodos -

Os linfonodos inguinais e poplíteos dos animais infectados por via intra-dérmica foram retirados assepticamente e desbridados em placa de Petri com o auxílio de duas pinças. As células foram lavadas três vezes por centrifugação em meio RPMI 1640, 200 x g por 12 min. a 10°C. O sedimento foi ressuspensão em meio RPMI completo. As células foram contadas e a concentração ajustada de acordo com cada ensaio.

Antígeno.

Obtenção .

O antígeno foi preparado segundo técnica descrita por Rodrigues Jr, Da Silva e Campos-Neto (1992) : formas promastigotas (obtidas como descrito anteriormente) foram ressuspensas em água estéril numa concentração de 2×10^8 promastigotas/ml. Em seguida foram submetidas a 5 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho maria a 37°C). A molaridade foi corrigida com BSS (solução salina balanceada) 10 vezes concentrada e procedeu-se a centrifugação por 60 minutos a $1.200 \times g$ a 5°C. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 micrômetros (Millipore, França), aliquotado e armazenado em freezer a -70°C .

Caracterização.

Proteína total.

A análise do conteúdo proteico do antígeno solúvel de *L.(L)donovani* foi realizada em “kit” para dosagem de proteínas de alta sensibilidade “BCA protein Assay”(Pierce - EUA).

Perfil eletroforético.

Uma alíquota do antígeno foi tratada com dodecil sulfato de sódio (SDS) e 10 µg do antígeno foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em presença de SDS. A eletroforese foi realizada em mini gel (Mini Protean II- Biorad; EUA) conforme especificação do fabricante. O gel obtido foi fixado e corado pelo Azul de Coomassie(Coligan et al., 1994).

Sensibilização

Animais normais foram inoculados com 40 µg do antígeno preparado como descrito anteriormente, emulsificado em igual volume de adjuvante Completo de Freund (ACF) (Sigma; EUA) no coxim plantar. Após três semanas os animais foram sacrificados e as células dos linfonodos inguinais e poplíteos foram testadas por proliferação celular.

Proliferação celular.

As células linfóides, obtidas como descrito anteriormente, foram cultivadas em triplicatas no meio RPMI completo em placas de 96 poços de fundo chato (Falcon; EUA) em estufa incubadora a 37°C, com atmosfera a 5% de CO₂ por 96 horas. Cada poço recebeu 5x10⁵ células em presença de meio, concanavalina-A (Con-A), (Sigma, EUA) 2µg/ml ou antígeno solúvel do parasita a 40 µg/ml e 1 µg/ml em volume final de 200 µl (Bunn-Moreno, et al., 1985; Rodrigues Jr, Da Silva e Campos-Neto 1992).

Nas ultimas 8 horas de cultivo, cada poço recebeu 0,5 µCi de timidina tritiada (Dupont, EUA). As células foram colhidas em coletor semi automático (Skatron - Dinamarca) em papel de fibra de vidro e a radiatividade determinada por cintilação líquida (Beckman, EUA).

Produção de sobrenadantes.

Aliquotas das células utilizadas na proliferação celular foram usadas na produção de sobrenadantes para ensaio de citocinas. As células foram cultivadas em meio RPMI completo, em placas de 24 poços (Falcon; EUA) em estufa incubadora a 37°C com atmosfera com 5% de CO₂ por 96 horas.

Cada poço recebeu 2x10⁶ células em presença de meio, Con-A 5µg/ml, e antígeno do parasita a 40 µg/ml, em volume final de 1ml. Os sobrenadantes foram colhidos e estocados em freezer a - 20°C até análise.

Ensaio de citocinas

Os sobrenadantes obtidos foram testados por ensaio biológico para a presença de IL-2 e IFN-γ, segundo Coligan et al., 1994, modificado.

Interleucina-2

Células CTLL (adquiridas do Banco de Células da Fundação Bio-Rio, R.J.) mantidas em estufa incubadora, com repiques periódicos, em meio RPMI completo suplementado com 10U/ml de IL-2 recombinante murina

(Boehringer; Alemanha) foram utilizadas para dosagem de atividade de Fator de Crescimento de Linfócitos T. As células foram lavadas por centrifugação como já descrito, ressuspensas em meio RPMI completo e distribuídas em placas de 96 poços de fundo chato numa concentração de 2×10^4 células por poço. Os sobrenadantes a serem testados e quantidades padrão de IL-2 recombinante murina foram distribuídos em duplicatas num volume final de 200 μ l e incubadas por 24 horas em estufa incubadora, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Nas últimas 8 horas cada poço recebeu 0,5 μ Ci de timidina tritiada, tendo as células sido colhidas e a radioatividade incorporada determinada como citado anteriormente. A quantidade de IL-2 em cada sobrenadante foi estimada pela sua capacidade de induzir proliferação quando comparada com a obtida frente à IL-2 padrão.

Interferon gama

Células L929 (adquiridas do Banco de Células da Fundação Bio-Rio, R.J.) mantidas em estufa incubadora, com repiques periódicos em meio RPMI completo, foram utilizadas para dosagem de atividade de inibição de efeito citopático viral. As células foram lavadas por centrifugação como já descrito, ressuspensas em meio RPMI completo e distribuídas em placa de 96 poços de fundo chato, na concentração de 5×10^4 células por poço. Os sobrenadantes a serem testados e quantidades padrão de IFN- γ recombinante murino (Genzyme, EUA) foram distribuídos em duplicatas, num volume final de 200 μ l e incubadas por 24 horas em estufa incubadora a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A seguir cada poço recebeu uma alíquota do vírus da encefalomiocardite murina (EMCV) em diluição previamente determinada (1/8.000). As placas foram novamente incubadas até que o efeito citopático se tornasse evidente nas células não expostas ao IFN- γ . Neste momento cada poço recebeu 0,5 μ Ci de timidina tritiada e as células foram incubadas por mais 8 horas, sendo então submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento para o rompimento das células aderentes. Foi feita a colheita das células e a determinação da radioatividade incorporada, como citado anteriormente. A quantidade de IFN- γ em cada sobrenadante foi estimada pela sua capacidade de inibir o efeito citopático quando comparada com a obtida frente ao IFN- γ padrão.

Carga parasitária.

A carga parasitária foi determinada por "imprint" dos baços segundo sugestão de Stauber (1958); Rezai, et al., (1980) e Corbett, et al., (1992). Segmentos de baço (cerca de 20% do órgão) foram primeiro adsorvidos com papel de filtro para remoção de sangue e em seguida impressos por aposição contra lâminas novas e desengorduradas (mantidas em imersão em solução de álcool - éter), secos ao ar, fixados em metanol por cinco minutos e corados pelo método de Giemsa. A coloração foi realizada de acordo com a técnica empregada rotineiramente no Laboratório de Parasitologia da UFU para leishmânias: as lâminas fixadas foram imersas em corante de Giemsa, diluído 0,1:1,0 ml em água destilada e tamponada em pH 7.2, por uma hora e meia, e secas ao ar. As lâminas foram então observadas com objetiva de imersão em microscópio Olympus (CHI). O valor da carga parasitária foi calculado pela determinação do número de amastigotas encontradas por 1.000 núcleos, multiplicado pelo peso do baço (em mg) e por 2×10^5 (Lds). Para cada carga parasitária determinada observou-se em média 3 lâminas.

IV - RESULTADOS

Parasitismo esplênico em hamsters infectados pela via IC.

Os resultados apresentados se referem a um total de 24 animais infectados com 5×10^7 formas amastigotas / ml, num inóculo de 100 μ l. Os hamsters foram sacrificados nos 10^o; 20^o; 30^o; 40^o; 60^o e 90^o dias pós infecção, tendo sido determinada a carga parasitária por "imprint" do baço. O parasitismo se tornou patente a partir do 30^o dia de infecção, tendo aumentado de $5,8 \times 10^6$ formas amastigotas no 30^o dia para $4,6 \times 10^8$ no 90^o dia. Todos os animais observados a partir do 30^o dia mostraram parasitismo positivo, em todas as lâminas observadas (figura 1). Foram examinados em média 4 animais por ponto, com 3 lâminas em média, por animal.

Caracterização do antígeno.

O preparado antigênico continha 2 mg/ml de proteína total. A análise eletroforética (figura 2) mostrou uma série de proteínas com peso molecular entre 30 kDa e 94 kDa e mostra ainda uma forte banda de 63 kDa que corresponderia a gp63.

O preparado antigênico induziu proliferação acentuada nas células dos linfonodos dos animais imunes, nas 2 concentrações empregadas para o desafio, e não estimulou proliferação significativa nos controles não infectados (figura 3).

Resposta proliferativa de células esplênicas de hamsters infectados pela via IC.

Células esplênicas de hamsters infectados com 5×10^6 formas amastigotas de *L.(L.)donovani* foram cultivadas em presença de meio, antígeno bruto de *L.(L.)donovani* a 40 μ g/ml; 1 μ g/ml e 2 μ g/ml de Con-A. Os resultados apresentados na figura 3 mostram que tanto os animais controles não infectados, quanto os hamsters sacrificados em vários dias após o início da infecção, mostraram ausência de resposta proliferativa frente aos antígenos do parasita.

Mostram ainda que as células obtidas de animais imunizados com o antígeno de **L.(L)donovani** apresentam uma boa resposta proliferativa frente a antígenos do parasita (índice de proliferação de 3,8). A resposta proliferativa das células estimuladas com 2 µg/ml de Con-A foi positiva nos hamsters infectados e não infectados (índice de proliferação de $40,5 \pm 5$).

Parasitismo esplênico e resposta proliferativa em células dos linfonodos de hamsters infectados pela via ID.

Hamsters infectados por via intra-dérmica com 5×10^6 formas amastigotas de **L.(L)donovani** foram sacrificados no 30^o, 60^o e 90^o dias após o início da infecção. Foram sacrificados 4 animais por ponto, sendo submetidos a uma avaliação do parasitismo a nível do baço e ao estudo da resposta proliferativa das células dos linfonodos a antígenos de **L.(L)donovani**.

Em 7 animais, não se observou a presença de parasitas a nível de baço. Em 5 animais foram encontrados parasitas no baço a partir do 30^o dia de infecção, com uma média de $4,6 \times 10^7$ parasitas / animal. Nos animais que não apresentaram um parasitismo patente, a resposta proliferativa a antígenos do parasita foi positiva nos diversos dias testados (índices de proliferação de 2,1 a 4,9 e 1,06 a 5,63 para, respectivamente, 40 µg/ml e 1 µg/ml do antígeno). Por outro lado, não se observou resposta proliferativa frente a antígenos de **L.(L)donovani** nas células de linfonodos dos animais onde foram observados parasitas no baço (figura 4A e 4B). A resposta proliferativa das células estimuladas com Con-A (2 µg/ml) foi positiva para hamsters parasitados e não parasitados (índice de proliferação $36,8 \pm 5$).

A figura 5 mostra a média da resposta proliferativa de células de linfonodos de hamsters com e sem parasitismo patente.

Deteccção e dosagem de citocinas.

A dosagem de citocinas foi realizada nos sobrenadantes do cultivo de aliquotas de células dos mesmos animais que foram utilizados para proliferação e nos quais também se avaliou o parasitismo esplênico. Utilizou-se sobrenadantes de cultivo de células de linfonodos dos animais infectados por via ID e sobrenadantes de cultivo de células de baço dos animais infectados por via IC.

A dosagem de IFN- γ foi prejudicada pela presença de atividade citotóxica, possivelmente TNF, presente no sobrenadante, já que observamos a presença de células L-929 mortas antes mesmo da adição do vírus da encefalomiocardite aos poços de cultivo.

A atividade de IL-2 foi determinada pela capacidade dos sobrenadantes induzirem proliferação celular em linhagem de células CTLL. Os resultados estão expressos em proliferação (CPM /1.000) (figura 6A) e em unidades de IL-2, determinada contra curva padrão (figura 6B).

A figura 6A mostra que a proliferação estimulada pelos sobrenadantes dos animais infectados pela via ID, sem parasitismo patente, foi aproximadamente 2,5 vezes maior que a observada com os sobrenadantes dos animais infectados pela via IC, e cerca de 10 vezes maior que a detectada nos sobrenadantes dos animais infectados pela via intra-dérmica, sem parasitismo observável. Não se observa proliferação importante com os sobrenadantes estimulados pelo antígeno ou sem estímulo (meio de cultura), sendo significativa apenas sob estímulo de Con-A. A figura 6B apresenta os mesmos resultados expressos em U/ml. Nos animais infectados por via intra-dérmica, sem parasitismo patente, detectou-se 53,6 U IL-2 / ml; nos infectados por via intra-dérmica com parasitismo patente encontramos 5,0 U IL-2 / ml e nos infectados por via intra-cardíaca, 17,45 U IL-2 / ml.

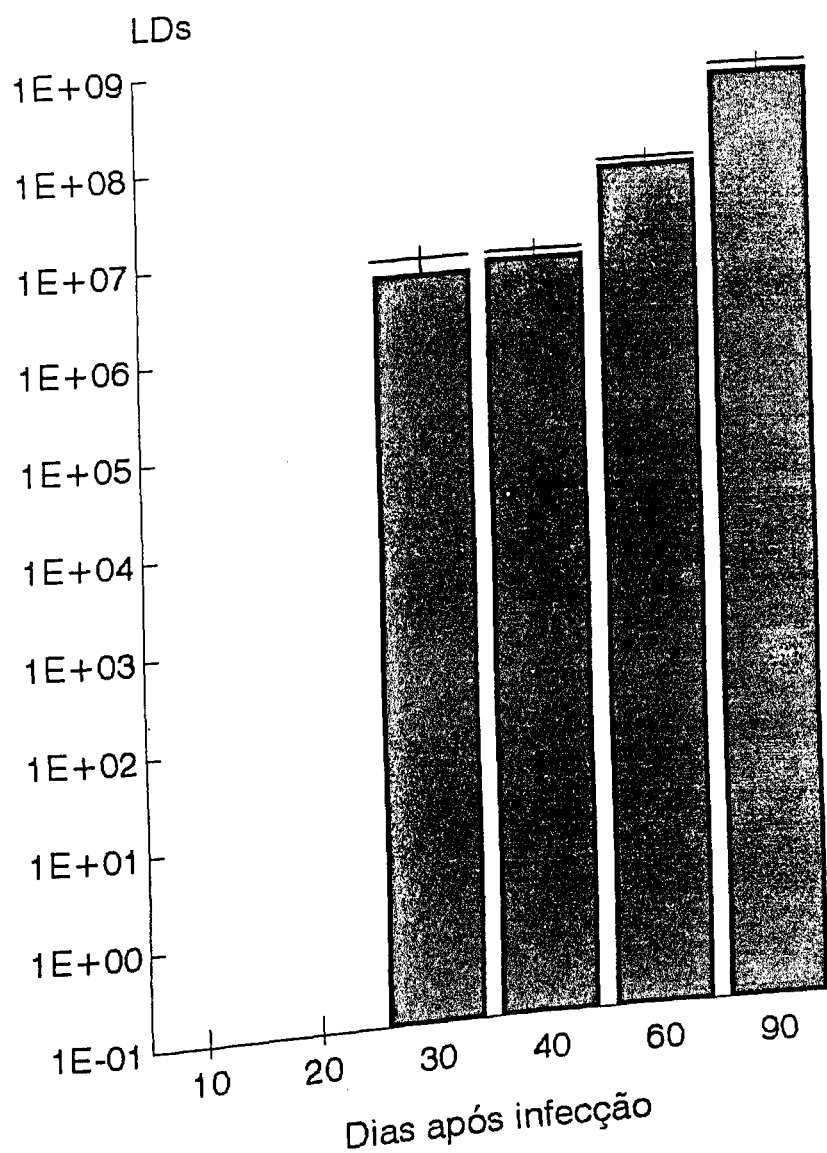


FIGURA 1 - Parasitismo esplênico em hamsters infectados pela via intra-cardíaca. Hamsters infectados com 5×10^6 formas amastigotas foram sacrificados 10, 20, 30, 40, 60, 90 dias após infecção, tendo sido determinado o parasitismo esplênico por "imprint" (expresso em LDs). Cada ponto representa a média de quatro animais, com a observação de três lâminas por animal. As barras expressam o desvio padrão (DP).

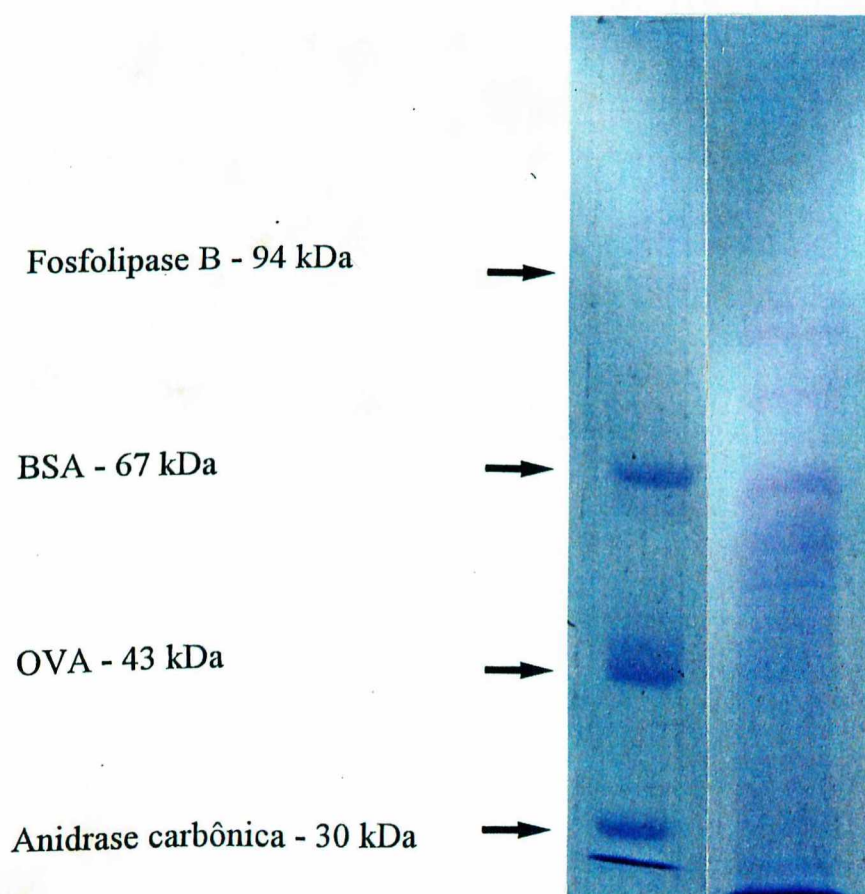


FIGURA 2 - Perfil eletroforético do antígeno de *Leishmania (Leishmania) donovani* (AgLd). 10 μ g do AgLd foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em presença de SDS e corado pelo Azul de Coomassie. Foram utilizados 5 μ g de uma mistura de marcadores de pesos moleculares contendo Fosfolipase B; BSA; OVA e Anidrase carbônica.

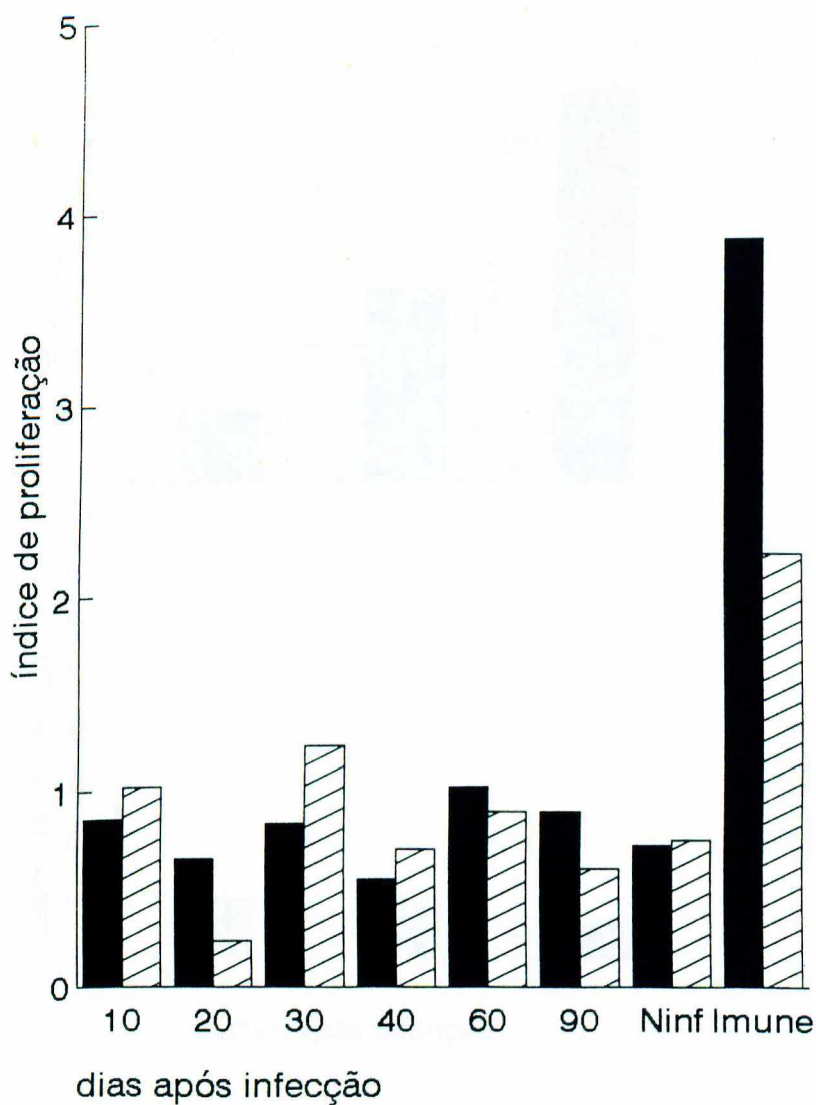


FIGURA 3 - Resposta proliferativa de células esplênicas de hamsters infectados pela via intra-cardíaca (IC). Células esplênicas de hamsters infectados pela via IC com 5×10^6 formas amastigotas foram cultivadas com duas concentrações do antígeno: 40 µg/ml ■ e 1 µg/ml ▨ . Cada ponto de infecção representa a média de quatro animais. Os resultados obtidos de animais controles não infectados (Ninf) e de animais imunizados com o antígeno (Imune) estão representados. Os resultados estão expressos em índice de proliferação: CPM do AgLd / CPM do Meio. O índice de proliferação para Con-A foi, em média, $40,5 \pm 5$ e o desvio padrão foi inferior a 20%.

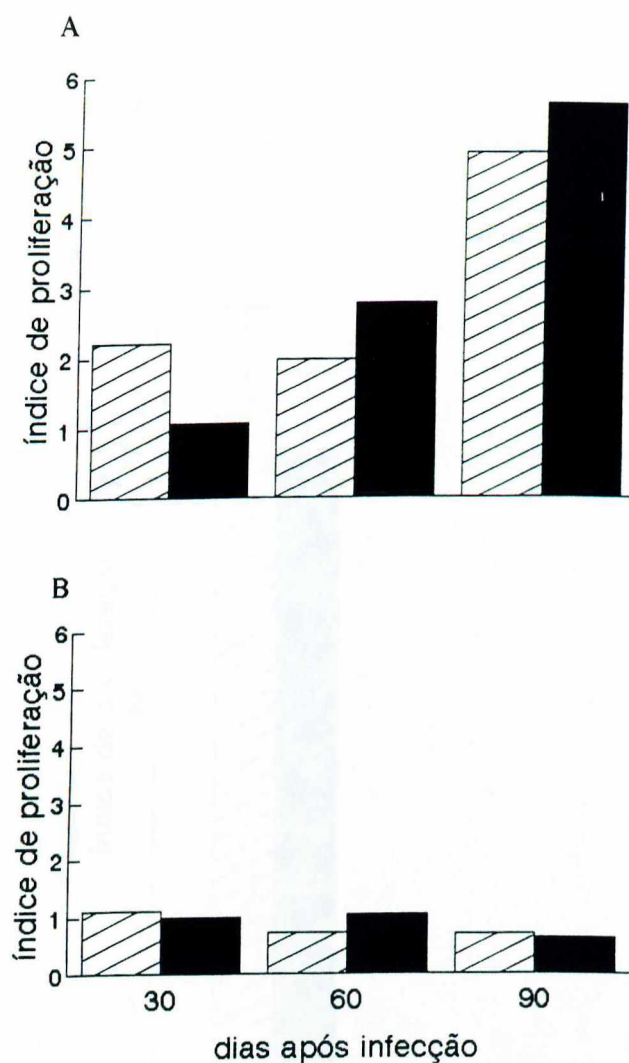


FIGURA 4 - Resposta proliferativa de células de linfonodos de hamsters infectados pela via intra-dérmica. Células de linfonodos de hamsters infectados com 5×10^6 formas amastigotas foram colhidas com 30, 60 e 90 dias após infecção e cultivadas em presença de duas concentrações do antígeno: 40 µg/ml ■ e 1 µg/ml ▨ . Na figura 4A estão representados os resultados da proliferação em animais onde não se observou parasitismo esplênico, e na figura 4B, a proliferação nos animais com parasitismo esplênico. Os resultados estão expressos em índice de proliferação: CPM do AgLd / CPM do Meio. O índice de proliferação para ConA foi, em média, $36,8 \pm 5$ e o desvio padrão foi inferior a 20%.

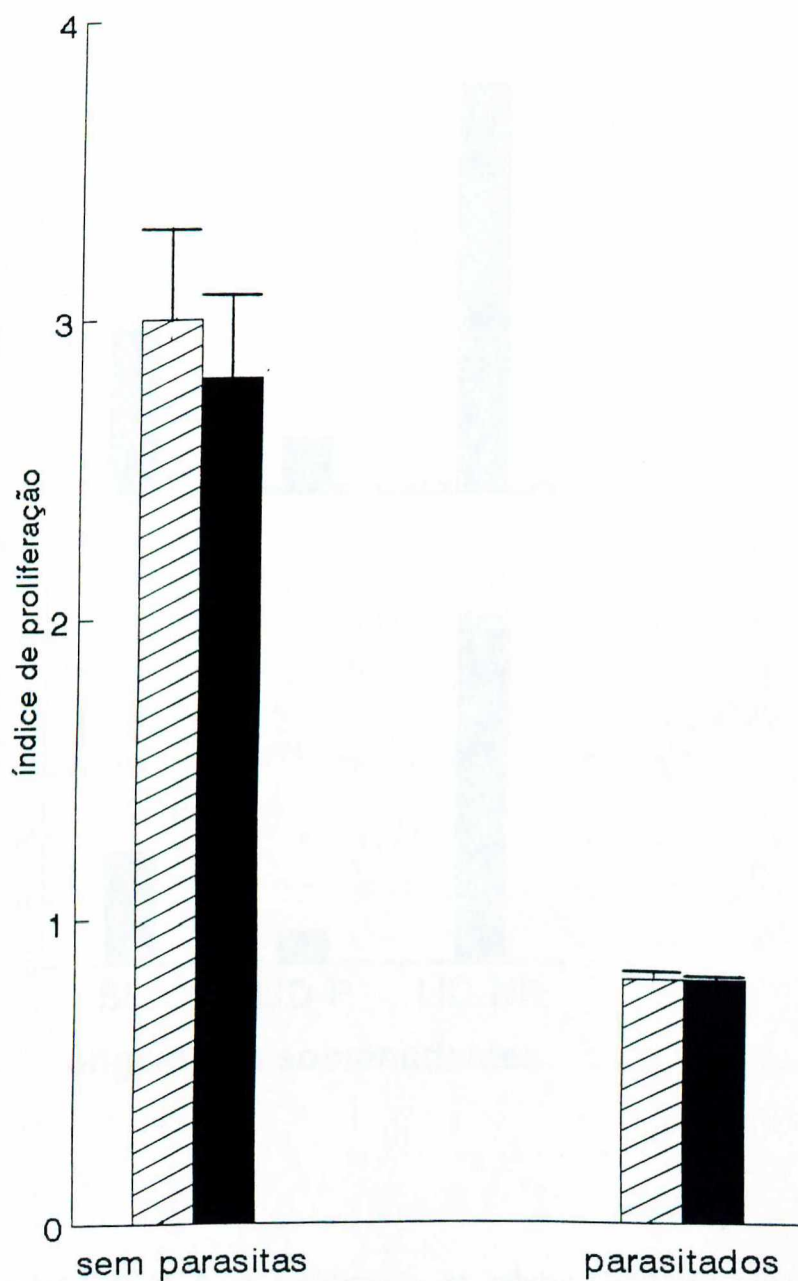


FIGURA 5 - Média da resposta proliferativa de células de linfonodos de hamsters infectados pela via intra-dérmica. Índices médios dos resultados de proliferação mostrados nas figuras 4A e 4B. As barras representam o desvio padrão. AgLd 40µg/ml ■ e 1µg/ml ▨.

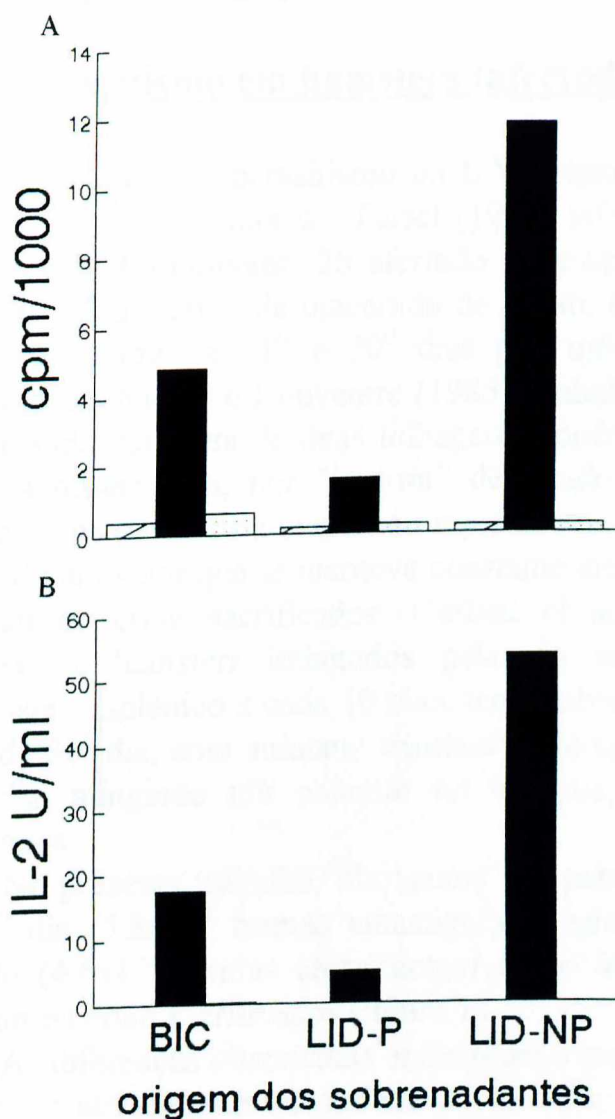


FIGURA 6 - Detecção de IL-2. A proliferação de células CTLL foi testada com os sobrenadantes dos cultivos de células de baço (BIC) e células de linfonodos de animais parasitados (LID-P) e sem parasitismo patente (LID-NP). Os sobrenadantes testados foram obtidos sob estímulo de: meio □; ConA (5µg/ml) ■ e AgLd (40µg/ml) ▨. Figura 6A - proliferação induzida nas células CTLL pelos sobrenadantes, expressa em CPM/1000. Figura 6B - unidades de IL-2 presentes nos sobrenadantes.

V - DISCUSSÃO

Parasitismo em hamsters infectados pela via IC .

A cinética do parasitismo na L.V. experimental em hamsters já foi descrita por vários autores : Farrel (1976) infectou hamsters pela via sub cutânea com **L.donovani** 2S aferindo o parasitismo de fígado e baço por "imprint" e/ou cultivo de macerado de órgão, tendo registrado parasitismo crescente entre os 8^o e 20^o dias pós infecção, quando encerrou as observações; Nickol e Bonventre (1985), trabalhando com **L.donovani** 1S e infectando hamsters de duas linhagens isogênicas distintas pela via intra cardíaca observaram, por "imprint" de fígado, uma cinética de infecção onde a carga parasitária aumentou rapidamente durante os 30 dias iniciais, atingindo um valor que se manteve constante até 90 dias, quando os animais morriam ou eram sacrificados; Corbett et al. (1992) utilizaram **L.(L.) chagasi** e hamsters infectados pela via intra peritoneal, aferindo o parasitismo esplênico a cada 10 dias, tendo observado parasitismo apenas a partir do 30^o dia, com aumento expressivo da carga parasitária em torno do 40^o dia, atingindo um patamar no 60^o dia, quando os ensaios eram encerrados.

No presente trabalho, obtivemos um parasitismo observável a partir do 30^o dia ($5,8 \times 10^6$ formas amastigotas) que se manteve num patamar elevado ($4,6 \times 10^8$ formas amastigotas) até o 90^o dia, quando os animais morriam ou eram sacrificados (figura 1).

As diferenças observadas entre nossos resultados e a literatura citada podem ser atribuídas à quantidade do inóculo, às características genéticas dos animais, à via de inoculação, aos órgãos observados e à espécie de **Leishmania** utilizada. Em comum, destacamos o perfil da curva com início abrupto e exponencial, e estabelecimento do parasitismo em patamar elevado.

Caracterização do antígeno.

Segundo Campos-Neto e Bunn-Moreno (1982), extratos antigênicos brutos de promastigotas de **L.(L)donovani** induzem, *in vitro*, a ativação policlonal de linfócitos B em hamsters não infectados.

Bunn-Moreno et al. (1985) confirmam estas observações para preparados antigênicos obtidos apenas por choque térmico.

Rodrigues Jr, Da Silva e Campos-Neto (1992), utilizando antígeno de **L.(L)donovani** obtido por choque térmico e osmótico, seguido de centrifugação e filtração observam atividade imunogênica específica para o preparado, não observando proliferação inespecífica em células de hamsters normais.

A metodologia utilizada na obtenção do antígeno de **L.(L)donovani** utilizado neste trabalho segue a descrita por Rodrigues Jr, Da Silva e Campos-Neto (1992). Nossos resultados confirmam que antígenos de **L.(L)donovani**, preparados como descrito, apresentam boa imunogenicidade sendo ainda desprovidos de atividade mitogênica nas concentrações empregadas (figura 3).

Proliferação de células linfóides esplênicas desafiadas com o antígeno (infecção IC.)

Nickol e Bonventre (1985), infectando animais isogênicos com **L.donovani** 1S pela via IC e procedendo ao desafio de células linfóides esplênicas com antígeno constituído por promastigotas formolizadas, descrevem uma resposta proliferativa substancial ao antígeno no 21^o dia pós infecção, com declínio à níveis desprezíveis em torno do 60^o dia, quando as observações foram encerradas. Os autores reportam ainda uma resposta diminuída a Con-A, a partir da 8^a semana pós infecção.

Gifawesen e Farrel (1989), encontram resposta proliferativa inicial em células esplênicas de hamsters isogênicos desafiadas com o antígeno de **L.donovani** 2S, obtido por sonicação de promastigotas na 2^a semana pós infecção, com declínio a níveis desprezíveis entre a 4^a e 6^a semanas pós infecção e reportam também uma resposta proliferativa diminuída a Con-A.

No entanto, Bunn-Moreno et al., (1985) e Rodrigues Jr, Da Silva e Campos-Neto (1992), relatam uma ausência de resposta proliferativa em células esplênicas ou de linfonodos de hamsters infectados por via IC com **L.(L)donovani** desafiadas com o antígeno.

Nossos dados apontam para uma ausência de resposta proliferativa significativa frente ao antígeno do parasita em quaisquer dos pontos observados (figura 3). A não ocorrência dos picos transientes de proliferação, descritos por Nickol e Bonventre (1985) e Gifawesen e Farrel

(1989), pode ser atribuída a diferentes preparações antigênicas utilizadas no desafio, onde os primeiros utilizam promastigotas formolizadas, os segundos promastigotas sonicadas e nós promastigotas rompidas por choque térmico e osmótico, centrifugadas e filtradas. Assim, a proliferação inicial descrita pelos dois autores, poderia ser devida a ativação policlonal de linfócitos B, elicitada por alguns preparados de antígeno, como descrito por Campos-Neto e Bunn-Moreno (1982).

Não encontramos no nosso trabalho resposta proliferativa diminuída a Con-A, seja relacionando valores obtidos em animais infectados e animais controles não infectados, ou avaliando-se apenas as respostas dos animais infectados nos vários pontos ensaiados. A resposta proliferativa preservada a Con-A na L.V. experimental em hamsters já foi descrita em trabalhos de Bunn-Moreno et al., (1985) e Rodrigues Jr, Da Silva e Campos-Neto (1992). Carvalho e Bacelar (1983), também descrevem resposta preservada a Con-A e a “pokeweed mitogen” (PWM) em linfócitos periféricos de pacientes com L.V.A.

Proliferação de células linfóides de linfonodos desafiadas com o antígeno (infecção ID.)

Dados da literatura (Farrel, 1976 e Gifawesen e Farrel, 1989) mostram que alguns animais infectados pela via ID apresentam resposta proliferativa para antígenos de *Leishmania donovani* e que podem ser resistentes a uma infecção de desafio pela via IC.

Os resultados apresentados na figura 4 mostram que a infecção de hamsters pela via ID pode seguir dois caminhos distintos. Células de linfonodos de animais que apresentam parasitas detectados à nível de baço não desenvolvem resposta proliferativa quando estimuladas com antígeno de leishmânia. Por outro lado, animais que não apresentam parasitas no baço têm resposta proliferativa positiva de células de linfonodos.

Este dados parecem refletir uma correlação direta entre o desenvolvimento de uma resposta linfoproliferativa e a capacidade do hamster de controlar a infecção (figura 5).

Análise de IL-2 nos sobrenadantes de células de baço e de linfonodo.

A quantidade de IL-2 presente nos sobrenadantes foi avaliada pela sua capacidade de induzir proliferação em linhagem de células T citotóxicas (CTL).

É possível que um percentual da resposta proliferativa se deva à presença de IL-4, uma vez que estas células podem apresentar uma pequena resposta à esta citocina. A quantidade de IL-2 detectada nos sobrenadantes estimulados com o antígeno de **L.(L)donovani**, ou sem estímulo (Meio) foi irrelevante, mesmo onde se observou resposta proliferativa. Isto pode ser devido a um consumo desta citocina pelas células presentes na cultura.

Porém, nos sobrenadantes de células estimuladas com Con-A, o nível de IL-2 foi diferente nos tres grupos. A quantidade de IL-2 detectada nos hamsters infectados por via ID e sem parasitismo esplênico foi 10,72 vezes maior que a dos animais infectados pela mesma via, porém com parasitismo patente. A quantidade de IL-2 presente nos sobrenadantes de células de baço dos animais infectados por via IC foi 3,07 vezes inferior a observada nos sobrenadantes de células de linfonodos dos animais sem parasitismo (figura 6).

IL-2, como citado anteriormente, é uma citocina relacionada na resposta imune secundária, ao desenvolvimento de padrão de resposta Th1 em murinos, que por sua vez está ligada a resolução da infecção por **Leishmania spp.** Sua detecção e função na leishmaniose tem sido investigada por vários autores.

Murray et al., (1987), trabalhando com **L.donovani** e camundongos isogênicos de linhagens sensível e resistente, compararam a infecção esplênica progressiva com a capacidade de gerar IL-2 ou IFN- γ , em resposta ao antígeno específico. Na linhagem resistente foram detectadas ambas citocinas, cuja presença coincidiu com o controle da multiplicação parasitária e cura. Na linhagem sensível não houve produção de IL-2 ou IFN- γ , nem resolução da doença.

Heinzel, et al., (1991) utilizando linhagens de camundongos resistentes e sensíveis, infectados com **L.major**, observaram a expressão de mRNA tradutor de IL-2 e IFN- γ em linfócitos T e B de linfonodos que drenavam as lesões, encontrando mRNA específico para ambas citocinas apenas na linhagem resistente.

Carvalho e Badaró (1985) investigaram a presença de IL-2 e IFN- γ em pacientes com L.V. ativa, não encontrando na fase ativa da doença a presença de valores expressivos de ambas citocinas em relação aos controles sadios. A presença de IL-2 e IFN- γ se tornou significativa após terapêutica bem sucedida.

Considerações gerais.

Nossos resultados quanto a infecção ID se assemelham aos obtidos por Pinelli et al., (1994) que trabalharam em leishmaniose visceral experimental e natural por *L.infantum* em cães. Os autores descrevem parâmetros clínicos, imunológicos e de detecção de parasitismo que permitiram dividir cães infectados experimentalmente por via intra-dérmica em resistentes e susceptíveis a infecção. Dentre os parâmetros imunológicos foram investigados a resposta proliferativa de linfócitos a antígeno específico e detecção de IL-2 nos sobrenadantes. Os resultados indicaram que no conjunto dos cães resistentes podiam ser encontrados animais com parasitismo negativo, resposta proliferativa positiva e níveis expressivos de IL-2. Os animais susceptíveis se encontravam parasitados, com resposta proliferativa ausente frente ao antígeno específico e apresentando baixos níveis de IL-2. Os resultados foram semelhantes quando os autores investigaram população de cães vadios em região endêmica de leishmaniose visceral canina (LVC) por *L.infantum*: cães assintomáticos, não parasitados exibiam resposta proliferativa ao antígeno específico e com produção de IL-2, ao contrário dos sintomáticos com parasitismo patente.

Carvalho et al., (1988), trabalhando em região endêmica de L.V.A. acompanharam, por cinco anos, um grupo de 29 crianças recém infectadas, quanto a proliferação de linfócitos periféricos frente a antígeno de *L.donovani*, e a habilidade de controlar a infecção por este parasita.

A proliferação foi positiva para 17 das 29 crianças, e quanto a aspectos clínicos, foi possível dividi-las inicialmente em dois grupos: assintomáticas e sub clínicas. As crianças assintomáticas (12) mantiveram-se sempre sadias.

O grupo sub clínico, ao longo das observações, se dividiu ainda em um grupo que se manteve sadio e noutro que desenvolveu a forma clássica da doença.

No grupo sadio, todas as crianças, exceto uma, apresentaram resposta proliferativa positiva de linfócitos, enquanto que no grupo que desenvolveu a doença, a resposta proliferativa foi sempre ausente.

Os nossos dados relativos a infecção estabelecida pela via intradérmica, quanto ao parasitismo, proliferação e detecção de IL-2 parecem indicar a possibilidade de dois eventos excluíveis: o primeiro seria parasitismo esplênico patente com ausência de resposta proliferativa e baixa quantidade de IL-2; o segundo, ausência de parasitismo observável no baço, resposta proliferativa positiva e altos níveis de IL-2. Os animais incluídos no primeiro grupo apontam para um padrão indicativo de resolução da infecção e os do segundo grupo, para infecção progressiva.

Como já revisto, a resolução da infecção e a infecção progressiva se relacionam, na leishmaniose, a padrões de resposta Th1 e Th2, respectivamente. Segundo Locksley e Scott (1991), embora os eventos de indução da resposta Th1 ou Th2 não sejam totalmente conhecidos, alguns parâmetros importantes podem ser a via de inoculação e a dose do antígeno, e associação entre o tipo de célula APC (células apresentadoras de antígenos) e células T.

A interação do antígeno com as células APC é aceite como um pré requisito para indução da imunidade mediada por células. Esta interação inclui um processamento complexo do antígeno e culmina com a expressão de frações deste antígeno, processado, em associação com moléculas do CHP, na superfície da APC (Unanue e Allen, 1987).

Kaye, Patel e Blackwell (1988) demonstraram que a influência genética no padrão de cura observado por linhagens de camundongos Lsh^R se traduziria numa expansão rápida da função APC, facilitando uma expansão subsequente maior de células T. Este aumento na função APC se correlacionaria com a expressão aumentada de moléculas do tipo II do CHP, observando ainda que o fenótipo Lsh^R é mais responsivo a ativação por IFN- γ .

Gajewski et al., (1991) sugerem que a resposta Th1 ou Th2 pode ser diferencialmente ativada em função do tipo de população de células APC envolvido, não só através do processamento e apresentação do antígeno, mas do fornecimento por estas de sinais estimulatórios distintos. Os autores apresentam dados que imputam as células B como APC preferencialmente indutoras de resposta Th2 e macrófagos como indutores de resposta Th1,

citando que o estado de ativação prévio destas APC determinaria seu potencial estimulatório.

Em relação às células potencialmente capazes de funcionar como apresentadoras de antígenos na leishmaniose experimental, Blank et al., (1992) demonstram que células de Langerhans murinas são capazes de fagocitar amastigotas de **L.major** e discutem que a função desta fagocitose, menos expressiva que a de macrófagos, seria importante não na eliminação do parasita, mas no processamento e apresentação de antígenos às células T, já que estas parecem migrar para linfonodos regionais após a fagocitose. Doherty e Coffman (1993), apresentam evidências de que macrófagos ativados por GM - CSF, derivados da medula óssea de camundongos, incubados com antígeno de **L.major** induzem uma resposta do tipo Th1 em linhagens sensíveis e correlacionam esta resposta com a expressão da função APC destes macrófagos, inferindo ainda que a natureza da célula APC e portanto, os eventos iniciais de aquisição e apresentação do antígeno influenciam o tipo de resposta Th1 ou Th2 elicitada.

Em hamsters, a importância das várias populações celulares envolvidas na resposta imune à leishmaniose também tem sido investigada : Gifawesen e Farrel (1989), observam supressão da resposta proliferativa apenas em presença de células aderentes; Nickol e Bonventre (1985), apresentam resultados que imputam células T como responsáveis pela supressão da resposta proliferativa. Rodrigues Jr, Da Silva e Campos-Neto (1992), mostram que a ausência da resposta proliferativa pode ser causada por uma incapacidade seletiva das células apresentadoras de antígeno em sensibilizar células T.

Nossos dados, em conjunto, mostram que para as duas vias de infecção utilizadas obtivemos resultados diferentes. Na via de infecção intra-cardíaca observamos um padrão de doença visceralizante, constante, com parasitismo esplênico e ausência de resposta proliferativa aos antígenos de **L.(L)donovani** e baixos níveis de IL-2.

Na infecção pela via intra-dérmica observamos que parte dos hamsters apresentava características semelhantes aos infectados pela via intra-cardíaca quanto ao parasitismo, proliferação e níveis de IL-2, mas outro grupo controlava a infecção e apresentava proliferação positiva ao antígeno específico e altos níveis de IL-2.

A diferença de resposta observada após a infecção intra-dérmica poderia ser atribuída a influência genética, uma vez que foram utilizados animais não isogênicos neste estudo. Porém, fatores relacionados aos

primeiros eventos do processamento e apresentação dos antígenos de **L.(L)donovani** aos linfócitos T podem estar envolvidos.

A rota de infecção intra-cardíaca em hamsters levou a resultados que se assemelham ao observado em casos graves de calazar.

Na via intra-dérmica os resultados se assemelham ao observado natural e experimentalmente, tanto em reservatórios de leishmaniose visceral (Pinelli et al., 1994), quanto ao detectado em inquéritos epidemiológicos humanos (Carvalho et al., 1988).

VI - CONCLUSÃO.

Destacamos que a rota intra-dérmica de infecção nos parece um modelo muito mais próximo do que se observa na infecção natural, que se dá através da picada do vetor, que a intra-cardíaca. Assim é possível que esta mimetize melhor os eventos iniciais que ocorrem *in situ* após a inoculação do parasita, e que podem resultar em resolução da doença ou em doença progressiva.

Finalizando, nos parece que o hamster pode ser um modelo versátil para estudos imunológicos da leishmaniose visceral, já que permite o estudo das formas de infecção semelhantes as observadas no calazar grave, bem como de formas assintomáticas ou de progressão lenta, observáveis na LVH, apenas pela variação da rota de infecção.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGU,W.E., FARREL,J.P., SOULSBY,J.L Proliferative glomerulonephritis in experimental **Leishmania donovani** infection of the golden hamster. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.4, p.353-368, 1981.
- AGU,W.E., FARREL,J.P., SOULSBY,J.L Pathogenesis of anaemia in hamsters infected with **L.donovani**. *Z. Parasitenkd.*, v.68, p.27, 1982.
- AKUFFO,H., MAASBO,K., HOWE,R. Natural and acquired resistance to **Leishmania**: cellular activation by **Leishmania aethiopica** of mononuclear cells from unexposed individuals is through the stimulation of natural killer (NK) cells. *Clin. Exp. Immunol.*, v.94, n.3, p.516-521, 1993.
- ALENCAR,J.E. Leishmaniose visceral no Brasil. *R. Med. Univ. Fed. Ceará*, v.17-18, p.129-148, 1977-78.
- ANDRADE,Z.A.,ANDRADE,S.G. Alguns novos aspectos da patologia do calazar (estudos morfológicos de 13 casos necropsiados). *R. Inst. Med. Trop. S. P.*, v.8, p.259, 1966.
- AYALA,M.A.R., BERGOXE,P.M., ANUNCIACAO,E.M. Calazar - 1º caso autóctone do Paraná. *J. Bras. Med.*, v.30, p.88-89, 1980.
- BARRAL-NETO,M., BARRAL,A. Transforming growth factor - beta in tegumentary leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.27, p.1-9, 1994.
- BLACKWELL,J.M., FREEMAN,J., BRADLEY,D.J. Influence of H-2 complex on acquired resistance to **Leishmania donovani** infection in mice. *Nat.*, v.283, p.72-74, 1980.
- BLACKWELL,J.M., HALE,C., ROBERTS,M.B., ULCZAK,O.M., LIEW,F.Y., HOWARD,J.G. An H-II - linked gene has a parallel effect on **Leishmania major** and **Leishmania donovani** infections in mice. *Immunogen.*, v.21, p.385-395, 1985.

- BLACKWELL,J.M., ROACH,T.I.A., KIDERLEN,A., KAYE,P.M. Role of Lsh in regulating macrophage priming / activation. *Res. Immunol.*, v.140, p.798-805, 1989.
- BLACKWELL,J.M., ROACH,T.I.A., ATKINSON,S.E., AJIOKA,J.W., BARTON,C.H., SHAW,M.A. Genetic regulation of macrophage priming / activation: the lsh gene story. *Immunol. Lett.*, v.30, p.241-248, 1991.
- BLANK,C., FUCHS,H., RAPPERSBERGUER,K., RÖLLINGHOFF,M., MOLL,H. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with **Leishmania major**. *J.Infect. Dis.*, v.167, n.2, p.418-425, 1993.
- BONVENTRE,P.F., NICKOL,A.D. **Leishmania donovani** infection in athymic mice derived from parental strains of the susceptible (lsh^s) or resistant (lsh^r) phenotype. *J. Leuk. Biol.*, v.36, p.651-658, 1984.
- BOUVIER,J., ETGES,R., BORDIER,C. Identification of the promastigote surface protease in seven species of **Leishmania**. *Mol. Bioch. Parasitol.*, v.24, n.1, p.73-79, 1987.
- BOUVIER,J., BORDIER,C., VOGEL,H., REICHEL,T.R., ETGES,R. Characterisation of the promastigote surface protease of **Leishmania** as a membrane-bound zinc endopeptidase. *Mol. Bioch. Parasitol.*, v.37, n.2, p.235-246, 1989.
- BRADLEY,D.J., TAYLOR,B.A., BLACKWELL,J., EVANS,E.P., FREEMAN,J. Regulation of **Leishmania** populations within the host. III - mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, v.37, p.7-14, 1979.
- BRUNT,L.M., PORTNOY,D.A., UNANUE,E.R. Presentation of "Listeria Monocytogenes" to Cd8+ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth. *J. Immunol.*, v.145, p.3540-3546, 1990.

- BUNN-MORENO,M.M., MADEIRA,E.D., MILLER,K., MENEZES,J.A., CAMPOS-NETO,A. Hypergammaglobulinaemia in **Leishmania donovani** infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. *Clin. Exp. Immunol.*, v.59, p.427-434, 1985.
- CAMPOS-NETO,A., BUNN-MORENO,M.M. Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of the genus **Leishmania**. *Infect. Immun.*, v.38, n.3, p.871-876, 1982.
- CARVALHO,E.M., BACELAR,O.A. Lymphocyte reactivity to mitogens in american visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol.Res.*, v.16, p.35, 1983.
- CARVALHO,E.M., BADARO,R. Absence of gama interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J. Clin. Inv.*, v.76, p.2066-2069, 1985.
- CARVALHO,E.M., SAMPAIO,D., BACELLAR,O., BARRAL,A., BADARÓ,R., BARRAL-NETTO,M. Imuno regulation in american visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Osw. Cruz, R. J.*, sup.1, v.83, 1988.
- CHAUDHURI,G., CHAUDHURI,M., PAN,A., CHANG,K.P. Surface acid proteinase (gp63) of **Leishmania mexicana** : a metalloenzyme capable of protecting liposome- encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J. Biol. Chem.*, v.264, n.13, p.7483-7489, 1989.
- CHAVES,J., FERRI,R.G. Immunoglobulins in visceral leishmaniasis. *R. Inst. Med. Trop. S. P.*, v.8, p.225, 1966.
- CHIPLUNKAR,S., DE LIBERO,G., KAUFMANN,S.H.E. "Mycobacterium Leprae" - specific Lyt-2+T lymphocytes with cytolytic activity. *Infect. Immun.*, v.54, p.793-797, 1986.

- COLIGAN,J.E., KRUISBEEK,A.M., MARGULIES,D.H., SHEVACH,E.M., STROBER,W. (Ed.). *Current Protocols In Immunology*. Interscience, National Institute of Health., 1994. 2v. V1, cap.6- Citokines.
- CORBET,C.E.P., PINTO PAES,R.A., LAURENTI,M.D., ANDRADE JR.,H.F., DUARTE,M.I.S. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. *Int. J. Exp. Pathol.*, v.73, p.417-433, 1992.
- CROCKER,P.R., BLACKWELL,J.M., BRADLEY,D.J. Expression of the natural resistance gene *lsh* in resident liver macrophages. *Infect. Immun.*, v.43, p.1033-1040, 1984.
- CROCKER,P.R., DAVIES,E.V., BLACKWELL,J.M. Variable expression of the murine natural resistance gene *lsh* in different macrophage populations infected in vitro with **Leishmania donovani**. *Parasit. Immunol.*, v.9, p.705-719, 1987.
- CUNHA,A.M., CHAGAS,E. Nova espécie de protozoário do gênero **Leishmania** patogênico para o homem. **Leishmania chagasi**, sp. Nota prévia. *Hosp.*, v.11, p.3-9, 1937.
- DE LIBERO,G., KAUFMANN,S.H.E. Antigen - specific Lyt-2+ cytolytic T lymphocytes from mice infected with the intracellular bacterium "Listeria Monocytogenes". *J. Immunol.*, v.137, p.2688-2694, 1986.
- DE TOLLA,L.J., SEMPREVIVO,L.H., POLCZUK,N.C., PASSMORE,H.C. Genetic control of acquired resistance to visceral leishmaniasis in mice. *Immunogen.*, v.10, p.353-361, 1980.
- DEANE,L.M., DEANE,M.P. Encontro de **Leishmania** nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica do calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *Hosp.*, v.45, p.419-421, 1954.

- DEANE,L.M., DEANE,M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa ("**Lycalopex vetulus**") como reservatório do **L.donovani** em área endêmica de calazar no Ceará. *Hosp.*, v.48, p.61-76, 1955.
- DOHERTY,T.M., COFFMAM,R.L. Leishmania antigens presented by GM-CSF-derived macrophages protect susceptible mice against challenge with **Leishmania major**. *J. Immunol.*, v.150, n.12, p.5476-5483, 1993.
- DUARTE,M.I.S, CORBETT,C.E.P., LAURENTI,M.D., NUNES,V.L.B., REGO JR,F.A., OSHIRO,E.T. Canine interstitial pneumonitis in a new endemic área of visceral leishmaniasis in western Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.80, n.6, p.992-993, 1986.
- ETGES,R.J., BOUVIER,J., BORDIER,C. The major surface protein of **Leishmania** promastigotes is a protease. *J. Biol. Chem.*, v.261, p.9099-9101, 1986.
- FALQUETO,A., DIETZE,R., MUSSO,H.M., VALLI,L.C.P., TEIXEIRA,L., RHOR,M.R.S., BOULOS,M. Determinação do limite de positividade (cut-off) do teste imunoenzimático dot - Elisa no diagnóstico do calazar canino. *R. Soc.Bras. Med. Trop.*, v.24, p.112, 1991.
- FARREL,J.P. **Leishmania**: acquired resistance to visceral leishmaniasis in the golden hamster. *Exp.Parasitol.*, v.40, p.89-94, 1976.
- FROMMEL,T.O., BUTTON,L.L., FUJIKURA,Y., MCMASTER,W.R. The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of **Leishmania**. *Mol. Bioch. Parasitol.*, v.38, n.1, p.25-32, 1990.
- GAJEWESKI,T.F., PINNAS,M., WONG,T., FITCH,F.W. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J. Immunol.*, v.140, n.6, p.1750-1758, 1991.

- GHOSE,A.C., HALDAR,J.P., PAL,S.C. Phitohaemagglutinin in induced lymphocyte transformation test in Indian kala-azar. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.73, p.725-726, 1979.
- GIFAWESEN,C., FARREL,J.P. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral **Leishmania donovani** infections in golden hamsters. *Infect. Immun.*, v.57, n.10, p.3091-3096, 1989.
- GLASSER,T.A., MOODY,S.F., HANDMAN,E., BACIC,A., SPITHILL,T.W. An antigenically distinct lipophosphoglycan on amastigotes of **Leishmania major**. *Mol. Bioch. Parasitol.*, v.45, n.2, p.337-344, 1991.
- GRIMALDI,G., TESH,R.B., MacMAHON-PRATT. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.41, p.687-725, 1989.
- HALL,B.F., JOINER,K.A. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defenses. *Immunoparasitol. Today* Cambridge., v.7, n.3, p.A22-A27, 1991.
- HANDMAN,E., McCONVILLE,M.J., GODING,J.W. CARBOHYDRATE Antigens as possible parasite vaccines. A case for the **Leishmania** glycolipid. *Immunol. Today*, v.8, p.181-185, 1987.
- HEINZEL,F.P., SADICK,M.D., MUTHA,S.S., LOCKSLEY,R.M. Production of interferon γ , interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4⁺ lymphocytes **in vivo** during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.88, p.7011-7015, 1991.
- HOWARD,J.G., HALE,C., LIEW,F.Y. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. IV - prophylactic effect of sublethal irradiation as a result of abrogation of suppressor T cell generation in mice genetically susceptible to **Leishmania tropica**. *J. Exp. Med.*, v.153, n.3, p.557-568, 1981.

- HOWARD,J.G., LIEW,F.Y., HALE,C., NICKLIN,S. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. II further characterization of the protective immunity against fatal **Leishmania tropica** infection induced by irradiated promastigotes. *J. Immunol.*, v.132, p.450-455, 1984.
- HUGHES,H.P.A. Oxidative killing of intracellular parasite mediated by macrophages. *Parasitol. Today*, v.4, p.340-347, 1988.
- KAUFMANN,S.H.E. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol. Today*, v.9, p.168-174, 1988.
- KAYE,P.M., PATEL,N.K., BLACKWELL,J.M. Acquisition of cell-mediated immunity to **Leishmania**. II-LSH gene regulation of accessory cell function. *Immunol.*, v.65, n.1, p.17-22, 1988.
- KAYE,P.M., BLACKWELL,J.M. Lsh, antigen presentation and the development of CMI. *Res. Immunol.*, v.140, p.810-815, 1989.
- KIRPATRICK,C.E., FARREL,J.P. Leishmaniasis in beige mice. *Infect. Immun.*, v.38, n.3, p.1208-1216, 1982.
- KIRPATRICK,C.E., FARREL,J.P. Splenic Natural Killer - cell activity in mice infected with **Leishmania donovani**. *Cel. Immunol.*, v.85, n.1, p.201-214, 1984.
- LAINSON,R., SHAW,J.J., LINS,Z.C. Leishmaniasis in Brazil: in the fox, **Cerdocyon thous**, as a reservoir of **Leishmania donovani** in Para state, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.63, n.6, p.741-745, 1969.
- LAINSON,R., SHAW,J.J. Evolution, classification geographical distribution. In: Peters,W., Killick-Kendrick,R. (Ed.). *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press, 1987, 2v.V1, 551pp, p.1-120.

- LAINSON,R., DYE,C., SHAW,J.J., MCDONALD,D.W., COURTENAY,O., SOUZA,A.A.A., SILVEIRA,F.D. Amazonian visceral leishmaniasis - distribution of the vector **Lutzomyia longipalpis**, (Lutz e Neiva) in relation to the fox **Cerdocyon thous**, (LINN.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, RJ., v.85, p.135-137, 1990.
- LIEW,F.Y., PARISH,C.R. Lack of correlation between cell-mediated immunity of the carrier and the carrier-hapten helper effect. *J. Exp. Med.*, v.139, p.779-784, 1974.
- LIEW,F.Y., HALE,C., HOWARD,J.G. Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V - characterization of effector and specific suppressor T cells. *J. Immunol.*, v.128, n.4, p.1917-1922, 1982.
- LIEW,F.Y., COX,F.E.G. Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide. *Immunoparasitol. Today*, Cambridge, v.7, n.3, p.A17-A21, 1991.
- LIEW, F.Y., O' DONNELL,C.A. Immunology of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v32, p.162-222, 1993.
- LOCKSLEY,R.M., SCOTT,P. Helper T - cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Immunoparasitol. Today*, Cambridge, v.7, n.3, p.A58-A61, 1991.
- LOHOFF,M., DINGFELDER,J., ROLLINGHOFF,M. A search for cells carrying the Gamma Delta T Cell Receptor in mice infected with **Leishmania major**. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v.173, p.285-289, 1991.
- MACHADO,M.I. Leishmaniose visceral americana (aspectos e importância epidemiológica). São Paulo: USP, Faculdade de Saúde Pública, Dep. de Epidemiologia, 1978. 214pp., (Dissertação Mestrado).

- MAGALHÃES,P.A., MAYRINK,N., COSTA,C.A., MELO,N.M., DIAS,M., BATISTA,S.M., MICHALICK,M.S., WILLIAMS,P. Calazar na zona do Rio Doce - Minas Gerais. Resultados de medidas profiláticas. *Rev. Inst. Med. Trop. SP*, v.22, p.197-202, 1980.
- MANSON-BAHR,P.E.C. Immunity in kala - azar. *Trans.R. Soc.Trop. Med. Hyg.*, v.55, n.6, p.550-555, 1961.
- MAUEL,J., BEHIN,R. Immunity: clinical and experimental. In: PETERS,W, KILLICK-KENDRICK,R. (Ed.). *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press, 1987, 2v.V2, 941pp, p.731-791.
- MAYRINK,W., ARAUJO,F.G., MAGALHAES,P.A. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. *R. Inst. Med. Trop. SP.*, v. 9, p.172-174, 1967.
- MC NEELY,T.B., TURCO,S.J. Inhibition of protein kinase c activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, v.148, n.2, p.653-657, 1987.
- MEDINA-ACOSTA,E., KARESS,R.E., SCHWARTZ,H., RUSSEL,D.G. The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localised in the amastigote stage. *Mol. Bioch. Parasitol.*, v.37, n.2, p.263-274, 1989.
- MELENEY,H.E. The histopathology of calazar in the hamster, monkey and man. *Am. J. Patholo.*, v.1, p.147-168, 1925.
- MITCHELL,G.F., CURTIS,J.M., HANDMAN,E., MCKENZIE,I.F.C. Cutaneous leishmaniasis in mice: disease patterns in reconstituted nude mice of several genotypes infected with *Leishmania tropica*. *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, v.58, p.521-532, 1980.
- MODABBER,F. The Leishmaniasis. In: MAURICE,J., PEARCE,A.M.(Ed.). *Tropical disease research, a global partnership, eighth programme report*. Geneva: WHO , 1987. p.99-112.

- MODLIN,R.L., PIRNEZ,C., HOFMAN,F.M., TORIGIAN,V., UYEMURA,K., REA,T.H., BLOOM,B.R., BRENNER,M.B. Lymphocytes bearing antigen - specific Gamma Delta T - Cell Receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nat.*, v.339, p.544-548, 1989.
- MOSMANN,T.R., COFFMAM,R.L. Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunol. Today*, v.8, n.7,8, p.223-227, 1987.
- MOSMANN,T.R., MOORE,K.W. The role of Il-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunoparasitol. Today*, Cambridge, v.7, n.3, p.A49-A53, 1991.
- MOSSER,T.M., EDELSON,P.J. Activation of the alternative complement pathway by **Leishmania** promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J. Immunol.*, v.132, n.3, p.1501-1505, 1984.
- MURRAY,H.W., STERN,J.J., WELTE,K., RUBIN,B.Y., CARRIERO,S.M., NATHAN,C.F. Experimental visceral leishmaniasis : production of interleukin 2 and interferon- γ , tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon- γ . *J. Immunol.*, v.137, n.7, p.2290-2297, 1987.
- NICKOL,A.D., BONVENTRE,P.F. Immunosuppression associated with visceral leishmaniasis of hamsters. *Parasit. Immunol.*, v.7, p.439-449, 1985.
- OLOBO,J.O., HANDMAM,E., CURTIS,J.M., MITCHELL,G.F. Antibodies to **Leishmania tropica** promastigotes during infection in mice of various genotypes. *Austral. J. Exp. Biolol. Med. Sci.*, v.58, p.595-601, 1980.
- PEARSON,R.D., STEIGBIGEL,R.T. Mechanism of lethal effect of human serum upon **Leishmania donovani**. *J. Immunol.*, v.125, n.5, p.2195-2201, 1980.

- PINELLI,E., KILLICK-KENDRICK,R.,WAGENAAR,J., BERNARDINA,W., DEL REAL,G., RUITENBERG,J. Cellular and humoral responses in dogs experimentally and naturally infected with **Leishmania infantum**. *Infect. Immun.*, v.62, n.1, p.229-235, 1994.
- PUENTES,S.M., DWYER,D.M., BATES,P.A., JOINER,K.A. Binding and release of C3 from **Leishmania donovani** promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.*, v.143, p.3743-9, 1989.
- RAZIUDDIN,S.T.A.W., EL-AWAD,M.E., AL-AMARI,O., AL-JANADI,M., $\gamma\delta$ T-cells and the immune response in visceral leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.*, v.22, p.1143-1148, 1992.
- REY,L. Parasitologia. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,S.A., 1991, 733pp, p.182-226.
- REZAI,H.R., AREHALI,S.M., AMIRHAKIMI,G., KHARAZMI,A. Immunological features of kala-azar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.27, p.1079-1083, 1978.
- REZAI,H.R., FARREL,J., SOULSBY,E.L. Immunological responses of **L.donovani** infection in mice and significance of Tcell in resistance to experimental leishmaniasis.*Clin. Exp. Immunol.*, v.40, n.3, p.508-514, 1980.
- RIDEL,P.R., ESTERRE,P., DEDET,J.P., PRADINAUD,R., SANTORO,F., CAPRON,A. Killer cells in human cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.82, n.2, p.223-226, 1988.
- ROACH,T.I.A., KIDERLEN,A.F., BLACKWELL,J.M. Role of inorganic nitrogen oxides and tumour necrosis factor alpha in killing **Leishmania donovani** amastigotes in gamma interferon-lipopolysaccharide-activated macrophages from Lsh^s and Lsh^r congenic mouse strains. *Infect. Immun.*, v.59, p.3935-3944, 1991.

- RODRIGUES JR.,V., DA SILVA,J.S., CAMPOS-NETO,A. Selective inability of spleen antigen presenting cells from **Leishmania donovani** infected hamsters to mediate specific T cell proliferation to parasite antigens. *Parasit. Immunol.*, v.14, p.49-58, 1992.
- ROITT,I., BROSTOFF,J., MALE,D. Immunology. 3ed. London: Mosby - Year Book Europe Ltd., 1993, 25.16pp.
- SACKS,D.L., LAT,S.L., SHRIVASTAVA,S.N., BLACKWELL,J., NEVA,F.A. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. *J. Immunol.*, v.138, p.908-913, 1987.
- SADICK,M.D., HEINZEL,F.P., HOLADAY,B.J., PU,R.T., DAWKINS,R.S., LOCKSLEY,R.M. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. *J. Exp. Med.*, v.171, p.115-127, 1990.
- SHERLOCK,I.A., MIRANDA,J.C., SADIGURSKY,M., GRIMALDI,G. Natural infection of the opossum **Didelphis albiventris** (marsupialia, didelphidae) with **Leishmania donovani**, in Brazil. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, RJ., v.79, p.511, 1984.
- SILVA,R., COSTA,J.M., MACHEL,A., CARNEIRO,E.W., BRASIL,R. Leishmaniose visceral na ilha de São Luiz. I - Aspectos clínicos e terapêuticos. Resumo - tema livre. XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, RJ., p.65, 1983.
- SILVER,J., BENACERRAF,B. Dissociation of T cell helper function and delayed hypersensitivity. *J.Immunol.*, v.113, p.1872-1875, 1974.
- STADNIK,A.W., GAULDIE,J. The acute phase protein response during parasitic infection. *Immunoparasitol. Today*, Cambridge, v.7, n.3, p.A7-A12, 1991.
- STAUBER,L.A., OCHS,J.Q., COY,N.H. Electrophoretic patterns of serum proteins of chinchillas and hamsters infected with **Leishmania donovani**. *Exp. Parasitol.*, v.3, p.325-331, 1954.

- STAUBER,L.A. Leishmaniasis in the hamster. In : COLE,W.H. (Ed.). Some physiological aspects and consequences of parasitism. Rutgers University Press, New Brunswick, 1955, p.76-90.
- STAUBER,L.A. Host resistance to the Khartoum strain of **Leishmania donovani**. *Rice Inst. Pamphlet.*, v.45, p.80-96, 1958.
- STERN,J.J., OCA,M.J., RUBIN,B.Y., ANDERSON,S.L., MURRAY,H.W. Role of L3t4+ and Lyt-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. *J. Immunol.*, v.140, p.3971-3977, 1988.
- TITUS,R.G., CEREDIG,R., CEROTTINE,J.C.P., LOUIS,J.A. Therapeutic effect of anti-L3T4 monoclonal antibody Gk1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically susceptible BALB/c mice. *J. Immunol.*, v.135, p.2108-2114, 1985.
- TITUS,R.G., MILON,G., MARCHAL,G., VASSALLI,P., CEROTTINE,J.C., LOUIS,J.A. Involvement of specific Lyt-2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.*, v.17, p.1429-1433, 1987.
- TITUS,R.G., MULLER,I., KIMSEY,P., CERNY,A., BEHIN,R., ZINKERNAGEL,R.M., LOUIS,J.A. Exacerbation of experimental murine cutaneous leishmaniasis with CD4+ **Leishmania major** - specific T cell lines or clones which secrete interferon - gamma and mediate parasite specific delayed - type hypersensitivity. *Eur. J. Immunol.*, v.21, p.559-567, 1991.
- TURCO,S.J. The lipophosphoglycan of **Leishmania**. *Parasitol. Today*, v.4, p.255-257, 1988.
- TURK,J.L., BRYCESON,A.D.M. Immunological phenomena in leprosy and related diseases. *Adv. Immunol.*, v.13, p.209-266, 1971.
- ULCZACK,O.M., BLACKWELL,J.M. Immunoregulation of genetically controlled acquired responses to **Leishmania donovani** infection in mice: the effects to parasite dose, cyclophosphamide and sublethal irradiation. *Parasit. Immunol.*, v.5, p.449-463, 1983.

- UNANUE,E.R., ALLEN,P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Sci.*, v. 236, p.551-557, 1987.
- WRIGHT,S.D., SILVERSTEIN,S.C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp. Med.*, v.158, n.6, p.2016-2023, 1983.
- WYLER,D.J., SYPEK,J.P., MCDONALD,J.A. *In vitro* parasite - monocyte interactions in human leishmaniasis : possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infect. Immun.*, v.49, p.305-311, 1985.
- YAMADA,K.M. Fibronectine and other cell interactive glycoproteins. In: HAY,E.D., Cell biology of extracellular matrix. 2ed. New York: Plenum Press, 1991, 468pp, p.111-139.
- ZWILLING,B.S., VESPA,L., MASSIE,M. Regulation of I-a expression by murine peritoneal macrophages: differences linked to the bcg gene. *J. Immunol.*, v.138, p.1372-1376, 1987.