

Juliano Leônidas Hoffmann

**Infecção experimental com *Leishmania chagasi* em
camundongos Balb/c submetidos à imunossupressão.
Resposta imune celular e carga parasitária**

**Botucatu/SP
2008**

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu
Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

**Infecção experimental com *Leishmania chagasi* em
camundongos Balb/c submetidos à imunossupressão.
Resposta imune celular e carga parasitária**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para
a obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Aluno: Juliano Leônidas Hoffmann

Orientador: Prof. Helio Langoni

Co-orientadora: Dra. Luciane Alarcão Dias-
Melício

**Botucatu/SP
2008**

*"É preciso pensar para acertar, calar para
resistir e agir para vencer !"*

Renato Kehl

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida maravilhosa que tenho, pelos passos que me conduziram até aqui, pelas pessoas que conheci, e pelas experiências que vivi.

Agradeço a minha mãe por ser a mulher mais incrível que conheço, sempre carinhosa, compreensiva, dedicada e chefe de família.

Ao meu pai, por compreender os dias em que estive ausente, pelas conversas e conselhos.

Aos meus irmãos, Gleisi, Bertholdo e Francis, que são para mim exemplos de vida, e aos meus sobrinhos Bruna, Lucas, João e Gabriela, pela alegria que é reencontrá-los cada vez.

Ao amigo e Prof. Alexander Biondo, incentivador da minha vinda para Botucatu, exemplo de amizade, inteligência e profissionalismo.

Ao professor Helio Langoni, orientador no verdadeiro sentido da palavra, pelo irrestrito apoio, amizade e credibilidade.

À família Langoni, Cidinha e Guilherme, por sempre me acolherem como membro de sua casa.

À Juliana Machado, amiga e profissional sem a qual não seria possível a realização deste trabalho, e as graduandas bolsistas de iniciação científica, Fernanda e Vivian, pela ajuda imprescindível.

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP-FMVZ), em especial ao Benedito, pela amizade crescente durante nossa convivência, aos amigos Wanderley e Sérgio, pela simpatia e trabalho bem realizado, e ao Roberto, pelo auxílio na criação dos hamsters.

Aos Professores do DHVSP-FMVZ, em especial à Profa. Jane, por ceder às instalações do seu biotério, e ao Prof. Márcio pelo companheirismo.

Ao Rodrigo Costa, amigo e profissional exemplo de generosidade, Luciano, e as amigas Marcella, Janaína (Cruz), Ana, Acácia, Nair, Vanessa, Daniele, Deolinda, Patrícia, Simone, Amanda, Tatiana e Audrey, pós-graduandas do DHVSP-FMVZ, pelo companheirismo durante toda a jornada.

Aos residentes da área de Zoonoses e Saúde Pública, pela disponibilidade e auxílio durante a execução do experimento.

À Profa. Jussara, pelas idéias construtivas, Solange, pelo auxílio, e Carlinhos, pela amizade e conhecimento sobre animais de laboratório. (Dep. de Doenças Tropicais-FM).

Aos meus colegas de pós-graduação do Dep. de Doenças Tropicais: Renato, Pananã, Mariele, e a todos que sempre me deram apoio e incentivo.

A Sofia, Michele, Juliana, Profa. Alexandrina, Prof. Silvio e Prof. Ramon, do Dep. de Imunologia do Instituto Biológico (IB) de Botucatu. Em especial, à Profa. Ângela, por ceder seu laboratório.

À Dra. Luciane Alarcão (Imuno-IB), minha co-orientadora, pelo conhecimento sobre citocinas, pensamento positivo e fé.

À Profa. Semíramis, Thaís e Érica, do Dep. de Parasitologia do IB de Botucatu.

À Marjorie e à Léia, do Hemocentro (FM) de Botucatu.

Aos irmãos da República Rancho da Goiabada, Ricardo (Curaxin), Rafael (Sodavet), Luis (Tenesmo), Vítor (Bódvéio), João (Kuíka) e Getúlio (Dagmar), vocês são inesquecíveis, o tempo jamais apagará o que cada um contribuiu para minha personalidade e caráter, obrigado pela compreensão e amizade em todas as horas.

À Dona Olga, pelo seu carinho materno incondicional, e por fazer do Rancho muito mais que uma república, uma família.

À Ana Letícia (Petékia), pessoa incrível, incentivadora e digna de toda a minha admiração, e a Marcella (Mocoronga), pela amizade e carinho sempre verdadeiros.

Ao Eduardo (Sharon) e a Cida, pela orientação e esclarecimento espiritual.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa (Processo 2005/03206-2) e auxílio à pesquisa (Processo 2006/03517-0), obviamente indispensáveis para a realização deste projeto.

A todas as pessoas que sempre me incentivaram, que dedicaram algum momento da sua vida para permitir a realização deste trabalho, auxiliando de maneira pessoal ou profissional, e que por um simples descuido não foram mencionadas aqui.

Meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Modelos murinos.....	16
1.2. Carga parasitária.....	18
1.3. Produção de citocinas.....	19
1.4. Leishmaniose e imunossupressão.....	22
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Cepa de <i>Leishmania chagasi</i>	27
3.3. Grupos experimentais.....	28
3.4. Infecção.....	28
3.5. Imunossupressão.....	30
3.6. Coleta das amostras.....	30
3.7. Carga parasitária.....	30
3.8. Obtenção do sobrenadante da cultura de células esplênicas.....	31
3.9. Determinação das citocinas pelo método de ELISA.....	32
3.10. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Peso dos animais e do baço.....	33
4.2. Carga parasitária.....	37
4.3. Citocinas.....	39
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO.....	57
7. RESUMO.....	58
8. ABSTRACT.....	59
9. REFERÊNCIAS.....	60
10. ANEXO A – Parecer de aprovação pela Câmara de Ética em Experimentação Animal.....	67
11. ANEXO B – Lista de drogas e materiais utilizados.....	68
12. ANEXO C – Fórmulas e reagentes.....	69

QUADRO DE TABELAS

Tabela 1. Resumo descritivo em mediana, primeiro e terceiro quartil, e valores de p, referentes as comparações entre grupos e momentos, em relação ao peso dos animais e ao peso do baço, ambos em gramas (g), aos 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.....	34
Tabela 2. Resumo descritivo em mediana, primeiro e terceiro quartil, e valores de p, referentes as comparações entre grupos e ao estudo da imunossupressão sobre a carga parasitária no baço e no fígado, aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.....	37
Tabela 3. Resumo descritivo em mediana, primeiro e terceiro quartil, dos níveis de IFN-γ, IL-10, IL-2 e IL-4, em picogramas/mL, e os valores de p, referentes as comparações entre grupos e momentos, nas culturas de células esplênicas não estimuladas. Botucatu, 2008.....	40
Tabela 4. Resumo descritivo em mediana, primeiro e terceiro quartil, dos níveis de IFN-γ, IL-10, IL-4 e IL-2, em picogramas/mL, e os valores de p, referentes as comparações entre grupos e momentos, nas culturas de células esplênicas estimuladas com antígeno. Botucatu, 2008.....	44
Tabela 5. Resumo descritivo em mediana, primeiro e terceiro quartil, dos níveis de IFN-γ, IL-10, IL-4 e IL-2, em picogramas/mL, e os valores de p, referentes as comparações entre grupos e momentos, nas culturas de células esplênicas estimuladas com concanavalina A. Botucatu, 2008.....	48

QUADRO DE FIGURAS

FIGURA 1. (A) Aspecto clínico e (B) Imprint de baço de hamster Sírio Dourado (<i>Mesocricetus auratus</i>) com aproximadamente 60 dias de infecção. Visualização sob óleo de imersão em aumento de 1000x. Botucatu, 2008.	29
FIGURA 2. Infecção intravenosa no seio infra-orbitário. Botucatu, 2008.....	29
FIGURA 3. Peso mediano, em gramas, dos animais de cada grupo nos dias 60, 75 e 90 PI. Botucatu, 2008.....	35
FIGURA 4. Peso mediano, em gramas, do baço dos animais de cada grupo nos dias 60, 75 e 90 PI. Botucatu, 2008.....	35
FIGURA 5. Tamanho do baço de um animal de cada grupo no dia 90 PI. Botucatu, 2008.....	36
FIGURA 6. Mediana da carga parasitária do baço, em parasitas por grama de tecido, de G3 e G4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.....	38
FIGURA 7. Mediana da carga parasitária do fígado, em parasitas por grama de tecido, de G3 e G4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.....	38
FIGURA 8. Níveis de IFN- γ (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, não estimuladas, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.....	41

FIGURA 9. Níveis de IL-10 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, não estimuladas, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.....	41
FIGURA 10. Níveis de IL-4 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, não estimuladas, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.....	42
FIGURA 11. Níveis de IFN- γ (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com antígeno sonicado de <i>Leishmania chagasi</i> , dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.....	45
FIGURA 12. Níveis de IL-10 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com antígeno sonicado de <i>Leishmania chagasi</i> , dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.....	45
FIGURA 13. Níveis de IL-4 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com antígeno sonicado de <i>Leishmania chagasi</i> , dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.....	46
FIGURA 14. Níveis de IFN- γ (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com concanavalina A, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.....	49
FIGURA 15. Níveis de IL-10 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com concanavalina A, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.....	49

FIGURA 16. Níveis de IL-2 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com concanavalina A, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008..... **50**

FIGURA 17. Níveis de IL-4 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com concanavalina A, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008..... **50**

LISTA DE ABREVIATURAS

LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1 (T helper 1)
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2 (T helper 2)
IL-2	Interleucina 2
IL-12	Interleucina 12
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-13	Interleucina 13
IL-3	Interleucina 3
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-6	Interleucina 6
INF-γ	Interferon gama
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (original do inglês)
TGF-β	Fator transformador do crescimento beta (original do inglês)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (original do inglês)
NO	Óxido nítrico
NOS-2	Gene que regula a produção do óxido nítrico
iNOS	Enzima que catalisa a produção do óxido nítrico
ConA	Concanavalina A
APC	Célula apresentadora de antígeno
RNA_m	RNA mensageiro
Balb/c IL-10^{-/-}	Camundongo isogênico Balb/c desprovido do gene da IL-10
IL-10R	Receptor da IL-10
PI	Pós – inoculação
IgG	Imunoglobulina G
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FM	Faculdade de Medicina
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade do Estado de São Paulo
RPM	Rotação por minuto
IgG2a	Imunoglobulina G2a
CO₂	Dióxido de carbono
PCR	Reação em cadeia pela polimerase (original do inglês)

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses têm como agentes etiológicos protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Existem aproximadamente 21 espécies de leishmania, transmitidas por cerca de 30 espécies de flebotomíneos, cinco delas causam as três principais formas da leishmaniose em humanos: *Leishmania tropica* e *L. major*, a leishmaniose cutânea; *L. braziliensis* e *L. mexicana*, a leishmaniose muco-cutânea; e o complexo *L. donovani*¹ que causam a leishmaniose visceral, no qual se encontram a *L. donovani*² e a *L. infantum*³ no Velho Mundo, e a *L. chagasi*⁴ no Novo Mundo, inclusive no Brasil.

Lainson *et al.*⁵ baseados em diferenças ecológicas e epidemiológicas, acreditam que a *L. chagasi* seja realmente uma espécie autóctone da América do Sul, pois encontraram altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia. Em função de suas características bioquímicas e moleculares muito semelhantes, alguns pesquisadores acreditam que a *L. chagasi* e *L. infantum* são a mesma espécie⁶. Lukes *et al.*⁷ acreditam que *L. chagasi* pode ter origem na América do Sul, mas possa ter-se modificado após a migração para a Ásia.

A leishmaniose visceral é uma zoonose com ampla distribuição mundial, endêmica, que persiste em vários continentes compreendendo principalmente as regiões tropicais e subtropicais. Está amplamente distribuída em 88 países com uma prevalência superior a 12 milhões de pacientes, com 2 milhões de casos novos por ano e 350 milhões de pessoas habitando em áreas de risco⁸, sendo que 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil⁹.

No Brasil, tem sido apontada como uma doença reemergente, caracterizada por nítido processo de transição epidemiológica. Nos últimos anos apresentou incidência crescente em áreas onde já ocorria e expansão geográfica para estados mais ao sul do país, com franco processo de urbanização nas regiões Nordeste e Sudeste¹⁰. A região Nordeste encontra-se com 65% do total de casos, seguida pela região Sudeste (14%), Norte (14%) e Centro-Oeste (7%)*.

As leishmanias são parasitas heteroxenos, completando o seu ciclo de vida em dois hospedeiros, um vertebrado (canídeos, roedores, humanos) e o outro invertebrado, sendo dípteros hematófagos pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, com várias espécies no Velho Mundo, e o gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo^{11, 12}. O vetor da leishmaniose visceral

* Resende SM. Comunicação pessoal: Coordenadoria de Controle de Zoonoses. Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais. 2004.

americana no Novo Mundo é a *Lutzomyia longipalpis*, pequeno mosquito de 2 a 3 mm, de hábitos peridomésticos e intradomiciliares¹³.

O ciclo de vida consiste em dois diferentes estágios de desenvolvimento. Nos vertebrados a leishmania apresenta-se esférica, imóvel e sem flagelo, forma denominada amastigota, com aproximadamente 2,5 a 5 µm de diâmetro, que multiplica-se no interior dos macrófagos do hospedeiro. O mosquito ingere macrófagos contendo amastigotas durante o seu repasto sanguíneo, estas amastigotas são liberadas no interior da glândula salivar do mosquito, aonde diferenciam-se em promastigotas procíclicas flageladas, e fixam-se ao epitélio. Pelo processo de metaciclologênese, dividem-se e adquirem virulência, transformando-se em uma forma infectante metacíclica, as quais desprendem-se do epitélio da glândula salivar e migram para a faringe e cavidade bucal. Durante o repasto sanguíneo, as promastigotas são passadas para o hospedeiro vertebrado, aonde necessitam evitar sua destruição pelo sistema imune, e por meio de receptores que facilitam a sua fagocitose, serem internalizadas pelos macrófagos. Dentro dos macrófagos, diferenciam-se em formas amastigotas, multiplicam-se e eventualmente rompem as células infectadas, sendo liberadas para serem fagocitadas, iniciando o ciclo¹.

Na leishmaniose visceral humana, as amastigotas permanecem dentro das células do sistema fagocítico mononuclear de órgãos como medula óssea, baço, fígado, linfonodos e intestino. Normalmente o período de incubação é de 2-4 meses. Os sintomas incluem febre, mal estar, progressivo estado debilitante caracterizado por anemia e protrusão do abdômen, devido ao aumento no tamanho do baço e do fígado. Sinais clínicos incluem edema, especialmente da face, sangramento nas mucosas, dificuldade respiratória e diarreia. Pode levar a óbito dentro de 2 a 3 anos, se não tratada corretamente, sendo que em formas mais agudas, a morte pode ocorrer dentro de 6 a 12 meses¹.

Em função do seu ciclo de vida, as leishmanias desenvolveram mecanismos adaptativos para assegurar sua sobrevivência frente às condições adversas encontradas tanto no sistema digestivo do vetor quanto pela ação do sistema imune do hospedeiro. Para entrar no macrófago, utilizam receptores celulares que favorecem a endocitose das formas promastigotas e, uma vez no macrófago, ela é protegida da degradação dentro dos fagolisossomos por vários mecanismos que impedem a defesa celular. Alguns destes mecanismos incluem: inibição de enzimas hidrolíticas, sinalização celular, fusão fagossomo-endossoma, produção de óxido nítrico e de citocinas, como a IL-12 por exemplo, que é necessária para a resposta imune celular, e aumento dos níveis de IL-10, que é associada com a supressão da atividade leishmanicida dos macrófagos¹.

Durante a infecção o sistema imune controla tanto o número de leishmanias presentes no organismo quanto à resistência a reinfecção, mas pode também induzir patologia associada ao parasitismo. As células T desempenham papel muito importante nesses eventos, diretamente, por mediar respostas celulares, e indiretamente, na regulação e produção de anticorpos. Os linfócitos T constituem-se de duas principais subpopulações: células CD4 ativadas ($CD4^+$) e CD8 ativadas ($CD8^+$). Em resposta aos antígenos protéicos dos microrganismos, os linfócitos $CD4^+$ auxiliares (Th) podem diferenciar-se em subpopulações de células efectoras que produzem diferentes grupos de citocinas e, portanto determinam funções efectoras distintas. As subpopulações mais bem definidas de linfócitos Th são designados Th1 e Th2, sendo o IFN- γ , IL-2 e TNF- α as citocinas características das células Th1, e a IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 as citocinas definidoras das células Th2. A IL-12 é a principal indutora das células Th1, as quais produzem IFN- γ , que promove a diferenciação em Th1 e inibe a proliferação das células Th2. Inversamente, a IL-4 produzida pelas células Th2, promove a diferenciação em Th2, e junto com a IL-10 inibe a diferenciação das Th1. A diferenciação entre as subpopulações Th1 e Th2 depende de três fatores: as citocinas já presentes no ambiente do estímulo, o tipo de célula apresentadora de antígeno (APC), como macrófagos por exemplo, e a natureza e quantidade do antígeno. Os macrófagos desempenham um papel importante no curso da infecção, servindo como células hospedeiras, células apresentadoras de antígeno, que modulam a resposta imune celular específica e, após ativação, como células efectoras na eliminação dos parasitas intracelulares. A principal função das células Th1 é a defesa mediada por fagócitos, especialmente contra microrganismos intracelulares, como as leishmanias por exemplo, e das Th2 são as reações imunes mediadas pela IgE e pelos eosinófilos/mastócitos¹⁴.

A resposta imune na leishmaniose pode resultar em uma polarização da subpopulação dos linfócitos T, levando a um fenótipo celular Th distinto, sendo que as citocinas produzidas por estas células podem ativar mecanismos efetores particulares, que resultam em proteção imune ou exacerbação da doença¹⁵. O padrão da resposta Th determina a característica da infecção pela leishmania, sendo que a resposta Th1 estabelece imunidade celular, controlando a infecção e determinando resistência à reinfecção, ao passo que a resposta Th2 leva, predominantemente, a resposta humoral e exacerbação da doença. Dependendo da espécie e da resposta imunológica do hospedeiro, a infecção no homem leva a variadas manifestações clínicas da doença¹⁶.

Dados de pacientes com leishmaniose visceral, causada pela *L. donovani* ou *L. chagasi*, sugerem que o aspecto clínico ou a doença progressiva pode estar associado,

preferencialmente, a uma resposta imune tipo Th2¹⁷, caracterizada por profunda imunossupressão da resposta Th1, desencadeando hipergamaglobulinemia e altos níveis de complexos imune¹⁶. No entanto, nos indivíduos com infecção aparentemente clínica, o padrão de resposta Th1 e Th2 não é bem definido, sendo que ambas citocinas ativadoras (INF- γ , e IL-12) e supressoras (IL-10, IL-3, IL-4 e TGF) são detectadas⁹. Assim, a resposta Th é menos polarizada em humanos, mas Th1 não responsiva é característica da leishmaniose visceral ativa¹⁶.

Em infecções experimentais com o gênero *Leishmania*, a resistência ou suscetibilidade ao parasita é determinada pela polarização dos linfócitos T para subpopulações Th1 ou Th2¹⁸. Estudos recentes, particularmente com a *L. major*, um dos agentes da leishmaniose cutânea em humanos, definem o paradigma Th1/Th2 como resistência/suscetibilidade à infecção, e o papel da IL-12 e IL-4, direcionando o desenvolvimento de células Th1 e Th2, respectivamente¹⁹. No entanto, padrão de resposta similar não tem sido observado na infecção pela *L. donovani* e *L. chagasi*, ambos agentes da leishmaniose visceral em humanos²⁰.

Enquanto são disponibilizadas informações suficientes sobre a resposta imunológica na leishmaniose cutânea experimental, a natureza da resposta imune na leishmaniose visceral é ainda pouco compreendida, e diferente em muitos aspectos²¹.

1.1. Modelos murinos

O hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) constitui um excelente modelo de estudo da infecção experimental por cepas viscerotrópicas de leishmania. O principal fator limitante na utilização deste modelo é a pouca disponibilidade de reagentes para estudos imunológicos²². Rodrigues *et al.*²³ afirmaram que este é o modelo mais indicado para o estudo da doença progressiva em humanos, pois hamsters infectados com *L. donovani* ou *L. chagasi*, desenvolvem doença similar a leishmaniose visceral humana progressiva, com hepatoesplenomegalia, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia.

O uso de camundongos para estudar a infecção experimental com a utilização da *L. infatum* na América do Norte tem vantagens sobre outros modelos, como cães e hamsters, pois reagentes imunológicos para camundongos são facilmente encontrados. Camundongos de linhagens isogênicas podem ser prontamente adquiridos, e têm a vantagem de proporcionar homogeneidade genética, quando comparados às raças de cães de laboratório²⁴, principalmente por reduzir variações genéticas entre indivíduos do mesmo grupo experimental²⁵.

O resultado da infecção experimental depende da imunidade do hospedeiro, da virulência da cepa, do número de parasitas inoculados²⁶ e da via de inoculação. Assim como na infecção em humanos, diferentes espécies de leishmania produzem variadas e incomparáveis manifestações em camundongos. O fenótipo murino suscetível ou resistente é definido de acordo com a magnitude da carga parasitária que se desenvolve. Estes fenótipos foram originalmente descritos em infecções com *L. donovani*. O mesmo padrão de resistência ou suscetibilidade vale para a *L. chagasi*, pois a inoculação de 1×10^7 promastigotas pela da veia da cauda, e avaliação da carga parasitária no baço e no fígado, indicam que camundongos Balb/c e C57BL/10 são suscetíveis, ao passo que camundongos C3H são resistentes a infecção²⁷.

Segundo Wilson *et al.*²⁸, na infecção com *L. donovani*, *L. chagasi* ou *L. infantum* as linhagens de camundongos A/Jax, CBA, C3H.HeJ e DBA/2 são resistentes, enquanto que C57BL/6, C57BL/10, B10.D2 e Balb/c são suscetíveis. A resistência à infecção está associada à ativação de células TCD4⁺Th1 específicas, que produzem IFN- γ , ativando os macrófagos para destruírem os parasitas intracelulares. Inversamente, a ativação das células Th2 pelo protozoário resulta no aumento da sobrevivência do parasita e exacerbação das lesões em razão das ações supressivas de suas citocinas nos macrófagos¹⁴.

Camundongos inoculados com reduzido número de parasitas produzem citocinas do tipo Th1²⁹, enquanto que camundongos inoculados com maior número de parasitas produzem citocinas do tipo Th2³⁰. Animais inoculados com número variável de parasitas, produzem tanto citocinas Th1 quanto Th2, o que pode ser interpretado erroneamente como uma resposta imune mista, comprometendo os resultados²⁵.

De acordo com Rolão *et al.*²⁵, a inoculação intraperitoneal de *L. infantum* em camundongos BALB/c resultou em alta homogeneidade da infecção, sugerindo assim que esta via deveria ser utilizada preferencialmente em infecções experimentais. A inoculação endovenosa também foi capaz de produzir a infecção progressiva em camundongos, mas observou-se uma alta dispersão dos valores da carga parasitária entre estes animais, possivelmente devido à perda de parte do inóculo nos tecidos adjacentes. Sabe-se que a inoculação de espécies de leishmanias viscerotrópicas pela via cutânea não desenvolve a forma visceral da doença³¹.

Recentemente, Ahmed *et al.*³² mostraram que a infecção intradérmica com 10^7 parasitas resultou em doença visceral, mas a evolução e subsequente resposta imune, foi menos intensa que na infecção endovenosa com alta dose, que é amplamente utilizada em modelos murinos de leishmaniose visceral.

De acordo com Mbat³³ a dose intraperitoneal de 10^8 promastigotas de *L. donovani* é recomendada para o estabelecimento da leishmaniose visceral em camundongos. A dose de 10^6 resulta numa carga parasitária variável, e uma dose alta de 10^{11} resulta em morte dos camundongos Balb/c. Devido às diferenças dos parasitas e da linhagem dos hospedeiros, é recomendável que cada laboratório determine a sua dose infectante ótima individual, bem como a via de administração.

O modelo da leishmaniose visceral mais estudado é com a linhagem de camundongo Balb/c infectados com *L. donovani* ou *L. chagasi*³⁴. O curso da infecção visceral pela *L. chagasi* em camundongos Balb/c mimetiza estritamente a infecção pela *L. donovani*, já que o camundongo expressa inicialmente um fenótipo suscetível, mas posteriormente desenvolve auto-cura¹⁷. A maioria dos estudos com cepas de leishmanias viscerais utiliza 10^7 parasitas por camundongo, sendo que a aplicação de doses diferentes pode dificultar a comparação dos resultados²⁵.

1.2. Carga parasitária

Quando se examinam órgãos distintos, os modelos experimentais de leishmaniose visceral são representações claras da diversidade imune do hospedeiro contra a infecção. A infecção hepática é usualmente auto-limitante, sendo um exemplo de resposta inflamatória granulomatosa dominada por células mononucleares, envolvendo células de Kupffer, monócitos, células TCD4⁺ e TCD8⁺. Múltiplas citocinas, incluindo IFN- γ , IL-12, IL-4 e níveis moderados de TNF- α produzido no granuloma hepático, contribuem para combater a infecção no fígado³⁵.

Engwerda *et al.*³⁵ avaliaram a carga parasitária no baço e no fígado de camundongos infectados com amastigotas de *L. donovani*. No fígado, o aumento das amastigotas é evidente nos primeiros momentos após a infecção, sendo controlado por volta do 28º dia, com formação de granulomas maduros. No baço, após a fase aguda onde a replicação das amastigotas não é evidente, ocorre uma exagerada esplenomegalia, perda da micro arquitetura e persistência de amastigotas.

De acordo com Kaye *et al.*³⁶ a resistência hepática está correlacionada com a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, que no estágio inicial da infecção, têm papel significativo contendo a multiplicação do parasita. Durante a fase tardia da infecção, quando a resistência hepática é evidenciada pelo declínio no número de amastigotas, o gene que regula a síntese do óxido nítrico (NOS-2) mostra-se dominante, e a produção do óxido

nítrico (NO), molécula final efetora necessária para a morte do parasita intracelular, ocorre em macrófagos ativados por citocinas das células T.

Simultânea à resolução da infecção hepática, ocorre o crescimento das amastigotas no baço, provocando destruição patológica³⁷. Os parasitas persistem no baço e na medula óssea por mecanismos pouco compreendidos. A persistência dos parasitas é acompanhada por falha na formação do granuloma e por uma variedade de mudanças patológicas, incluindo esplenomegalia, alteração da micro arquitetura do tecido linfóide e aumento da atividade hematopoiética³⁶.

A infecção pela *L. donovani* em camundongos resulta em aumento precoce da carga parasitária, com subsequente controle durante o curso da infecção. Este controle é associado com o desenvolvimento de resposta imune celular parasito específica, envolvendo tanto células TCD4⁺ quanto TCD8⁺; produção de IFN- γ pelas células T esplênicas; formação de granulomas hepáticos, e geração endógena de TNF- α ³⁸.

1.3. Produção de citocinas

O papel protetor da IL-12 na leishmaniose visceral tem sido atribuído a sua habilidade em ativar os macrófagos, aumentando a atividade leishmanicida. A IL-12 produzida pelos macrófagos infectados induz a ativação das células natural killers (NK), diferenciação de células Th1 e produção de IFN- γ ¹⁹. O IFN- γ estimula os macrófagos a produzirem a iNOS (sintetase induzível do óxido nítrico), enzima que catalisa a formação do NO²⁸, responsável pela destruição do parasita e pela resistência à infecção. Falha na produção da IL-12 ou alternativamente produção de IL-4/IL-13, juntamente com a IL-10, resulta em replicação irregular do parasita dentro das células infectadas¹⁹.

Kaye *et al.*³⁹ afirmaram que a inabilidade para controlar a infecção visceral aguda da *L. donovani* em camundongos suscetíveis, está associada com a baixa capacidade de células do baço produzirem IFN- γ *in vitro*, e não com a produção de citocinas Th2, como IL-4 e IL-5. Por outro lado, Murray *et al.*³⁴ afirmam que camundongos Balb/c deficientes em células T não controlam a infecção pela *L. donovani*, pois não formam granulomas e nem produzem IFN- γ .

Murray *et al.*⁴⁰ utilizando anticorpos monoclonais anti-IL-2 e IL-2 recombinantes, mostraram o papel da IL-2 na atividade leishmanicida, aparentemente pela indução de IFN- γ e formação do granuloma.

A IL-10 era originalmente descrita como uma citocina produzida especificamente por células TCD4⁺Th2, mas estudos mais recentes demonstraram que esta citocina é secretada

tanto por células Th1 quanto Th2. Novos relatos têm mostrado que a produção de IL-10 por células efectoras Th1 ajudam a limitar o dano colateral causado por uma inflamação exagerada. No entanto, este controle pode também limitar a eficiência da resposta imune, resultando em falha no processo para eliminar o patógeno⁴¹.

Nos humanos, a severidade e as lesões teciduais da LV estão relacionadas com os aumentos de IL-10 no soro⁴². Esta citocina é considerada reguladora da resposta do tipo Th1 e/ou dos macrófagos teciduais parasitados durante a leishmaniose visceral humana, pois redução na atividade da IL-10 aumenta, quase que invariavelmente, a resistência em hospedeiros com resposta Th1 estável, e aparentemente satisfatória⁴³.

Embora o TGF- β seja induzido pela forma latente do parasitismo e tenha significativa atividade na promoção da doença visceral, a IL-10 é a principal citocina imunossupressora na leishmaniose visceral, podendo ser produzida pelas células do hospedeiro, células Th2 e/ou pelas células T reguladoras Tregs¹⁹.

Murray *et al.*⁴⁴ observaram que tratamentos com anticorpos monoclonais anti-receptor para IL-10 (IL-10R) induziram a morte dos parasitas intracelulares por macrófagos do fígado em camundongos infectados com *L. donovani*. O bloqueio do receptor de IL-10 mantido pela proteína 40 da IL-12 aumentou consideravelmente o nível de INF- γ no soro, a expressão de iNOS no tecido, bem como a quantidade de estruturas semelhantes a um granuloma. Estes autores concluíram que com o IL-10R bloqueado, a IL-10 endógena livre inibe sua produção, favorecendo a resposta de citocinas do tipo Th1 (IL-12 e INF- γ), o que regula a morte da *L. donovani*. Portanto, esta citocina mostra ter papel na suscetibilidade em modelo experimental de leishmaniose visceral²¹.

Murphy *et al.*⁴⁵ examinaram o papel da IL-10 na resistência durante a infecção experimental pela *L. donovani*. Após 14 dias de inoculação, o curso da infecção foi examinado em camundongos Balb/c e C57BL/6 desprovidos do gene da IL-10 (IL-10^{-/-}), sendo que estes animais foram resistentes a infecção, pois a carga parasitária do fígado foi dez vezes menor que a do grupo controle, que eram camundongos com o gene para IL-10 (IL-10^{+/+}). Esta resistência nos camundongos Balb/c IL-10^{-/-} foi acompanhada pelo aumento da produção de INF- γ e óxido nítrico. Após tratamento *in vivo* com anticorpos neutralizantes para INF- γ ou IL-12, a suscetibilidade nos camundongos Balb/c IL-10^{-/-} infectados foi maior. Estes estudos em conjunto demonstram que a IL-10 é um componente crítico na resposta imune, inibindo a resistência na infecção pela *L. donovani*.

Em camundongos infectados com *L. major*, a IL-4 está entre as citocinas associadas com a não resolução da infecção por três razões: pela indução e expansão de células Th2

estarem claramente associada com um resultado desfavorável da infecção; a neutralização da IL-4 por anticorpos ou por receptores solúveis de IL-4 (IL-4R) conferir proteção; e funções inibitórias sobre os macrófagos mostraram ser mais proeminentes do que seus efeitos estimulatórios⁴⁶.

Na leishmaniose visceral, a IL-4 não está associada a suscetibilidade^{21, 42}, pois o efeito protetor da IL-4 em estágios precoces da infecção tem sido relatado em camundongos suscetíveis a infecção pela *L. donovani*⁴⁷. A IL-4 tem demonstrado não exacerbar a leishmaniose visceral murina, como tem na progressão da doença cutânea. Além disso, está bem estabelecido que não somente pode-se induzir resposta Th2 independente da IL-4, mas que a IL-4 sob certas circunstâncias pode primar pela produção da IL-12 produzindo uma resposta Th1. Embora a IL-4 e a IL-13 possam promover a progressão da doença em modelos apropriados, tanto da leishmaniose do novo quanto do velho mundo, aparentemente estas citocinas podem atuar aumentando a resposta de proteção Th1 contra a doença visceral causada pela *Leishmania donovani*¹⁹.

Miralles *et al.*⁴⁸ examinaram tecido hepático de camundongos infectados com amastigotas de *L. donovani*, pela expressão de genes de citocinas associadas com o perfil Th1 (IFN- γ e IL-2) e Th2 (IL-4 e IL-10). Nas quatro primeiras semanas a carga parasitária no fígado de camundongos infectados aumentou, mas declinou com o desenvolvimento de resistência adquirida. Detectaram pelo RT-PCR a presença de RNA mensageiro (mRNA) da IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, sugerindo assim a indução de mRNA de citocinas relacionadas tanto com o perfil Th1 como Th2. Como detectaram a presença de mRNA de IFN- γ também pelo Northernblot, sugeriram que a infecção induziu no fígado, uma resposta preferencialmente Th1. Estes autores afirmam que em camundongos capazes de controlar a infecção pela *L. donovani*, a resposta Th2 é insuficiente para alterar o curso da infecção, ou mais provavelmente, camuflada pela resposta Th1.

Melby *et al.*³⁸ para melhor compreenderem o mecanismo relacionado com o controle da infecção pela *L. donovani*, estudaram a evolução e a resposta imune celular esplênica em modelo murino utilizando camundongos Balb/c, que é representativo da infecção subclínica humana. Analisaram a produção *in situ* das seguintes citocinas: IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ e TGF- β , por imunoistoquímica. Observaram que após a inoculação da *L. donovani*, os parasitas se localizaram primariamente e em grande quantidade, nos macrófagos esplênicos da polpa vermelha. No início do curso da infecção, observaram que a produção de IL-10 na zona marginal e a produção de TGF- β por células da polpa vermelha foi mais intensa. No 28º dia

da infecção, quando a carga parasitária visceral do baço e do fígado começou a declinar, o número de células do baço produtoras de IL-10 começava a retornar para níveis basais. No entanto, a produção de IFN- γ era alta e o número de células produtoras de IL-12 foi aumentando consideravelmente. Além disto, as células T e células dendríticas migraram para o folículo linfóide e zona marginal da polpa vermelha, onde os parasitas se localizavam. Estes achados sugerem que o controle da infecção está associado com a produção de IFN- γ e IL-12, e migração de células T e dendríticas, para o local do parasitismo crônico.

1.4. Leishmaniose e imunossupressão

As leishmanias persistem no organismo após o tratamento, da mesma forma que nas infecções assintomáticas. A presença do parasita pode ser vista como um fator benéfico na manutenção da memória imunológica pelas células T, conferindo resistência à re-infecção. Por outro lado, a leishmania persistente representa um risco em condições de imunossupressão, e na última década inúmeros relatos têm definido as leishmanioses como infecções oportunistas⁴⁹.

De acordo com Ferreira e Borges⁵⁰, os protozoários são os patógenos mais importantes que causam infecções em hospedeiros imunocomprometidos. Estes microrganismos infectam particularmente indivíduos com imunidade celular diminuída, como no caso de transplantes, neoplasias hematológicas, pacientes que utilizam altas doses de glicocorticóides e pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida. Entre eles se destacam o *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp* e *Cryptosporidium parvum*.

Em pacientes imunocomprometidos, a leishmaniose é uma doença severa que ameaça a vida, caracterizada por disseminação e envolvimento visceral, manifestações atípicas e baixa resposta a terapia.⁵¹

Glicocorticóides, incluindo o acetato de hidrocortisona e a dexametasona, são drogas antiinflamatórias imunossupressoras utilizadas em um amplo espectro em doenças^{52, 53}. Estas drogas utilizadas sós ou em combinações, tem vários efeitos imunossupressores e podem alterar o curso da infecção do *Toxoplasma gondii* e da *Leishmania*⁵³. A dexametasona é conhecida por várias propriedades imunossupressoras, especialmente com relação à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e IFN- γ ⁵⁴, mas seus efeitos no perfil Th1/Th2 não estão claros⁴⁹.

Segundo Finamor *et al.*⁵⁵ os efeitos antiinflamatórios e imunossupressores dos glicocorticóides se devem às suas ações interferindo na circulação das células imunes, principalmente diminuindo o número de linfócitos T periféricos e também inibindo a migração de neutrófilos para o local da inflamação; promoverem apoptose das células linfóides; inibirem a síntese de citocinas; modular em direta e indiretamente a função das células B; e inibirem a proliferação dos monócitos e sua diferenciação em macrófagos, bem como suas funções fagocíticas e citotóxicas.

Moynihan *et al.*⁵⁶, utilizando modelo experimental não infectado, sugeriram que os glicocorticóides poderiam regular diferencialmente a produção de citocinas Th1 versus Th2. Observaram que a dexametasona suprimiu a produção de IL-2, IL-4 e INF- γ . Alguns estudos mostram que glicocorticóides favorecem tanto a produção de citocina do tipo Th1⁵⁷ como do tipo Th2⁵⁸, ou ainda causam imunossupressão seletiva na imunidade celular Th1 e uma mudança em direção à imunidade humoral mediada por células Th2⁵⁹.

Franchimont *et al.*⁶⁰ investigaram o efeito da dexametasona no perfil de citocinas secretadas em cultura de células sanguíneas de pacientes saudáveis. Este estudo mostrou que a inibição da secreção de citocinas pela dexametasona é mais considerável em citocinas do tipo Th1 do que em citocinas tipo Th2, mostrando que os glicocorticóides podem induzir mudança no perfil de secreção de citocinas Th1 para Th2.

Rousseau *et al.*⁴⁹ verificaram que a administração prolongada de dexametasona induz limitada reativação da leishmaniose visceral murina, com um modelo não claro de citocinas Th1 e Th2, reduzindo a produção das citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4 e TNF- α em camundongos Balb/c infectados cronicamente. Observaram ainda que a carga parasitária dos camundongos tratados com dexametasona na fase crônica da infecção com *L. infantum* aumentou apenas no baço, não havendo reativação no fígado e na medula óssea. Verificaram também, que camundongos não infectados e tratados com dexametasona pela via subcutânea, três vezes por semana, na dose de 2 mg/kg, apresentaram a contagem de linfócitos TCD3, TCD4 e TCD8 reduzidas em aproximadamente 80% no 31º dia de tratamento, quando comparado com camundongos não infectados e não tratados.

As propriedades imunomodulatórias da pentoxifilina e seus efeitos inibitórios sinérgicos com glicocorticóides fazem desta droga um potencial agente de suporte para o tratamento de doenças autoimunes humanas. Além disso, a pentoxifilina pode reduzir a dose necessária de corticosteróides no tratamento de várias doenças inflamatórias, diminuindo os efeitos adversos inerentes ao longo período de tratamento⁵⁴.

A pentoxifilina é utilizada clinicamente para tratar pacientes com doença vascular periférica. Seus principais efeitos são: aumento na deformabilidade das células vermelhas do sangue, diminuição da viscosidade sanguínea, aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPC), que leva à inibição da síntese de tromboxano, e um aumento na síntese de prostaciclina. Com isso, a agregação plaquetária e adesão na parede dos vasos são inibidas. É também conhecida por diminuir a expressão de antígenos MHC de classe II e por inibir a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelas células mononucleares periféricas, como por exemplo TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ e MCP-1⁶¹.

As principais ações celulares da pentoxifilina são modulações na produção de citocinas de maneira dose dependente, como a síntese de TNF- α pelos macrófagos, síntese de IL-2, IL-12 e INF- γ , e influência na produção de outras citocinas como IL-4, IL-6 e IL-10. Isto indica que a pentoxifilina atua estimulando alterações na resposta celular da população Th1 para Th2. A modulação extrínseca da resposta imune induzida por esta droga pode ajudar a compreender melhor a maneira pela qual as células participam na patogênese da doença e os fatores relacionados a elas, principalmente as citocinas. Além disso, a pentoxifilina tem uma importante ação nos leucócitos polimorfonucleares, principalmente pela neutralização dos efeitos estimulantes da IL-1 e do TNF- α sobre as células. Esta droga tem mostrado uma ação inibitória potente na produção da IL-12 e da síntese de TNF- α pelos macrófagos peritoneais¹⁸.

Funk *et al.*⁵⁴ indicam que a pentoxifilina exerce uma seletiva supressão na produção de citocinas associada ao perfil Th1, mas não ao perfil Th2, sugerindo o uso em potencial desta droga como agente antiinflamatório. É uma droga com boa tolerância e ampla utilização terapêutica, imunossupressora em combinação com glicocorticóides ou ciclosporina A, podendo servir como ferramenta útil para melhor compreender o mecanismo regulatório complexo de indução das citocinas e possível intervenção farmacológica.

Gangneux *et al.*⁵³ avaliaram o efeito da terapia imunossupressora no curso da infecção de *Leishmania infantum* em modelo murino por meio do imunofenótipo das células do baço, carga parasitária dos tecidos e produção de citocinas (IL-4 e INF- γ). Utilizaram formas promastigotas de *L. infantum* para infectar (dia 0) o grupo controle, e dois grupos de camundongos Balb/c que foram tratados a partir do 10º até 40º dia com acetato de hidrocortisona e dexametasona+pentoxifilina. A administração da hidrocortisona aumentou a carga parasitária apenas no baço, não alterando a do fígado. Um aumento significativo da carga parasitária tanto no baço quanto no fígado, foi obtido somente quando os camundongos foram tratados com dexametasona+pentoxifilina. A análise da produção de citocinas revelou menor produção de IFN- γ , comparado ao grupo controle, e a concentração de IL-4 não diferiu

entre os três grupos. Com estes resultados eles concluíram que o aumento da carga parasitária não estava associado com o imunofenótipo de células específicas do baço ou com o perfil de secreção de citocinas Th1 e Th2.

Diante da crescente ocorrência e severidade da manifestação da leishmaniose visceral em hospedeiros imunossuprimidos, é de extrema importância conhecer o comportamento imunológico nesta situação. Estudos neste sentido são necessários para se compreender melhor como é a resposta imune do hospedeiro, para viabilizar o desenvolvimento de vacinas com o objetivo de se prevenir a doença tanto em humanos quanto em animais¹⁵, e ainda possibilitar a utilização de citocinas exógenas, que auxiliarão na recuperação ou cura, de pacientes imunossuprimidos infectados.

2. OBJETIVOS

A partir da infecção de camundongos Balb/c com *Leishmania chagasi* e posterior imunossupressão utilizando dexametasona associada à pentoxifilina, pretende-se avaliar:

- 1) Os efeitos da infecção e da imunossupressão no peso dos animais e do baço;
- 2) Os efeitos da infecção e da imunossupressão na carga parasitária do baço e do fígado;
- 3) Estudar os aspectos imunopatológicos, quanto à produção de citocinas no baço, em animais infectados e imunossuprimidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais foram realizados no biotério do serviço de Moléstias Infecciosas dos Animais, e nos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses – NUPEZO, ambos no Depto. de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e no Laboratório para Imunologia da Paracoccidioidomicose do Depto. de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, todos localizados no campus da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, em Botucatu/SP.

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos machos da linhagem Balb/c com sete semanas de idade, adquiridos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – CEMIB – UNICAMP – Campinas/SP, local de excelência na produção de animais isogênicos para utilização experimental. Os animais foram mantidos sob condições específicas livre de patógenos, recebendo ração comercial e água *ad libitum*, em caixas de polipropileno colocadas em estante ventilada ALESCO, modelo ALE 99002-001 com “no break”, localizada em sala adequada com janelas e portas teladas com malha fina.

3.2. Cepa de *Leishmania chagasi*

Em cada um dos dois experimentos realizados foram utilizadas para a infecção formas amastigotas de *Leishmania chagasi* cepa M6445, gentilmente fornecida pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – Faculdade de Medicina da USP. A cepa foi mantida por passagens a cada 60 dias, em hamster Sírio Dourado (*Mesocricetus auratus*), criados e mantidos em estante ventilada no Núcleo de Pesquisa em Zoonoses da FMVZ-UNESP em Botucatu/SP.

3.3. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais a saber:

GRUPO 1 (G1): 16 camundongos não infectados e não imunossuprimidos;

GRUPO 2 (G2): 21 camundongos não infectados e imunossuprimidos com pentoxifilina + dexametasona;

GRUPO 3 (G3): 17 camundongos infectados com *Leishmania chagasi*;

GRUPO 4 (G4): 20 camundongos infectados com *Leishmania chagasi* e imunossuprimidos com pentoxifilina + dexametasona;

3.4. Infecção

Na infecção, denominado dia zero, os grupos G3 e G4 foram anestesiados com Ketamina/Xilazina, na dose 100mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente, por via intramuscular de acordo com Curl e Peters⁶², para facilitar a manipulação, o procedimento de infecção e minimizar a perda do inóculo. Em seguida, foram infectados com 10^7 amastigotas/100µL de solução salina via intravenosa, no seio infra-orbitário. Os animais dos grupos G1 e G2 também foram anestesiados e inoculados com água para injeção, com o mesmo volume e pela mesma via da infecção.

O protocolo de infecção foi realizado segundo Stauber *et al.*⁶³, no qual as formas amastigotas da *L. chagasi* (cepa M6445) foram purificadas do baço de hamster Sírio Dourado por meio de centrifugação diferencial. O hamster foi eutanasiado com aproximadamente dois meses e meio de infecção, o baço foi acessado pelo flanco dorsal esquerdo, retirado e acondicionado em uma placa de Petri estéril, previamente pesada. A placa foi pesada novamente, para proceder o cálculo do peso do baço, e com um fragmento realizou-se imprint em lâmina, que foi corada pela técnica rápida descrita como Panótico. A contagem do número de formas amastigotas presentes, foi realizada de acordo com a fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de amastigotas no baço} = n^{\circ} \text{ amastigotas} / 100 \text{ cél. nucleadas} \times \text{peso do baço (mg)} \times 2 \times 10^5$$

O baço foi macerado em 5 ml de solução salina em macerador apropriado, até a obtenção de uma solução homogênea, a qual foi transferida para um tubo tipo Falcon de 15mL, que foi centrifugado durante 10 minutos, a 400 RPM, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon de 15 mL e este, centrifugado por 10 minutos, a 2800 RPM, a 4°C. Com isso, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspensionado no volume necessário para a obtenção de 10^8 amastigotas/mL de acordo com a fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de amastigotas no baço} / \text{volume que será diluído} = n^{\circ} \text{ amastigotas/mL}$$

De acordo com a literatura a dose de 10^7 amastigotas produz uma infecção homogênea, sem risco de vida para os animais. O volume foi fixado em 100 μ L, que é adequado a via proposta para a infecção e ao tamanho dos animais, obtendo 10^8 amastigotas/mL.

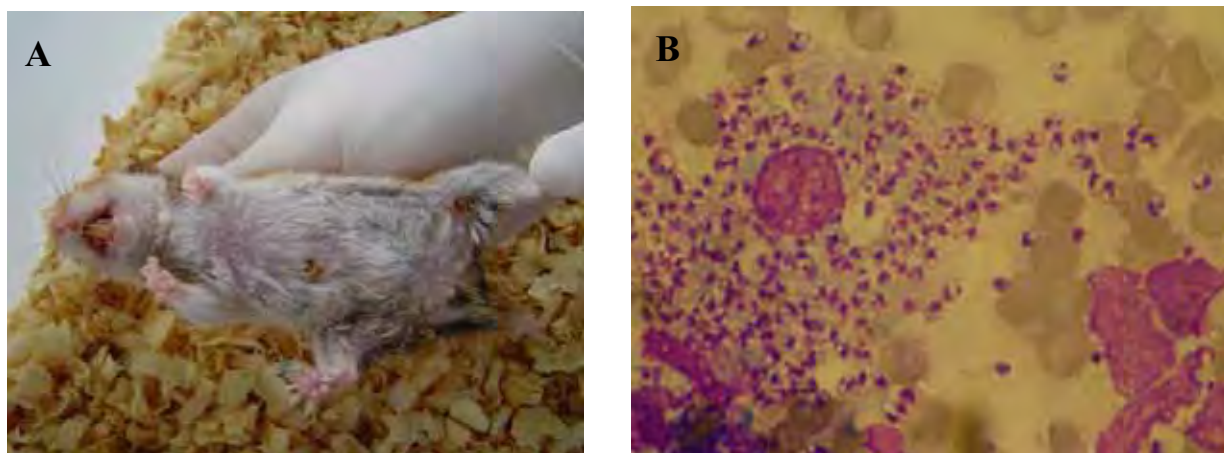


FIGURA 1. (A) Aspecto clínico e (B) Imprint do baço de hamster Sírio Dourado (*Mesocricetus auratus*) com aproximadamente 60 dias de infecção. Visualização em microscópio óptico sob óleo de imersão em aumento de 1.000x. Coloração: Panótico. Botucatu, 2008.

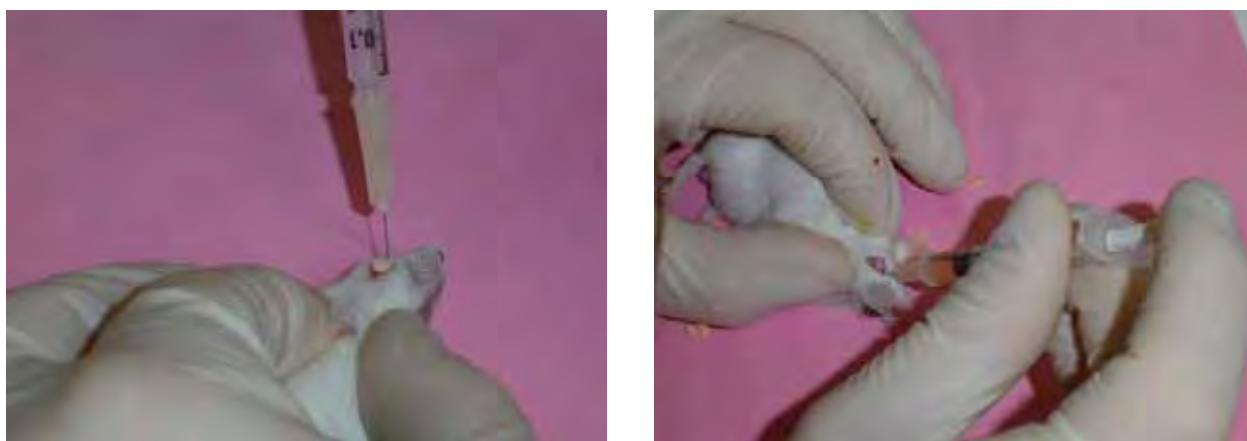


FIGURA 2. Infecção intravenosa no seio infra-orbitário. Botucatu, 2008.

3.5. Imunossupressão

Os animais dos grupos G2 e G4 foram imunossuprimidos durante 30 dias, do 60º ao 90º dia pós-inoculação (PI), com 200 µL/dia contendo 15mg/kg de dexametasona (Decadron®) intraperitoneal, e 300 µL/dia contendo 150mg/kg de pentoxifilina (Trental®) pela via subcutânea, na região dorso escapular⁵³. Os animais dos grupos G1 e G3 foram inoculados com água para injeção seguindo o mesmo protocolo da imunossupressão.

3.6. Coleta das amostras

Quatro animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 foram eutanasiados, em câmara saturada de vapor de isoflurano, nos dias 30, 60, 75 e 90 pós-inoculação (PI), totalizando 16 animais por dia. No dia 75, os animais do G2 e G4 estavam com 15 dias de imunossupressão, e no dia 90 com 30 dias de imunossupressão.

Todos os animais de cada grupo foram pesados em balança analítica de precisão nos dias 60, 75 e 90. Nestes mesmos dias, o baço foi removido de maneira asséptica, sendo fotografado e pesado.

3.7. Carga parasitária

A carga parasitária foi pesquisada pela técnica de microtitulação em cultura de acordo com Buffet *et al.*⁶⁴, pois é mais sensível do que o método de imprint⁶⁵. Foram pesados fragmentos do baço e do fígado, em seguida macerados utilizando pistilo em cadinho contendo 4 mL de meio drosophila de Schneider, suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado/estéril, e penicilina/estreptomicina (10.000UI/mL e 10mg/mL respectivamente). Em condições estéreis, foram preparadas placas de microtitulação de 96 poços, nas quais 300µL do homogenato de cada órgão foram colocados em quadruplicata na coluna 1. Em seguida realizaram-se diluições sucessivas, transferindo-se 75µL sobre 225µL de meio de cultura previamente colocados nas colunas 2 à 12, obtendo-se diluições de 4 (coluna 2) até 4.194.304 (coluna 12). As placas foram incubadas sob temperatura controlada entre 26 a 28°C por 7 dias, em estufa a 37°C em tensão de 5% de CO₂, sendo então observadas em microscópio invertido, no aumento de 200x. O título final foi determinado pela maior diluição para a linha observada que ainda continha pelo menos um parasita viável. O número de parasitas por grama de tecido foi calculado da seguinte forma: (média geométrica dos quatro títulos / peso do fragmento) x400.

3.8. Obtenção do sobrenadante da cultura de células esplênicas

Aproximadamente metade do baço de cada camundongo foi retirado, acondicionando-se em placas de petri 20 x 100mm contendo 5ml de meio de cultura de células RPMI1640, e macerado com o auxílio de uma peneira de nylon e pistilo. O material foi recolhido e centrifugado em tubos tipo Falcon de 15mL, durante 10 minutos, a 1500RPM, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células desprendido por homogeneização em 2mL de meio completo para cultura de células (MCCC: RPMI 1640, acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado/estéril, 1% de penicilina (10.000UI/mL)/estreptomicina (10mg/mL) e enriquecido com 1% de L-Glutamina). Procedeu-se a contagem em câmara de Newbauer, utilizando líquido de Turk para melhor visualização, sendo a concentração final ajustada para 5×10^6 células/mL. A seguir, 900µL desta suspensão foram distribuídos em triplicata em placas de microcultura de 48 poços de fundo chato. Essas células foram estimuladas com 100µL de MCCC, 10µg/mL do mitógeno concanavalina-A e 10µg/mL do antígeno⁶⁶ de *Leishmania chagasi*. Estas placas foram incubadas a 37°C em tensão de 5% de CO₂ por 48 horas, para subsequente colheita do sobrenadante, que foram armazenados congelados em freezer a -80°C para posterior dosagem das citocinas.

Produção do antígeno de Leishmania chagasi

A produção do antígeno foi a partir da cultura de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* em 30-40mL de meio drosophila de Schneider, suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado/estéril, e penicilina/estreptomicina (10.000UI/mL e 10mg/mL respectivamente), por 10-15 dias em temperatura de 28°C. Após este período, a cultura foi centrifugada a 3.000 RPM por 10 minutos em tubo tipo Falcon de 50mL. O meio foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em 10mL de solução salina tamponada de fosfatos (SST) 0,01M, pH 7,2, estéril. Centrifugou-se novamente a 3.000 RPM por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Esta operação foi repetida por mais duas vezes e o sobrenadante final foi homogeneizado, aliquoteado e mantido a -20°C, até ser sonicado.

O sonicador foi ajustado para seis ciclos de 50%, a 4°C, durante 30 segundos. Em seguida, esta solução foi examinada em microscópio óptico em aumento de 200x, para verificar a fragmentação das formas promastigotas. A suspensão foi centrifugada a 5.000

RPM por 15 minutos a 4°C, filtrada em membrana microporo de 0,22µm, e armazenada em alíquotas de 1mL em tubos tipo eppendorf, mantidos congelados a -20°C.

Para estimular a cultura celular com o antígeno é necessário determinar a concentração de proteínas solúveis do filtrado, para se ajustar a concentração do estímulo, que no presente estudo foi de 10µg/mL. Para tanto, utilizou-se o método descrito por Lowry *et al.*⁶⁷.

3.9. Determinação das citocinas pelo método de ELISA

Os níveis de INF-γ, IL-10, IL-2 e IL-4, foram detectados no sobrenadante da cultura de células esplênicas, com e sem estímulo, pelo método de ELISA de captura. A realização da técnica foi de acordo com a orientação do fabricante (R&D Systems).

3.10. Análise Estatística

As pressuposições de normalidade e homocedasticidade foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para comparar os grupos em relação a todas as variáveis em estudo (peso, peso do baço, citocinas e carga parasitária) em cada momento de observação, foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas e o teste de Mann-Whitney. Para comparar os momentos de observação em relação às mesmas variáveis em cada grupo foram utilizados o teste de Friedman para amostras dependentes seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas e o teste de Wilcoxon para amostras dependentes^{68, 69}, de acordo com o assessoramento do consultor estatístico Hélio Rubens de Carvalho Nunes (CONRE 8480A).

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados são referentes ao mais representativo de dois experimentos independentes realizados.

4.1. Peso dos animais e do baço

Todos os animais dos quatro grupos foram pesados nos dias 60, 75 e 90. Os baços dos animais sacrificados também foram pesados, e ambos os valores são apresentados em mediana, primeiro e terceiro quartil, na Tabela 1. O peso do G1 e G2 no dia 60 foi menor do que o peso do G3 e G4, sendo o peso do G2 estatisticamente menor do que o do G3. Nos dias 75 e 90, com 15 e 30 dias de imunossupressão do G2, o peso do grupo G1 foi maior, sendo estatisticamente significativo apenas no dia 75. Pode-se observar na Figura 3 que o peso mediano do G3 (infectado) é maior no dias 75 e 90, quando comparado ao G4 (infectado e imunossuprimido), sendo estatisticamente significativo no dia 75. Quando se compara G1 e G3, pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles nos momentos estudados.

Em relação ao peso do baço, no dia 60 pode-se observar na Figura 4 que os grupos infectados, G3 e G4, apresentaram o peso mediano do baço maior do que G1 e G2. Nos dias 75 e 90, com 15 e 30 dias de imunossupressão do G2 e G4, o peso mediano do baço destes grupos foi menor do que o do G1 e G3. Quando se compara o peso do baço do G1 e G3, pode-se observar que o grupo infectado (G3) apresentou o peso mediano do baço maior do que do grupo controle (G1) em todos os momentos estudados.

Na Figura 5 pode-se visualizar a diferença no tamanho do baço de um animal de cada grupo no dia 90, com 30 dias de imunossupressão do G2 e G4.

Tabela 1. Resumo descritivo em mediana, primeiro e terceiro quartil, e valores de p , referentes as comparações entre grupos e momentos, em relação ao peso dos animais e ao peso do baço, ambos em gramas (g), aos 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

<i>Variável</i>	<i>n</i>	<i>Grupo 1</i>	<i>n</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>n</i>	<i>Grupo 3</i>	<i>n</i>	<i>Grupo 4</i>	<i>p</i> ⁽¹⁾
Peso (60 dias)	12	28,10 (27,70 ; 29,08) ab	17	27,80 (26,45 ; 28,85) a	13	30,00 (28,40 ; 30,80) b	16	29,25 (28,08 ; 30,55) ab	0,012
Peso (75 dias)	8	30,10 (29,13 ; 31,18) a	12	25,10 (23,63 ; 25,85) b	8	31,85 (29,15 ; 33,70) a	10	26,30 (24,95 ; 27,50) b	<0,001
Peso (90 dias)	4	30,75 (29,85 ; 33,00) a	3	26,40 (25,00 ; 27,00) a	4	32,95 (29,75 ; 34,58) a	5	27,20 (25,35 ; 28,60) a	0,008 ^(*)
p ⁽²⁾		0,174		0,529		0,368		0,022	
Peso do baço (60 dias)	4	0,13 (0,13 ; 0,16) a	4	0,13 (0,12 ; 0,13) a	4	0,92 (0,64 ; 1,03) a	4	0,83 (0,78 ; 0,92) a	0,009 ^(&)
Peso do baço (75 dias)	4	0,11 (0,09 ; 0,12) ab	4	0,04 (0,04 ; 0,04) a	3	1,20 (1,10 ; 1,26) b	4	0,22 (0,20 ; 0,24) ab	0,004
Peso do baço (90 dias)	4	0,13 (0,10 ; 0,38) ab	3	0,05 (0,04 ; 0,05) a	4	1,38 (1,36 ; 1,65) b	4	0,21 (0,19 ; 0,26) ab	0,008
p ⁽²⁾		0,174		0,097		0,050		0,050	

(1) Teste de Kruskal-Wallis. Resumo descritivo em mediana, primeiro e terceiro quartil.

(2) Teste de Friedman para amostras dependentes. Resumo descritivo em mediana, primeiro e terceiro quartil.

(*) Aos 90 dias, todas as comparações múltiplas (contrastes simples) feitas com o teste de Dunn entre os grupos em relação ao peso tiveram $p > 0,05$.

(&) Aos 60 dias, todas as comparações múltiplas (contrastes simples) feitas com o teste de Dunn entre os grupos em relação ao peso do baço tiveram $p > 0,05$.

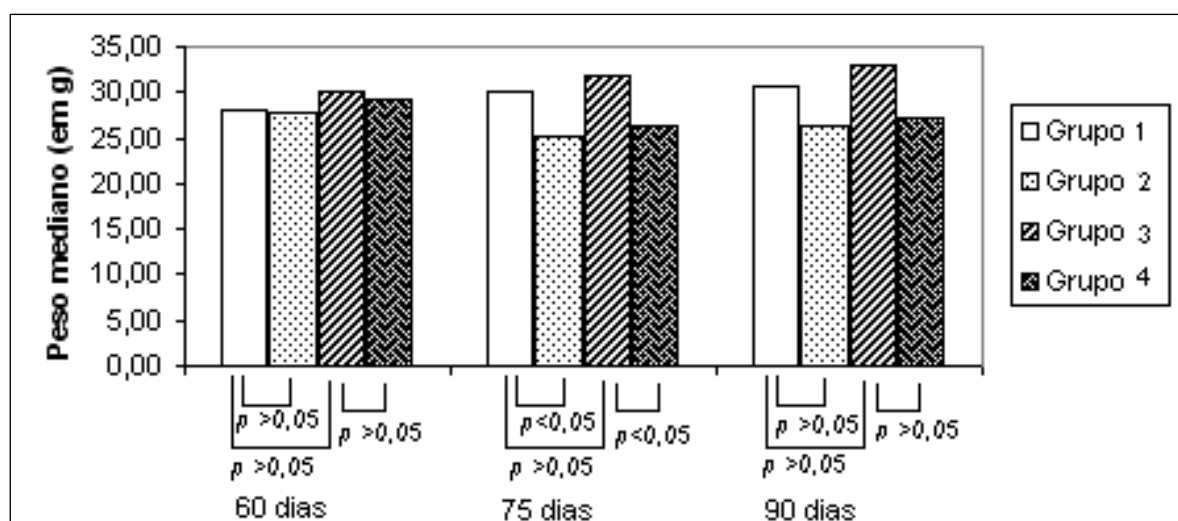


FIGURA 3. Peso mediano, em gramas, dos animais de cada grupo nos dias 60, 75 e 90 PI. Botucatu, 2008.

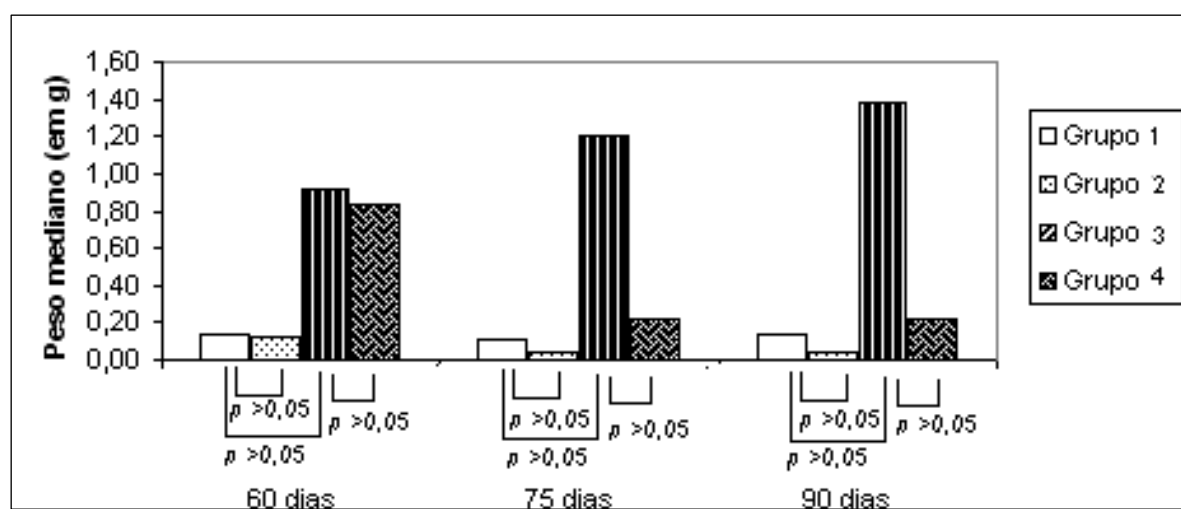


FIGURA 4. Peso mediano, em gramas, do baço dos animais de cada grupo nos dias 60, 75 e 90 PI. Botucatu, 2008.

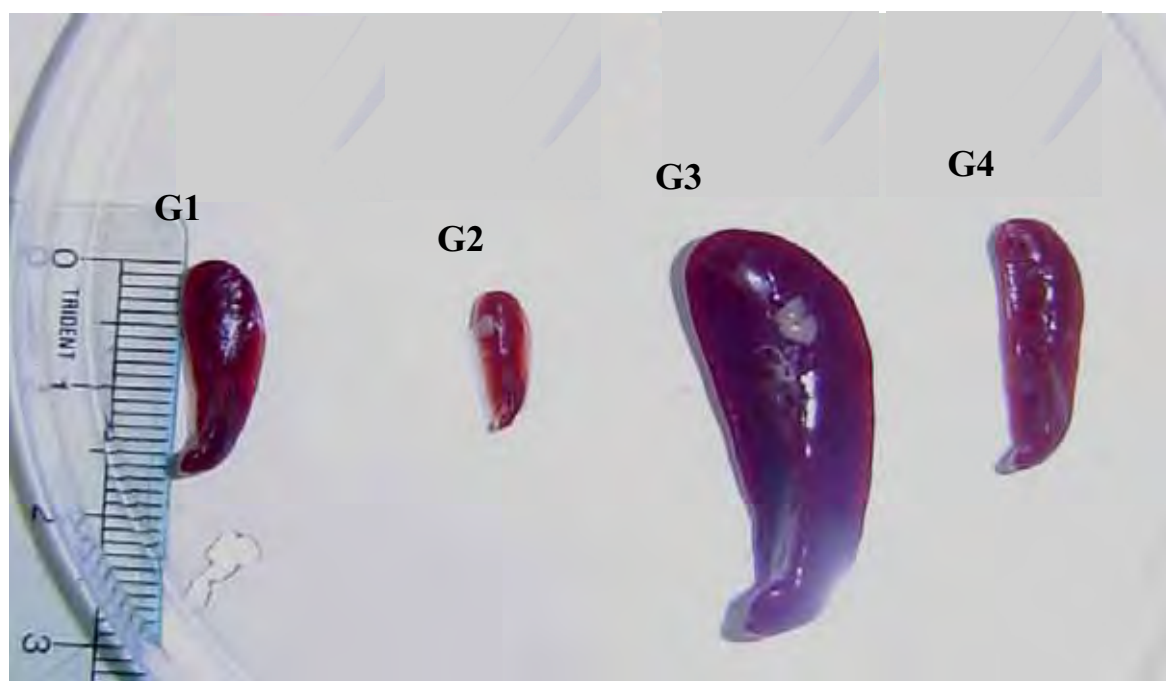


FIGURA 5. Tamanho do baço de um animal de cada grupo no dia 90 PI. Botucatu, 2008.

G1 – não infectado/não imunossuprimido; G2 – não infectado, mas com 30 dias de imunossupressão;

G3 – com 90 dias de infecção; G4 – com 90 dias de infecção e 30 dias de imunossupressão.

4.2. Carga parasitária

Na Tabela 2 encontram-se as medianas e os quartís da carga parasitária do baço e do fígado do G3 e do G4 aos 30, 60, 75 e 90 dias pós-infecção. A carga parasitária do grupo imunossuprimido (G4) foi maior do que a carga do G3, no baço e no fígado, tanto com 15 (dia 75) como com 30 (dia 90) dias de imunossupressão. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos durante o período de imunossupressão.

Pode-se verificar nas Figuras 6 e 7 que no dia 60 a carga parasitária do fígado do G3 foi maior do que a do baço, e que durante o período do estudo ela diminuiu e a do baço aumentou.

Tabela 2. Resumo descritivo em mediana, primeiro e terceiro quartil, e valores de p , referentes as comparações entre grupos e ao estudo da imunossupressão sobre a carga parasitária no baço e no fígado, aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

<i>Variável</i>	<i>Grupo 3 (n = 4)</i>	<i>Grupo 4 (n = 4)</i>	<i>p⁽¹⁾</i>
Carga no baço (30 dias)	1,78E+08 (4,76E+07 ; 2,64E+08)	1,52E+08 (1,15E+08 ; 1,08E+09)	0,773
Carga no baço (60 dias)	1,01E+09 (4,77E+08 ; 2,3E+09)	2,48E+09 (3,83E+08 ; 4,44E+09)	0,564
Carga no baço (75 dias)	3,5E+09 (7,01E+08 ; 4,88E+09)	6,65E+09 (3,38E+09 ; 1,13E+10)	0,083
Carga no baço (90 dias)	6,65E+08 (1,18E+08 ; 1,13E+09)	2,76E+09 (9,01E+08 ; 3,53E+09)	0,083
$p^{(2)}$	0,144	0,144	
$p^{(3)}$	0,465	0,715	
Carga no fígado (30 dias)	3,7E+09 (6,62E+08 ; 7,35E+09)	1,24E+09 (6,49E+08 ; 2,16E+09)	0,564
Carga no fígado (60 dias)	1,3E+09 (8,63E+07 ; 6,1E+09)	4,14E+08 (1,45E+08 ; 5,3E+08)	0,773
Carga no fígado (75 dias)	3,02E+08 (3,94E+07 ; 1,11E+09)	1,64E+09 (5,41E+08 ; 2,95E+09)	0,149
Carga no fígado (90 dias)	1,04E+08 (7,83E+07 ; 7,08E+08)	1,01E+09 (4,26E+08 ; 2,13E+09)	0,083
$p^{(4)}$	0,465	0,068	
$p^{(5)}$	0,144	0,144	

(1) Teste de Mann-Whitney. Resumo descritivo em mediana e quartís.

(2) e (4) Teste de Wilcoxon para amostras dependentes – Comparação entre os momentos 75 e 60 dias. Resumo descritivo em mediana e quartís.

(3) e (5) Teste de Wilcoxon para amostras dependentes – Comparação entre os momentos 90 e 60 dias. Resumo descritivo em mediana e quartís.

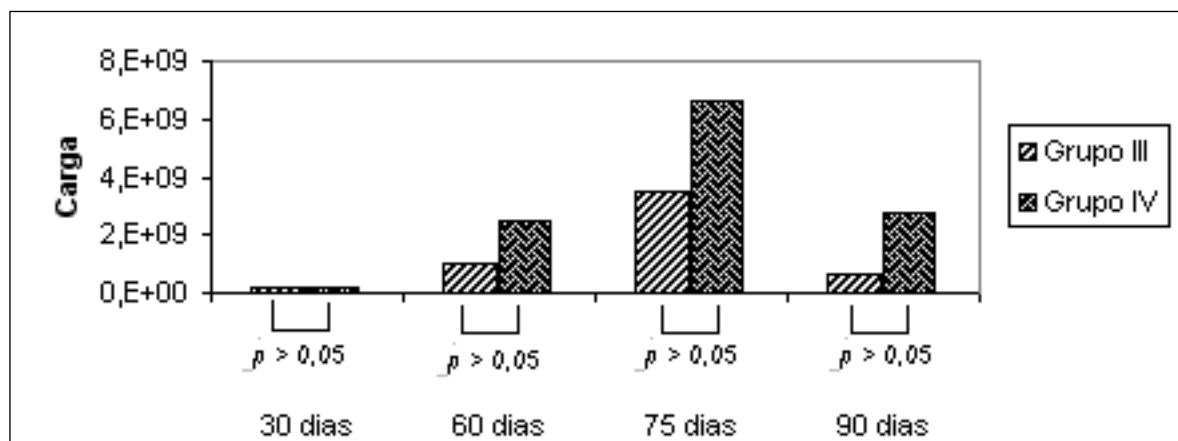


FIGURA 6. Mediana da carga parasitária do baço, em parasitas por grama de tecido, do G3 e G4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

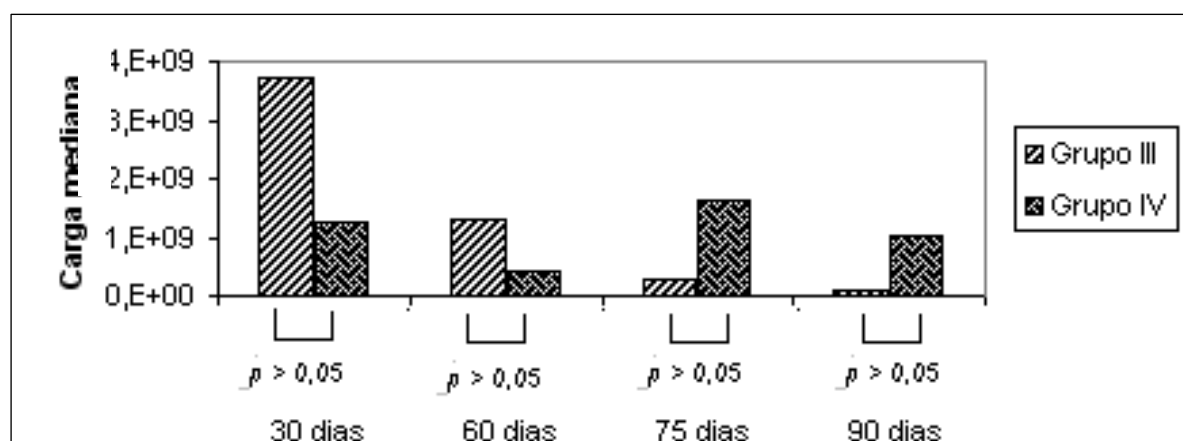


FIGURA 7. Mediana da carga parasitária do fígado, em parasitas por grama de tecido, do G3 e G4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

4.3. Citocinas

Foram dosados os níveis de citocinas em culturas de células esplênicas não estimuladas, estimuladas com antígeno sonicado de *Leishmania chagasi* e estimuladas com concanavalina A, simultaneamente, para cada animal. Não foi possível obter o número mínimo de células necessárias (5×10^6 células/mL) no grupo 2 nos dias 75 e 90, devido ao reduzido tamanho do baço, o que impossibilitou a realização da cultura de células deste grupo nestes momentos.

Podemos observar na Tabela 3 os níveis medianos em picogramas/mL de IFN- γ , IL-10, IL-2 e IL-4, por grupo e momento, nas culturas celulares não estimuladas. Na Figura 8, verificamos que no dia 30 os níveis de IFN- γ foram próximos entre os grupos G1/G2 e os grupos infectados (G3/G4). Já no dia 60, os níveis de IFN- γ dos grupos infectados (G3/G4) foram maiores do que G1/G2. Com o início da imunossupressão, os níveis de IFN- γ de G4 foram indetectáveis nos dias 75 e 90.

A IL-10 também apresentou níveis medianos próximos no dia 30 em todos os grupos, com níveis maiores em G3 e G4 no dia 60 (Figura 9). No entanto, mesmo com a imunossupressão, foram detectados níveis de IL-10 em G4 nos dias 75 e 90, sendo que no dia 90, a mediana do nível de IL-10 do G4 foi maior do que a do G3.

Não foram detectados níveis de IL-2 nas culturas não estimuladas durante o período do estudo. Níveis baixos de IL-4 só foram detectados em G3 e G4 nos dias 75 e 90, sendo menores estatisticamente no grupo imunossuprimido (G4), conforme podemos observar na Figura 10.

Tabela 3. Mediana, primeiro e terceiro quartil, dos níveis de IFN- γ , IL-10, IL-2 e IL-4, em picogramas/mL, e os valores de *p*, referentes as comparações entre grupos e momentos, nas culturas de células esplênicas não estimuladas. Botucatu, 2008.

<i>Citocina / dia</i>	<i>Grupo 1 (n=4)</i>	<i>Grupo 2 (n=4)</i>	<i>Grupo 3 (n=4)</i>	<i>Grupo 4 (n=4)</i>	<i>p</i>
IFN- γ (dia 30)	14,4 (7,9; 36,2)	21,2 (12,1; 42,0)	55,4 (16,3; 87,5) A ^(#)	67,0 (56,1; 82,8)	0,084 ⁽¹⁾
IFN- γ (dia 60)	14,6 (8,3; 26,7) a ^(#)	19,5 (5,0; 37,8) ab	221,4 (170,5; 250,2) B ab	263,5 (197,5; 401,8) b	0,009 ⁽¹⁾
IFN- γ (dia 75)	100% ^(*)	(-)	126,3 (122,7; 132,4) AB	100% ^(*)	
IFN- γ (dia 90)	100% ^(*)	(-)	129,6 (127,2; 174,0) AB	100% ^(*)	
<i>p</i>	0,465 ⁽³⁾	0,715 ⁽³⁾	0,019 ⁽⁴⁾	0,068 ⁽³⁾	
IL-10 (dia 30)	65,3 (59,4; 147,7)	95,3 (61,9; 158,6)	179,2 (141,4 ; 184,3) A	165,2 (116,3 ; 360,8) A	0,071 ⁽¹⁾
IL-10 (dia 60)	66,3 (53,9; 72,8) a	70,3 (59,3; 89,5) ab	744,4 (631,1; 835,7) B ab	842,0 (712,2; 988,3) Bb	0,009 ⁽¹⁾
IL-10 (dia 75)	61,4 (20,5; 93,3) a	(-)	335,5 (271,5; 447,4) AB a	297,9 (276,5; 375,2) ABa	0,025 ⁽¹⁾
IL10 (dia 90)	39,1 (23,3; 79,2) a	(-)	175,1 (151,4; 230,9) AB ab	429,7 (349,6; 613,0) ABb	0,007 ⁽¹⁾
<i>p</i>	0,738 ⁽⁴⁾	0,144 ⁽³⁾	0,011 ⁽⁴⁾	0,011 ⁽⁴⁾	
IL-2 (dia 30)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	
IL-2 (dia 60)	100% ^(*)	25% ^(*) (3,4–8,3) ^(&)	100% ^(*)	75% ^(*) 12,3 ^(§)	
IL-2 (dia 75)	100% ^(*)	(-)	75% ^(*) 3,7 ^(§)	100% ^(*)	
IL-2 (dia 90)	100% ^(*)	(-)	100% ^(*)	100% ^(*)	
<i>p</i>					
IL-4 (dia 30)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	
IL-4 (dia 60)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	
IL-4 (dia 75)	50% ^(*) (5,62–8,43) ^(&)	(-)	17,4 (13,1; 21,1)	7,6 (5,22; 8,8)	0,020 ⁽²⁾
IL-4 (dia 90)	50% ^(*) (1,21–3,22) ^(&)	(-)	16,2 (12,0; 20,1)	5,0 (2,9; 11,3)	0,043 ⁽²⁾
<i>p</i>			0,715 ⁽⁵⁾	1,000 ⁽⁵⁾	

(1) Teste de Kruskal-Wallis.

(2) Teste de Mann-Whitney

(3) Teste de Wilcoxon para amostras dependentes para comparação entre os momentos 30 e 60 dias.

(4) Teste de Friedman para amostras dependentes.

(5) Teste de Wilcoxon para amostras dependentes para comparação entre os momentos 75 e 90 dias.

(*) Percentual de unidades experimentais com nível indetectável.

(&) Valores mínimo e máximo

(#) Letras iguais minúsculas indicam que $p > 0,05$ nas comparações múltiplas entre grupos e letras iguais maiúsculas indicam que $p > 0,05$ nas comparações múltiplas entre momentos pelo teste de Dunn.

(§) Único valor obtido

(-) Não foi possível realizar a cultura de células.

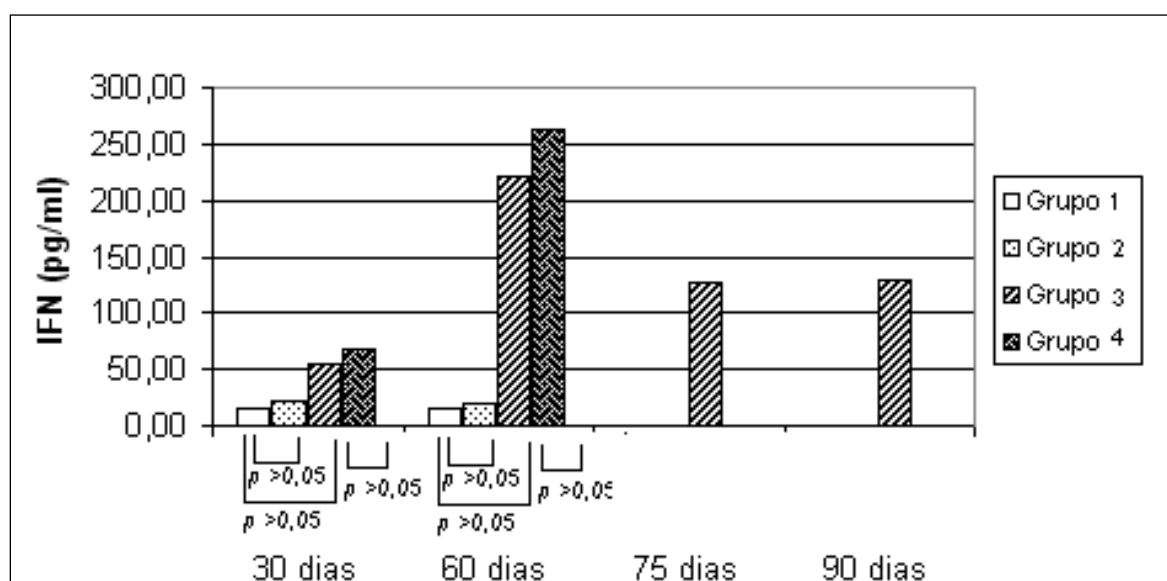


FIGURA 8. Níveis de IFN- γ (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, não estimuladas, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

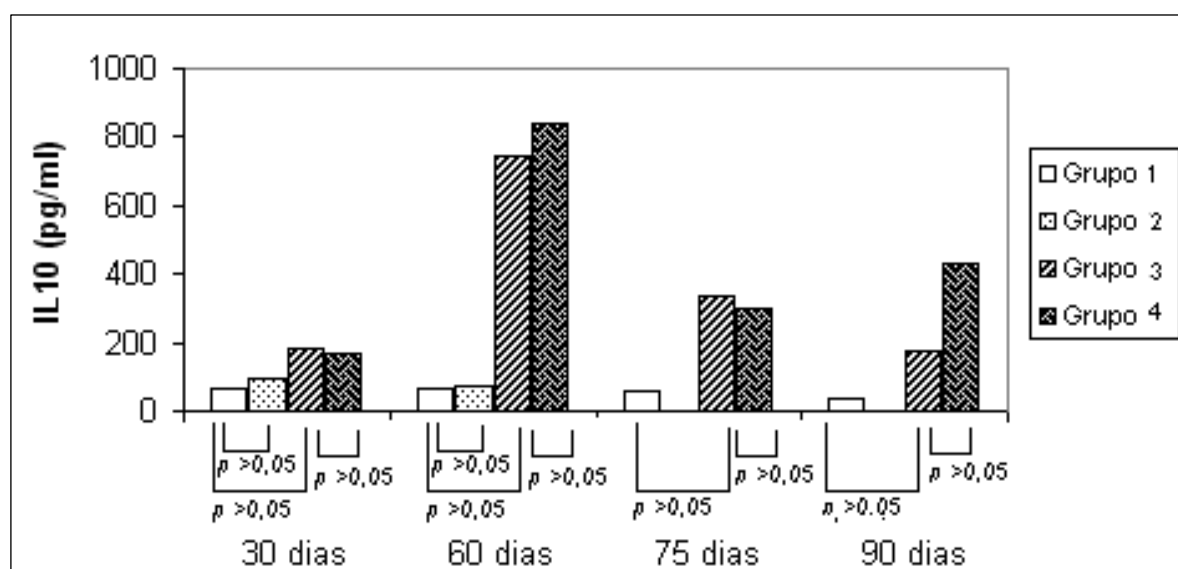


FIGURA 9. Níveis de IL-10 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, não estimuladas, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

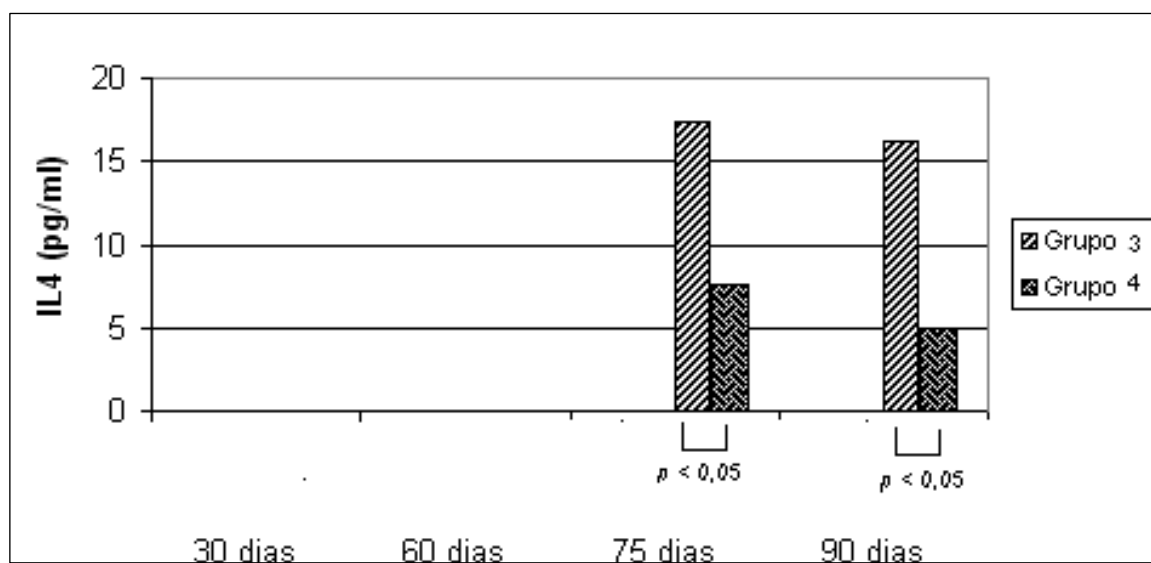


FIGURA 10. Níveis de IL-4 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, não estimuladas, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

Na Tabela 4 pode-se observar os níveis de IFN- γ , IL-10, IL-2 e IL-4 nas culturas estimuladas com o antígeno sonicado de *Leishmania chagasi*, por grupo e momento. Na Figura 11 verifica-se que, da mesma forma que nas culturas não estimuladas, os níveis medianos de IFN- γ no dia 30 foram semelhantes entre os grupos, e no dia 60, foram maiores nos grupos infectados (G3/G4). Com a imunossupressão, os níveis de IFN- γ no G4, também não foram detectados.

Na Figura 12 observa-se que não foram detectados níveis de IL-10 no G1 e no G2. No G3 e G4 os maiores níveis foram detectados no dia 60. Mesmo com a imunossupressão, foram detectados níveis de IL-10 no G4 nos dias 75 e 90, sendo estatisticamente maiores do que no G3 no dia 90.

Não foram detectados níveis de IL-2 nas culturas estimuladas, com o antígeno. Níveis baixos de IL-4 foram detectados somente no G3 e no G4 nos dias 75 e 90, sendo estatisticamente menores no grupo imunossuprimido (G4), conforme pode-se observar na Figura 13.

Tabela 4. Mediana, primeiro e terceiro quartil, dos níveis de IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-2, em picogramas/mL, e os valores de *p*, referentes as comparações entre grupos e momentos, nas culturas de células esplênicas estimuladas com antígeno. Botucatu, 2008.

<i>Citocina/ dia</i>	<i>Grupo 1 (n=4)</i>	<i>Grupo 2 (n=4)</i>	<i>Grupo 3 (n=4)</i>	<i>Grupo 4 (n=4)</i>	<i>p</i>
IFN- γ (dia 30)	20,9 (9,0; 32,4) ^{a(#)}	28,5 (17,2; 44,9) ^{ab}	82,6 (61,2; 102,3) ^{A(#)} ab	101,4 (73,5; 106,0) ^b	0,009 ⁽¹⁾
IFN- γ (dia 60)	25,0 (17,5;34,0) a	21,8 (9,3; 34,5) a	733,8 (555,7; 932,7) ^B a	867,7 (629,0; 1048,2) a	0,009 ⁽¹⁾
IFN- γ (dia 75)	100% ^(*)	(-)	180,0 (174,6; 180,5) ^{AB}	100% ^(*)	
IFN- γ (dia 90)	100% ^(*)	(-)	373,5 (318,7; 396,9) ^{AB}	100% ^(*)	
<i>p</i>	0,109 ⁽³⁾	0,715 ⁽³⁾	<0,001 ⁽⁴⁾	0,068 ⁽³⁾	
IL-10 (dia 30)	100% ^(*)	100% ^(*)	234,10 (198,16; 370,37)	363,88 (289,50; 483,17)	0,149 ⁽²⁾
IL-10 (dia 60)	100% ^(*)	100% ^(*)	1609,91 (1328,11; 1906,45)	1727,55 (1497,95; 1850,84)	1,000 ⁽²⁾
IL-10 (dia 75)	100% ^(*)	(-)	328,72 (284,47; 447,02)	329,10 (255,99; 392,52)	0,773 ⁽²⁾
IL10 (dia 90)	100% ^(*)	(-)	192,37 (69,32; 252,76) ^a	494,69 (376,57; 693,13) ^b	0,021 ⁽²⁾
<i>p</i>			0,019 ⁽⁴⁾	0,011 ⁽⁴⁾	
IL-2 (dia 30)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	
IL-2 (dia 60)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	25% ^(*) (4,2 – 34,9) ^(&)	
IL-2 (dia 75)	100% ^(*)	(-)	50% ^(*) (16,7 – 19,4) ^(&)	100% ^(*)	
IL-2 (dia 90)	100% ^(*)	(-)	100% ^(*)	100% ^(*)	
<i>p</i>					
IL-4 (dia 30)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	
IL-4 (dia 60)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	100% ^(*)	
IL-4 (dia 75)	25% ^(*) (0,01-12,03) ^(&)	(-)	15,24 (13,13; 34,16)	3,42 (2,32; 3,62)	0,020 ⁽²⁾
IL-4 (dia 90)	75% ^(*) 2,02 ^(\$)	(-)	23,05 (16,64; 27,65)	2,82 (1,31; 4,32)	0,021 ⁽²⁾
<i>p</i>			0,715 ⁽³⁾	0,715 ⁽³⁾	

(1) Teste de Kruskal-Wallis.

(2) Teste de Mann-Whitney.

(3) Teste de Wilcoxon para amostras dependentes.

(4) Teste de Friedman para amostras dependentes.

(*) Percentual de unidades experimentais com nível indetectável.

(#) Letras iguais minúsculas indicam que $p > 0,05$ nas comparações múltiplas entre grupos e letras iguais maiúsculas indicam que $p > 0,05$ nas comparações múltiplas entre momentos pelo teste de Dunn.

(&) Valores mínimo e máximo.

(\$) Único valor obtido.

(-) Não foi possível realizar a cultura de células.

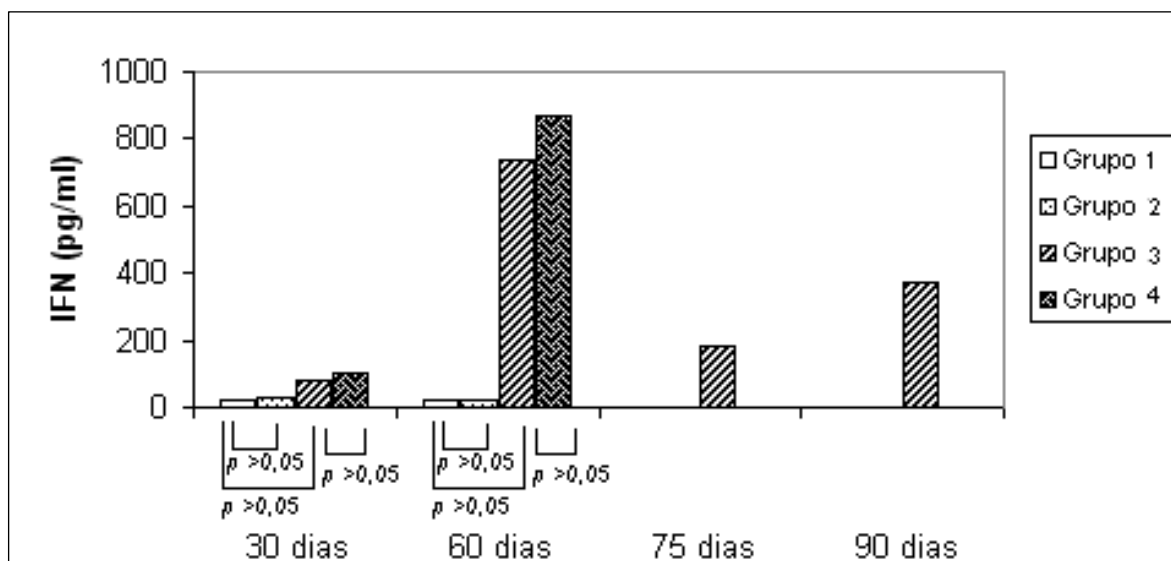


FIGURA 11. Níveis de IFN- γ (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com antígeno sonicado de *Leishmania chagasi*, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

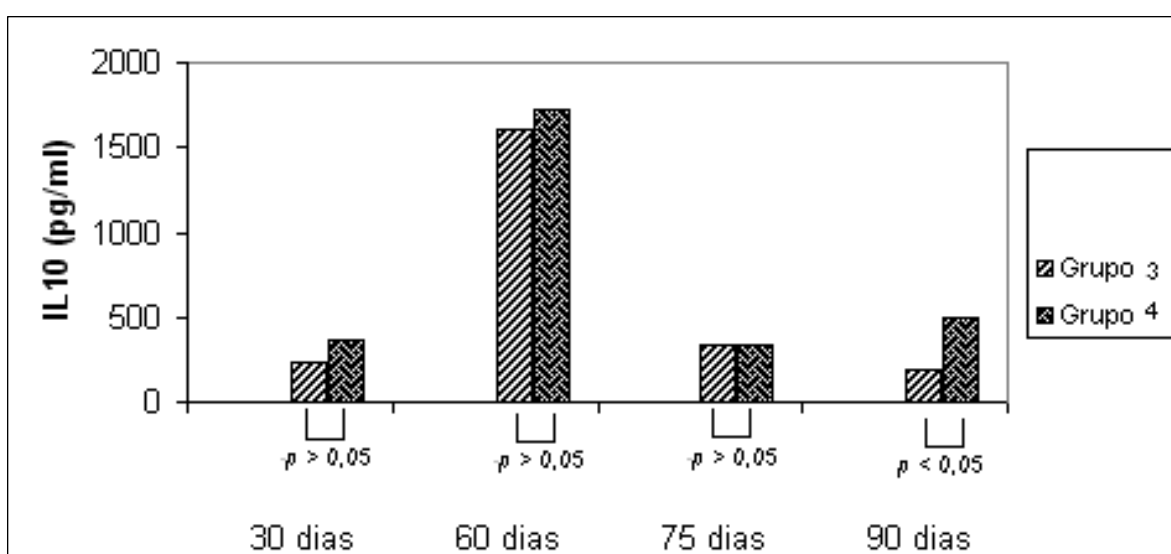


FIGURA 12. Níveis de IL-10 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com antígeno sonicado de *Leishmania chagasi*, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

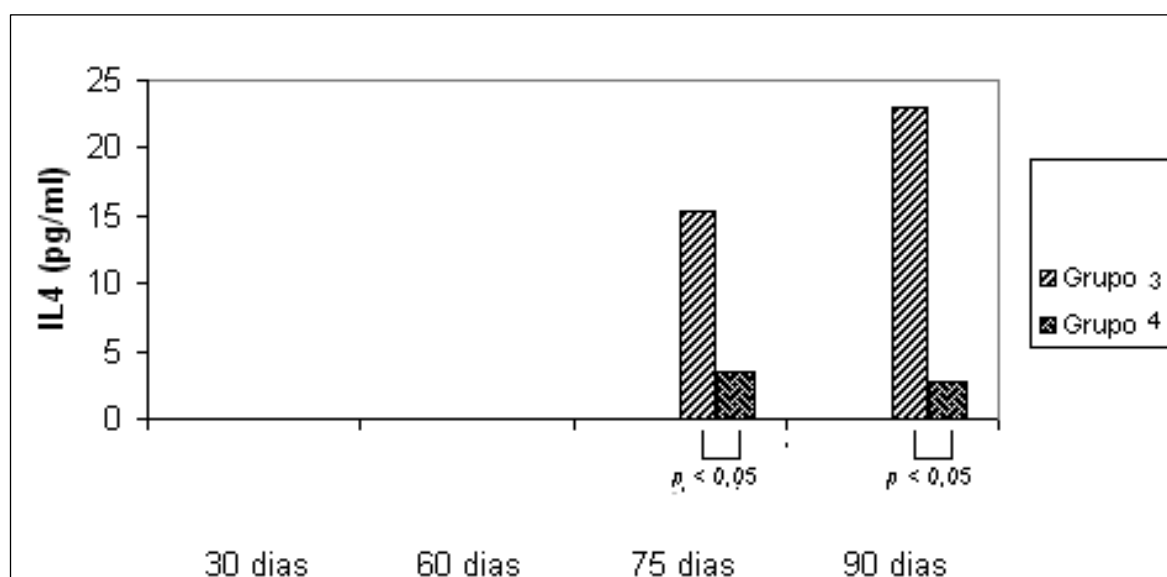


FIGURA 13. Níveis de IL-4 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com antígeno sonicado de *Leishmania chagasi*, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

Na Tabela 5 pode-se observar os níveis de IFN- γ , IL-10, IL-2 e IL-4 nas culturas estimuladas com concanavalina A, por grupo e momento. Na Figura 14 verifica-se que no dia 30, a mediana dos níveis de IFN- γ nos grupos infectados foi menor do que no G1/G2. Já com 60 dias, os níveis de IFN- γ foram maiores nos grupos infectados (G3/G4). O G3 apresentou níveis maiores do que o G1 nos dias 75 e 90. Com a imunossupressão do G4 a mediana dos níveis de IFN- γ foram menores do que o G3, sendo estatisticamente significativa no dia 90.

Na Figura 15 pode-se observar que os níveis de IL-10 foram menores nos grupos infectados (G3/G4) nos dias 30 e 60, quando comparados aos G1/G2. No dia 90, com 30 dias de imunossupressão no G4, pode-se observar que a mediana do nível de IL-10 foi estatisticamente maior do que a do G3.

A IL-2 foi detectada somente nas culturas estimuladas com a concanavalina A, como pode-se observar na Figura 16. Nos dias 30 e 60, a mediana dos níveis de IL-2 foram maiores nos grupos não infectados (G1/G2) do que nos grupos infectados (G3/G4). Com a imunossupressão pode-se observar que a mediana dos níveis de IL-2 nos dias 75 e 90 foram menores do que as do G3.

Na Figura 17 verifica-se que não se detectou IL-4 nos grupos infectados no dia 30, somente a partir do dia 60, sendo que neste momento, a mediana do nível de IL-4 no G1 foi estatisticamente maior do que a do G3. Com a imunossupressão, podemos observar que G4 apresentou níveis de IL-4 menores do que os do G3 nos dias 75 e 90.

Tabela 5. Mediana, primeiro e terceiro quartil, dos níveis de IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-2, em picogramas/mL, e os valores de *p*, referentes as comparações entre grupos e momentos, nas culturas de células esplênicas estimuladas com concanavalina A. Botucatu, 2008.

<i>Citocina/ dia</i>	<i>Grupo 1 (n=4)</i>	<i>Grupo 2 (n=4)</i>	<i>Grupo 3 (n=4)</i>	<i>Grupo 4 (n=4)</i>	<i>p</i>
IFN- γ (dia 30)	515,0 (462,8; 601,9) A ^(#)	581,7 (167,8; 1050,0)	319,6 (196,9; 491,1) A	412,1 (187,0; 612,2) A	0,708 ⁽¹⁾
IFN- γ (dia 60)	631,8 (511,8; 879,0) AB a ^(#)	751,7(597,9; 1033,4) ab	1316,5(1222,6; 1744,9) AB ab	1552,4 (1513,8; 1798,7) B b	0,007 ⁽¹⁾
IFN- γ (dia 75)	776,4 (750,8; 828,6) AB a	(-)	1806,16 (1682,6; 1861,2) B b	1170,13(949,0; 1430,4) AB ab	0,007 ⁽¹⁾
IFN- γ (dia 90)	1058,6 (976,3; 1169,0) B ab	(-)	1402,9(1219,9; 1537,6) AB a	638,6 (561,9; 1065,5) AB b	0,044 ⁽¹⁾
<i>p</i>	0,019 ⁽²⁾	0,465 ⁽³⁾	0,011 ⁽²⁾	0,007 ⁽²⁾	
IL-10 (dia 30)	2011,0(1805,4; 2234,7) AB a	1602,7(957,9; 2579,1) a	413,3 (264,3; 517,3) AB a	447,7 (223,1; 883,5) A a	0,014 ⁽¹⁾
IL-10 (dia 60)	2240,6 (1642,7; 2371,4) A a	2125,8 (1960,1; 2336,5) a	1081,66 (724,2; 1485,4) A a	1118,6 (994,3; 1277,3) A a	0,014 ⁽¹⁾
IL-10 (dia 75)	1372,2 (899,0; 1416,6) AB	(-)	856,2 (644,1; 1173,2) AB	754,4 (535,9; 804,9) A	0,098 ⁽¹⁾
IL10 (dia 90)	941,8 (413,4; 1216,2) B ab	(-)	182,5 (156,2; 225,6) B a	1019,5 (764,1; 1311,4) A b	0,021 ⁽¹⁾
<i>p</i>	0,017 ⁽²⁾	0,715 ⁽³⁾	0,011 ⁽²⁾	0,044 ⁽²⁾	
IL-2 (dia 30)	775,6 (429,4; 946,5) AB a	941,3 (742,0; 1053,4) a	498,2 (332,8; 684,2) a	601,5 (537,7; 682,2) A a	0,017 ⁽¹⁾
IL-2 (dia 60)	684,4 (657,7; 814,6) A ab	914,0 (820,3; 926,7) a	317,1 (184,4; 385,0) b	367,4 (292,9; 441,4) AB ab	0,005 ⁽¹⁾
IL-2 (dia 75)	984,2 (895,8; 1144,3) B a	(-)	334,8 (280,2; 412,3) ab	32,7 (18,9; 41,8) B b	0,007 ⁽¹⁾
IL-2 (dia 90)	1025,6 (981,6; 1105,6) AB a	(-)	229,4 (159,2; 319,8) ab	26,1 (21,1; 101,1) B b	0,007 ⁽¹⁾
<i>p</i>	0,013 ⁽²⁾	0,715 ⁽³⁾	0,098 ⁽²⁾	0,013 ⁽²⁾	
IL-4 (dia 30)	1014,6 (910,6; 1116,0)	939,50(761,93 ; 1143,03)	100% ^(*)	25% ^(*) (18,8 - 37,3) ^(&)	0,685 ⁽⁴⁾
IL-4 (dia 60)	957,0 (853,5; 1011,3) a	947,31(888,78 ; 1068,88) a	375,4 (352,8; 538,3) A b	378,3 (299,3; 667,1) ab	0,010 ⁽¹⁾
IL-4 (dia 75)	1017,1 (576,3; 1123,3)	(-)	863,9 (800,7; 922,3) B	416,8 (186,0; 667,8)	0,050 ⁽¹⁾
IL-4 (dia 90)	608,1 (465,3; 1082,4) a	(-)	550,7 (420,3 ; 720,7) AB ab	178,8 (98,9; 207,1) b	0,024 ⁽¹⁾
<i>p</i>	0,753 ⁽²⁾	1,000 ⁽³⁾	0,018 ⁽²⁾	0,105 ⁽²⁾	

(1) Teste de Kruskal-Wallis.

(2) Teste de Friedman para amostras dependentes.

(3) Teste de Wilcoxon para amostras dependentes. Comparação entre os momentos 30 e 60 dias.

(4) Teste de Mann-Whitney.

(*) Percentual de unidades experimentais com nível indetectável.

(#) Letras iguais minúsculas indicam que $p > 0,05$ nas comparações múltiplas entre grupos e letras iguais maiúsculas indicam que $p > 0,05$ nas comparações múltiplas entre momentos pelo teste de Dunn.

(&) Valores mínimo e máximo.

(\$) Único valor obtido.

(-) Não foi possível realizar a cultura de células.

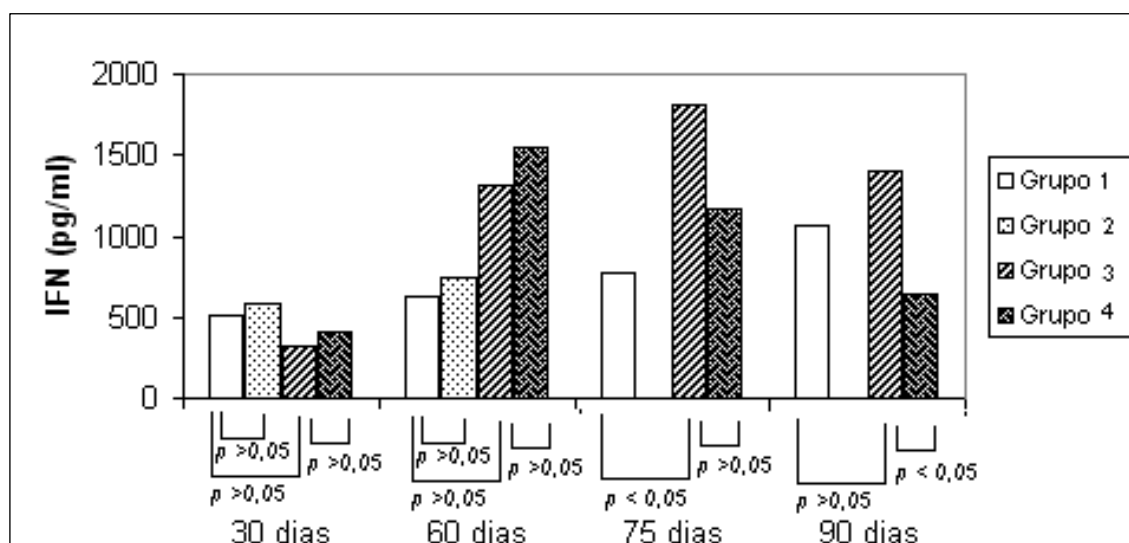


FIGURA 14. Níveis de IFN- γ (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com concanavalina A, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

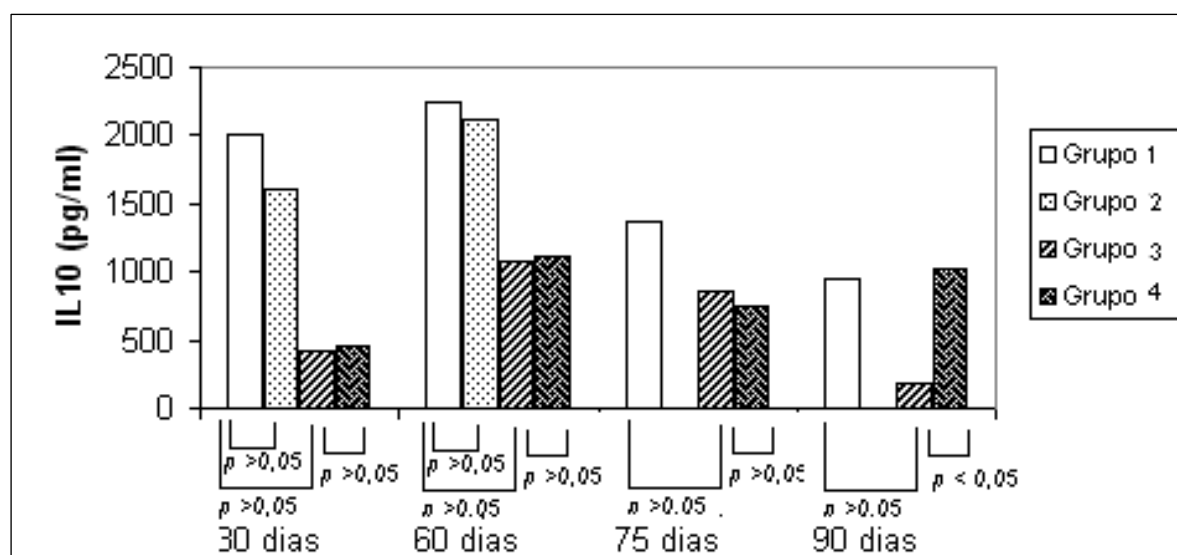


FIGURA 15. Níveis de IL-10 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com concanavalina A, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

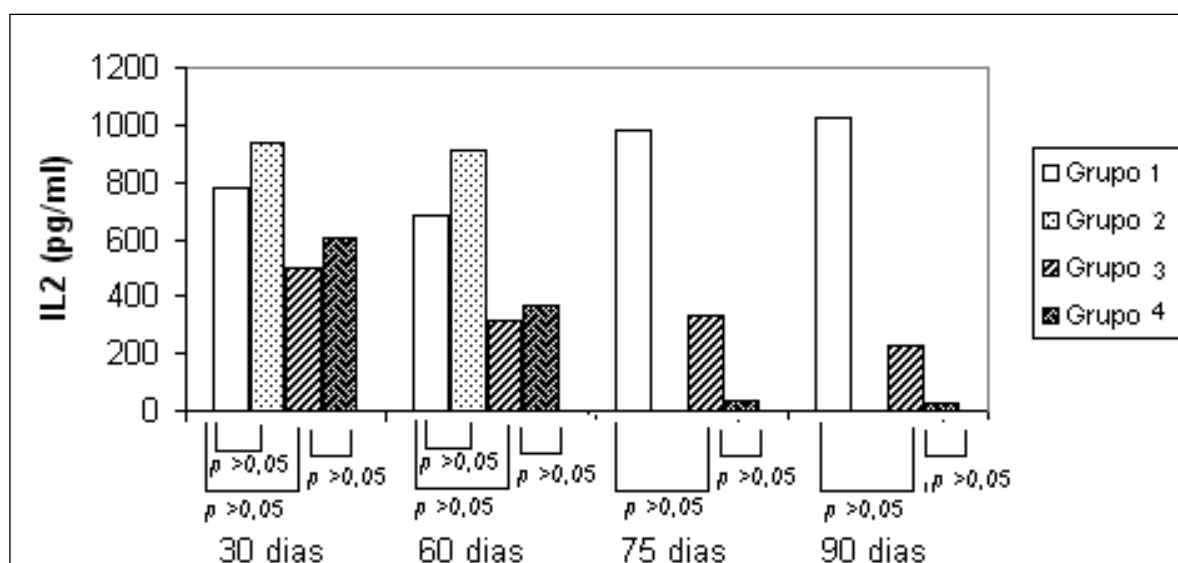


FIGURA 16. Níveis de IL-2 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com concanavalina A, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

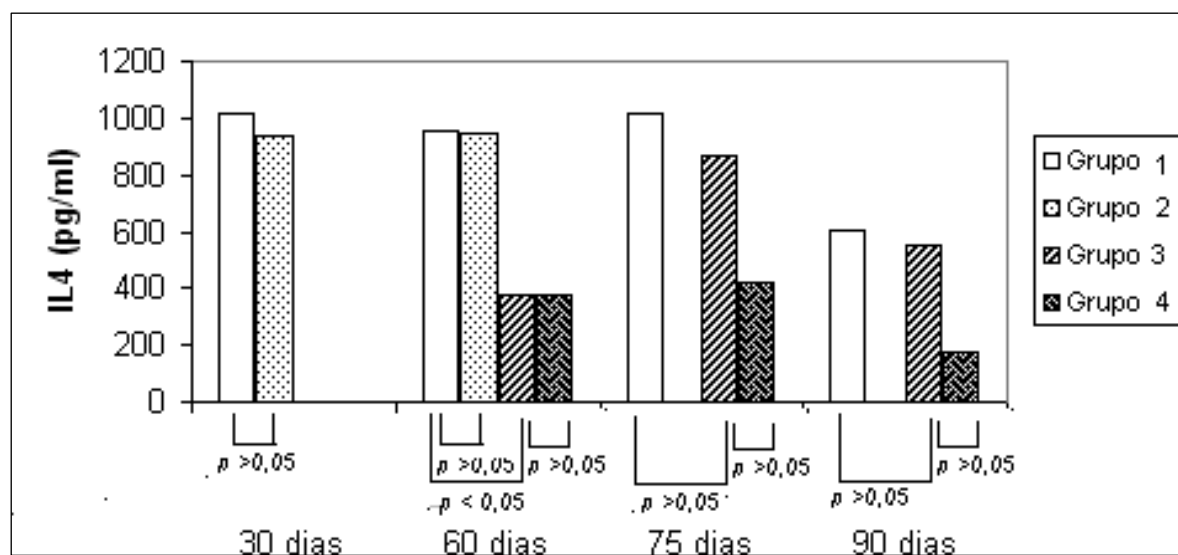


FIGURA 17. Níveis de IL-4 (pg/ml) em culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c, estimuladas com concanavalina A, dos grupos 1, 2, 3 e 4 aos 30, 60, 75 e 90 dias PI. Botucatu, 2008.

5. DISCUSSÃO

Os glicocorticóides, como o acetato de hidrocortisona e a dexametasona, são drogas anti-inflamatórias imunossupressoras⁵³ com múltiplos efeitos inibitórios tanto na resposta inflamatória quanto imune. As propriedades imunomodulatórias da pentoxifilina e seus efeitos sinérgicos com corticóides⁵⁴ podem alterar o curso da infecção pela *Leishmania sp.*

No presente estudo utilizou-se a dexametasona e a pentoxifilina para se realizar a imunossupressão do G2 (não infectado) e G4 (infectado) do dia 60 ao dia 90 PI. Na Tabela 1 observa-se que no dia 60 os grupos G1, G2, G3 e G4 não apresentaram diferença estatística na mediana do peso dos camundongos, sendo que até este momento, nenhum grupo estava imunossuprimido, apenas G3 e G4 estavam com 60 dias de infecção. No entanto, nos dias 75 e 90, a mediana do peso do grupo G2 e do G4 foram menores que as medianas dos seus respectivos grupos controle, G1 e G3. Estes dados sugerem que a dexametasona e a pentoxifilina, quando associadas, podem diminuir o ganho de peso dos camundongos (Figura 3).

O peso e o tamanho do baço sofreram nítida influência tanto da infecção quanto da imunossupressão (Tabela 1, e Figuras 4 e 5). A esplenomegalia nos grupos infectados pode ser em decorrência da infecção por uma espécie de leishmânia viscerotrópica^{31, 35}, neste caso, a *Leishmania chagasi*. Rousseau *et al.*⁷⁰ observaram um aumento do baço de camundongos infectados com *Leishmania infantum* de 140mg para 198mg com 18 dias de infecção, e para 442mg com 70 dias de infecção. De acordo com Kaye *et al.*³⁶, a persistência dos parasitas no baço é acompanhada pela falha da formação do granuloma e pela variedade de mudanças patológicas, incluindo esplenomegalia, alteração da microarquitetura do tecido linfóide e aumento da atividade hematopoiética.

Quanto ao efeito da imunossupressão sobre o baço, pode-se observar que houve uma diminuição do seu peso e tamanho, tanto no grupo não infectado (G2) quanto no grupo infectado (G4) (Tabela 1 e Figura 3). Lebrech *et al.*⁷¹ observaram que muitos parâmetros da imunidade mediada por células foram afetados no tratamento com a dexametasona, e que esta droga ocasionou modificações nos parâmetros imunopatológicos. Os pesos dos baços após a administração desta droga diminuiu significativamente, de maneira dose dependente. Miller *et al.*⁷² relataram que o baço e o timo diminuíram mais de 80% de tamanho, sendo que após a interrupção do tratamento com a dexametasona, o baço aumentou.

Pode-se observar, segundo a Figura 7, que a carga parasitária do fígado do G3 decresceu durante o período de estudo, provavelmente devido a características particulares

deste órgão como o desenvolvimento de granulomas, que é importante para a resistência hepática na leishmaniose^{36, 37}. No dia 30 a carga do fígado foi maior do que a carga do baço (Figuras 6 e 7). Já com 60 dias de infecção, pode-se observar uma inversão, com aumento na carga parasitária do baço e diminuição do fígado, que permaneceu menor até o dia 90. Isto se deve ao fato de que durante a infecção com *Leishmania chagasi* em camundongos, as amastigotas multiplicam-se rapidamente nas primeiras quatro semanas no fígado, e diminui espontaneamente antes da oitava semana. No baço, o aumento do número de parasitas é lento²⁷, e o fígado aparentemente serve como local para expansão inicial do parasita, sendo que o baço pode servir para a persistência da infecção²⁸.

Segundo Engwerda *et al.*³⁵, a infecção hepática é usualmente auto-limitante e a resposta imune hepática é um bom exemplo de resposta inflamatória granulomatosa dominada por células mononucleares envolvendo células de kupffer, monócitos, e linfócitos TCD4 e TCD8. Múltiplas citocinas, incluindo IFN- γ , IL-12, IL-4, níveis moderados de TNF- α produzido no granuloma hepático, e a produção de reativo de oxigênio e reativo intermediário de nitrogênio³⁶ contribuem para a resistência do hospedeiro, especificamente no fígado.

No presente estudo não se detectou aumento significativo da carga parasitária nem do baço e nem do fígado (Tabela 2). Estes resultados discordam dos obtidos por Gangneux *et al.*⁵³, nos quais camundongos tratados com dexametasona e pentoxifilina do 10º ao 40º dia pós-infecção, a carga parasitária do baço e fígado aumentaram significativamente, quando comparadas com o grupo controle, e que nos camundongos tratados com dexametasona na fase crônica da infecção com *L. infantum* a carga parasitária aumentou apenas no baço, sem reativação da *Leishmania* no fígado e medula óssea. A análise da produção de citocinas revelou menor produção de IFN- γ , comparado ao grupo controle, e a concentração de IL-4 não diferiu entre os três grupos. Com estes resultados, concluíram que o aumento da carga parasitária não se associou com o imunofenótipo de células específicas do baço ou com o perfil de secreção de citocinas Th1 e Th2.

Rolão *et al.*⁶⁶ caracterizaram o curso da infecção e resposta imunológica desenvolvida pela *L. infantum* em camundongos Balb/c infectados. A carga parasitária foi determinada por PCR em tempo real enquanto a produção de citocinas e imunoglobulinas foram avaliadas pelo ELISA. DNA de leishmânia foi detectado no baço e no fígado no primeiro dia pós-inoculação e este parasitismo se manteve sustentado até o final do experimento. A cinética das citocinas no baço e no fígado estava geralmente associada com a oscilação da carga parasitária, e esta foi uma particularidade evidenciada nas células não estimuladas. Durante o experimento, não foi observado padrão distinto de produção de citocinas Th1 e Th2. Os camundongos

infectados desenvolveram uma resposta imune mista, com concomitante produção de INF- γ , IL-10 e IL-4, no baço e no fígado e ambos os tipos de IgG. Os resultados sugerem que comparado com o fígado, o baço é mais suscetível à infecção com *L. infantum*.

Quanto à produção de citocinas, podem-se observar níveis concomitantes de INF- γ (Th1) e IL-10 (Th2) tanto nas culturas não estimuladas quanto nas culturas estimuladas com antígeno específico (Figuras 8, 9, 11 e 12).

A detecção de INF- γ não coincidiu com a diminuição da carga parasitária, pois não houve correlação estatística (dados não mostrados). Melby *et al.*³¹ observaram aumento significativo de células produzindo INF- γ comparado com o grupo controle no 28º de infecção, e Rolão *et al.*⁶⁶ observaram que altos níveis de INF- γ coincidiram com a redução da carga parasitária. No entanto, Ansari *et al.*⁷³ afirmam que apesar da presença de níveis elevados de INF- γ durante a infecção, o hospedeiro pode falhar no controle da infecção pela leishmaniasse devido a resposta incompleta do INF- γ , que induz sinalização de mecanismos intracelulares. Talvez os maiores níveis de INF- γ no dia 60 nos grupos G3 e G4 poderiam estar relacionados com o controle da infecção, pois alguns trabalhos afirmam que este controle se inicia com aproximadamente quatro semanas de infecção^{34, 35, 74}.

A IL-10 foi detectada em todos os momentos no G3 e G4 (Figuras 9 e 12). Melby *et al.*⁷⁴ observaram que no início do curso da infecção por *L. infantum* a produção de IL-10 e TGF- β foi mais intensa, mas a partir do 28º dia da infecção, quando a carga parasitária visceral (baço e fígado) começou a declinar, o número de células do baço produtoras de IL-10 iniciava o retorno para níveis basais, mesmo com a produção de INF- γ alta e o número de células produtoras de IL-12 aumentando drasticamente. No presente estudo, detectou-se IL-10 e INF- γ no G3 em todos os momentos (Figuras 8, 9, 11 e 12). Gomes-Pereira *et al.*⁷⁵ observaram que os níveis de IL-10 não foram suficientes para inibir a produção de INF- γ pelos leucócitos hepáticos e subsequente destruição dos parasitas. Isto suporta a hipótese que esta citocina não tem efeito inibitório direto na função do INF- γ na leishmaniose experimental pela *Leishmania infantum*, o que está de acordo com os resultados do presente estudo.

A IL-10 endógena, primariamente regula a morte da *L. donovani* na infecção, pela supressão da produção bem como da resposta de citocinas do tipo Th1 (IL-12 e INF- γ)^{44, 45}. As citocinas anti-inflamatórias TGF- β e IL-10 contribuem para o estabelecimento da infecção^{28, 37, 66}. No entanto, Murray *et al.*¹⁷ acreditam que a exacerbação da doença associada a resposta imune Th2 envolvendo IL-4 e IL-10 não é realmente detectada na infecção visceral experimental.

A IL-10 foi originalmente descrita como uma citocina produzida especificamente por células TCD4⁺Th2, mas estudos posteriores mostraram que esta citocina é secretada tanto por células Th1 quanto por Th2. Novos relatos têm mostrado que a produção de IL-10 por células efectoras Th1 ajudam a limitar o dano colateral causado por uma inflamação exagerada. Mas este controle pode também limitar a eficiência da resposta imune, não sendo efetiva ao tentar eliminar completamente o patógeno⁴¹.

A IL-4 não foi detectada nas culturas não estimuladas e estimuladas com antígeno sonificado em nenhum dos grupos nos dias 30 e 60 (Figuras 10 e 13). Foi detectada apenas no G3 e G4 nos dias 75 e 90. Estudos indicam que a secreção substancial de IL-4 por si só pode não ser suficiente para vencer uma resistência inata, provavelmente pela produção sub-ótima de IL-4, insuficiente secreção do co-fator (IL-10), ou devido a uma possível resposta Th1 bem caracterizada¹⁷.

Gomes-Pereira *et al.*⁷⁵ observaram que durante o experimento para analisar a resposta imune celular hepática em camundongos com fenótipo de “cura” e “não-cura” para a infecção por *Leishmania infantum*, os animais infectados apresentaram níveis baixos ou similares de IL-4 entre os fenótipos. Esta observação confere um papel discreto da IL-4 na doença visceral no fenótipo “não-cura” no fígado.

De acordo com Goto e Lindoso²¹, na LV a IL-4 não está envolvida na suscetibilidade. A ausência de um papel significativo da IL-4 na infecção com *Leishmania* visceral em modelo murino foi observada por vários autores. Rolão *et al.*⁶⁶ observaram que a cinética da IL-4 não se correlacionou com a carga parasitária; Melby *et al.*⁷⁴ não detectaram IL-4 analisando sua produção *in situ* no baço, pela imunoistoquímica; Melby *et al.*³¹ demonstraram a mínima expressão de RNAm de IL-4 em baços de camundongos infectados e, Miralles *et al.*⁴⁸ trataram camundongos com anticorpo anti IL-4 ou receptor solúvel de IL-4, o que não afetou a carga parasitária. No entanto, no modelo com camundongos e *L. major*, a IL-4 se enquadra como as citocinas que não protegem o hospedeiro⁴⁶.

Não foram detectados níveis de IL-2 nas culturas de células não estimuladas e estimuladas com antígeno sonificado. A IL-2 foi detectada apenas nas culturas estimuladas com conA (Tabelas 3, 4 e 5).

O IFN- γ , IL-10 e a IL-2 foram detectadas em todos os momentos e grupos nas culturas estimuladas com a conA, que é um estímulo inespecífico, com algumas variações (Figuras 14, 15 e 16). Estudos sobre a imunossupressão em hamsters devido a infecção com *Leishmania chagasi* mostraram que a conA induz resposta linfoproliferativa em todo o período experimental²¹. No entanto, nos dias 30 e 60 observou-se que os níveis de IL-10 e IL-2 são

menores nos grupos infectados (G3/G4) do que no G1 e G2, e a IL-4 não foi detectada no G3 e G4 no dia 30 (Figura 17). Segundo Mookerjee *et al.*⁷⁶ ocorre dano da resposta linfoproliferativa para mitógenos em hamsters infectados com leishmânia visceral.

De acordo com os resultados do presente estudo, observa-se um padrão misto Th1/Th2 na produção de citocinas até o dia 60. Ambas as espécies de leishmaniose cutânea ou visceral requerem resposta imune Th1 para o controle da infecção nos modelos experimentais. Porém, o conceito Th1/Th2 não parece explicar suscetibilidade e resistência da infecção utilizando modelo experimental com a *Leishmania infantum*⁷⁷. O curso da infecção visceral pela *Leishmania chagasi* em camundongos Balb/c mimetiza estritamente o da *L. donovani*, e os camundongos expressam um fenótipo suscetível mas finalmente de auto-cura. No modelo com *L. chagasi*, a supressão inicial da atividade Th1 (secreção de IFN- γ) não está aparentemente relacionada com IL-4 ou IL-10¹⁷.

O paradigma Th1/Th2 de resistência/suscetibilidade aos parasitas intracelulares parece ser uma simplificação grosseira para uma das cadeias imunes de interações regulatórias/contraregulatórias mais complexas, podendo diferir principalmente, de acordo com a espécie de leishmânia e o modelo experimental utilizado. Vários estudos estão propiciando discernimento da base dos mecanismos imunológicos no controle das consequências das doenças infecciosas, que poderão redundar no desenvolvimento de estratégias apropriadas para intervenção imune ou vacinação¹⁹.

Devido ao tamanho do baço do G2 nos dias 75 e 90, não foi possível obter o número mínimo de 5×10^6 células/mL, o que impossibilitou a realização da cultura celular. Já no grupo infectado e imunossuprimido (G4) não se detectou IFN- γ nas culturas não estimuladas e estimuladas com o antígeno (Figuras 8 e 11). Com relação a IL-10, o G4 não só apresentou níveis detectáveis nos dias 75 e 90, como no dia 90 o nível mediano desta citocina superou o de G3 (Figuras 9 e 12).

Os glicocorticóides têm múltiplos efeitos inibitórios na resposta imune e inflamatória, e os aspectos da ação imunossupressiva são complexos e pouco compreendidos. Os corticóides inibem a síntese e a secreção de IL-2 em células T auxiliaadoras, evitando a expansão clonal de células ativadas dependentes de IL-2. Esta imunossupressão causada pela dexametasona ocorre independente da ativação do receptor da célula T, parecendo envolver uma via sinalizadora regulada por citocinas⁷⁸. Ela inibe ainda, vários aspectos da imunidade citomediada, incluindo linfoproliferação induzida por mitógeno⁷⁹. Na Figura 16, nas culturas estimuladas com a conA, pode-se observar que a mediana do nível de IL-2 no G4 é menor do que a do G3, tanto no dia 75 quanto no dia 90.

De acordo com Franchimont *et al.*⁶⁰ e Kunicka *et al.*⁸⁰ a dexametasona inibe a secreção de IL-10 em culturas de células estimuladas, o que discorda dos resultados desta pesquisa, pois a IL-10 foi detectada tanto com 15 (dia 75) quanto com 30 dias de imunossupressão (dia 90) (Figura 15).

A pentoxifilina é comumente conhecida por diminuir a expressão de antígenos MHC de classe II, e por inibir a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelas células mononucleares periféricas, como por exemplo, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , e MCP-1.

Outro aspecto importante é o estresse físico resultante da manipulação diária para a aplicação das drogas imunossupressoras, o que pode influenciar na produção de citocinas. Moynihan *et al.*⁸¹ demonstraram que o estresse físico ou psicológico pode influenciar na produção de IL-2, IL-4, e IFN- γ pelas células do baço ou de linfonodos *in vitro*. Observaram também que a dexametasona suprime a produção das três citocinas examinadas. Estes dados assinalam para a hipótese de que os glicocorticóides podem regular a produção de citocinas do padrão Th1 ou Th2. Sugerem ainda, que em condições de estresse, nas quais a produção de citocinas e funções efectoras são afetadas, outros fatores neuroendócrinos, além dos glicocorticóides, podem ser relevantes.

6. CONCLUSÕES

A infecção de camundongos com a cepa M6445 de *Leishmania chagasi* não alterou o ganho de peso dos animais, mas sim o peso e o tamanho do baço. A imunossupressão utilizando a dexametasona associada à pentoxifilina afetou tanto ganho de peso, quanto o peso e o tamanho do baço, dos animais infectados e não infectados.

A imunossupressão utilizando dexametasona associada a pentoxifilina não alterou significativamente o curso da carga parasitária, tanto do baço, como do fígado.

A dexametasona e a pentoxifilina afetaram a produção das citocinas estudadas, mas não direcionaram o perfil de resposta Th1/Th2 nos animais infectados.

7. RESUMO

Hoffmann JL. Infecção experimental com *Leishmania chagasi* em camundongos Balb/c submetidos à imunossupressão. Resposta imune celular e carga parasitária. [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2008.

A resposta imune na leishmaniose pode resultar em uma polarização da subpopulação dos linfócitos T, levando a um fenótipo celular distinto, que resultam em proteção imune ou exacerbação da doença. As leishmânias persistem no organismo tanto em infecções assintomáticas como após o tratamento, representando risco em condições de imunossupressão. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da infecção e da imunossupressão com dexametasona associada à pentoxifilina, sobre o peso dos animais, peso do baço, carga parasitária do baço e do fígado, e da imunopatologia quanto à produção de IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-2 em cultura de células esplênicas de camundongos Balb/c infectados com *Leishmania chagasi*. A infecção não alterou o ganho de peso dos animais, mas sim o peso e o tamanho do baço. A imunossupressão utilizando a dexametasona associada à pentoxifilina afetou tanto ganho de peso, quanto o peso e o tamanho do baço, de animais infectados e não infectados. A imunossupressão não alterou significativamente o curso da carga parasitária, tanto do baço, como do fígado. A dexametasona e a pentoxifilina afetaram a produção das citocinas estudadas, mas não direcionaram o perfil de resposta Th1/Th2 nos animais infectados.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*; imunossupressão; resposta citomediada; carga parasitária; infecção experimental.

8. ABSTRACT

Hoffmann JL. Experimental infection with *Leishmania chagasi* in immunosuppressed Balb/c mice. Cellular immune response and parasite burden. [Dissertation]. Botucatu: Medical School, UNESP – São Paulo State University; 2008.

The immune response in leishmaniasis can result in a polarization of a subpopulation of T lymphocytes, leading to a different cell phenotype, resulting in immune protection or exacerbation of the disease. Leishmanias persist in the body both in asymptomatic infections and after the treatment, representing risk in terms of immunosuppression. The objective of this study was to evaluate the effect of infection and immunosuppression with dexamethasone associated with pentoxifylline on the weight of the animals, weight of the spleen, the parasitic load in the spleen and liver, and immunopathology on the production of IFN- γ , IL - 10, IL-4, and IL-2 in spleen cell culture of Balb/c mice infected with *Leishmania chagasi*. The infection did not alter the animals' weight gain, but the weight and size of the spleen increased. The immunosuppression using dexamethasone associated with pentoxifylline affected both weight gains, as the weight and size of the spleen of infected and not infected animals. The immunosuppression did not alter significantly the course of the parasite burden of the spleen and the liver. Dexamethasone and pentoxifylline affected the studied cytokines production, but not influenced the profile of Th1/Th2 response in infected animals.

Key words: *Leishmania chagasi*; immunosuppression; cyto mediated response; parasite burden; experimental infection.

9. REFERÊNCIAS*

1. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 2002; 72: 132-41.
2. Ross, R. Notes on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Br Med J* 1903; 2237: 1261-2.
3. Nicolle C. Sur trois cas d infection splénique infantile à corps de Leishman observés in Tunisia. *Arch Inst Pasteur* 1908; 3: 1-26.
4. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Kellick-Kendrick R. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press; 1987. v.1, p. 1-120.
5. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 517.
6. Maurício IL, Stohard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 2000; 16: 188-99.
7. Lukes J, Maurício IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 9375-9380.
8. Alvar J. *Leishmania* and HIV co-infection in the Mediterranean countries. Canine Leishmaniasis: an update. *Proc Int Canine Leishmaniasis* 1999; 78-81.
9. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *The Lancet* 2005; 366: 1561-77.
10. Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad. Saúde Pública* 2004; 20: 259-65.
11. Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramello C, Llano R, Velez ID. Binomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. *J Med Entomol* 1996; 33: 278-85.
12. Galati EAB, Nunes VBL, Rego Jr FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1997; 31: 378-90.

* As referências bibliográficas seguem as normas sugeridas pelo *International Committee of Medical Journal Editors* ("Vancouver"): International Committee of Medical Journal Editors, Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals. *Ann Intern Méd.* 1997; 126: 36-47.

13. Santa Rosa ICA, Oliveira ICS. Leishmaniose Visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clín Vet* 1997; 11: 24-8.
14. Abbas AB, Lichtman MD, Prober JS. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000. p. A553.
15. Pinelli E, Rutten VMG, Ruitenberg EJ. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: an update. *Proc Int Canine Leishmaniasis* 1999; 60-4.
16. Hailu A, Van Baarle D, Knol GJ, Berhe N, Miedema F, Kager PA. T cell subset and profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. *Clin Immunol* 2005; 117: 182-91.
17. Murray HW, Hariprashad J, Coffman, RL. Behavior of visceral *Leishmania donovani* in an experimentally induced T helper cell 2 (Th2) – associated response model. *J Exp Med* 1997; 185(5): 867-74.
18. Oliveira TS, Capp Neto M, Martins BJA, Rodrigues HA, Antonio RMP, Magalhães AV. Action of pentoxifylline on experimental cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(4): 477-82.
19. Alexander J, Bryson K. T helper(h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 2005; 99: 17-23.
20. Pinto AR, Beyrodt CGP, Lopes RAM, Barbiéri CL. Identification of 30 kDa antigen from *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes implicated in protective cellular responses in a murine model. *Int J Parasitol* 2000; 30: 599-607.
21. Goto H, Lindoso JAL. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 615-23.
22. Requena JM, Soto M, Doria MD, Alonso C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 76: 269-81.
23. Rodrigues Jr V, Silva JS, Campos-Neto A. Selective inability of spleen antigen presenting cells from *Leishmania donovani* infected hamsters to mediate specific T cell proliferation to parasite antigens. *Parasite Immunol* 1992; 14: 49-58.
24. Rosypal AC, Zajac AM, Troy GC, Lindsay DS. Infections in immunocompetent and immune-deficient mice with promastigotes of a North American isolate of *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 2005; 130: 19-27.
25. Rolão N, Melo C, Campino L. Influence of the inoculation route in Balb/c mice infected by *Leishmania infantum*. *Acta Trop* 2004; 90: 123-6.

26. Titus RG, Ribeiro JM. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 1988; 239: 1306-8.
27. Wilson ME, Weinstock JV. Hepatic granulomas in murine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *Methods* 1996; 9: 248-54.
28. Wilson ME, Jeronimo SMB, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog* 2005; 38: 147-60.
29. Mattner F, Di Padova K, Alber G. Interleukin-12 is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infect Immun* 1997; 65: 4378-83.
30. Menon JN, Bretscher PA. Characterization of the immunological memory state generated in mice susceptible to *Leishmania major* following exposure to low doses of *L. major* and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. *Eur J Immunol* 1996; 26: 243-9.
31. Melby PC, Yang YZ, Cheng J, Zhao W. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 1998; 66: 18-27.
32. Ahmed S, Colmenares M, Soong L, Goldsmith-Pestana K, Munstermann L, Molina R, et al. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 2003; 71: 401-10.
33. Mbatia PA. Standardization of *Leishmania donovani* parasite inoculum dose and route of challenge for use in infectivity studies: is it necessary? *East Afr Med J* 1995; 72: 804.
34. Murray HW, Stern JJ, Welte K, Rubin BY, Carriero SM, Nathan CF. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon- γ , tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon- γ . *J Immunol* 1987; 138: 2290-7.
35. Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2004; 20: 524-530.
36. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 2004; 201: 239-53.
37. Malla N, Mahajan RC. Pathophysiology of visceral leishmaniasis-some recent concepts. *Indian J Med Res* 2006; 123: 267-74.
38. Melby PC, Tabares A, Restrepo BI, Cardona AE, McGuff HS, Teale M. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol* 2001; 99: 17-25.

39. Kaye PM, Curry AJ, Blackwell JM. Differential production of T_H1 e T_H2- derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1991; 146: 2763-70.
40. Murray HW, Miralles GD, Stoeckle MY, Mcdermott DF. Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1993; 151: 929-38.
41. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med* 2007; 204: p. 239-43.
42. Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YAW, Siddig M, Hashim AM, El-Hassan AM, et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest* 1993; 92: 324-329.
43. Murray HW, Lu Christina M, Mauze S, Freeman S, Moreira AL, Kaplan G, et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect and Immun* 2002; 62: 84-93.
44. Murray HW, Moreira AL, Devecchio JL, Matsuhashi M, Ma XJ, Heinzl FP. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 2003; 188: 458-64.
45. Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrel JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2848-56.
46. Bogdan C, Gessner A, Solbach W, Rollinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Immun Infect* 1996; 8: 517-25.
47. Mazumdar T, Anam K, Ali N. A mixed Th1/Th2 response elicited by a liposomal formulation of *Leishmania* vaccine instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania donovani* in susceptible BALB/c mice. *Vaccine* 2004; 22: 1162-71.
48. Miralles GD, Stoeckle MY, Mcdermott DF, Finkelman FD, Murray HW. T_H1 and T_H2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 1994; 62: 1058-63.
49. Rousseau D, Suffia I, Ferrua P, Philip Y, Fichoux L, Kubar J. Prolonged administration of dexamethasone induces limited reactivation of visceral leishmaniasis in chronically infected BALB/c mice. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9: 655-62.
50. Ferreira MS, Borges AS. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 443-57.
51. Fernández-Guerrero ML, Robles P, Rivas P, Mójer F, Muñiz G, Górgolas M. Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. *Acta Trop* 2004; 90: 11-16.

52. Stahl W, Matsubayashi H, Akao S. Modification of subclinical toxoplasmosis in mice by cortisone, 6- mercaptopurine and splenectomy. *Am J Trop Med Hyg* 1966; 15: 869.
53. Gangneuxs JP, Sulahian FC, Derouin F, Garin YJF. Effects of immunosuppressive therapy on murine *leishmania infantum* visceral leishmaniasis. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10: 557-9.
54. Funk JO, Ernst M, Schönharting MM, Zabel P. Pentoxifylline exerts synergistic immunomodulatory effects in combination with dexamethasone or cyclosporin A. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17: 1007-16.
55. Finamor LP, Finamor Jr F, Muccioli C. Corticoterapia e Uveítes. *Arq Bras Oftalmol* 2002; 65: 483-6.
56. Moynihan JA, Callahan TA, Kelley SP, Campbell LM. Adrenal hormone modulation of type 1 and type 2 cytokine production by spleen cells: dexamethasone and dehydroepiandrosterone suppress interleukin-2, interleukin-4, and interferon-gamma production in vitro. *Cell Immunol* 1998; 184: 58-64.
57. Krouwels FH, Van Der Heijden JF, Lutter R, Van Neerven RJ, Janse HM, Out TA. Glucocorticosteroids affect functions of airway-and blood-derived human T cell clones, favoring the Th1 profile through two mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14: 388- 97.
58. Ramierz F, Fowell DJ, Puklavek M, Simmonds S, Mason D. Glucocorticoids promote a Th2 cytokine response by CD4⁺ T cells in vitro. *J Immunol* 1996; 156: 2406-12.
59. Elenkov IJ. Glucocorticóids and Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1024: 138-46.
60. Franchimont D, Louis E, Dewe W, Martens H, Vrindts-Gevaert Y, Groote D, et al. Effects of dexamethasone on the profile of cytokine secretion in human whole blood cell cultures. *Regul Pept* 1998; 73: 59-65.
61. Lin S-L, Chen Y-M, Chiang W-C, Tsai T-J, Chen W-Y. Pentoxifylline: a potential therapy for chronic kidney disease. *Nephrology* 2004; 9: 184-204.
62. Curl JL, Peters LL. Ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride anesthesia in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Lab Anim* 1983; 17: 290–3.
63. Stauber LA, Franchino EM, Grun J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in golgen hamsters. *J Protozool* 1958; 5: 269-73.
64. Buffet PA, Sulahian A, Garin YJF, Nassar N, Derouin F. Culture microtitration: sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother* 1995; 39: 2167-8.

65. Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin J F, Sulahian A, Rivollet D, et al. Real-Time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. Clin Diag Lab Immunol 2001; 8: 828-31.
66. Rolão N, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L. *Leishmania infantum*: Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. Exp Parasitol 2007; 115: 270-6.
67. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-75.
68. Hollander M, Wolfe DA. Nonparametric statistical methods. New York: John Wiley; 1973.
69. Jekel JF, Katz DL, Joann GE. Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva. Porto Alegre: Artmed; 2006.
70. Rousseau D, Le Fichoux Y, Stien X, Suffia I, Ferrua B, Kubar J. Progression of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in BALB/c mice is markedly slowed by prior infection with *Trichinella spiralis*. Infect Immun 1997; 65: 4978-83.
71. Lebrech L, Blot C, Pequet S, Roger R, Bohuon C, Pallardy M. Immuno toxicological investigation using pharmaceutical drugs: in vivo evaluation of immune effects. Fundam Appl Toxicol 1994; 23: 159-68.
72. Miller TA, Schaefer FW. Changes in mouse circulation leukocyte numbers in C57BL/6 mice immunosuppressed with dexamethasone for *Cryptosporidium parvum* oocyst production. Vet Parasitol 2007; 149: 147-57.
73. Ansari NA, Saluja S, Salotra P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. Clin Immunol 2006; 119: 339-45.
74. Melby P, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: Progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. Immunol 2001; 166: 1912-20.
75. Gomes-Pereira S, Rodrigues OR, Rolão N, Almeida PD, Santos-Gomes, GM. Hepatic cellular immune responses in mice with “cure” and “non-cure” phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8⁺ T cells and TGF-beta production. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 41: 59-68.
76. Mookerjee A, Sen PC, Ghose AC. Immunosuppression in hamsters with progressive visceral leishmaniasis is associated with an impairment of protein kinase C activity in their lymphocytes that can be partially reversed by okadaic acid or anti-transforming growth factor β antibody. Infect Immun 2003; 71: 2439-46.

77. Honoré S, Garin YJF, Sulahian A, Gangneux JP, Derouin F. Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral Leishmania infantum infection. FEMS Immunol Med Microbiol 1998; 21: 231-9.
78. Sierra-Honigsmann MR, Murphy PA. T cell receptor-independent immunosuppression induced by dexamethasone in murine T helper cells. J Clin Invest 1992; 89:556-560.
79. Baus E, Andris F, Dubois P, MM Urbain J, Leio O. Dexamethasone inhibits early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes. Immunol 1996; 156: 4555-4560.
80. Kunicka JE, Talle MA, Denhardt GH, Brown M, Prince LA, Goldstein G. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. Cell Immunol 1993; 149: 39-49.
81. Moynihan JÁ, Callahan TA, Kelley SP, Campbell LM. Adrenal hormone modulation of type 1 and type 2 cytokine production by spleen cells: dexamethasone and dehydroepiandrosterone suppress interleukin-2, interleukin-4, and interferon- γ production *in vitro*. Cell Immunol 1998; 184: 58-64.

10. ANEXO A – Parecer de aprovação pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEEAA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



fmvz - unesp

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

ATESTADO

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa de “**Infecção experimental com *Leishmania chagasi* em camundongos Balb/c submetidos à imunossupressão. Resposta imune celular e carga parasitária**”, Protocolo nº 143/2005-CEEAA, do Pós-graduando **Juliano Leônidas Hoffmann**, nível Mestrado do Programa de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP, campus de Botucatu, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 28 de julho de 2008.

Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica

Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 18618-000

☎/fax: 14-3811-6105 – ✉ sta@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br

11. ANEXO B – Lista de drogas e materiais utilizados

- 1) Ketamina: Cetamin – Lab. Syntec do Brasil, Campinas/SP.
- 2) Xilazina: Anasedan – Vetbrands Saúde Animal, Jacareí/SP.
- 3) Dexametasona: Decadron[®] - Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., Campinas/SP.
- 4) Pentoxifilina: Trental[®] - Aventis Pharma Ltda., Suzano/SP.
- 5) Meio Drosophila de Schneider: Gibco – Invitrogen, Grand Island, NY, USA.
- 6) Soro fetal bovino inativado/estéril: Gibco – Invitrogen, Grand Island, NY, USA.
- 7) Penicilina/estreptomicina: Cultilab – Materiais para Cultivo Celular Ltda., Campinas/SP.
- 8) Placas de microtitulação de 96 poços: Nunc – Naperville, USA.
- 9) Meio de cultura de células RPMI1640: Cultilab – Materiais para Cultivo Celular Ltda., Campinas/SP.
- 10) L-Glutamina: Dinâmica – Reagentes Analíticos Ltda., Diadema/SP.

12. ANEXO C – Fórmulas e reagentes

Líquido de Turk

1,5 % de Ácido Acético

1% de Violeta Genciana

Água destilada QSP 100mL

Solução Salina Tamponada (SST) de fosfatos 0,01M, pH 7,2

Cloreto de sódio	8,18g
Fosfato monobásico de potássio	1,05g
Fosfato dibásico de potássio	0,31g
Água destilada	1000mL