

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Rosidete Pereira de Bastos

**Infecção murina por isolados de *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis*: avaliação da participação de
leucotrienos endógenos.**

Orientadora:

Profa. Dra. Fátima Ribeiro-Dias

Co-orientadora:

Profa. Dra. Miriam L. Dorta

Dissertação de Mestrado

Goiânia- GO, 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

Rosidete Pereira de Bastos

**Infecção murina por isolados de *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis*: avaliação da participação de
leucotrienos endógenos.**

Orientadora:

Profa. Dra. Fátima Ribeiro-Dias

Co-orientadora:

Profa. Dra. Miriam L. Dorta

**Dissertação submetida ao CPGMT/IPTSP/UFG como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre em Medicina
Tropical na Área de Concentração de Imunologia**

**Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro:
CNPq/SECTEC.**

Goiânia- GO, 2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)

Bastos, Rosidete Pereira.

Infecção murina por isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis*: avaliação da participação de leucotrienos endógenos [manuscrito] / Rosidete Pereira de Bastos. - 2008.

xv, 95 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Ribeiro Dias; Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Miriam Leandro Dorta

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2008.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu concluísse esse trabalho. Muitos participaram auxiliando nas atividades práticas, na manutenção do laboratório, manuseio dos camundongos, na realização dos experimentos, e mesmo com palavras de apoio e incentivo.

À minha família, pelo respeito, carinho, imensurável amor, apoio financeiro e ensinamentos que ajudaram na formação do meu caráter. Mesmo à distância sempre se mostraram presentes na minha vida, prontos para me acolher, chorar comigo as minhas decepções, festejar comigo as conquistas e buscar soluções para os meus problemas. Obrigada Mãe, papai, meus irmãos, minhas amadas irmãs Nilvânia, Nilva e Neide. Parte disso eu devo a vocês.

À minha querida amiga e professora, Fátima Ribeiro-Dias, à qual carrega tantos predicados, quero mostrar meus profundos agradecimentos. Esta orientadora que desperta forte admiração pela sua brilhante capacidade de fazer ciência e extrair resultados nas mais adversas situações. Como pessoa, é um exemplo de moralidade, sinceridade e sensibilidade, sempre esteve acessível para ajudar em quaisquer problemas que me afligiu. A você, Fátima, palavras são insuficientes para agradecer pela oportunidade, apoio e generosidade. Muitíssimo abrigada.

À minha querida amiga e professora, Miriam L. Dorta, que além da imprecindível colaboração na realização dos experimentos, me mostrou com seu gesto de generosidade o quanto é importante a presença dos amigos. Além de ser uma pesquisadora e professora com muito mérito, agora é também mamãe de duas crianças lindas. Serei eternamente grata.

Ao professor Dr. Milton A. P. Oliveira, pelo carinho, dedicação, e pelos ensinamentos de imunologia e no manuseio dos camundongos do biotério. A sua contribuição foi importantíssima para a realização deste trabalho.

À professora Dra Glória M. Collet Lima, pela convivência, ensinamentos importantes para o conhecimento das leishmanias e pela oportunidade de intercâmbio com

uma instituição de grande porte como a USP.

Ao Dr. Henrique Serezani pela inestimável colaboração ao doar os fármacos usados nos experimentos.

À professora Dra Lucile M. Floeter-Winter pela oportunidade ímpar de conhecer e realizar alguns trabalhos de biologia molecular no seu laboratório (USP), os quais foram contemplados neste trabalho.

Ao professor Dr. Ruy S. Lino Jr pela auxílio na confecção e análises dos histopatológicos dos camundongos, e pela contribuição durante a participação na Banca do Exame de Qualificação.

À professora Dra. Valéria pelas sugestões e participação na Banca do Exame de Qualificação.

Às amigas e companheiras Joelma G. Oliveira e Cibeli Dantas que têm me acompanhado nestes dias de jornada com os camundongos, inclusive aos fins de semana; e a mais recente amiga, Keila Alcântara, que embora pouco tempo esteve no laboratório, também contribuiu para esse trabalho.

Ao amigo Hermínio Maurício R. Sobrinho, pelas horas agradáveis de conversas e palavras amigas.

Agradeço de maneira bem especial ao amigo e companheiro Helio Galdino Jr, pelas horas de trabalho compartilhadas, pelos “quebra galhos” trocados durante os nossos experimentos, inclusive nos finais de semana e pelas palavras de conforto nas horas em que tudo estava dando errado.

Às amigas e colegas do laboratório, Tatiana, Alause e Vânia, pela contribuição e amizade com que sempre me dirigiram.

Aos meus amigos pessoais, Eliane, Paulinho, Isabel e Isabel Cristina pela amizade e cumplicidade nas horas difíceis.

Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve, e a vida é muito bela para ser insignificante. (Charles Chaplin)

SUMÁRIO

RESUMO

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana.....	1
1.1.1. Características Gerais.....	1
1.1.2. A resposta imune na LTA: enfoque nos modelos murinos.....	7
1.1.3. Imunologia da infecção murina por <i>L. (V.) braziliensis</i>	14
1.2. Os leucotrienos.....	17
1.2.1.Características Gerais.....	17
1.2.2. Os leucotrienos nas infecções	21
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. METODOLOGIA.....	26
3.1. Obtenção e manutenção dos parasitos.....	26
3.1.1. Obtenção dos isolados de <i>Leishmania</i> sp.....	26
3.1.2. Dados dos pacientes.....	26
3.1.3. Cultivo e manutenção dos parasitos <i>in vitro</i>	27
3.2. Camundongos.....	27
3.3. Caracterização da espécie dos parasitos.....	27
3.3.1. Extração do DNA genômico.....	27
3.3.2. Identificação da espécie.....	28
3.4. Avaliação do crescimento <i>in vitro</i> dos parasitos.....	28
3.5. Avaliação do desenvolvimento da lesão após inóculo dos isolados IMG3 e RPL5 em camundongos C57BL/6, BALB/c e em camundongos deficientes em IFN γ (C57BL/6 IFN γ KO).....	29
3.6. Estimativa da carga parasitária nos camundongos C57BL/6, BALB/c e C57BL/6 IFN γ KO infectados com IMG3 ou RPL5: ensaio da diluição limitante.....	30
3.7. Análises histopatológicas das lesões causadas pelos isolados IMG3 e RPL5.....	30
3.8. Avaliação da indução de NO pelos isolados IMG3 e RPL5 em células Raw 264.7 e sua modulação pelos leucotrienos endógenos.....	31

3.9. Avaliação da infecção de macrófagos de camundongos C57BL/6 com o isolado IMG3: indução de NO e modulação da atividade microbicida dos macrófagos pelos leucotrienos endógenos.....	32
3.10. Tratamento dos camundongos C57BL/6 com inibidor de leucotrienos: avaliação da evolução da lesão causada pelo isolado IMG3.....	33
3.11. Análises estatísticas.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Características dos pacientes com LTA dos quais foram obtidos os parasitos.....	34
4.2. Confirmação da espécie dos isolados <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 e RPL5.....	34
4.3. Perfil do crescimento in vitro dos isolados de <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 e RPL5.....	36
4.4. Características da infecção com os isolados <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 e RPL5 em camundongos C57BL/6, BALB/c e C57BL/6 IFN γ KO.....	37
4.5. Avaliação da participação dos leucotrienos endógenos na infecção camundongos C57BL/6 por isolados de <i>L. (V.) braziliensis</i>	42
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÕES.....	59
6.1. Conclusão geral	59
6.2. Conclusões específicas.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HEDH - 5-hidroxi-eicosanóide desidrogenase

5-HETE - ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico

5-HpETE - ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenóico

5-LO - 5 lipoxigenase

5-oxoETE - ácido 5-oxo-eicosatetraenóico

AA - ácido araquidônico

ATP - adenosina trifosfato

cAMP - *cyclic adenosine monophosphate* (AMP cíclico)

CMN - células mononucleares

cPLA₂ - fosfolipase A₂ citosólica

CR3 - receptor para C3bi

CysLT - Cys leucotrienos

DNA - *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DO - *optical density* (densidade óptica)

EDTA - *ethylenediamine tetracetic acid* (ácido etilenodiaminotetracético)

FcγR - receptor para a porção Fc de IgG

FLAP - *5-LO-activating protein* (proteína ativadora de 5-LO)

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde

G6PD - *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (glicose-6-fosfato desidrogenase)

GM-CSF - *granulocyte and macrophage-colony stimulating factor* (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos)

HDT - Hospital de Doenças Tropicais

IFI - Imunofluorescência Indireta

IFNγ - Interferon gama

IFNγ KO – deficiente de Interferon gama

IL-1β - Interleucina 1 beta

IL-12 - Interleucina 12

IL-12Rβ2 - cadeia β2 do receptor de IL-12

IL-13 - Interleucina 13

IL-18 - Interleucina 18

IL-1α - Interleucina 1 alfa

IL-23 - Interleucina 23

IL-4 - Interleucina 4

iNOS - *inducible nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase induzida)

Jak - *Janus kinase*

kDNA - DNA do cinetoplasto

LC - Leishmaniose cutânea

LCD - Leishmaniose cutânea disseminada

LCDf - Leishmaniose cutânea difusa

LCL - Leishmaniose cutânea localizada

LM - Leishmaniose mucosa

LPS - lipopolissacarídeo

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LTA₄ - leucotrieno A₄

LTB₄ - leucotrieno B₄

LTC₄ - leucotrieno C₄

LTE₄ - leucotrieno E₄

M1 - macrófago classicamente ativado

M2 - macrófago alternativamente ativado

MAPK - *mitogen-activated protein kinase* (proteína quinase ativada por mitógenos)

MCP -1 - *monocyte chemoattractant protein-1* (proteína quimiotática para monócitos)

NADPH-oxidase - *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase* (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase)

NK - *natural killer* (citotóxicas naturais)

NO - *nitric oxide* (óxido nítrico)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAF - *platelet-activating factor* (fator ativador de plaquetas)

PBS - *phosphate buffer saline* (salina tamponada com fosfato)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação de Polimerase em Cadeia)

PI3K - *phosphatidylinositol 3-kinase* (fosfatidil inositol-3-quinase)

PKA - *protein kinase A* (proteína quinase A)

PLA_{2s} - fosfolipase A₂ secretória

PMN - polimorfonucleares

PPARα - *peroxisome proliferator-activated receptor* (receptor ativado por proliferador de peroxissomo)

ROI - *reactive oxygen intermediates* (intermediários reativos do oxigênio)

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SSU rDNA - *small subunits coding sequences* (pequenas subunidades de seqüências de DNA ribossomal)

STAT4 - *signal transducer and activator of transcription 4* (transdutor de sinal e fator de transcrição 4)

TGF β - *transforming growth factor beta β* (fator transformador do crescimento beta)

Th1 - *T helper 1* (linfócitos T auxiliares 1)

Th2 - *T helper 2* (linfócitos T auxiliares 2)

TLR - *Toll-like receptor* (receptores similares à proteína *Toll*)

TNF α - *tumour necrosis factor alfa* (fator de necrose tumoral alfa)

Treg - *regulatory T cell* (células regulatórias)

TyK2 - *Tyk2 kinase*

WHO - *World Health Organization*

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes	35
Tabela 2. Dados laboratoriais dos pacientes.....	35
Figura 1. Isolados IMG3 e RPL5 são <i>L. (V.) braziliensis</i>	36
Figura 2. Curva de crescimento <i>in vitro</i> dos isolados <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 e RPL5.....	37
Figura 3. Evolução da lesão em camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com os isolados <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 e RPL5.....	39
Figura 4. Evolução da lesão em camundongos C57BL/6 IFN γ KO infectados com os isolados <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 e RPL5.....	40
Figura 5. Avaliação da carga parasitária dos baços e linfonodos drenantes da lesão de camundongos C57BL/6, BALB/c e C57BL/6 IFN γ KO infectados com os isolados <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 e RPL5.....	43
Figura 6. Fotomicrografias dos cortes histopatológicos das patas dos camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 após 12 semanas de infecção.....	44
Figura 7. Fotomicrografias dos cortes histopatológicos das lesões causadas pelos isolados IMG3 e RPL5 em camundongos C57BL/6 IFN γ KO.....	45
Figura 8. Indução de NO pelos isolados <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 e RPL5 em macrófagos murinos RAW 264.7.....	46
Figura 9. Leucotrienos endógenos não modulam a produção de NO induzida pelo isolado <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3 em macrófagos murinos RAW 264.7.....	48
Figura 10. Avaliação da atividade microbicida de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3.....	49
Figura 11. Inibição da síntese de leucotrienos <i>in vivo</i> não altera a evolução da lesão em camundongos C57BL/6 infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> IMG3.....	50

RESUMO

A imunologia da infecção murina por *Leishmania (Viannia) braziliensis* é pouco conhecida, especialmente considerando a imunidade inata e a participação dos leucotrienos nos mecanismos de resistência à infecção. Os leucotrienos são mediadores lipídicos da inflamação que ativam mecanismos microbicidas dos leucócitos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil da infecção de camundongos BALB/c e C57Bl/6 por dois isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de pacientes com leishmaniose cutânea e o envolvimento dos leucotrienos endógenos na resistência à infecção. Para isto, os isolados denominados IMG3 e RPL5 foram identificados como *L. (V.) braziliensis* por meio de técnicas moleculares e foram avaliados quanto ao crescimento *in vitro* em meio Grace (26°C), e quanto ao curso da evolução da lesão, em camundongos BALB/c e em C57Bl/6. Camundongos C57Bl/6 geneticamente deficientes em interferon gama (IFN γ) foram infectados para avaliar a importância desta citocina no controle da infecção. A carga parasitária foi obtida pelo ensaio da diluição limitante em linfonodos drenantes da lesão e nos baços. As patas dos camundongos BALB/c e C57Bl/6 foram colhidas após 12 semanas de infecção, e dos camundongos deficientes em IFN γ , na 4ª semana, e foram processadas para análises histopatológicas. A capacidade de indução de óxido nítrico (NO) pelos isolados foi avaliada em culturas de células RAW 264.7 tratadas ou não com IFN γ e lipopolissacarídeo (LPS), sendo os nitritos detectados por reação de Griess. A regulação da produção de NO pelos leucotrienos endógenos foi avaliada por tratamento das culturas de macrófagos com um inibidor de 5-lipoxigenase (5-LO) e um antagonista de receptor de leucotrieno B₄ (LTB₄). A atividade microbicida dos macrófagos foi avaliada em macrófagos peritoneais (C57Bl/6) infectados com o isolado IMG3, sendo o NO inibido por aminoguanidina. O efeito da inibição de leucotrienos, *in vivo*, foi avaliado em camundongos C57Bl/6 infectados com o isolado IMG3 e tratados com um inibidor de 5-LO. As curvas de crescimento *in vitro* foram similares para os dois isolados e os parasitos no 5º dia de cultivo foram usados nos experimentos de infecção. O curso da lesão foi similar entre os dois isolados nos camundongos BALB/c e C57Bl/6, porém enquanto a lesão regrediu nos C57Bl/6, nos camundongos BALB/c, a lesão foi persistente até a 12ª semana de infecção. Em camundongos deficientes em IFN γ houve crescimento progressivo das lesões e visceralização, tanto com o isolado IMG3 quanto com o RPL5. Confirmando estes dados, a carga parasitária nos linfonodos drenantes da lesão nos camundongos BALB/c foi maior do que a encontrada nos C57Bl/6 após 12 semanas de infecção com IMG3 e os parasitos (IMG3 e RPL5) foram encontrados em cerca de 50% dos baços dos camundongos deficientes em IFN γ . As análises histopatológicas mostraram um acentuado infiltrado inflamatório na derme, com macrófagos vacuolizados repletos de parasitos nos camundongos BALB/c (12 semanas), e nos deficientes de IFN γ (4 semanas), mas não nos camundongos C57Bl/6 (12 semanas), similarmente para IMG3 e RPL5. Os isolados IMG3 e RPL5 induziram NO em células RAW 264.7 em sinergismo com IFN γ e os leucotrienos endógenos não alteraram a produção de NO destas células. Macrófagos peritoneais murinos mostraram atividade microbicida de maneira dependente de NO. A inibição *in vivo* da síntese de leucotrienos não alterou o curso da infecção pelo isolado IMG3 em camundongos C57Bl/6. Coletivamente, os dados mostram que o camundongo BALB/c é suscetível à infecção pelos dois isolados, enquanto o C57Bl/6 é resistente; o IFN γ é essencial para o controle da infecção; os isolados induzem a produção de NO, o qual contribui para a eliminação dos parasitos; e os dados sugerem que os leucotrienos endógenos não estão envolvidos nos mecanismos de resistência dos camundongos C57Bl/6 a *L. (V.) braziliensis*.

ABSTRACT

The knowledge about immunology of *Leishmania (Viannia) braziliensis*-murine infection is poorly known, especially concerning innate immune response and the involvement of leukotrienes in the resistance mechanisms. Leukotrienes are lipid mediators of inflammation that activate microbicidal mechanisms in leukocytes. The present study aimed to evaluate the BALB/c and C57Bl/6 murine infection with two *L. (V.) braziliensis* isolates obtained from cutaneous leishmaniasis patients and the involvement of leukotrienes in the resistance of infection. Thus, IMG3 and RPL5 isolates were identified as *L. (V.) braziliensis* by using molecular techniques and the *in vitro* growth of parasites in Grace's medium (26°C) was evaluated. The time course of lesion after footpad infection was followed in BALB/c and C57Bl/6 mice. C57Bl/6 mice genetically deficient in interferon gamma (IFN γ) were infected to evaluate the relevance of this cytokine in resistance. The parasite burden in draining lymph nodes and spleens was detected by limiting dilution assay. BALB/c- and C57Bl/6-infected footpads were processed after 12 weeks of infection and those from IFN γ -deficient mice after 4 weeks for histopathological analyses. Tissue sections were stained by hematoxylin-eosin. Parasite capacity to induce nitric oxide (NO) was analyzed in RAW 264.7 cell cultures treated or not with IFN γ and lipopolysaccharide (LPS). Nitrites were detected by using Griess reaction. The NO modulation by endogenous leukotrienes was evaluated through treatment of the cultures with a 5-lipoxygenase (5-LO) inhibitor and a leukotriene B₄ (LTB₄) antagonist. Macrophage leishmanicidal activity against IMG3 isolate was evaluated in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages of C57Bl/6 mice. In these cultures, NO was inhibited by aminoguanidine. *In vivo* leukotriene inhibition was achieved by using a 5-LO inhibitor. *In vitro*-parasite growth profiles were similar and parasites at the 5th day of culture were used to infection. The lesion course was also similar between isolates in both two mouse strains used, but C57Bl/6 mice presented healing after 12 weeks of infection whereas in BALB/c mice the lesion was persistent. In IFN γ -deficient mice there progressive lesions and visceralization in IMG3- as well as in RPL5-infected mice. Corroborating these data, the parasite burden in draining lymph nodes of BALB/c mice was higher than in C57Bl/6 mice after 12 weeks of infection with IMG3, and parasites (IMG3 and RPL5) were identified in about 50% of the IFN γ -deficient mouse spleens. The histopathological analyses showed an intense dermal infiltrate with vacuolated macrophages heavily parasitized in BALB/c mice (12 weeks) and in IFN γ -deficient mice (4 weeks), but not in C57Bl/6 mice (12 weeks), similarly for IMG3 and RPL5. Both isolates IMG3 and RPL5 induced NO production in RAW 264.7 cell cultures presenting synergism with IFN γ . Endogenous leukotrienes did not affect NO production in these cultures. C57Bl/6 peritoneal macrophages activated with IFN γ /LPS killed IMG3 parasites depending on NO release. *In vivo* inhibition of leukotriene synthesis did not change the course of infection in C57Bl/6 mice infected with IMG3 isolate. The relevant findings are: BALB/c mouse is susceptible to infection with IMG3 and RPL5 isolates whereas C57Bl/6 is resistant; IFN γ is crucial to the control of the infection; the isolates induce NO and this molecule contributes to macrophage leishmanicidal activity; and also the data suggest that endogenous leukotrienes are not involved in the control of *L. (V.) braziliensis* in C57Bl/6 mouse.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Leishmaniose Tegumentar Americana

1.1.1. Características gerais

A leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária antroponozoonótica, causada por protozoários do gênero *Leishmania sp*, que acomete pele e, ocasionalmente, mucosas. *Leishmania sp* é um parasito que cresce em células do sistema mononuclear fagocitário de vertebrados e é transmitido pela picada do inseto vetor do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, ou *Lutzomyia*, no Novo Mundo. A maioria das infecções ocorre como zoonoses entre animais silvestres, geralmente roedores, sendo o homem um hospedeiro acidental no ciclo de transmissão (Gontijo & Carvalho 2003; Desjeux 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem mais de 12 milhões de pessoas com leishmaniose, incluindo a forma visceral, distribuídas em 88 países nos quatro continentes, estando entre as seis doenças infecciosas mais importantes. Anualmente, são notificados 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea (LC) em todo o mundo, mas a notificação compulsória só é feita em 32 países e um grande número de casos deixam de ser registrados (WHO 2005). No Brasil, a LTA merece muita atenção, pois apresenta ampla distribuição, com registros de casos em todas as regiões brasileiras (Machado-Coelho et al. 1999; Castro et al. 2002; Manoel & Martins 2003; Guerra et al. 2003; Carvalho et al. 2006), assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, com reflexos no campo social e econômico. Aproximadamente 90% dos casos de LTA são registrados em indivíduos maiores de 10 anos e do total de casos registrados, 60% ocorre em indivíduos do gênero masculino (Ministério da Saúde 2007; Manoel & Martins 2002).

A partir da década de 1980, foi verificado um aumento do número de casos no Brasil, de 3.000 no ano 1980 para 37.710 no ano 2001. Entre 1985 e 2005, a média anual de casos autóctones registrados foi de 28.568, sendo registrados em média 18,5 casos por 100.000 habitantes. Considerando o número de casos de LTA por Km² como indicador da densidade de casos de LTA, foram identificados 24 circuitos de importância epidemiológica no período de 2001 a 2003. Nesse período, o circuito de maior densidade de casos foi representado pela região do Tucuruí, que envolve os estados do Maranhão,

Pará e Tocantins com densidade de 551,84 casos. Em outro circuito se encontram o Distrito Federal e o Estado de Goiás com densidade de 245,44 casos (Ministério da Saúde 2007). Em Goiás, foi verificada uma expansão significativa da LTA em quatro anos, passando de 71 municípios atingidos em 1994 para 113 em 1998, o que correspondeu a um acréscimo de 62% (FUNASA 2000). Em 2002, foram confirmados 507 casos (Manoel & Martins 2002) e no ano 2004, este número caiu para 413 casos em Goiás, sendo 20% deles no município de Niquelândia (SINAN 2006).

O perfil epidemiológico da LTA, nos últimos anos, tem sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença, havendo atualmente o ciclo silvestre, com a transmissão em áreas de vegetação primária, sendo uma zoonose de animais silvestres; o ocupacional ou lazer, onde a transmissão está associada à exploração das florestas, derrubada de matas e ecoturismo (antropozoonose); e o rural ou periurbano, relacionado ao processo migratório, a aglomerados em centros urbanos associados a matas residuais, em que há adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e ou antropozoonose), verificando-se o processo de urbanização da doença (Oliveira et al. 2004, Ministério da Saúde 2007; Reithinger et al. 2007; Shaw 2007).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários que foram primeiramente descritos por Leishman em 1900 e Donovan em 1903 (Handman 1999). Estes parasitos pertencem à família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, e foram inicialmente classificados em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, conforme características do desenvolvimento no intestino do inseto vetor (Shaw 1994). Parasitos de todas as espécies de *Leishmania* são morfolologicamente similares, habitam células do sistema mononuclear fagocitário dos hospedeiros vertebrados e o intestino dos insetos vetores, dípteros da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. *Leishmania sp* apresenta dois estágios morfolologicamente e bioquimicamente distintos durante o seu ciclo de vida, a forma amastigota e a forma promastigota. A forma amastigota desenvolve-se intracelularmente na forma arredondada ou fusiforme contendo um núcleo simples, um cinetoplasto, um flagelo rudimentar, multiplicando-se obrigatoriamente dentro de células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente macrófagos. No intestino do flebotomíneo, as amastigotas, dentro das células ingeridas durante o repasto sanguíneo do inseto em hospedeiros infectados, são liberadas e se transformam em formas promastigotas, as quais se apresentam na forma alongada, com núcleo central, cinetoplasto na posição terminal e com um flagelo bem desenvolvido (Ashford, 2000; Gontijo & Carvalho, 2003).

No intestino do vetor, a forma promastigota, recém-diferenciada a partir da forma

amastigota ingerida, sofre um processo de diferenciação morfológica e funcional, passando da forma procíclica inicial, não infectante, para a forma metacíclica infectante, um processo chamado de metaciclologênese (da Silva & Sacks 1987). A forma promastigota procíclica que tem formato elipsóide, sofre intensas divisões binárias e adere à parede intestinal; posteriormente, dentro de 5 a 8 dias, ela se transforma na forma metacíclica, que tem um formato mais delgado e um longo flagelo, são altamente móveis e migram para a peça bucal do inseto. O flebotomíneo infectado, quando pica a pele do próximo hospedeiro, regurgita cerca de 1 a 1.000 formas metacíclicas sobre a gota de sangue criada pela picada, completando o ciclo de transmissão (Almeida et al. 2003; Ashford 2000). As formas promastigotas procíclicas e metacíclicas são também encontradas em culturas axênicas, representado as formas em fase de crescimento logarítmico e em fase estacionária do crescimento, respectivamente. Durante a metaciclologênese, as formas promastigotas sofrem alteração nos carboidratos de superfície, podendo ser separadas as formas procíclicas das metacíclicas por meio de aglutinação com lectinas (da Silva & Sacks 1987; Sacks 1989; Almeida et al. 1993; Pinto-da-Silva et al. 2002).

Existem cerca de 30 espécies do gênero *Leishmania*, sendo que mais de 20 delas causam infecções no homem. Novas espécies causando infecções humanas estão emergindo, especialmente em associação com o vírus da imunodeficiência humana (Ashford 2000; WHO 2005). No Brasil, foram descritas sete espécies de *Leishmania* causadoras de LTA, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são as principais, sendo menos frequentemente encontradas *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, nas regiões Norte e Nordeste (Grimaldi & Tesh 1993; Gontijo & Carvalho, 2003; Ministério da Saúde, 2007).

L. (V.) braziliensis é a espécie mais prevalente no Brasil, sendo descrita em todas as regiões. A transmissão de *L. (V.) braziliensis* difere quanto aos reservatórios e vetores de uma determinada região. Os roedores silvestres são os principais reservatórios de *L. (V.) braziliensis*, embora o parasito tenha sido isolado de felídeos, canídeos e eqüídeos, em diferentes partes do país. Seus vetores variam conforme o tipo de vegetação, tendo sido identificados principalmente *Lutzomyia wellcomei* e *L. complexa* no estado do Pará; *L. wellcomei* nas florestas do Ceará; *L. whitmani*, no Ceará, Bahia, Mato Grosso do Sul e Paraná; *L. migonei*, no Rio de Janeiro e no Ceará; *L. neivai*, no Sul do país e *L. intermedia* nos estados do Sudeste, Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (Ministério da Saúde,

2007). Em Goiás, as principais espécies de vetores são *L. intermedia*, *L. flaviscutellata* e *L. whitmani* (Nascimento, 1986; Grimaldi & Tesh 1993; Peterson & Shaw 2003; Manoel & Martins 2003; Ministério da Saúde, 2007; Andrade Filho et al. 2007; da Costa et al. 2007). A heterogeneidade genética dos parasitos de diferentes localidades tem sido atribuída a pressões seletivas exercidas por diferentes componentes do ciclo de transmissão de cada área eco-epidemiológica ocupada por esses parasitos, sugerindo que a ocorrência de determinadas variantes genéticas esteja intimamente associada à relação dos parasitos com seus reservatórios silvestres e insetos vetores (Gomes et al. 1995; Cupollilo et al. 2003).

Algumas espécies de *Leishmania* estão comumente associadas a determinadas formas clínicas da LTA, embora diferentes espécies possam causar distintas formas clínicas da doença. O amplo espectro de manifestações clínicas pode variar desde úlceras cutâneas simples, que curam espontaneamente, a lesões cutâneas múltiplas, bem como lesões erosivas na mucosa, com progressiva destruição da nasofaringe e orofaringe e severa desfiguração facial. As lesões, em geral, iniciam como pequenas pápulas eritematosas que alargam e ulceram, possuindo bordas bem delimitadas e elevadas, com o fundo avermelhado, de tecido de granulação. Há, ainda, lesões do tipo nodulares, vegetantes, verrucosas, com presença de pequenas crostas, ou ectimóide. Linfadenopatia às vezes precede a lesão e uma linfangite (cordão linfático) ou adenomegalia satélite podem acompanhar o desenvolvimento da lesão. As lesões tendem à cura espontaneamente, mas podem permanecer ativas ou em latência clínica e por disseminação hematogênica e/ou linfática do parasito, causar novas lesões cutâneas e/ou mucosas. As cicatrizes das lesões, dependendo do seu tamanho podem ser desfigurantes ou mesmo passarem despercebidas (Romero et al. 2001; Gontijo & Carvalho 2003; Bailey & Lockwood 2007).

De acordo com as características clínicas, a LTA pode ser classificada principalmente em: Leishmaniose cutânea localizada (LCL), com lesão única ou múltipla (até 20 lesões), em geral cura espontaneamente, causada por todas as espécies acima citadas; Leishmaniose cutânea disseminada (LCD), caracterizada por lesões múltiplas ulceradas, podem ser centenas, disseminadas para áreas não contíguas, não raro ocorre comprometimento de mucosa, mas a LCD é uma condição rara, causada especialmente por *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*; Leishmaniose cutânea difusa (LCDf), cuja severidade é dada pela ocorrência de lesões semelhantes às lepromatosas, múltiplas lesões não ulceradas, que nunca curam espontaneamente e o indivíduo tem recidivas após o tratamento com os fármacos frequentemente usados, concorrente com deficiente resposta

imune específica mediada por células, uma doença rara, causada por *L. (L.) amazonensis*; e a Leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LM), também conhecida como “espúndia”, causa úlceras infiltrantes na mucosa das vias aéreas superiores, com extensa destruição da cavidade oronasal e faríngea, geralmente surge após a forma cutânea, como uma metástase da lesão primária em cerca de 5% dos casos, sendo causada especialmente por *L. (V.) braziliensis* (Turetz et al. 2002; Hepburn, 2003; Gontijo & Carvalho 2003; Desjeux, 2004; Ogawa et al. 2006; Bailey & Lockwood 2007).

Para diagnóstico da LTA, dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais devem ser frequentemente associados. Uma extensa anamnese, com colheita de dados clínicos e epidemiológicos, seguida de diagnóstico diferencial de várias outras doenças que causam lesões cutâneas ou mucosas, deve ser feita inicialmente. No entanto, encontrar o parasito em fragmentos de biópsias ou aspirados das lesões, é o único diagnóstico de certeza de infecção por *Leishmania sp.* Assim, o método parasitológico mais simples é o exame direto, feito por escarificação, biópsia com impressão em lâmina ou punção aspirativa, sendo o material corado por corantes Giemsa ou Leishman, para análise microscópica à procura do parasito. A inoculação do material obtido da lesão em meios de cultura ou animais de laboratório permite a confirmação do diagnóstico e a posterior identificação da espécie do parasito. A pesquisa de parasitos também é feita em cortes histológicos dos fragmentos das biópsias, porém, nem sempre é possível visualizar o parasito. Apesar disto, os aspectos histopatológicos podem favorecer o diagnóstico de leishmaniose e descartar outras doenças cutâneas (Romero et al. 2001; Silveira et al 2004; Andrade et al 2005; Bailey et al 2007).

Os métodos moleculares, que empregam a reação em cadeia da polimerase (PCR, *polimerase chain reaction*), também têm sido usados no diagnóstico de leishmaniose, apresentando uma elevada sensibilidade, pois são capazes de detectar menos de um parasito inteiro no material obtido do paciente (aspirado, biópsia fresca ou estocada, esfregaço), por meio da amplificação do ácido desoxirribonucleio (DNA, *deoxyribonucleic acid*). Além de poder indicar a presença do parasito, os métodos moleculares permitem a identificação da espécie destes parasitos, o que é relevante do ponto de vista epidemiológico e para a terapia. Vários são os alvos dos métodos moleculares, dentre eles podemos citar o DNA do cinetoplasto (kDNA), que diferencia os subgêneros; as pequenas subunidades de seqüências de DNA ribossomal (SSU rDNA, *small subunits coding sequences*), as quais também não diferenciam espécies, apenas grupos ou subgêneros; e ainda genes específicos para uma determinada espécie, como o gene da glicose-6-fosfato

desidrogenase (G6PD, *glucose-6-phosphate dehydrogenase*), o qual tem permitido a discriminação entre espécies pertencentes ao subgênero *L. (Viannia)* (Uliana et al 2000; Andrade et al 2001; Castilho et al 2003; Floeter-Winter & Shaw 2004; Reithinger & Dujardin 2007).

Métodos indiretos para demonstrar a presença do parasito incluem os testes imunológicos, tais como reações sorológicas e a intradermorreação de Montenegro. As técnicas sorológicas abrangem especialmente o ensaio imunoenzimático e a reação de imunofluorescência indireta (IFI), para pesquisa de anticorpos anti-antígenos de *Leishmania sp.* Na LTA, os títulos de anticorpos são geralmente baixos, exceto em casos de LCDf, sendo a sensibilidade e a especificidade dos testes baixa, portanto, não há um teste padrão-ouro de diagnóstico sorológico para a LTA. O teste intradérmico de Montenegro é um teste de fácil execução, simples, de alta sensibilidade e especificidade, porém não diferencia infecção passada de infecção atual, não apresentando, isoladamente, grande relevância para o diagnóstico, mas apenas para auxiliar na avaliação da resposta imune celular do paciente (a qual será descrita mais abaixo). Esta reação costuma ser forte em pacientes com LM e ausente naqueles com LCDf (Faber et al. 2003; Gontijo & Carvalho 2003; Marques et al. 2006).

O tratamento da LTA tem como fármacos de primeira escolha os antimoniais pentavalentes, o antimoniato de N-metilme glucamina e o stibogluconato de sódio, apenas o primeiro sendo utilizado no Brasil. Estes dois antimoniais têm eficácia comparável para o tratamento de LTA causada por *L. (V.) braziliensis* (Saldanha et al. 1999), sendo que há maior chance de fracasso no tratamento da infecção por *L. (V.) guyanensis* (Romero et al. 2001). Apesar de bastante usado, com alta taxa de cura de LCL, tanto de pacientes com LTA causada por parasitos do complexo *L. (Leishmania) sp* quanto pelo complexo *L. (Viannia) sp*, e mesmo de pacientes com LM, alguns pacientes não respondem bem ao tratamento e tem sido descrita a emergência de cepas resistentes aos antimoniais. Assim, como fármaco de segunda escolha, para os pacientes refratários ao tratamento com antimonial pentavalente, utiliza-se a anfotericina B ou a pentamidina. A anfotericina B é um antibiótico poliênico, antifúngico, com atividade leishmanicida, que devido à sua toxicidade sistêmica pode ser usada topicamente ou em formulações lipossomais (Vardy et al. 1999; Amato et al. 2004; Brown et al. 2005; Solomon et al. 2007). A pentamidina é uma diamidina aromática, que vem sendo utilizada nos países da América do Sul para tratamento da LTA, com alta eficácia e segurança. No Brasil, é comercializada na forma do sal isotionato para uso intramuscular. Outros fármacos, combinados aos antimoniais, tais

como pentoxifilina, aminosidina, alopurinol, também podem ser utilizados nos casos em que os pacientes não respondem aos fármacos de primeira ou segunda escolha, ou seu uso é contra-indicado. Ainda, combinados aos antimoniais, estimuladores do sistema imune têm sido usados, tais com interferon gama (IFN γ), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF, *granulocyte and macrophage-colony stimulating factor*) e leishvacin (Toledo et al. 2001; Sundar & Raí, 2002; Bailey et al. 2007; Ministério da Saúde, 2007). Ainda podem ser usadas a rifampicina (Kochar et al. 2000) e azitromicina (Silva-Vergara et al. 2004).

A imunoprofilaxia da LTA tem seu suporte nas evidências de que indivíduos que tiveram LTA apresentam resistência a uma nova infecção. No entanto, até o momento nenhum protocolo de imunização contra leishmaniose obteve sucesso (Reithinger et al. 2007). Vários protocolos estão sendo investigados em modelos experimentais (Handman 2001; Rhee et al. 2002; Salay et al. 2007) na esperança de obter-se a vacina contra leishmaniose.

De um modo geral, a diversidade dos biomas brasileiros, nas diferentes regiões do país, gera uma epidemiologia muito variada da LTA, com diferentes reservatórios silvestres, insetos vetores e agentes etiológicos, o que dificulta o seu controle, pois ainda faltam dados sobre todos os elos da cadeia de transmissão, sobre a doença e a resposta do hospedeiro. Em seguida serão descritos alguns aspectos da imunologia da leishmaniose.

1.1.2. A resposta imune na LTA: enfoque nos modelos murinos

O amplo espectro clínico das leishmanioses é definido pela relação parasito-hospedeiro, sendo consideradas de grande relevância as características genéticas do hospedeiro associadas aos fatores imunológicos que podem predispor ao desenvolvimento de formas brandas ou graves da doença. Os modelos de infecção de camundongos isogênicos das linhagens BALB/c e C57BL/6 com *L. major* representam bem a relevância da genética do hospedeiro para a definição da evolução da doença. *L. major* é amplamente distribuída pelo norte da África e Ásia, sendo responsável pela leishmaniose cutânea. A predisposição genética para resistência à infecção por *L. major*, em camundongos C57BL/6, correlaciona com o desenvolvimento de linfócitos T CD4⁺ auxiliares do tipo 1 (Th1, *T helper 1*) produtores de IFN γ , induzidos por interleucina-12 (IL-12). Enquanto a suscetibilidade, observada em camundongos BALB/c, é associada à predominância de linfócitos T CD4⁺ auxiliares do tipo 2 (Th2, *T helper 2*), induzidos por interleucina-4 (IL-

4) (Heinzel et al. 1989; Sacks & Noben-Truth 2002). Ao se estabelecerem as respostas imunes, os camundongos C57BL/6 resolvem a lesão cutânea, enquanto os camundongos BALB/c sucumbem devido à disseminação do parasito a partir do sítio da lesão e conseqüente visceralização. Embora este seja o modelo clássico estabelecido, este fenômeno não ocorre com todos os isolados de *L. major*, mostrando a relevância da genética dos parasitos (Anderson et al. 2005). Muitas características da resposta imune nos modelos murinos com *L. major* não são similarmente descritos para infecções com leishmanias do Novo Mundo, dos complexos *L. (Leishmania) sp* ou *L. (Viannia) sp*, ressaltando a diversidade das respostas dos hospedeiros às diferentes espécies de *Leishmania* e mesmo a diferentes isolados da mesma espécie (Guevara-Mendoza et al. 1997; Jones et al. 2002; Gomes et al. 2003; Qi et al. 2004; Souza-Neto et al. 2004; Pinheiro & Rossi-Bergmann 2007).

O IFN γ é uma citocina essencial no controle da infecção por *L. major*, tanto no início da resposta imune (imunidade natural) quanto na fase mais tardia (imunidade adquirida). Na fase inicial da infecção, a principal fonte de IFN γ são as células NK (*Natural Killer*), que são rapidamente recrutadas para os linfonodos drenantes da lesão, contribuindo para a contenção dos parasitos (Scharton & Scott 1993). A infecção com *L. major* induz produção de IL-12 e esta citocina é requerida para a ativação das células NK, que produzem IFN γ , o qual amplifica a produção de IL-12 pelos macrófagos ou células dendríticas (Vieira et al. 1994; Scharton-Kersten et al. 1995). Outras citocinas que podem agir sinergisticamente com a IL-12 na geração dos linfócitos Th1 são a IL-1 α , a IL-18 e a IL-23 (Von Stebut & Udey 2004). Após a sensibilização dos linfócitos T auxiliares aos antígenos dos parasitos, realizada em um microambiente rico em IL-12, os linfócitos Th1 assumem a produção de IFN γ . Porém, vale ressaltar que a IL-12 é um heterodímero com as subunidades p40 e p35, formando a IL-12p70 e é nesta forma que ela induz a geração de linfócitos Th1. Na forma de homodímeros da subunidade p40, a IL-12p80 inibe a geração Th1, por antagonizar os receptores para a IL-12, aumentando a suscetibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. major* (Nigg et al. 2007). Além dos linfócitos Th1, os linfócitos T CD8⁺ também são importante fonte de IFN γ , contribuindo para a imunidade anti-*Leishmania* (Sacks & Noben-Truth 2002). A produção de IFN γ nos pacientes que curam espontaneamente ou naqueles que apresentam cura clínica após o tratamento quimioterápico, indica a relevância desta citocina no controle da infecção humana (Coutinho et al. 1998). Além disto, os experimentos com animais, nos quais o gene do IFN γ foi eliminado, foram fundamentais para consolidar a importância do IFN γ no

controle da infecção. Estes animais apresentam lesões progressivas, sem controle, já demonstradas em camundongos infectados com *L. major* (Wang et al. 1994) ou *L. (V.) braziliensis* (Souza-Neto et al. 2004).

O IFN γ é importante na geração de mecanismos microbicidas dos macrófagos, auxiliando os macrófagos a eliminarem os parasitos. Macrófagos tratados com IFN γ têm aumentada produção de reativos intermediários do oxigênio (ROI, *reactive oxygen intermediates*), tais como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas, bem como de reativos intermediários do nitrogênio, tais como o óxido nítrico (NO, *nitric oxide*). A produção simultânea destes dois tipos de reativos gera a formação de peroxinitritos, que são altamente tóxicos para os parasitos. Juntas, estas substâncias tóxicas contribuem para a eliminação dos parasitos e controle da infecção (Ding et al. 1988; Brunet 2001; Von Stebut & Udey 2004). A produção de ROI ocorre especialmente no momento da fagocitose do parasito, como um mecanismo primário de defesa dos macrófagos. Durante a fagocitose, enquanto os patógenos são internalizados, há um aumento no consumo de oxigênio mediado pelo complexo enzimático NADPH-oxidase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*), gerando os ROI altamente tóxicos (Rosen et al. 1995; Peters & Sacks 2006).

O óxido nítrico (NO), um gás inorgânico extremamente tóxico, atua nos grupos prostéticos de várias enzimas alterando suas funções e inibe a cadeia respiratória, causando morte celular (Jorens et al. 1995; Boscá et al., 2005). O NO é produzido por diversos tipos de células, dentre elas células endoteliais e macrófagos, sendo descrito como regulador de respostas fisiológicas e patofisiológicas no corpo, incluindo a pressão sanguínea, a função plaquetária, a neurotransmissão, a inflamação e a defesa do organismo. O NO difunde-se através das membranas e seu efeito pode ser determinado pela reatividade química com ânion superóxido, formando peroxinitrito, o qual pode reagir para formar outros intermediários como nitrosoperoxicarbonato. Esses produtos reativos do nitrogênio podem inibir enzimas contendo centros ferro-enxofre, inibir a função mitocondrial das células por competição pelo oxigênio molecular e serem potencialmente tóxicos para microrganismos intracelulares, até mesmo para as células do hospedeiro (Mayer & Hemmens 1997; Korhonen et al. 2005; Boscá et al. 2005).

O NO é produzido por meio do metabolismo da L-arginina pela enzima NO sintase (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*), o qual além de gerar o NO, gera L-citrulina. A enzima iNOS pode ser induzida por vários estímulos imunológicos, tais como o IFN γ , o fator de necrose tumoral (TNF), a IL1- β e por estímulos microbianos, levando à formação

de elevadas quantidades de NO (Mills 2001; Brunet 2001). Para que esta enzima seja otimamente induzida são necessários pelo menos dois sinais: um estímulo por uma citocina, em geral, IFN γ , e uma ativação com um padrão molecular de microrganismo. Entre os padrões moleculares mais bem estudados na indução de NO está o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram negativas, que age ativando receptores similares a proteína *Toll*, o TLR4 (*Toll-like receptor 4*) (Ding et al. 1988; Corraliza et al. 1995; Mills 2001; Royle et al. 2003; Boscá et al. 2005). Os sinais simultâneos via receptor do IFN γ e TLR, induzem produção acentuada de NO (Xie & Nathan, 1994). Na infecção por *L. major*, foi demonstrada a importância do NO não somente para a eliminação do parasito (Liew et al. 1991), mas também para a ativação de células NK. O NO produzido nas primeiras horas da infecção, induzido pelo parasito e o IFN $\alpha\beta$, ativa a via de sinalização Tyk2/Jak/STAT4 (*Tyk2 quinase/Janus quinase/signal transducer and activator of transcription 4*) do receptor da IL-12, aumentando a produção de IFN γ pelas células NK (Bogdan et al. 2000). O NO não somente é fundamental para matar o parasito e favorecer a cura clínica, como animais que apresentam resolução da lesão dependem de contínua produção de NO para não haver reativação da mesma (Stenger et al. 1996). Além disto, foi demonstrado que animais geneticamente deficientes em iNOS são altamente suscetíveis à infecção por *L. major* (Wei et al. 1995).

Diferenças na indução de NO e/ou suscetibilidade às suas ações tóxicas têm sido descritas para as diferentes espécies de *Leishmania*. *L. major* induz produção de NO em sinergismo com o IFN γ (Bogdan et al. 2000), no entanto, *L. (L.) amazonensis* inibe o NO induzido por LPS em macrófagos murinos *in vitro*, um efeito que é eliminado pelo tratamento com IFN γ (Balestieri et al. 2002). Para que *L. (L.) amazonensis* seja eliminada dos macrófagos, é necessária a produção simultânea de NO e ânion superóxido induzidos por IFN γ e LPS (Mukbel et al. 2007). A resistência à infecção por *L. (V.) braziliensis* é dependente de NO em murinos (Rocha et al. 2007), mas nem todo isolado de *L. (V.) braziliensis* é suscetível à ação do NO (Giudice et al. 2007).

Outra citocina que contribui para a geração de NO e reativos intermediários do oxigênio é o TNF, que é importante para o controle da infecção por *L. major* (Ding et al. 1988; Liew et al. 1990). Também na infecção por *L. (L.) amazonensis*, o TNF age de maneira sinérgica com o IFN γ para controlar a infecção de macrófagos peritoneais (Gomes et al. 2003). Níveis elevados de TNF α , na fase de resolução da lesão por *L. (V.) braziliensis*, foram descritos e podem estar associados ao controle da infecção (Souza-Neto et al. 2004), uma vez que camundongos geneticamente deficientes na produção de TNF α ,

infectados com um isolado de *L. (V.) braziliensis*, mostraram-se incapazes de curar as lesões, apresentando lesões progressivas, erosivas, hemorrágicas, e havendo visceralização em cerca de 30% dos animais (Rocha et al. 2007). O sinergismo entre o IFN γ e o TNF pode induzir a produção de NO (Ding et al. 1988), o que explica a eficácia de ambos na eliminação dos parasitos. Quando são comparadas as infecções murinas com *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*, apenas na infecção por *L. (V.) braziliensis* há um controle do crescimento dos parasitos, o que pode ser explicado pelos níveis aumentados na produção IFN γ e TNF, nos linfonodos drenantes das lesões (Maioli et al. 2004).

Em humanos, a atividade leishmanicida dos macrófagos também envolve a ativação da iNOS, tendo sido demonstrada a produção de NO em culturas de macrófagos humanos infectados com *L. infantum* e ativados com LPS, IFN γ e prostaglandina E₂ (Panaro et al. 1999; Panaro et al. 2001). Foi demonstrado, por análise imunohistoquímica de fragmentos de biópsia de pele de pacientes com leishmaniose cutânea localizada ou cutânea difusa, a expressão de iNOS. A expressão acentuada da iNOS nas lesões da forma cutânea localizada correlacionou com um reduzido número de parasitos, enquanto em lesões da forma cutânea difusa, o pequeno número de células positivas para iNOS coincidiu com um elevado número de parasitos (Qadoumi et al. 2002). As concentrações séricas de IgE podem ser aumentadas em pacientes com leishmaniose cutânea, e em estudos com macrófagos humanos, a ligação de IgE/imunocomplexo com seu receptor de alta afinidade, Fc ϵ RII/CD23, foi capaz de induzir NO de maneira dependente da produção de TNF (Vouldoukis et al. 1995).

Enquanto o eixo Th1/IFN γ /TNF/NO está associado frequentemente à resistência à LTA, por outro lado, a suscetibilidade à infecção por *L. major*, está associada com resposta Th2, a qual é caracterizada pela presença de elevados níveis das citocinas IL-4, IL-13, IL-10 e fator transformador do crescimento β (TGF β , *transforming growth factor β*), as quais inibem a produção/sinalização de IFN γ e a ativação dos macrófagos (Sacks & Noben-Trauth 2002). A produção precoce de IL-4 não é necessariamente um indicador de suscetibilidade à *L. major* porque a linhagem de camundongo resistente, C57BL/6, também produz essa citocina logo no início da infecção. A inabilidade de montar uma resposta Th1 observada na linhagem suscetível, BALB/c, tem sido atribuída a vários defeitos intrínsecos das células apresentadoras de antígeno e dos linfócitos T, entre eles baixa expressão de IL-1 pelas células dendríticas, baixa expressão da cadeia beta 2 do receptor para IL-12 (IL-12R β 2) na membrana da célula T CD4⁺ e deficiência da co-polarização do receptor do IFN γ com o receptor para antígeno no linfócito T, importante na sinalização para

diferenciação dos linfócitos Th1. Nesse microambiente, a IL-4 promove a diferenciação dos linfócitos Th em Th2 (Heinzel et al., 1989; Sacks & Anderson, 2001; Peters & Sacks 2006).

Uma forma das citocinas Th2 aumentarem a suscetibilidade à infecção é por meio da ativação de macrófagos para geração de prolina e poliaminas. A IL-4 e a IL-13 induzem a expressão da enzima arginase I nos macrófagos, a qual catalisa a hidrólise de L-arginina em uréia e L-ornitina. Esta última pode ser convertida pela enzima ornitina descarboxilase em poliaminas, importante na proliferação celular, e em prolina, pela ação da ornitina aminotransferase, sendo a prolina importante na formação do colágeno nos processos de reparação tecidual. Quando os macrófagos são ativados por IFN γ , há indução da iNOS, que metaboliza a L-arginina produzindo NO, o qual auxilia na eliminação de microrganismos. Estes macrófagos ativados expressando iNOS são ditos macrófagos classicamente ativados ou M1, e apresentam um perfil pró-inflamatório. Em contraste, os macrófagos alternativamente ativados ou M2, que expressam arginase I são antiinflamatórios e assumem um papel reparador na reconstituição tecidual (Mills 2001; Gordon 2003).

Nos macrófagos, a arginase I compete com a iNOS pelo mesmo substrato, a L-arginina, diminuindo a produção de NO, em detrimento do controle da infecção. Em camundongos BALB/c infectados com *L. major*, se houver uma diminuição na geração dos macrófagos alternativamente ativados por deficiência da resposta à IL-4, há uma melhora na atividade microbicida dos macrófagos e reduzida atividade arginase (Holscher et al. 2006). O efeito pode ser devido à ausência de NO, mas também pode ser porque *Leishmania* utiliza a L-ornitina, gerada pela ação da arginase I, para produzir poliaminas, que são essenciais para sua proliferação (Iniesta et al. 2001; Iniesta et al. 2002; Noel et al. 2004). Infecção, por *L. major*, de camundongos geneticamente deficientes em TLR4 mostrou um aumento da atividade da arginase favorecendo o crescimento do parasito, o que sugere uma importância do TLR4 na resistência à infecção e o papel da arginase na suscetibilidade (Kropf et al. 2004a). Coletivamente os dados indicam que a função dos macrófagos é diferencialmente regulada pelas citocinas Th1 e Th2, definindo o curso da infecção.

O perfil de suscetibilidade baseado na produção de IL-4, no entanto, apresenta algumas contradições no próprio modelo de *L. major* e não parece ser válido para todas as espécies de *Leishmania*. Ainda no modelo de *L. major*, foi demonstrado um papel protetor da IL-4, dependendo da fase da infecção e da célula apresentadora de antígenos, a IL-4 pode induzir diferenciação Th1 e camundongos deficientes em IL-4 ainda permanecem

suscetíveis à infecção (Tripathi et al. 2007). Infecção de camundongos BALB/c com *L. mexicana* ou *L. (V.) panamensis*, que causam lesões progressivas, não induzem IL-4 na primeira semana de infecção (Guevara-Mendoza et al. 1997). Também na infecção murina por *L. (V.) braziliensis*, baixa ou não detecção de IL-4 é observada (Souza-Neto et al. 2004). A indução de IL-4 pode ser variável mesmo entre isolados da mesma espécie, tendo sido demonstrado, em camundongos BALB/c, quatro vezes maior produção de IL-4 quando a infecção foi por *L. major* LV39, comparada à infecção por *L. major* Friedlin (Hondowicz & Scott 1999). Além destas observações, tem sido demonstrada a emergência de células T regulatórias (Treg, T CD4⁺CD25⁺) nas infecções, sendo esta população celular, juntamente com a citocina IL-10, também responsáveis pela resistência/suscetibilidade à *Leishmania*. Na leishmaniose cutânea por *L. major* tem sido demonstrada a presença de células T CD4⁺ produtoras de IFN γ e de IL-10 nas lesões, mantendo a infecção crônica (Tripathi et al. 2007).

Em humanos, o paradigma Th1/Th2, associado à cura ou não resolução da infecção na leishmaniose tegumentar, não é tão claro como nos camundongos. No entanto, está claro que a imunidade celular é essencial para a resolução da infecção (Tripathi et al. 2007). Na infecção por *L. major* em humanos, Ajdary et al. (2000) mostraram que o perfil de não cura estava associado com baixa produção de IFN γ e alta produção de IL-4. Em biópsias com predomínio do perfil Th1 há uma correlação negativa entre os níveis de IFN γ e o número de parasitos nas lesões cutâneas causadas por *L. (V.) guyanensis*, porém não há correlação entre os níveis de citocinas Th2 e o número de parasitos em biópsias com perfil Th2 (Bourreau et al. 2003). Neste estudo, foi demonstrado que inicialmente há um predomínio de resposta Th2 nas biópsias e com a evolução da lesão este perfil muda para Th1. Ainda em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea, a expressão de iNOS é associada à redução no número de parasitos nas lesões e a indução de NO pode ser induzida em macrófagos humanos especialmente via sinalização no CD23/Fc ϵ R2 e receptor do IFN γ (Mossalayi et al. 1999; Qadoumi et al. 2002; Vouldoukis et al. 1995).

Na LTA, durante a fase ativa da LCL, há predominância de células T CD4⁺ periféricas com produção mista de citocinas do tipo Th1/IFN- γ e Th2/IL-4. Nos indivíduos que curam espontaneamente ou naqueles que apresentam cura clínica após o tratamento quimioterápico, foi observada uma proporção similar de células T CD4⁺ e T CD8⁺, com produção de IFN- γ e baixos níveis de IL-4 (Coutinho et al. 1998). Indivíduos com a LM, no entanto, podem apresentar níveis de IFN γ similares àqueles de indivíduos que apresentam cura espontânea de lesões cutâneas (Carvalho et al. 1995). O TNF e o IFN- γ

controlam a multiplicação dos parasitos na fase inicial da infecção, no entanto, a produção de TNF exacerbada pode estar associada a uma maior gravidade da doença. Níveis mais elevados de TNF foram detectados nos pacientes com LM quando comparados com indivíduos que apresentam a forma cutânea e uma dissociação entre níveis de IFN γ e TNF foi observada em pacientes com a forma cutânea que curaram após tratamento (Da-Cruz et al. 1996; D'Oliveira Jr. 2002).

Quando a imunidade celular está preservada nos pacientes com LTA, a intradermorreação de Montenegro é positiva, sendo o teste intradérmico com antígenos de *Leishmania* um método auxiliar importante no diagnóstico da LTA, o que ocorre na maioria dos pacientes com as formas LCL, LCD e LM. Na LM há forte reação de Montenegro, indicando o pólo hiperérgico da LTA, enquanto na LCDf na maioria das vezes o teste é negativo, indicando o pólo anérgico da doença (Convit et al. 1993; Silveira et al. 2004). A análise histopatológica das lesões da LTA mostram diferenças entre infecções por parasitos do complexo *L. (Leishmania) sp* e *L. (Viannia) sp*. Nas lesões causadas por *L. (L.) amazonensis*, há um intenso infiltrado mononuclear pobre em linfócitos e rico em macrófagos na derme, apresentando-se vacuolizados e repletos de amastigotas, dando ao infiltrado uma aparência de granuloma de macrófagos. Já com o subgênero *Viannia*, o infiltrado é mais modesto com macrófagos e parasitos escassos; compondo o infiltrado há especialmente linfócitos e plasmócitos, que dão ao infiltrado uma característica de granuloma epitelióide. Na LCL, a presença de resposta imune celular é representada pela detecção de linfócitos T CD8 $^{+}$ e T CD4 $^{+}$ /Th1/IFN γ nas lesões, que predominam nas lesões causadas por *L. (Viannia) sp*. Já nas lesões causadas por *L. (L.) amazonensis* podem ser encontradas células expressando IL-4 e/ou IFN γ . Nas lesões mucosas causadas por *L. (V.) braziliensis*, o infiltrado celular, em alguns pacientes, compõe um granuloma tuberculóide, com abundante infiltrado de linfócitos (especialmente T CD4 $^{+}$ expressando IFN γ) e plasmócitos, poucos histiócitos e escassos parasitos. Na LCDf causada por *L. (V.) amazonensis* os escassos linfócitos T CD4 $^{+}$ presentes nas lesões expressam fortemente IL-4 e fracamente IFN γ (Silveira et al. 2004).

1.1.3. Imunologia da infecção murina por *L. (V.) braziliensis*

Em relação à leishmaniose causada por *L. (V.) braziliensis* não há uma abundância tão grande de dados da imunologia como ocorre para o modelo de *L. major*, porém, avanços têm sido obtidos nos últimos anos. Estudar *L. (V.) braziliensis* é de suma

importância para a América Latina, onde esta espécie está entre as mais prevalentes, especialmente no Brasil, e causa formas graves da doença. O modelo de infecção de camundongos C57BL/6 com *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903, cepa de referência da Organização Mundial da Saúde, OMS) mostra que os camundongos são resistentes à infecção, desenvolvendo lesões pequenas (~1 mm) e a cura clínica completa da lesão pode ser observada por volta da sexta semana da infecção (Souza-Neto et al., 2004). Já a linhagem de camundongos BALB/c mostrou respostas variáveis aos diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* que têm sido avaliados. Vários deles não causaram lesão e naqueles que causaram, houve cura clínica. O período de cura das lesões nos camundongos BALB/c foi variável, tendo sido de cerca de trinta dias para isolados do Ceará e da Bahia. Na maioria dos isolados avaliados, o tamanho máximo da lesão induzida foi muito pequeno, sendo ~0,2 mm (Indiani de Oliveira et al. 2004; Teixeira et al. 2005); cerca de 13 semanas para outro isolado (WR604) da Bahia (Samuelson et al. 1991) e quase 16 semanas para o isolado MAN/BR/LTB-111 (Dekrey et al. 1998). Nestes dois últimos relatos, o tamanho máximo da lesão obtido foi de ~1 mm. Em todos estes experimentos foram injetadas formas procíclicas em fase estacionária do crescimento. Quando formas metacíclicas (cepa M2903) foram injetadas em camundongos C57BL/6, Maioli et al. (2004), estas induziram lesões menores, de apenas ~0,2 mm. Estes dados mostram a dificuldade em induzir lesões por *L. (V.) braziliensis* em murinos.

Para aumentar a infecção dos camundongos BALB/c com *L. (V.) braziliensis*, saliva do inseto vetor tem sido utilizada juntamente com os parasitos no sítio do inóculo. Foi assim que Samuelson et al. (1991) descreveram o primeiro modelo de infecção murina por *L. (V.) braziliensis*. Foi utilizado o isolado WR604, obtido de um paciente com LTA (região de Corte de Pedra, Bahia, Brasil). A lesão produzida não curou até os quatro meses pós-infecção. O aumento da lesão nos camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* parece estar associado ao aumento de produção de IL-4 induzida pela saliva do inseto vetor, não tendo sido detectadas outras citocinas que poderiam contribuir para a exacerbação da lesão, como o TGF β e a IL-10 (Lima & Titus, 1996). Tem sido demonstrado que a saliva do vetor possui substâncias imunomoduladoras, sendo que a pré-exposição de camundongos à saliva é capaz de protegê-los contra a infecção por *L. major*, o que está associado à uma forte reação de hipersensibilidade tardia no local do inóculo (Kamhawi 2000; Kamhawi et al. 2000). No entanto, no modelo de camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis*, apesar da saliva do inseto vetor modular a resposta imune, não houve proteção contra o desafio com o parasito (de Moura et al. 2007).

Estudos usando o modelo murino BALB/c de infecção com isolados de *L. (V.) braziliensis*, obtidos de pacientes de diferentes áreas geográficas do Brasil (Ceará - MHOM/BR/94/H3227 e Bahia – MHOM/BR/01/BA788), mostraram diferenças na patogenicidade dos isolados (Indiani de Oliveira et al. 2004). O isolado H3227 foi mais patogênico, apesar do discreto desenvolvimento da lesão, esta lesão apresentou maior reação inflamatória, que estava associada à maior indução de quimiocinas (Teixeira et al. 2005). Este isolado induziu maior produção de IL-4 e IL-10, enquanto o isolado menos patogênico BA788 induziu mais IFN γ e IL-12 (Indiani de Oliveira et al. 2004). A maior indução de CXCL10/IP10 pelo isolado BA788 pode estar associada ao maior número de células NK rapidamente encontradas nas lesões produzidas por este isolado, o que explicaria a resistência à infecção (Indiani de Oliveira et al. 2004; Teixeira et al. 2005). No Ceará, é comum encontrar um expressivo enfartamento dos nódulos linfáticos regionais precedendo ou acompanhando as lesões cutâneas, fato que deu origem ao termo “leishmaniose bubônica” para descrever a doença (Sousa et al. 1995), enquanto, na Bahia, o quadro é diferente, com linfadenopatia localizada sendo freqüentemente encontrada (Barral et al. 1992; Barral et al. 1995). Estas diferenças clínicas foram refletidas nos diferentes perfis de infecção do camundongo BALB/c com isolados destas duas áreas geográficas distintas, descritas por Indiani de Oliveira et al. (2004) e Teixeira et al. (2005).

Recentemente foram descritos os componentes essenciais para o controle da leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c. Foi utilizado o isolado MHOM/BR/94/H3227. A IL-12 é absolutamente necessária, uma vez que camundongos geneticamente deficientes em IL-12 apresentam lesões progressivas com visceralização e morte dos camundongos. Camundongos geneticamente deficientes em TNF apresentam lesões progressivas que não curam, são erosivas e hemorrágicas, mas somente cerca de 20 a 30% dos animais morrem por visceralização. Também os animais geneticamente deficientes em iNOS não conseguem controlar a infecção, porém o complexo NADPH-oxidase não é necessário para a resolução da infecção (Rocha et al. 2007).

Em camundongos C57Bl/6, a infecção com a cepa M2903 de *L. (V.) braziliensis* causa uma lesão que regride rapidamente, havendo aumento da produção de TNF e IFN γ nas culturas de células dos linfonodos drenantes da lesão (Maioli et al. 2004). A ausência da IL-12, no entanto, causou resultados diferentes daqueles obtidos por Rocha et al. (2007) com os camundongos BALB/c. Souza-Neto et al. (2004) mostraram que na ausência da IL-12 os camundongos C57Bl/6 desenvolvem lesões crônicas sob controle até 12 semanas

pós-infecção; os animais produzem baixas quantidades de IFN γ , mas não viram para um perfil Th2. Já nos animais geneticamente deficientes em IFN γ , as lesões são progressivas e descontroladas, havendo necessidade de sacrificar os animais quatro semanas pós-infecção.

1.2. Os leucotrienos

1.2.1. Características gerais

Os leucotrienos são mediadores lipídicos da inflamação, produzidos especialmente por células de origem mielóide, incluindo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos e mastócitos, as quais possuem as enzimas necessárias para a geração destes mediadores. Eles têm o nome de leucotrienos devido a três ligações duplas conjugadas na estrutura de 20 carbonos e por serem produzidos por leucócitos (Murphy & Gijón 2007). Os leucotrienos são eicosanóides (do grego *eicosa* = vinte; para derivados de ácidos graxos contendo 20 carbonos) derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo poliinsaturado ω -6 (20:4) derivado da dieta, que é incorporado aos fosfolipídios de membrana de todas as células do corpo. A biossíntese dos leucotrienos começa apenas após estimulação celular. Moléculas sinalizadoras, incluindo imunocomplexos, endotoxinas, o componente do sistema complemento C5a, IL-1, TNF, GM-CSF, fator ativador de plaquetas (PAF, *platelet-activating factor*), elastase produzida pelo neutrófilo e o próprio LTB $_4$ são capazes de ativar fosfolipases nos leucócitos para iniciar a síntese dos leucotrienos (Crooks & Stockley 1998; Funk 2001).

O aumento de Ca $^{2+}$ livre em resposta aos diversos estímulos ativa a fosfolipase A $_2$, isoforma citosólica (cPLA $_2$), a qual age na posição sn-2 dos fosfolipídios da membrana nuclear liberando o AA e lisofosfolipídios. Existe também a forma secretória da enzima (sPLA $_2$), de baixo peso molecular, que pode ser uma fonte primária de liberação de AA (Flamand et al. 2007; Funk 2001). O aumento de Ca $^{2+}$ intracelular também ativa a enzima 5-lipoxigenase (5-LO), que é uma dioxigenase que possui um domínio NH $_2$ terminal (Cd-2 similar) que liga dois íons cálcio e um domínio catalítico que liga ferro, podendo ser encontrada no núcleo de algumas células e no citosol. A ligação com o Ca $^{2+}$ provoca a translocação da 5-LO para a membrana nuclear, que é rica em glicerofosfolina. Para a função catalítica da 5-LO, o ferro é essencial, sendo oxidado Fe $^{2+}$ para Fe $^{3+}$ por hidroperóxidos lipídicos. Assim, o tônus redox é um parâmetro de atividade 5-LO na célula. Condições que promovem a peroxidação lipídica, como quando há aumento de ROI, aumenta a produção de leucotrienos. A 5-LO é também ativada por fosforilação em

resíduos de serina dependente de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), p38 e ERK1/2 (Burket et al. 2003; Coffey et al. 2007; Radmark et al. 2007).

Uma vez ativada, a 5-LO deve se juntar à proteína ativadora da 5-LO (FLAP, *5-LO-activating protein*), presente na membrana nuclear. A FLAP age como um dímero que facilita a captura do AA pela 5-LO. A 5-LO catalisa duas reações: 1- retirada de um átomo de hidrogênio do C-7 do AA e inserção de oxigênio molecular para formar ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HpETE); 2- remoção de um átomo de hidrogênio do C-10 do 5-HpETE, com conseqüente desidratação, para formar o conjugado trieno epóxido leucotrieno A₄ (LTA₄). O LTA₄ pode ser hidrolisado pela enzima LTA₄ hidrolase (adição de água no C-12) para formar leucotrieno B₄ (LTB₄, ácido 5(S),12(R)-dihidroxi-6,8,10,14-(Z,E,E,Z)-eicosatetraenóico). Alternativamente, o LTA₄ pode ser conjugado com glutatona para formar leucotrieno C₄ (LTC₄, ácido 5(S)-hidroxi-6(R)-S-glutathionil-7,9,11,14-(E,E,Z,Z)-eicosatetraenóico), por meio da ação da enzima LTC₄ sintase. Do LTC₄, podem ainda serem formados o leucotrieno D₄ e o leucotrieno E₄ (LTD₄ e LTE₄, respectivamente). Portanto, os leucotrienos podem ser classificados em dois grupos: o LTB₄ e os cisteinil leucotrienos (cysLTs), que possuem um resíduo de cisteína em comum, compreendendo os LTC₄, LTD₄ e LTE₄. Durante o processo inflamatório pode ocorrer biossíntese transcelular de leucotrienos, mediada por transferência de AA ou LTA₄ de uma célula para outra. De tal forma que mesmo que uma célula não possua alguma enzima da via de síntese de leucotrienos, é possível produzi-los (Crooks & Stockley, 1998; Funk, 2001; Murphy & Gijón 2007; Flamand et al. 2007).

A biossíntese dos leucotrienos é finamente controlada em vários passos. A disponibilidade do AA depende do grau de ativação das fosfolipases e da taxa de reincorporação do AA aos fosfolipídios. Para controlar os níveis de AA e fosfolipídios na célula há um processo de reacilação dos fosfolipídios que permite a reincorporação dos mesmos às membranas, chamado de ciclo de Lands ou remodelagem de AA (Murphy & Gijón 2007). O metabolismo do AA depende de 5-LO e FLAP, sendo a 5-LO ativada por cálcio ou fosforilação enzimática e sua função depende do estado redox da célula. A 5-LO é estabilizada por ATP (adenosina trifosfato), o que aumenta sua atividade. A fosforilação no resíduo de Ser523 inibe a atividade da 5-LO, o que é mediado por proteína quinase A (PKA, *protein kinase A*), a qual é ativada por agentes que aumentam cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) (Werz & Steinhilber 2005). Ambas 5-LO e FLAP têm sua expressão positivamente regulada por estímulos como IL-3, GM-CSF, TNF, vitamina D3, TGFβ e dexametasona. O TGFβ também pode aumentar ou diminuir a expressão de 5-LO,

dependendo do estágio de maturação dos macrófagos. A IL-4 inibe a expressão de 5-LO em monócitos e em células dendríticas em maturação. Finalmente, a degradação dos leucotrienos finaliza suas funções biológicas. As vias de degradação de ácidos graxos, tais como β -oxidação e reações de conjugação com ácido glucurônico estão envolvidas no metabolismo do LTB₄. Os CysLTs são metabolizados por peptidases e ω -oxidação seguida de β -oxidação. Após o metabolismo dos leucotrienos, seus produtos não são capazes de ligar aos receptores específicos para os leucotrienos (Yokomizo et al. 2001; Murphy & Gijón 2007; Radmark et al. 2007).

Os tipos de leucotrienos produzidos dependem do tipo celular. Neutrófilos, células dendríticas e linfócitos B humanos produzem especialmente LTB₄. Já os esonifílicos secretam LTC₄ e os mastócitos produzem mais LTC₄ do que o LTB₄. Há diferenças entre espécies com relação à produção de determinados tipos de leucotrienos, por exemplo, os macrófagos murinos produzem mais LTC₄ do que o LTB₄, ao inverso dos macrófagos humanos (Flamand et al. 2007). Em geral, os leucotrienos são análogos aos hormônios que atuam localmente, apresentando um efeito parácrino ao atuarem sobre células vizinhas, e autócrino, atuando sobre a própria célula fonte. Os efeitos dos leucotrienos se iniciam após ligação destes mediadores a receptores acoplados à proteína G, contendo sete domínios transmembrânicos. São eles, os receptores para o LTB₄, o BLT₁ e o BLT₂; e para os CysLTs, o CysLT₁ e o CysLT₂. O receptor BLT₁ tem maior afinidade pelo LTB₄ do que o BLT₂, mas diferente do BLT₁, o BLT₂ pode também mediar resposta a hidroieicosanóides. A ligação dos leucotrienos a esses receptores ativa diferentes proteínas G que desencadeiam várias vias bioquímicas de sinalização nas células, tais como inibição de cAMP (via Gi), ativação de fosfolipase C (PLC, *phospholípase C*, via Gq), aumento de cálcio intracelular (via Gq) e ativação de fosfatidil inositol-3-quinase (PI3K, *phosphatidy inositide 3-kinase*). Estas vias de sinalização levam às várias funções dos leucotrienos nas células, entre elas a indução de quimiotaxia, liberação de enzimas lisossomais de granulócitos e macrófagos, fagocitose e liberação de ROI. Outros receptores identificados para leucotrienos são o PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor), envolvido no metabolismo lipídico e que quando acionado por LTB₄ intracelular aumenta a degradação do LTB₄ via LTB₄ ω hidrolase, diminuindo a inflamação; e o GPR17, que liga CysLTs (Yokomizo et al. 2001; Peres et al. 2007a; Flamand et al. 2007).

Estudos em humanos mostram uma elevada expressão de BLT₁ em leucócitos do sangue periférico, tais como granulócitos, monócitos, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e em células B, sendo baixa a expressão nas células do timo e do baço. Enquanto a distribuição

dos BLT₁ é mais restrita a leucócitos, a expressão de LTB₂ é mais ubíqua, sendo este expresso em vários tecidos (Kim & Luster 2007). A expressão do BLT₁ em monócitos humanos é diminuída por citocinas próinflamatórias como o IFN γ e o TNF, enquanto a sua transcrição é aumentada por IL-10 ou dexametasona (Pettersson et al. 2005). Muitas das funções biológicas dos leucotrienos são mediadas pelos receptores BLT₁ e BLT₂, sendo sua importância no processo inflamatório bastante estudada. Células endoteliais ativadas com LPS apresentam aumento da expressão de BLT₁ e quando ativadas com TNF têm expressão aumentada de BLT₂. O próprio LTB₄ aumenta a expressão de BLT₁ nas células endoteliais. A ação do LTB₄ nestes receptores aumenta a produção de NO pelas células endoteliais, o que contribui para a vasodilatação, e da quimiocina MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), que contribui para a quimiotaxia de leucócitos (Qiu et al. 2006). O LTB₄ aumenta a quimiotaxia dos leucócitos para o foco inflamatório por aumentar a adesão dos leucócitos ao endotélio (Nagai & Katori 1987), o que é mediado por um aumento na expressão de integrina (CD11b) nos neutrófilos e monócitos e aumento de cálcio intracelular, que é necessário para as alterações no citoesqueleto celular. Também induz neutrófilos a produzirem a quimiocina IL-8, que atrai mais neutrófilos para o foco inflamatório (Crooks & Stockley 1998; Kim & Luster 2007). O LTB₄ pode mediar os efeitos do PAF na quimiotaxia, uma vez que foi demonstrado que a inibição de LTB₄ endógeno inibe a quimiotaxia de neutrófilos induzida pelo PAF (Gaudreault et al. 2005).

Os efeitos quimiotáticos do LTB₄ não se resumem a leucócitos envolvidos na inflamação, mas também o LTB₄ é quimiotático para células dendríticas e linfócitos T, agindo em receptores BLT₂ ou BLT₁, respectivamente (Goodarzi et al. 2003; Shin et al. 2006; Del Prete et al. 2007). O LTB₄ aumenta a expressão do receptor para quimiocina CCR7, importante para levar as células dendríticas para os linfonodos (Del Prete et al. 2007). Desta forma, o LTB₄ atua também sobre as células da imunidade adquirida, favorecendo o encontro de células dendríticas e linfócitos T para o estabelecimento das respostas imunes. Os linfócitos T ativados após interação com as células dendríticas expressam BLT₁ e são recrutados para os tecidos inflamados (Goodarzi et al. 2003; Islam et al. 2006). A ação dos leucotrienos sobre as células dendríticas, além de induzir quimiotaxia, pode também modular a produção de citocinas importantes para a definição do perfil de linfócitos Th, dependendo do estímulo utilizado e da origem das células dendríticas (Jozefowski et al. 2005; DiMeo et al. 2007).

Os CysLTs são bastante conhecidos como mediadores da broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e ativação dos leucócitos, sendo importantes na asma

alérgica. Entretanto, também estão envolvidos em uma variedade de processos inflamatórios. Os receptores CysLT₁ e CysLT₂ são expressos especialmente em eosinófilos, mastócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T. O CysLT₁ também é expresso em basófilos, monócitos e linfócitos B. A ação dos CysLTs nestes receptores promove a quimiotaxia de eosinófilos e sua desgranulação, ativação de monócitos e macrófagos, especialmente no pulmão, e ampliação da produção de citocinas por mastócitos (IL-5, TNF e quimiocinas), favorecendo a resposta inflamatória Th2. Em células dendríticas, a ação dos CysLTs parece promover a produção de IL-10 em detrimento da IL-12. O CysLT1 é expresso tanto em linfócitos Th1 quanto nos Th2, que respondem quimiotaticamente ao LTD₄. Atuando em linfócitos B, o LTD₄ aumenta a produção de anticorpos das classes IgG e IgE, aumentando a resposta Th2 (Kim & Luster 2007).

Como mediadores da inflamação, os leucotrienos podem participar dos processos inflamatórios de doenças crônicas, alérgicas e autoimunes. Elevadas concentrações de LTB₄ têm sido encontradas em secreções de pacientes com fibrose cística, asma, psoríase, artrite reumatóide e bronquite crônica. Nesses casos, o excessivo recrutamento e ativação de neutrófilos por LTB₄, bem como por CysLTs, pode contribuir para maior dano tecidual, favorecendo a progressão e perpetuação da doença. Além disto, participam da aterosclerose, osteoporose e câncer (Crooks & Stockley, 1998; Werz & Steinhilber 2005). Apesar da relevância comprovada nestas doenças, apenas na asma um inibidor de síntese de leucotrienos, o A-64077 (zileuton), mostrou algum benefício. Na rinite alérgica, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal houve baixa eficácia e nenhum benefício terapêutico foi alcançado na colite ulcerativa. O zileuton é um derivado N-hidroxiuréia que inibe 5-LO por ligar o ferro do sítio ativo da enzima (Werz & Steinhilber 2005). Outras intervenções farmacológicas para inibir os leucotrienos são a inibição da FLAP (que pode ser conseguida com o uso do composto MK0591, por exemplo) e o antagonismo dos receptores BLTs (usando compostos tais como o CP-105,696) e CysLTs (zafirlukast e montelukast) (Showell et al. 1996; Surette et al. 1999; Funk 2001).

Os leucotrienos também possuem ações nas atividades microbidas dos leucócitos, as quais serão descritas na Seção 1.2.2, que discorre sobre o papel dos leucotrienos nas infecções.

1.2.2. Os leucotrienos nas infecções

Como importantes mediadores inflamatórios, os leucotrienos também podem desempenhar um importante papel na defesa do hospedeiro contra os microrganismos na resposta imune inata. O papel dos leucotrienos nas infecções tem sido demonstrado em vários estudos. Baile et al. (1996) mostraram que camundongos geneticamente deficientes em 5-LO tornam-se suscetíveis à infecção por *Klebsiella pneumoniae*. Os macrófagos alveolares apresentam diminuída fagocitose e destruição das bactérias, facilitando a bacteremia e um aumento na letalidade. O LTB₄ aumenta a fagocitose de *Klebsiella pneumoniae* por neutrófilos, mediada tanto pelo complemento (CR3, receptor para C3bi) quanto por anticorpo IgG (FcγR, receptor para porção Fc de IgG); os CysLTs, no entanto, não mostraram qualquer efeito sobre a fagocitose desta bactéria (Mancuso et al. 2001). A atividade bactericida dos macrófagos alveolares neste modelo é aumentada pelo LTB₄ exógeno e os leucotrienos endógenos são necessários para a ótima destruição das bactérias. Os leucotrienos aumentaram a produção de peróxido de hidrogênio, mediada pelo aumento da atividade NADPH-oxidase, sendo este o mecanismo responsável pela destruição das bactérias (Serezani et al. 2005).

Os leucotrienos produzidos por mastócitos após injeção de *E. coli* na cavidade peritoneal de camundongos foram necessários para o recrutamento e ativação de neutrófilos. A inibição farmacológica da síntese de leucotrienos, neste modelo, causou uma diminuição da eliminação das bactérias (Malaviya & Abraham 2000). Peres et al. (2007b), também inibindo farmacologicamente a síntese de leucotrienos, mostraram que na ausência destes mediadores lipídicos, os camundongos perdem o controle da infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Neste modelo, a deficiência dos leucotrienos reduziu significativamente os níveis de IL-12, INFγ e NO, aumentando a mortalidade de 14 para 57% dos animais.

Além da importância na resposta a bactérias, em um modelo murino de helmintíase a ação dos leucotrienos também foi marcante. A inibição de 5-LO ou a remoção genética de 5-LO aumentou a carga parasitária e o número de ovos liberados nas fezes de camundongos infectados com *Strongyloides venezuelensis*. Houve uma diminuição de eosinófilos e células mononucleares no sangue periférico e no parênquima pulmonar houve diminuição de IL-15, aumento de IL-12 e diminuição de IgE (Machado et al. 2005). Também tem sido demonstrado o papel dos leucotrienos na resistência a infecções por vírus e fungos em modelos murinos (Flamand et al. 2007).

Na resposta imune inata a protozoários, os leucotrienos também participam dos mecanismos de resistência às infecções. O LTC₄ aumenta a fagocitose e morte de *Trypanosoma cruzi* por macrófagos murinos peritoneais (Wirth & Kierszenbaum, 1985) e o LTB₄ induz destruição de *T. cruzi* mediada por aumento de NO. O LTB₄ induz aumento de PAF e TNF nos macrófagos infectados com *T. cruzi*, estando estes mediadores envolvidos na indução do NO. Além disto, o LTB₄ sinergiza com IFN γ para aumentar a produção de NO nestes macrófagos, um efeito também mediado pela indução de TNF e PAF. O tratamento de camundongos com um antagonista de BLT₁ (CP-105,696) aumentou a parasitemia, mas não a letalidade, causadas pelo *T. cruzi* (Talvani et al. 2002). Segundo Reiner et al. (1985), a infecção de macrófagos peritoneais murinos com *Leishmania donovani* é capaz de induzir a produção de LTC₄. A infecção de camundongos com *L. major* induziu a produção de LTB₄ na fase inicial da infecção em camundongos BALB/c, sugerindo seu papel no recrutamento de células inflamatórias e de linfócitos, tanto do perfil Th1 quanto Th2 (Milano et al. 1996). Mais recentemente, foi demonstrado que a deficiência na produção de leucotrienos, tanto por deficiência genética de 5-LO, quanto por inibição farmacológica com MK0591 (inibidor de 5-LO), resultou no aumento da gravidade da infecção murina por *L. (L.) amazonensis*. Os macrófagos dos camundongos resistentes à infecção produziram níveis mais elevados de LTB₄, após a infecção, do que os animais suscetíveis. A ausência de leucotrienos diminuiu a atividade microbicida dos macrófagos, a qual foi mediada por NO e foi aumentada pelo LTB₄ exógeno (Serezani et al. 2006). Até o momento nenhum estudo avaliando a importância dos leucotrienos na infecção por *L. (V.) braziliensis* foi realizado.

De maneira geral, a participação dos leucotrienos nas infecções envolve a atração dos leucócitos para o foco infeccioso, o aumento da fagocitose, o aumento da atividade microbicida dos leucócitos por meio de indução de ROI, NO, liberação de α -defensinas dos neutrófilos, liberação de enzimas lisossomais de neutrófilos e eosinófilos e indução de citocinas que ampliam suas atividades biológicas, tais como as quimiocinas e as citocinas TNF, IL-1, IFN γ , IL-6, IL-4, IL-5 (Crooks & Stockley 1998; Flamand et al. 2004; Peters-Golden et al. 2004; Serezani et al. 2005a; Flamand et al. 2007).

O modelo clássico de resistência e suscetibilidade à leishmaniose foi estabelecido na infecção murina por *L. major*. E este modelo tem sido a base para entender os mecanismos de resistência e suscetibilidade à infecção por outras espécies de *Leishmania*. A ativação de macrófagos pelo IFN γ produzido pelos linfócitos T CD4⁺ e a inibição destes

macrófagos pela IL-4 foram postulados como principais mecanismos de resistência e suscetibilidade, respectivamente. Nos modelos de infecção por outras espécies de *Leishmania*, no entanto, nem sempre este paradigma é observado (McMahon-Pratt & Alexander 2004). Por exemplo, na infecção de camundongos C57Bl/6 com *L. (L.) amazonensis*, o IFN γ não é necessário para conter a infecção na fase inicial da doença, somente após dois meses de infecção foi observado que a ausência de IFN γ interfere no curso da lesão (Pinheiro & Rossi-Bergmann 2007). A infecção de camundongos BALB/c com *L. mexicana* causa lesões progressivas sem controle, no entanto, não há indução de IL-4 na primeira semana de infecção (Guevara-Mendoza et al. 1997). Para *L. (V.) braziliensis*, o IFN γ é essencial para o controle, mas a IL-12, que induz a diferenciação dos linfócitos Th1 não é fundamental como na infecção por *L. major* (Souza-Neto et al. 2004). Os mecanismos de controle de *L. (V.) braziliensis* são ainda pouco conhecidos, especialmente por causa da falta de bons modelos murinos da infecção. Outro problema para se avaliar a infecção por *L. (V.) braziliensis* é a dificuldade do isolamento desta espécie a partir de lesões de pacientes e sua manutenção em culturas axênicas. Isto faz com que não haja muitos estudos sobre o comportamento imunobiológico dos isolados desta espécie, cuja relevância é ressaltada pela alta prevalência e pelo elevado número de casos de LTA causados por ela no Brasil. Menos ainda é conhecido sobre a participação dos leucotrienos nas infecções por *Leishmania*, os quais podem ser induzidos pelos macrófagos durante a infecção por *L. (V.) braziliensis* e ser importantes para o controle do parasito.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral:

- Avaliar o perfil da infecção de camundongos por dois isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (IMG3 e RPL5) e o envolvimento dos leucotrienos endógenos na infecção.

2.2. Objetivos específicos:

- Confirmar a espécie dos dois isolados, IMG3 e RPL5, obtidos de pacientes com LTA e estocados no *Leishbank* (Banco de *Leishmania*/IPTSP/UFG).
- Fazer a busca dos dados clínicos e epidemiológicos nos prontuários dos pacientes, dos quais as leishmanias foram isoladas.
- Comparar as curvas de crescimento dos isolados IMG3 e RPL5 *in vitro*.
- Avaliar o perfil da infecção pelos isolados IMG3 e RPL5 em camundongos C57Bl/6, em BALB/c e em camundongos C57Bl/6 geneticamente deficientes em IFN γ .
- Avaliar a capacidade de indução de NO pelos dois isolados em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 e sua modulação pelos leucotrienos.
- Avaliar a infecção de macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 com o isolado IMG3, a indução de NO e a modulação da atividade microbicida dos macrófagos pelos leucotrienos.
- Avaliar o efeito da inibição da produção de leucotrienos no desenvolvimento da lesão causada pelo isolado IMG3 em camundongos C57Bl/6.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção e manutenção dos parasitos

3.1.1. Obtenção dos isolados de *Leishmania* spp

Foram estudados dois isolados estocados no *Leishbank* (Banco Imunobiológico de Leishmanioses da Região Centro-Oeste/IPTSP/Universidade Federal de Goiás), o IMG3 e o RPL5, os quais foram obtidos de pacientes atendidos no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad (Goiânia – Goiás). Esses isolados foram selecionados de pacientes com LCL que apresentavam pequenas diferenças ao exame clínico e pertenciam a áreas geográficas distintas (regiões Norte e Centro-Oeste). Assim, os parasitos podem ser adaptados a diferentes reservatórios silvestres e insetos vetores. O isolado IMG3 já foi utilizado em um trabalho anterior no nosso laboratório (Gosh 2005) e o RPL5 foi um isolado que chamou a atenção pela notável disseminação e visceralização em camundongos C57Bl/6 deficientes em IFN γ , após injeção de fragmentos da biópsia da lesão do paciente RPL para isolamento dos parasitos.

A cepa *L. (V.) braziliensis* M2903, referência da Organização Mundial da Saúde (MHOM/BR/1975/M2903), foi gentilmente cedida pela profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter, Instituto de Biologia, Universidade de São Paulo.

3.1.2. Dados dos pacientes

Os pacientes foram atendidos no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad (Goiânia – Goiás) e diagnosticados com LTA por meio de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (Intradermorreação de Montenegro, exame direto, análises histopatológicas, segundo métodos recomendados pelo Ministério da Saúde (2007) e reação de Imunofluorescência indireta, utilizando lâminas contendo formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), sendo a técnica de acordo com Marques et al. (2006). O paciente RPL desenvolveu linfangite e lesão úlcero-crostosa, sendo observada a presença de granuloma no exame histopatológico, características estas ausentes no paciente IMG. O paciente RPL, provavelmente, contraiu a LTA no estado do Pará e o IMG, no estado de Goiás. Os dados dos pacientes estão

apresentados nas Tabelas 1 e 2.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas/UFG.

3.1.3. Cultivo e manutenção dos parasitos *in vitro*

Os parasitos foram mantidos em nitrogênio líquido até o momento dos experimentos, quando foram descongelados e cultivados em placas de 24 poços (Costar, Cambridge, MA, EUA) contendo meio Grace completo (Grace's Insect Medium, Sigma Chemical Co., St Louis, MD, EUA) suplementado com 20% Soro Fetal Bovino (SFB, Cripion, Andradina, SP, Brasil) inativado, 2 mM de L-glutamina (Sigma), 100 U/mL de penicilina (Sigma) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), à temperatura de 26 °C, sendo repicados de três em três dias, sempre iniciando a cultura com 5×10^5 parasitos/mL. Cada cultura foi repicada somente até a 6ª passagem. A quantificação dos parasitos foi realizada em hematócitosmetro, após diluição de uma pequena alíquota da cultura em solução salina tamponada com fosfato (PBS, *phosphate buffer saline*)–formaldeído 2%. Para minimizar variações entre experimentos, os parasitos eram expandidos em cultura e vários tubos eram congelados, para realização de experimentos usando um mesmo estoque de parasitos. A criopreservação dos parasitos foi realizada em meio Grace completo contendo 10% de dimetilsulfóxido (Sigma).

3.2. Camundongos

Foram usados camundongos isogênicos das linhagens BALB/c, C57BL/6 e C57BL/6 geneticamente deficientes em IFN- γ (C57BL/6 IFN- γ KO, gentilmente doados pela Profa. Dra. Leda Quercia Vieira, Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG), machos com idade entre 8 e 12 semanas, fornecidos e mantidos no Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás.

Durante os experimentos, os camundongos foram mantidos em uma sala com ventilação, condições de umidade, temperatura, ruído e luz adequadas, segundo normas adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea), sendo 5 animais o número máximo de animais por gaiola.

3.3. Caracterização da espécie dos parasitos

3.3.1. Extração do DNA genômico

As formas promastigotas foram obtidas do cultivo *in vitro* (1×10^8 parasitos), lavados três vezes com 10 mL de PBS (centrifugação a 1.800 g, 15 min, 10°C) e ressuspendidos em 150 µL de TELT (Tris 50 mM, pH 8,0; EDTA 62,5 mM, pH 9,0; LiCl 2,5 M; Triton X-100 4%), para o rompimento das membranas celulares. Em seguida, 50 µL de proteinase K (50 µg/mL) foram acrescentados, seguido de incubação a 37°C (banho-maria), cerca de 18 h, para ocorrer a digestão das proteínas. Após este período, a separação do DNA foi feita com o acréscimo de 150 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), por meio de centrifugação a 15.000 g por 5 min, à temperatura ambiente (T.a. ~ 25°C). A fase aquosa formada, contendo o DNA, foi coletada cuidadosamente e acrescida de etanol absoluto (2 v/v) (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e incubada por 60 min a -20°C, para a precipitação do DNA. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (15.000 g, 10 min, T.a.), seguida por duas lavagens do sedimento com 1 mL de etanol 70%, (15.000 g, 5 min, T.a). O sedimento, após evaporação do etanol, foi acrescido de 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0), contendo RNase (USBTM, Cleveland, OH, EUA) e incubado por 1 h a 37°C (banho-maria), antes de ser estocado a -20°C.

3.3.2. Identificação da espécie

Inicialmente foi feita a identificação do subgênero, por meio de uma reação de sequenciamento de uma região gênica conservada do DNA ribossomal, após a sua amplificação pela PCR usando como par de iniciadores S₄/S₁₂, de acordo com Uliana et al. 1994.

A identificação da espécie foi realizada pelo ensaio da PCR, por meio da amplificação do gene da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD; EC 1.1.1.49), conforme Castilho et al. (2003). A amplificação do DNA genômico extraído foi feita usando 50 µM dos iniciadores que amplificam o gene da G6PD específico para *L. (V.) braziliensis* (ISVB, 5' TACTCGCCAT GTCGGAGG 3' e ISVC, 5' ATCACAATGATG GTCAACGCA 3'), 50 µM de dNTPs, 0,4 U de Taq DNA

polimerase, tampão composto com Tris-HCl 10 mM, pH 8,6; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM e 2 µL da amostra de DNA, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 44°C por 1 min e extensão a 72°C por 30 seg, sendo a extensão final a 72°C por 4 min. O produto de amplificação com 234 pb foi visualizado em gel de agarose 1,5% (Gibco, EUA).

3.4. Avaliação do crescimento *in vitro* dos parasitos

Os parasitos, cultivados em meio Grace completo, em placas de 24 poços (Costar), à temperatura de 26°C, foram quantificados diariamente durante 9 dias, por meio de contagem em hematocítômetro, como referido acima. As culturas foram iniciadas com 5×10^5 parasitos/mL, em triplicatas. A quantidade de parasitos foi expressa em número de parasitos/mL.

3.5. Avaliação do desenvolvimento da lesão após inóculo dos isolados IMG3 e RPL5 em camundongos C57BL/6, BALB/c e em camundongos deficientes em IFN γ (C57BL/6 IFN γ KO)

Os parasitos, em fase estacionária de crescimento *in vitro* (5º dia de cultivo), foram lavados três vezes com PBS (1.800 g, 10 min, 10°C) e quantificados em hematocítômetro. Foram inoculados 5×10^6 de formas promastigotas (em 0,05 mL de PBS), subcutaneamente, no coxim plantar da pata direita traseira dos camundongos. Esta quantidade de parasitos foi utilizada em todos os experimentos *in vivo*. O desenvolvimento da lesão foi avaliado semanalmente, durante 12 semanas, por mensuração da espessura do coxim das patas com o uso de um paquímetro (Starfer, 150 x 0,02 mm), sendo considerado o tamanho da lesão o resultado da subtração da medida da pata infectada daquela da pata contralateral não infectada, o qual é expresso em milímetros (mm). Por questões éticas, animais apresentando lesões ulceradas ou com tamanho superior a 5 mm foram sacrificados.

3.6. Estimativa da carga parasitária nos camundongos C57BL/6, BALB/c e C57BL/6 IFN- γ KO infectados com IMG3 ou RPL5: ensaio da diluição limitante

O número de parasitos nos linfonodos drenantes da lesão e nos baços foi estimado pelo Ensaio da Diluição Limitante (EDL). Os baços e os linfonodos drenantes das lesões dos camundongos infectados, sacrificados na 4^a (C57BL/6 IFN γ KO) ou 12^a semana de infecção (C57BL/6 e BALB/c), foram macerados com uso de um homogeneizador de tecidos, em 5 mL de meio Grace completo. A suspensão de células obtida foi submetida a oito diluições em série, começando com uma diluição de 1:5, e em seguida, foram distribuídas em placas de 96 poços de fundo chato (Costar), para um volume final de 200 μ L, sendo 12 poços para cada diluição. As placas foram seladas e incubadas por 15 dias, a 26°C, sendo examinadas sob microscopia de luz em microscópio invertido. Os resultados foram expressos como o logarítmico negativo do título de parasitos (última diluição em que os parasitos foram detectados).

3.7. Análises histopatológicas das lesões causadas pelos isolados IMG3 e RPL5

Após o período de 12 semanas de infecção dos camundongos C57BL/6 e BALB/c com os isolados de *L. (V.) braziliensis* IMG3 e RPL5, e quatro semanas para os camundongos C57BL/6 IFN γ KO, as patas infectadas e não infectadas foram coletadas, fixadas (solução de Bouin, ácido pícrico 75%, ácido acético 5% e formaldeído 10% para descalcificação) e embebidas na parafina. Os cortes (5 μ m), feitos a partir do material parafinizado, foram então preparados e corados com hematoxilina e eosina (H&E). Posteriormente, os cortes histológicos foram analisados e fotografados usando um fotomicroscópio (Zeiss modelo Axiostar plus) equipado com uma câmera digital Sony modelo S-85. Nas fotografias foram adicionadas as barras indicativas das medidas em μ m.

Foram avaliados os processos patológicos gerais (PPG) seguintes: patologia da célula, do interstício, do sistema circulatório, inflamação e alterações do crescimento celular. A intensidade dos PPG foi quantificada usando os termos ausente (0), discreto (1 a 25%), moderado (26 a 50%) e acentuado (acima de 50%), conforme o grau de acometimento do corte de tecido avaliado.

3.8. Avaliação da indução de NO pelos isolados IMG3 e RPL5 em células RAW 264.7 e sua modulação pelos leucotrienos endógenos

As linhagens de células murinas, RAW 264.7 (macrófagos) foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Costar) em meio D-MEM (Gibco), suplementado com Hepes 10 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 mg/L e 5% de SFB (Gibco), 11 mM de bicarbonato de sódio e 2 mM de L-glutamina. As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% CO₂, sendo repicadas de duas a três vezes por semana. As células foram distribuídas na concentração de 5 x 10⁴/200 µL em placas de fundo chato de 96 poços (Costar), incubadas por cerca de 20 h e então, cultivadas por adicionais 48 h na ausência ou na presença de diferentes quantidades de formas promastigotas (em fase estacionária do crescimento) dos isolados IMG3 ou RPL5, correspondendo aproximadamente a 1:1, 5:1 e 10:1 parasitos:células. As culturas foram também tratadas com IFN γ recombinante murino (50 U/mL, Sigma) e/ou LPS 100 ng/mL (*E. coli* 0111:B4, Sigma). Para avaliar o efeito dos leucotrienos na indução de NO pelos isolados, as células foram tratadas com MK0591 a 1 µM (inibidor de FLAP, Merck-Frost, gentilmente doado pelo Dr. Carlos Henrique Serezani, Departamento de Imunologia, USP) ou CP-105,696 a 1 µM (antagonista de receptor BLT₁, Pfizer Groton CT, gentilmente doado pelo Dr. Carlos Henrique Serezani, USP), 30 min antes da adição dos estímulos (parasitos e/ou IFN γ /LPS). As concentrações dos compostos utilizadas nos ensaios estão de acordo com aquelas usadas anteriormente (Serezani et al. 2006; Talvani et al. 2002) e não foram tóxicas para os parasitos ou células, como avaliado pelo ensaio do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide), baseado em Ribeiro-Dias et al. (2000).

A concentração de nitritos, produtos estáveis da oxidação do NO em meio aquoso, presente nos sobrenadantes das culturas, foi determinada por uma reação padrão utilizando reagente de Griess. Brevemente, 50 µL dos sobrenadantes das culturas foram incubados com 50 µL de reagente de Griess (sulfanilamida 1%/dihidrocloreto de N-1-naftilenodiamina 0,1%/ácido fosfórico 2,5%) por 10 min, à temperatura ambiente. A absorbância foi detectada por um leitor de microplacas (Multskam, Thermo Labsystems, Shanghai, China), usando filtros de 550 e 620 nm. As concentrações de nitritos foram

determinadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio, iniciando em 5 μM . Os resultados foram expressos em concentração μM de NO_2^- , de valores obtidos de dosagens em duplicatas.

3.9 Avaliação da infecção de macrófagos de camundongos C57Bl/6 com o isolado IMG3: indução de NO e modulação da atividade microbicida dos macrófagos pelos leucotrienos endógenos.

O protocolo seguido foi de acordo com Serezani et al. (2006), com algumas modificações. Tioglicolato (3%) foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos C57Bl/6 e após quatro dias foi realizada uma lavagem da cavidade peritoneal, com 5 mL de PBS gelado, para obtenção das células. Aos lavados foram acrescentados 10 mL de PBS e estes foram centrifugados (600 g, 4°C, 10 min) e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado como o meio DMEM descrito acima. Após quantificação das células, estas foram distribuídas (3×10^5) sobre lamínulas de vidro em poços de placas de fundo chato de 24 poços (Costar). Inicialmente era depositada uma gota de 200 μL sobre as lamínulas e após 30 min (T.a.), para permitir a sedimentação e aderência das células às lamínulas, o meio era adicionado para completar 500 μL . As células eram incubadas na ausência ou na presença de $\text{IFN}\gamma$ (50 U/mL) por quatro horas e então, acrescidas ou não dos compostos MK0591 a 1 μM , CP-105,696 a 1 μM ou aminoguanidina 1 mM por 30 min antes da adição dos parasitos. Como os compostos foram dissolvidos em DMSO, este veículo foi adicionado aos controles (0,1%). Em seguida, os parasitos IMG3 foram adicionados às células peritoneais na relação 5:1 (parasitos:célula). Aos poços tratados com $\text{IFN}\gamma$ foram adicionados 100 ng/mL de LPS. As placas foram incubadas a 35°C, 5% CO_2 em atmosfera umidificada por quatro horas. Após este período, os poços foram lavados com PBS aquecido para retirar células não aderentes e parasitos livres. Lamínulas foram colhidas neste momento, para análise do índice de infecção após 4 h. Aos poços restantes, o meio e todos os tratamentos foram repostos e as placas foram incubadas novamente por mais 20 h (35°C, 5% CO_2). Após a incubação, os sobrenadantes foram colhidos para avaliação da produção de NO, por meio de dosagem de nitritos, como descrito acima. As lamínulas foram fixadas com metanol e coradas pelo kit Instant-Prov (Pinhais, PR, Brasil), conforme recomendações do fabricante. Após, as lamínulas foram fixadas com Entellan (Merck, Brasil) sobre lâminas para microscopia e avaliadas sob microscopia de luz. O índice de infecção foi

obtido pela quantificação de 500 células, sendo multiplicada a porcentagem de macrófagos infectados pelo número médio de parasitos por macrófago infectado. Os experimentos foram feitos em triplicatas.

3.10. Tratamento dos camundongos C57Bl/6 com inibidor de leucotrienos: avaliação da evolução da lesão causada pelo isolado IMG3

Para inibir a atividade da enzima 5-LO *in vivo*, grupos de cinco camundongos C57Bl/6 foram tratados com A-64077 (zileuton) a 1 mg/Kg aplicado via intra peritoneal (i.p.), 1 h antes da infecção e diariamente durante 7 dias. O zileuton foi dissolvido em dimetilsulfóxido (Sigma), sendo este solvente aplicado nos animais controles na mesma concentração usada na preparação do zileuton (2 %). O desenvolvimento da lesão foi acompanhado como já descrito acima.

3.11. Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média), sendo então os dados comparados pelos testes *t* Student, teste pareado de Wilcoxon (para tratados com os compostos inibidores de leucotrienos vs não tratados) ou Two-Way ANOVA/Bonferroni (para vários grupos); ou apresentados como mediana (mínimo e máximo) e os resultados analisados pelo teste de Mann Whitney, conforme indicado nas legendas das figuras. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ e as análises foram feitas utilizando o GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Características dos pacientes com LTA dos quais foram obtidos os parasitos

Para avaliar o comportamento imunobiológico de *L. (V.) braziliensis* foram selecionados dois isolados, os quais foram obtidos de pacientes diagnosticados com LTA. A Tabela 1 apresenta os dados clínicos e epidemiológicos dos dois pacientes, mostrando que ambos apresentavam a forma cutânea localizada da LTA com duas lesões ulceradas, porém com aspectos clínicos diferentes: no paciente RPL a lesão era do tipo úlcero-crostosa, além disto, este paciente apresentava linfangite (presença de cordão linfático). Os locais prováveis de infecção também diferiram entre os dois pacientes, sendo um na região Centro-Oeste (Goiás) e outro na região Norte (Pará). Ambos os pacientes responderam positivamente ao tratamento com antimonial pentavalente, cicatrizando as lesões. Exames laboratoriais auxiliaram o diagnóstico clínico-epidemiológico e mostraram ausência de anticorpos e forte resposta imune celular (intradermoreação positiva), no momento do diagnóstico. Em ambas as biópsias foram detectadas formas amastigotas nos exames histopatológicos, porém, nestes exames não foi detectada a presença de granuloma no paciente IMG, enquanto um granuloma foi detectado na amostra do paciente RPL (Tab. 2).

4.2. Confirmação da espécie dos isolados *L. (V.) braziliensis* IMG3 e RPL5

A identificação do subgênero dos parasitos foi realizada usando a técnica da PCR, amplificando regiões conservadas do DNA ribossomal, seguida de sequenciamento, sendo os resultados apresentados na Figura 1A. Os isolados IMG3 e RPL5 apresentaram seqüências compatíveis com o subgênero *Viannia*. Para a identificação da espécie foi realizada uma *semi-nested* PCR, utilizando iniciadores específicos para a amplificação de genes que codificam uma isoforma da enzima G6PD exclusiva para a espécie *L. (V.) braziliensis*. Foi amplificado o gene da G6PD nos dois isolados, indicando que IMG3 e RPL5 são *L. (V.) braziliensis* (Fig. 1B).

Tabela 1. Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes^a

Pacientes	IMG	RPL
Gênero	Feminino	Masculino
Idade	43	46
Profissão	Do Lar	Garimpeiro
Forma Clínica	Cutânea localizada	Cutânea localizada
Número de lesões	2	2
Tipo de lesão	Ulcerada	Úlcero-crostosa
Tempo de lesão	45 dias	3 meses
Adenomegalia satélite	Não	Sim, presença de cordão linfático (linfangite)
Provável infecção	Goiás	Pará
Tratamento	Antimonial Pentavalente	Antimonial Pentavalente
Resultado	Cura clínica	Cura clínica

^aDados clínicos e epidemiológicos de dois pacientes (IMG e RPL) com Leishmaniose Tegumentar Americana, atendidos no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad, Goiânia – Goiás (paciente IMG no ano 2003 e paciente RPL5 em 2005).

Tabela 2. Dados laboratoriais dos pacientes^a

Paciente	Exame direto	Reação de imunofluorescência indireta (IFI)	Intradermorreação de Montenegro	Exame histopatológico
IMG	Positivo	Não reagente	10 mm	Presença de amastigota, ausência de granuloma
RPL	Não realizado	Não reagente	15 mm	Presença de amastigota, presença de granuloma

^aDados laboratoriais da primeira consulta dos dois pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad, Goiânia – Goiás (paciente IMG no ano 2003 e paciente RPL5 em 2005).

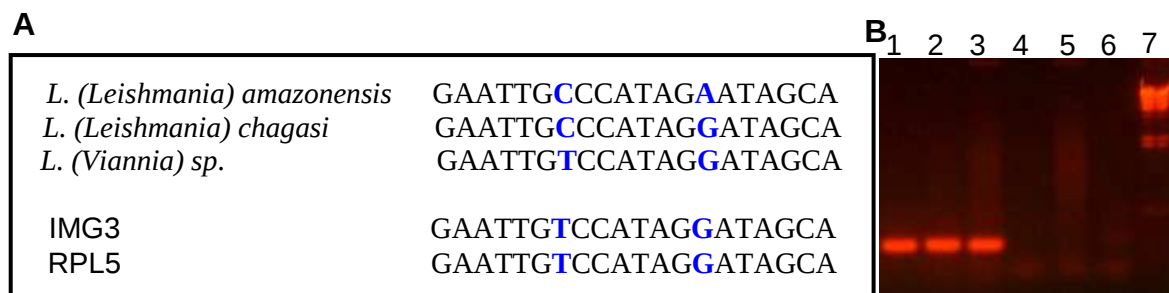


Figura 1. Isolados IMG3 e RPL5 são *L. (V.) braziliensis*. Em **A**, seqüenciamento da região conservada do DNA ribossomal amplificado com os pares de iniciadores S4 e S12. Em **B**, o DNA foi amplificado, utilizando iniciadores específicos para a isoforma da enzima G6PD de *L. (V.) braziliensis*. O produto da PCR (234 pares de bases) foi visualizado em gel de agarose 1,5%, após incorporação de brometo de etídio. Em **1**- IMG3; **2**- RPL5; **3** – *L. (V.) braziliensis* referência da OMS (MHOM/BR/1975/M2903); **4** – *L. (L.) amazonensis* referência da OMS (IFLA/BR/1967/PH8); **5** – *L. (L.) chagasi* referência da OMS (MHOM/BR/74/M2682); **6** – controle negativo da reação; **7** – padrão de peso molecular DNA λ -hind.

4.3. Perfil do crescimento *in vitro* dos isolados *L. (V.) braziliensis* IMG3 e RPL5

Para avaliar o perfil de crescimento *in vitro*, em meio Grace a 26°C, foram realizadas culturas com inóculo inicial de 5×10^5 parasitos/mL. Os perfis de crescimento dos isolados IMG3 e RPL5 foram similares, porém o IMG3 atingiu uma densidade maior de parasitos do que o RPL5 ($4,9 \pm 0,4$ vs $2,7 \pm 0,2 \times 10^7$ parasitos/mL, respectivamente, $p < 0,05$, $n = 7$), ambos atingindo o pico de crescimento no terceiro dia (Fig. 2). Baseado nas curvas de crescimento, os parasitos foram considerados em fase logarítmica de crescimento do primeiro ao terceiro dia de cultura e em fase estacionária do quarto ao oitavo dia de cultivo. A partir do oitavo dia, vários parasitos mortos eram vistos nas culturas. De acordo com estes experimentos, foi definida a utilização dos parasitos em fase estacionária do crescimento no quinto dia de cultivo para os experimentos subseqüentes.

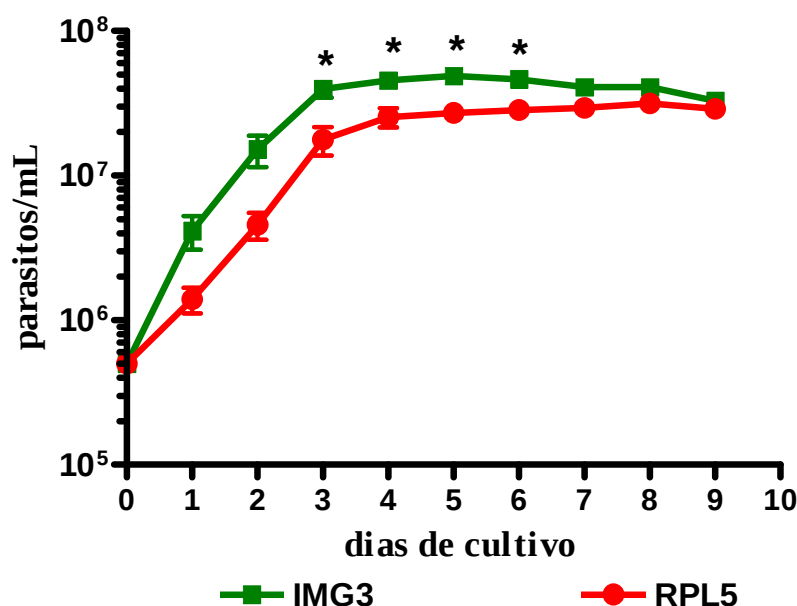


Figura 2. Curva de crescimento *in vitro* dos isolados *L. (V.) braziliensis* IMG3 e RPL5. Os parasitos (■ IMG3 e ● RPL5) foram cultivados na concentração inicial de 5×10^5 parasitos/mL em meio Grace, à temperatura de 26°C. A quantificação dos parasitos foi realizada diariamente durante 9 dias de cultura, usando hematocitômetro. Cada ponto representa a média $\pm$ EPM de 7 experimentos independentes, realizados em triplicatas. * $p < 0,05$ (IMG3 vs RPL5), Two-Way ANOVA/Bonferroni.

4.4. Características da infecção com os isolados *L. (V.) braziliensis* IMG3 e RPL5 em camundongos C57BL/6, BALB/c e C57BL/6 IFN γ KO

As linhagens de camundongos C57BL/6 e BALB/c foram escolhidas para comparar a eficiência da infecção *in vivo* pelos isolados IMG3 e RPL5, bem como o estudo da evolução clínica da lesão. Os camundongos C57BL/6 infectados com os isolados IMG3 ou RPL5 desenvolveram inchaço nas patas já na segunda semana e o tamanho máximo da lesão foi obtido na terceira semana após o inóculo dos parasitos (IMG3: $1,05 \pm 0,14$ mm; RPL5: $1,7 \pm 0,2$ mm). A lesão regrediu progressivamente a partir da quarta semana. Até a 12ª semana de infecção, a regressão da lesão foi praticamente completa nos camundongos infectados com IMG3 ou RPL5, sendo que a medida da lesão permaneceu com 0,1mm (Fig. 3A).

Assim como nos camundongos C57BL/6, os camundongos BALB/c infectados com o isolado RPL5 apresentaram uma lesão com tamanho máximo na terceira semana de infecção ($1,7 \pm 0,12$ mm, Fig. 3B). O isolado IMG3, porém, nestes camundongos, induziu

o pico da lesão somente na quinta semana de infecção ($1,2 \pm 0,19$ mm, Fig. 3B). Contrariamente ao que ocorreu nos camundongos C57Bl/6, as lesões causadas pelos dois isolados, nos camundongos BALB/c, não regrediram até a 12ª semana de infecção, sendo mantida uma lesão de ~ 1 mm (Fig. 3B). As lesões causadas pelos dois isolados nos camundongos BALB/c foram significativamente maiores do que as causadas nos camundongos C57Bl/6, a partir da quarta semana para o isolado IMG3 e da quinta semana para o isolado RPL5 (Fig. 3A e 3B).

A cepa referência *L. (V.) braziliensis* M2903 induziu a formação de uma pequena lesão, tanto em camundongos C57Bl/6 (5ª semana: $0,3 \pm 0,05$ mm, Fig. 3A), quanto nos BALB/c (5ª semana: $0,2 \pm 0,01$ mm, Fig. 3B), que não regrediu totalmente até a 12ª semana de infecção, em ambas as linhagens de camundongos. As lesões causadas pelos isolados IMG3 ou RPL5 foram significativamente maiores do que aquelas causadas pela cepa M2903 nas duas linhagens de camundongos usadas, C57Bl/6 e BALB/c (Fig. 3A e 3B).

A evolução da infecção com os isolados IMG3 ou RPL5 também foi analisada em camundongos C57Bl/6 deficientes em IFN γ . As lesões progrediram rapidamente nestes animais, havendo necessidade de sacrificá-los entre a quarta e a sexta semanas de infecção, devido à ulceração (isolado IMG3) ou elevado crescimento da lesão (RPL5). Na quarta semana pós-inóculo dos parasitos os tamanhos das lesões eram de $2,78 \pm 0,35$ mm para IMG3 e $5,13 \pm 0,13$ mm para RPL5 (Fig. 4A). Da terceira para a quarta semana de infecção, a pata contralateral dos camundongos infectados com IMG3 apresentou leve inchaço, dificultando a mensuração do tamanho da lesão (Fig. 4A). Nas Figuras 4B e 4C são apresentadas as imagens das lesões nas patas dos camundongos C57Bl/6 IFN γ KO infectados por RPL5 (sem ulceração) e IMG3 (com ulceração), respectivamente.

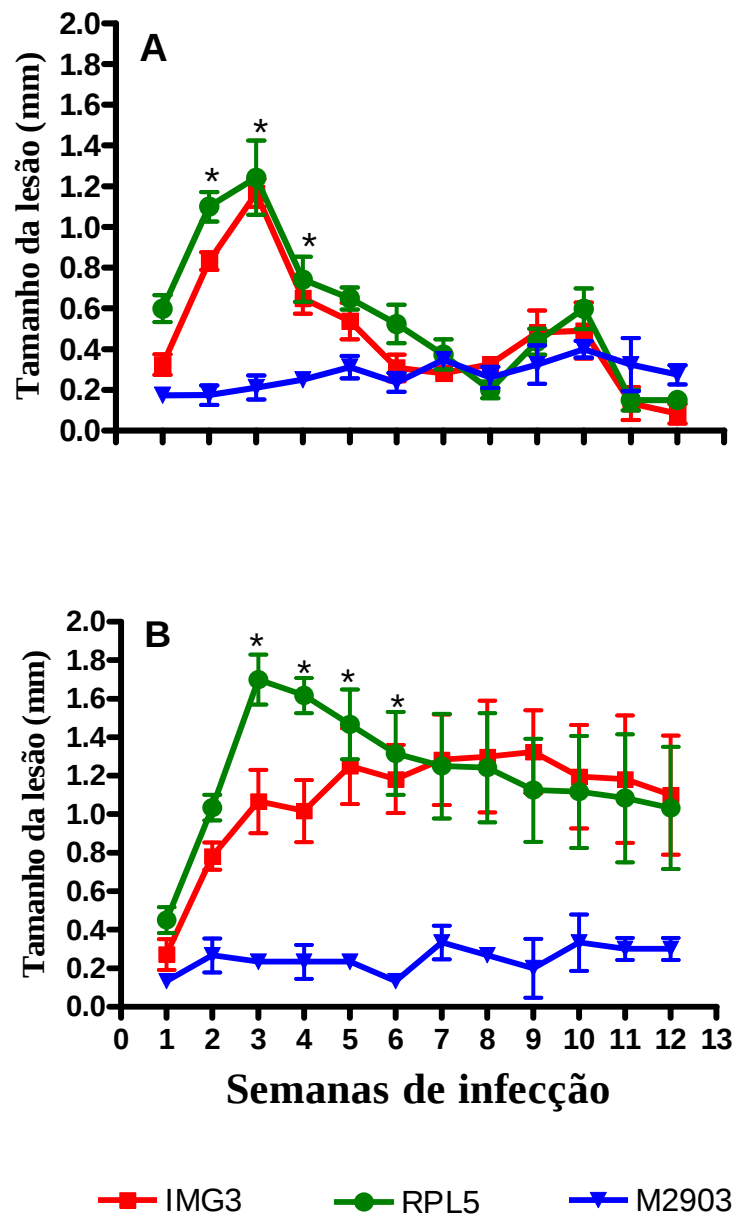
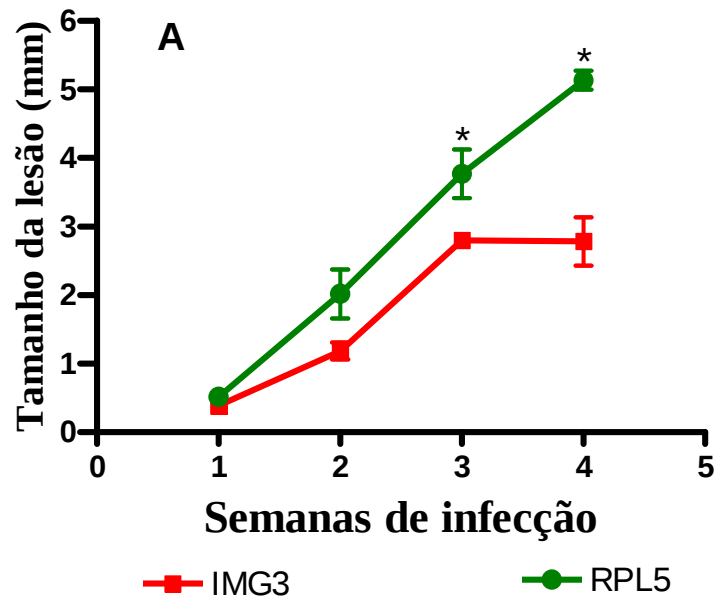


Figura 3. Evolução da lesão em camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com os isolados *L. (V.) braziliensis* IMG3 ou RPL5. Os camundongos C57BL/6 (A) ou BALB/c (B) foram inoculados com 5×10^6 parasitos (■ IMG3, ● RPL e ▼ M2903) em fase estacionária de crescimento, na pata direita traseira. O curso da infecção foi avaliado semanalmente por mensuração da espessura das patas. A medida de cada pata infectada foi subtraída da medida da pata contralateral não infectada e o resultado é expresso como o tamanho da lesão em milímetros (mm). Cada ponto representa a média $\pm$ EPM (n = 6). *p < 0,05 (isolados vs M2903), Two-Way ANOVA/Bonferroni.



B



C



Figura 4. Evolução da lesão em camundongos C57BL/6 IFN γ KO infectados com os isolados *L. (V.) braziliensis* IMG3 ou RPL5. Os camundongos foram inoculados com 5×10^6 parasitos em fase estacionária de crescimento (■ IMG3 e ● RPL), na pata direita traseira. O curso da infecção foi avaliado semanalmente por mensuração da espessura das patas. A medida de cada pata infectada foi subtraída da medida da pata contralateral não infectada e o resultado é expresso como tamanho da lesão em milímetros (mm). Cada ponto representa a média $\pm$ EPM ($n = 6$). * $p < 0,05$ (IMG3 vs RPL5), Two-Way ANOVA/Bonferroni. Em **A**, evolução da lesão nos camundongos C57BL/6 IFN γ KO, em **B** e **C**, fotos das patas infectadas com os isolados RPL5 ou IMG3, respectivamente, na quarta semana de infecção.

Para quantificar os parasitos após 12 semanas de infecção e analisar se havia disseminação dos parasitos a partir do sítio de inóculo, a carga parasitária foi estimada nos linfonodos drenantes da lesão e nos baços dos camundongos C57BL/6 e BALB/c. Em acordo com os resultados da Figura 3B, os linfonodos drenantes das lesões causadas pelos isolados IMG3 ou RPL5 em camundongos BALB/c apresentavam parasitos (Fig. 5A). A carga parasitária de IMG3 (-2,7 log de parasitos) foi levemente superior à de RPL5 (-1,0 log de parasitos) nestes camundongos. Apesar da aparente cura clínica (Fig. 3A) dos camundongos C57Bl/6, ainda foram detectados parasitos nos linfonodos drenantes das lesões em alguns camundongos (2/6 para IMG3 e 1/6 para RPL5, Fig. 5A). A quantidade de parasitos IMG3 nos linfonodos de camundongos BALB/c foi significativamente maior do que aquela detectada nos camundongos C57Bl/6 ($p < 0,05$; Fig. 5A), enquanto para o isolado RPL5 a diferença entre o número de parasitos nas duas linhagens de camundongos não atingiu significância estatística ($p = 0,09$). Em nenhum dos baços avaliados de camundongos BALB/c ou C57Bl/6 foram detectados quaisquer parasitos após as 12 semanas de infecção. Camundongos C57BL/6 deficientes em $IFN\gamma$ mostraram elevada carga parasitária nos linfonodos drenantes na quarta semana de infecção (IMG3: -4,19 e RPL5: -4,54 log de parasitos, Fig. 5B) e 50% destes camundongos apresentaram disseminação dos parasitos do sítio da lesão para o baço (Fig. 5C).

Para analisar os aspectos microscópicos das lesões, após três meses de infecção dos camundongos C57Bl/6 e BALB/c com os isolados IMG3 e RPL5, as patas foram submetidas a análises histopatológicas. Como pode ser observado na Figura 6, o sítio de infecção dos camundongos BALB/c apresentava um processo inflamatório crônico, com acentuado infiltrado mononuclear (Fig. 6A) e com macrófagos contendo várias formas amastigotas dos parasitos IMG3 (Fig. 6B). Os camundongos C57Bl/6 apresentavam um processo de cicatrização com depósito de colágeno na derme (Fig. 6C) e não foi observada a presença de parasitos em aumento de 1.000x. Resultados similares foram obtidos com o isolado RPL5 (dados não mostrados).

Na ausência de $IFN\gamma$, o isolado IMG3 causou lesão ulcerativa com forte reação inflamatória, sendo observada uma necrose fibrinóide no local (Fig. 7A), havendo a presença de numerosos macrófagos densamente infectados (Fig. 7B), após quatro semanas de infecção. Nesta semana de infecção houve um inchaço na pata contralateral, que não havia sofrido qualquer intervenção. Sob análise microscópica, foi observada a presença de um infiltrado contendo tanto células polimorfonucleares quanto mononucleares (Fig. 7C), podendo ser visualizado margeamento leucocitário nos vasos sanguíneos (Fig. 7D).

Porém, não foi observada a presença de parasitos dentro destas células em aumento de 1.000x. As patas de camundongos infectados com o isolado RPL5 apresentaram um denso infiltrado inflamatório composto de macrófagos (Fig. 7E), que ia da região plantar à região dorsal da pata. Os macrófagos vacuolizados continham inúmeros parasitos (Fig. 7F).

4.5. Avaliação da participação dos leucotrienos endógenos na infecção de camundongos C57BL/6 por isolados de *L. (V.) braziliensis*

Inicialmente, a capacidade dos isolados *L. (V.) braziliensis* de induzir NO foi avaliada em culturas de macrófagos murinos RAW 264.7. A indução de NO foi muito variável entre os experimentos, sendo demonstrado um aumento significativo apenas com o isolado RPL5 na relação 10:1 parasitos:célula ($2,8 \pm 0,9$ vs $12,7 \pm 4,2 \mu\text{M NO}_2^-$, $n = 4$, $p < 0,05$, Fig. 8A). O IFN γ sozinho induziu uma leve produção de NO nos macrófagos, a qual foi significativamente aumentada por ambos os isolados IMG3 ($12,2 \pm 6,4$ vs $37,1 \pm 9,8 \mu\text{M NO}_2^-$, $n = 4$, $p < 0,05$, Fig. 8B) ou RPL5 ($12,2 \pm 6,4$ vs $43,3 \pm 11,1 \mu\text{M NO}_2^-$, $n = 4$, $p < 0,05$, Fig. 8B). A adição de LPS às culturas tratadas com IFN γ também aumentou significativamente a produção de NO ($12,2 \pm 6,4$ (Fig. 7B) vs $47,2 \pm 6,3 \mu\text{M NO}_2^-$ (Fig. 8C), $n = 4$, $p < 0,05$), porém a adição dos parasitos não alterou significativamente esta produção (Fig. 8C).

Em seguida, foi analisada a modulação da produção de NO pelos leucotrienos. A infecção por *L. major* é capaz de induzir produção de leucotrienos (Milano et al. 1996) e estes mediadores aumentam a produção de NO em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Serezani et al. 2006). Foram realizadas co-culturas de macrófagos RAW 264.7 com IMG3 na proporção de 5:1 (parasitos:células). Nesta relação escolhida, a quantidade de parasitos foi suficiente para induzir baixos níveis de NO nas co-culturas, induziu NO quando IFN γ foi adicionado simultaneamente e não alterou a produção de NO induzida por IFN γ /LPS. As co-culturas foram tratadas com inibidor de síntese de leucotrienos (MK0591) ou com o antagonista do receptor de LTB $_4$ (CP-105,696). Conforme visto na Figura 9, os nossos resultados mostraram que na presença do inibidor ou do antagonista, houve uma pequena redução nos níveis de produção de NO apenas nas culturas tratadas com IFN/LPS, tanto na ausência quanto na presença de parasitos.

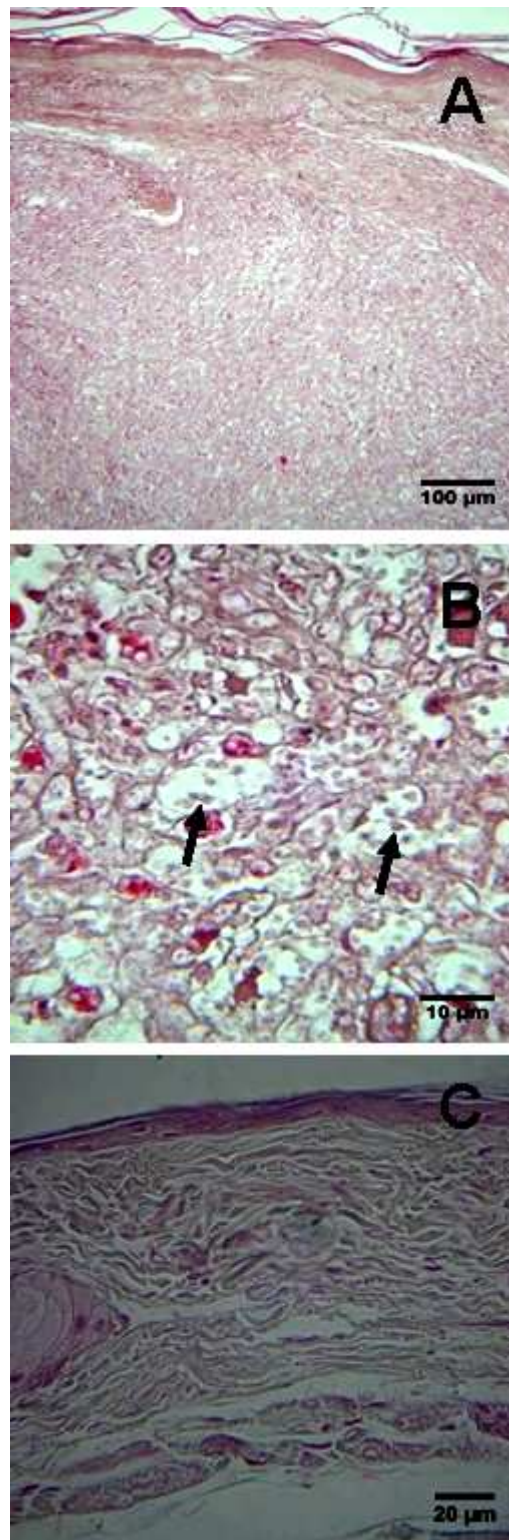


Figura 6. Fotomicrografias dos cortes histopatológicos das patas dos camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados com *L. (V.) braziliensis* IMG3 após 12 semanas de infecção. Os camundongos foram infectados com 5×10^6 parasitos/pata e após 12 semanas foram sacrificados para preparação de cortes histológicos corados por H&E. Em **A** é mostrado um acentuado infiltrado mononuclear atingindo toda a derme, aumento de 100 x. Em **B**, macrófagos vacuolizados repletos de parasitos (setas), aumento de 1000 x. Em **A** e **B**, lesão em camundongos BALB/c. Em **C**, aspectos de cicatrização da lesão em camundongos C57Bl/6, mostrando moderado depósito de colágeno na derme, aumento de 400 x. As barras horizontais representam as medidas em μm .

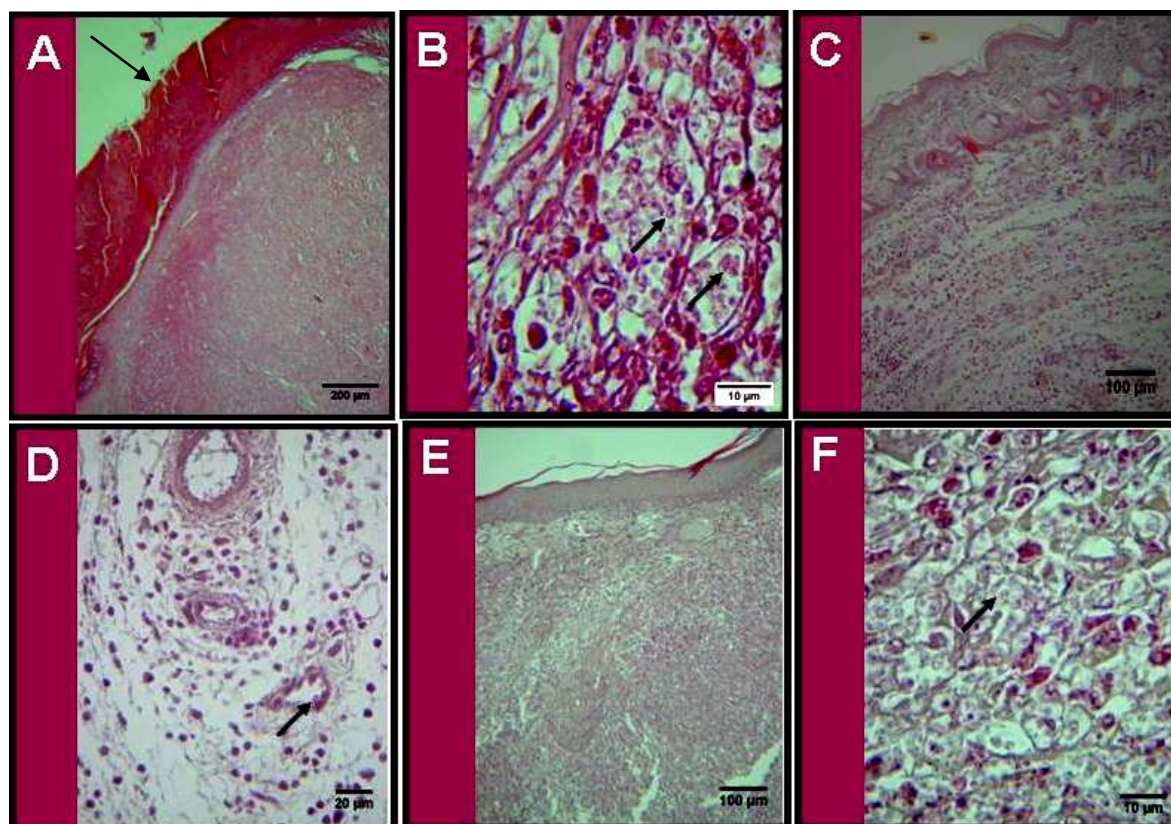


Figura 7. Fotomicrografias dos cortes histopatológicos das lesões causadas pelos isolados IMG3 e RPL5 em camundongos C57Bl/6 IFN γ KO. Os camundongos foram infectados com 5×10^6 parasitos/pata e após quatro semanas foram sacrificados para preparação de cortes histológicos corados por H&E. Em **A**, lesão causada pelo isolado IMG3, mostrando uma área de necrose fibrinóide (indicada pela seta) e um acentuado infiltrado inflamatório em toda a derme, aumento 50 x. Em **B**, macrófagos vacuolizados densamente parasitados (nas setas, amastigotas de IMG3), aumento 1000 x. Em **C**, infiltrado inflamatório na derme da pata contra-lateral não inoculada (camundongos infectados com IMG3), aumento de 100 x. Em **D**, em detalhe o margeamento leucocitário (seta), camundongos infectados com IMG3, aumento de 400 x. Em **E**, infecção pelo isolado RPL5, mostrando a derme totalmente infiltrada (aumento de 100 x) e em **F**, os macrófagos vacuolizados acentuadamente parasitados (as setas indicam as amastigotas), aumento de 1000 x. As barras horizontais representam as medidas em μm .

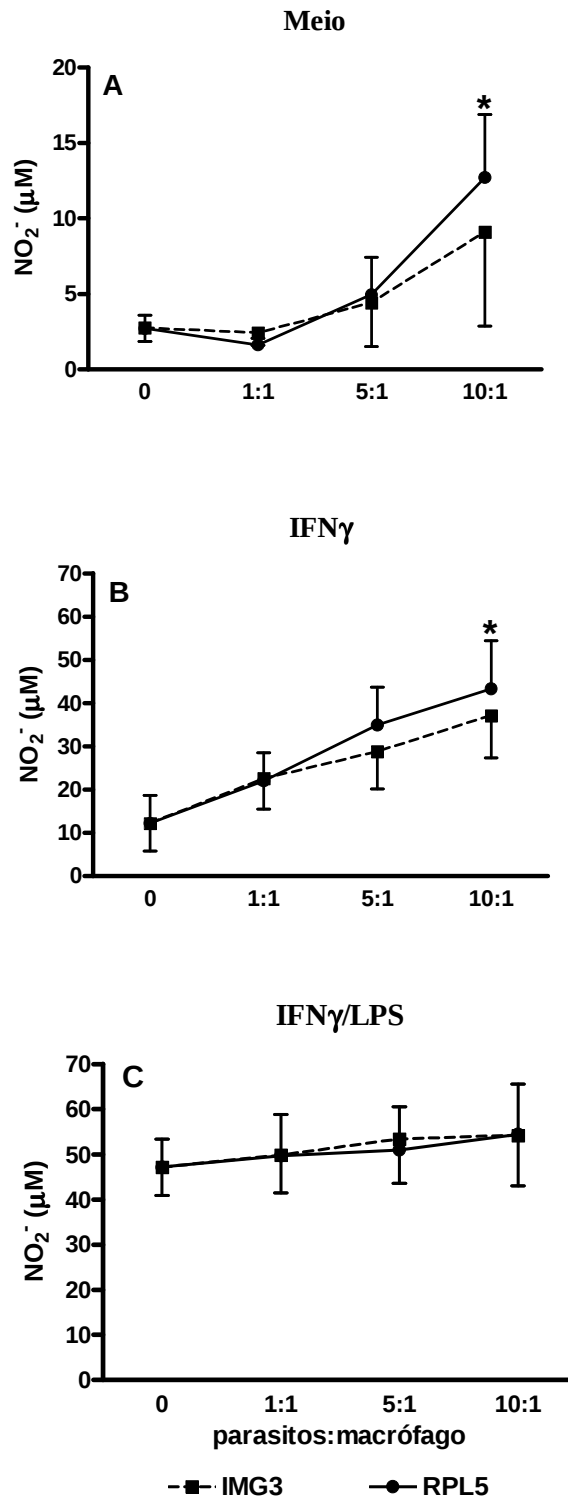


Figura 8. Indução de NO pelos isolados *L. (V.) braziliensis* IMG3 ou RPL5 em macrófagos murinos RAW 264.7. Células RAW 264.7 ($5 \times 10^4/200 \mu\text{L}$) foram incubadas na ausência (A) ou presença de 50 U/mL de IFN γ (B), ou ainda na presença de IFN γ (50 U/mL) e LPS (100 ng/mL) (C), com diferentes relações parasitos:célula, por 48 h, 35°C. As concentrações de nitritos foram determinadas nos sobrenadantes das culturas, usando reativo de Griess. Os dados representam as médias $\pm$ EPM ($n = 4$ experimentos em duplicatas). * $p < 0,05$ (A: meio (0) vs 10:1; B: IFN γ (0) vs IFN + 10:1), teste t de Student.

Como os resultados anteriores mostraram similaridades nas características dos isolados IMG3 e RPL5, os experimentos descritos a seguir foram realizados somente com o isolado IMG3. Uma das dificuldades em avaliar a atividade microbicida dos macrófagos usando células RAW 264.7 é o fato de que elas se multiplicam durante o período de incubação, portanto, para avaliar a atividade microbicida foram utilizados macrófagos peritoneais murinos. A Figura 10A apresenta um experimento representativo de três realizados, mostrando que o isolado IMG3 sozinho não induz a produção de NO. Na presença de IFN γ e LPS, houve indução de NO ($1,8 \pm 0,6$ vs $8,4 \pm 0,4$ μ M NO $_2^-$). A inibição de 5-LO ou antagonismo do BLT $_1$ parecem não afetar a produção de NO (Fig. 10A). A inibição do NO pela aminoguanidina (Fig. 10A) aumentou a atividade microbicida dos macrófagos na ausência ou na presença de IFN γ /LPS (Fig. 10B). Os dados preliminares indicam que na ausência de IFN γ /LPS os inibidores de leucotrienos não modulam a atividade microbicida dos macrófagos, mas podem fazê-lo na presença destes estímulos (Fig. 10B).

Para avaliar um possível papel dos leucotrienos na evolução da infecção de camundongos C57BL/6 com o isolado IMG3, estes camundongos foram tratados com zileuton, um inibidor de síntese de leucotrienos, durante a primeira semana de infecção. Como pode ser observado na Figura 11, não houve diferença estatisticamente significativa entre as lesões na quarta e quinta semanas de infecção nos camundongos tratados com zileuton em relação ao grupo controle tratado com PBS. Em ambos os grupos houve regressão da lesão a partir da quinta semana de infecção.

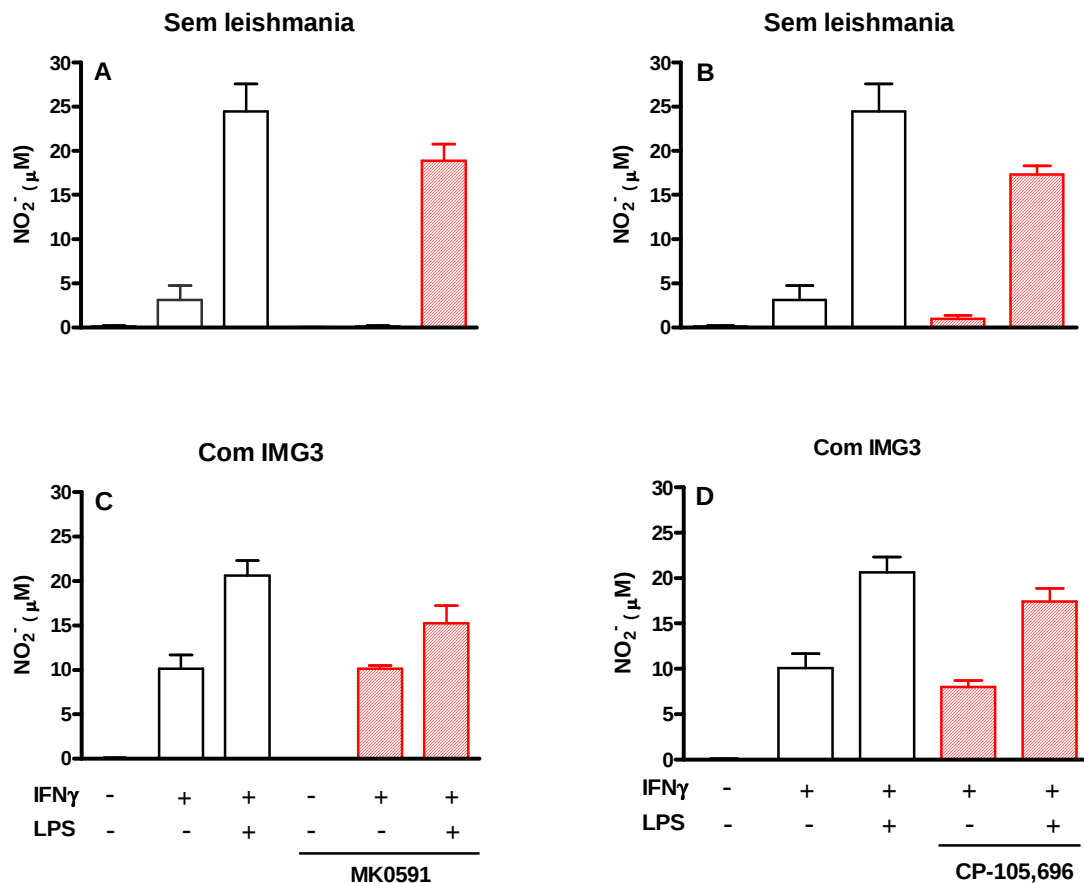


Figura 9. Leucotrienos endógenos não modulam a produção de NO induzida pelo isolado *L. (V.) braziliensis* IMG3 em macrófagos murinos RAW 264.7. Células RAW 264.7 ($5 \times 10^4/200 \mu\text{L}$) foram incubadas na ausência (A e B) ou na presença (C e D) de parasitos (relação parasitos:células 5:1) por 48 h. As culturas foram tratadas (+) ou não (-) com IFN γ (50 U/mL), LPS (100 ng/mL), MK0591 (1 μM) ou CP-105,696 (1 μM). As concentrações de nitritos foram determinadas nos sobrenadantes das culturas, usando reativo de Griess. Os dados representam as médias $\pm$ EPM ($n = 4$ experimentos em duplicatas).

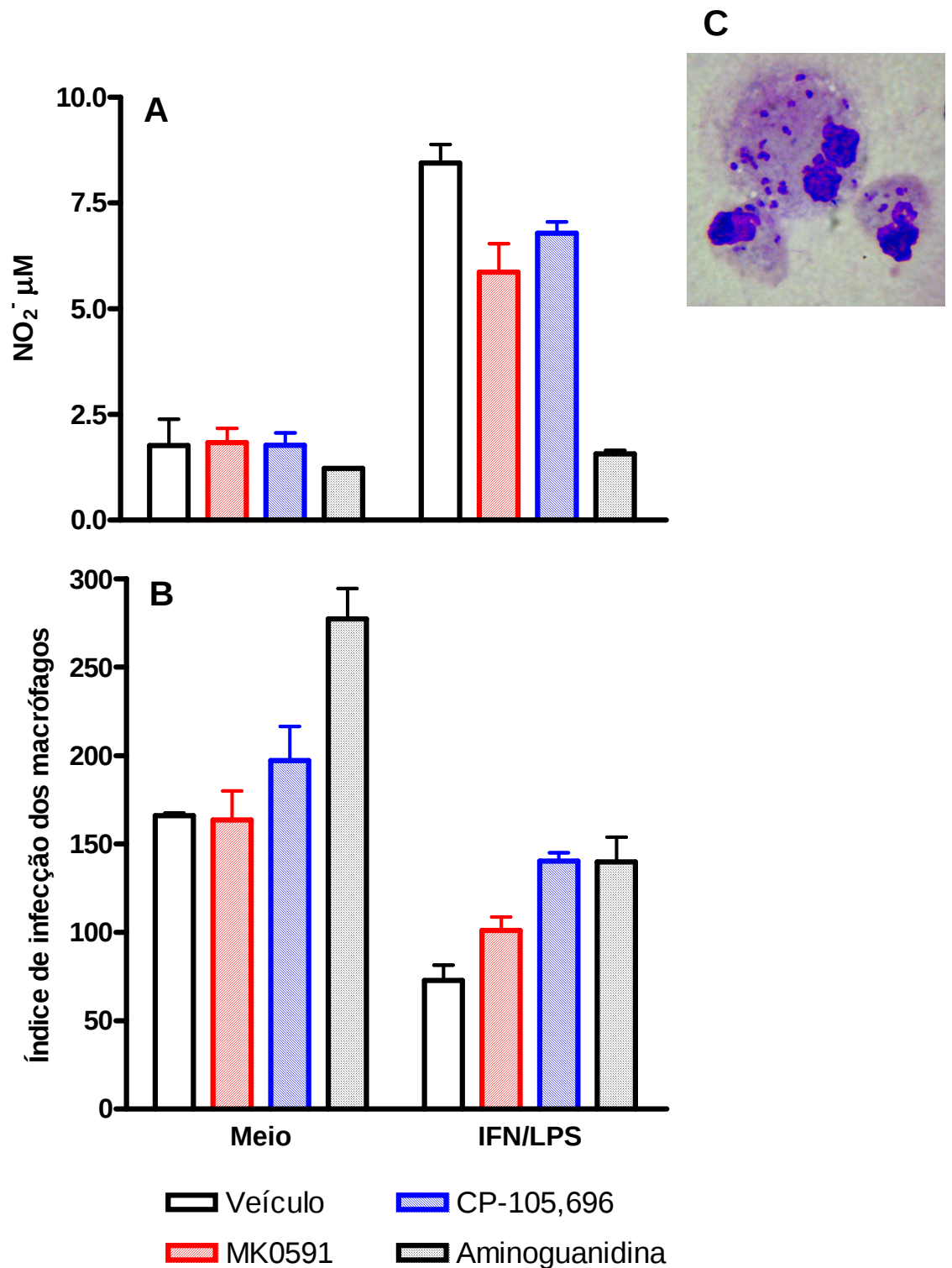


Figura 10. Avaliação da atividade microbicida de macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 infectados com *L. (V.) braziliensis* IMG3. Os macrófagos peritoneais foram coletados quatro dias após injeção de tioglicolato, foram aderidos ($3 \times 10^5/500 \mu\text{L}$) em lamínulas de vidro e infectados com os parasitos IMG3 (5:1) na ausência (Meio) ou presença de IFN γ /LPS, por 4 h. As culturas foram tratadas com o veículo ou com os compostos CP-105,696 e MK0591 (ambos a $1 \mu\text{M}$), e aminoguanidina 1 mM . Após 24 h de cultivo, os sobrenadantes foram colhidos e os nitritos determinados por reação de Griess (A). As lamínulas foram coradas para análise microscópica e obtenção do índice de infecção dos macrófagos (B, 500 células avaliadas). Em C, fotomicrografia de macrófagos peritoneais infectados com parasitos IMG3 corados com Instant Prov, aumento de 1000 x. Os dados representam as médias $\pm$ EPM de triplicatas de um experimento representativo. Acima, uma foto mostrando a infecção dos macrófagos pelo isolado IMG3.

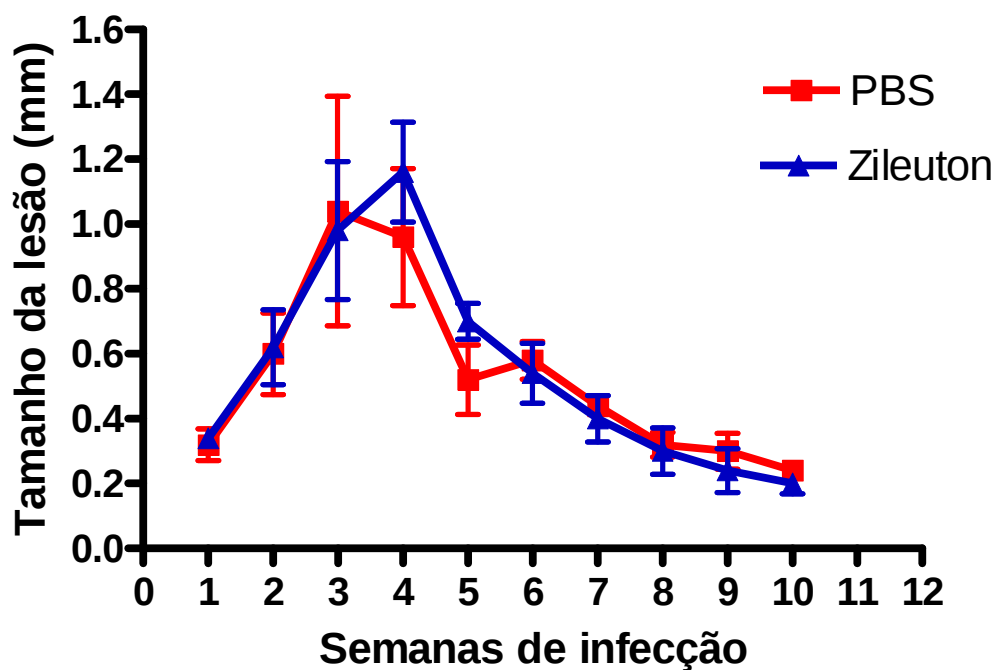


Figura 11. Inibição da síntese de leucotrienos *in vivo* não altera a evolução da lesão em camundongos C57BL/6 infectados por *L. (V.) braziliensis* IMG3. Camundongos C57BL/6 foram tratados com zileuton (1 mg/kg) ou com PBS por via i.p. uma hora antes e durante a primeira semana após o inculo dos parasitos IMG3 na pata direita (5×10^6 parasitos). A evolução da lesão foi avaliada através da mensuração da pata infectada subtraindo-se a medida da pata contralateral não infectada, sendo o resultado expresso como tamanho da lesão em milímetros (mm). n = 5 camundongos.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, dois isolados de *L. (V.) braziliensis*, obtidos a partir de biópsia de dois pacientes diagnosticados com LTA na forma LCL, foram estudados. Estes isolados foram selecionados do *Leishbank*/IPTSP/UFG para um estudo comparativo, por apresentarem algumas características distintas. As características clínico-epidemiológicas da doença nos pacientes foram compatíveis com aquelas descritas anteriormente (Nascimento 1986; Nunes et al. 1995; Romero et al. 2001; Silveira et al. 2004). A lesão causada pelo isolado RPL5 era do tipo úlcero-crostosa e o paciente apresentava linfangite (cordão linfático) e formação de granuloma epitelióide na lesão, características estas diferentes daquelas apresentadas pela infecção causada pelo isolado IMG3, as quais poderiam ser devido a diferenças na virulência dos parasitos. Entretanto, o tempo mais prolongado da lesão no paciente RPL (três meses) do que no paciente IMG (45 dias) pode ter contribuído para o desenvolvimento da reação granulomatosa detectada no exame histopatológico, como já descrito anteriormente (Faber et al. 2003). Uma possibilidade para diferenças nas características intrínsecas dos parasitos é a procedência dos mesmos, pois o IMG3 é de um caso autóctone de Goiás, enquanto o RPL5 é do extremo Norte do Brasil, próximo a Guiana Francesa, regiões ecologicamente distintas. Estes parasitos são, de acordo com a classificação do Ministério da Saúde (2007), oriundos do circuito 20 (Goiás/Distrito Federal, o IMG3) e do circuito 14 (Pará/Amapá, o RPL5) de produção de LTA, nos quais os parasitos são adaptados a diferentes reservatórios silvestres e diferentes insetos vetores.

A identificação da espécie dos isolados foi feita usando técnicas moleculares, que mostraram que eles são da espécie *L. (V.) braziliensis*. Trabalhos prévios atestam a eficiência das técnicas moleculares na identificação do gênero e da espécie dos parasitos (Uliana et al. 1994; Uliana et al. 2000; Castilho et al. 2003). Técnicas moleculares têm sido importantes para a caracterização mais precisa das espécies de *Leishmania* em áreas endêmicas, permitindo a caracterização epidemiológica da leishmaniose no local e uma associação entre espécie e características clínicas, o que pode auxiliar no tratamento os pacientes (Lopez et al. 1993; Romero et al. 2001; Floeter-Winter & Shaw 2004). A espécie *L. (V.) braziliensis* é a espécie prevalente no Brasil, incluindo as áreas de origem dos dois isolados aqui estudados, embora no estado do Pará, a espécie *L. (V.) guyanensis* também seja de elevada importância (Grimaldi Jr et al. 1991; Dorta et al. 2003; Carvalho et al. 2006; Ministério da Saúde, 2007).

O acompanhamento diário do crescimento dos parasitos *in vitro* mostrou similaridade no curso temporal do crescimento dos dois isolados, embora o isolado IMG3 mostrasse uma densidade de parasitos significativamente maior do que aquela apresentada pelo isolado RPL5. O perfil de crescimento do isolado IMG3, obtido nas condições do presente estudo, foi similar àquele descrito anteriormente por Gosh (2005), alcançando fase estacionária de crescimento por volta do 5º dia de cultivo. A fase estacionária no 5º dia de cultura também foi relatada por Souza-Neto et al. (2004), usando a cepa de *L. (V.) braziliensis* M2903. O perfil de crescimento *in vitro* de *Leishmania* é variável dependendo de vários fatores, incluindo o tempo de adaptação dos parasitos ao meio de cultura, o tipo de meio de cultura e sua suplementação, o isolado ou cepa, de tal forma que a fase estacionária do crescimento dos parasitos pode demorar mais ou ser mais rápida para se estabelecer em algumas condições (O'Daly & Rodriguez 1988; Lemestre et al. 1988; Celeste & Guimarães, 1988; Rey et al. 1990). No presente trabalho, no período da fase estacionária, numerosos parasitos livres dos aglomerados típicos da fase log do crescimento, eram observados, contendo o corpo pequenino e longo flagelo, movimentando-se rapidamente (dados não mostrados). Essas mudanças coincidem com aquelas descritas durante o processo de metaciclologênese descrito por Almeida et al. (1993) para *L. (V.) braziliensis*, em que o processo de adaptação dos parasitos ao meio de cultura é acompanhado por mudanças bioquímicas e morfológicas, que os tornam potencialmente mais infectantes. Por isso, os parasitos, no 5º dia de cultivo foram utilizados para a realização dos nossos experimentos.

A eficiência da infecção pelos isolados IMG3 ou RPL5 e a evolução clínica da lesão foi avaliada em camundongos isogênicos C57BL/6 e BALB/c. Essas linhagens de camundongos têm sido intensamente utilizadas para definir o curso da infecção causada por diferentes espécies de *Leishmania sp* (Neal & Hale 1983; Barral-Netto et al. 1987; Samuelson et al. 1991; DeKrey et al. 1998; Maiolli et al. 2004). No presente trabalho, na linhagem C57BL/6, o pico da lesão (~ 1 mm) ocorreu na 3ª semana de infecção e houve uma aparente resolução da lesão entre a 11ª e 12ª semana de infecção, isto para ambos os isolados. Na linhagem BALB/c, os isolados induziram lesões progressivas até a 3ª ou 5ª semana, que permaneceram sem resolução durante 12 semanas, similarmente com os dois isolados. O tamanho das lesões obtidas com os dois isolados nas duas linhagens estudadas foi similar ao previamente relatado por DeKrey et al. (1998) e Samuelson et al. (1991), usando BALB/c e *L. (V.) braziliensis* LTB-111 ou WR604, respectivamente, e por Souza-Neto et al. (2004), usando C57Bl/6 e *L. (V.) braziliensis* M2903.

Alguns estudos realizados com camundongos BALB/c e diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* têm demonstrado lesões pequenas (~ 0,2 mm) e que apresentam cura clínica (Indiani de Oliveira et al. 2004; Teixeira et al. 2005; Rocha et al. 2007). Para aumentar a lesão e prolongar a infecção, o inóculo dos parasitos tem sido realizado juntamente com a saliva do inseto vetor (Samuelson et al. 1991; Lima & Titus 1996; Bezerra & Teixeira 2001). No presente trabalho, o tamanho da lesão causada pela cepa M2903 também foi pequeno e comparável ao dos trabalhos citados acima (~ 0,2 mm), mostrando uma diferença significativa em relação ao tamanho da lesão causada pelos isolados IMG3 e RPL5.

A maioria dos estudos mostra que há resolução da infecção por *L. (V.) braziliensis* tanto no camundongo C57Bl/6 quanto no BALB/c (DeKrey et al. 1998; Samuelson et al. 1991; Indiani de Oliveira et al. 2004; Souza-Neto et al. 2004), porém, suscetibilidade do BALB/c, com progressiva lesão dermal e visceralização, foi observada por Childs et al. (1984). No presente trabalho, apesar da lesão não ser resolvida no camundongo BALB/c infectado com os isolados IMG3 ou RPL5, não foi observada visceralização após 12 semanas de infecção. Também nos camundongos C57Bl/6 infectados com os isolados IMG3 ou RPL5 não apresentaram disseminação dos parasitos do sítio de infecção para os baços.

Além de variações no padrão de infecção em camundongos, também em hamsters têm sido descritas variações com diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*. Dois isolados de pacientes com leishmaniose da região de Salta na Argentina, mostraram comportamento distintos: um induziu lesão severa e persistente, enquanto o outro isolado causou metástase cutânea e disseminação sistêmica, mesmo sendo a lesão auto-limitante (Sinagra et al. 1997). Coletivamente, estes dados mostram que características dos parasitos influenciam a evolução da infecção, e indicam que os isolados aqui estudados, IMG3 e RPL5 infectam eficientemente os camundongos C57Bl/6 e BALB/c, podendo ser usados para estudo da infecção por *L. (V.) braziliensis*, o que tem sido difícil devido à baixa capacidade de infecção murina por esta espécie. O modelo com o camundongo C57Bl/6 pode ser um bom modelo de estudo da resistência à infecção pelos isolados IMG3 e RPL5, e como neste caso há a cura clínica, seria um bom modelo para estudos de re-agudizações. Por outro lado, o camundongo BALB/c, infectado por estes isolados, seria um bom modelo para o estudo da suscetibilidade, mostrando possíveis mecanismos alvos a serem modulados para obtenção da cura clínica.

Os isolados IMG3 e RPL5 causaram lesões que foram resolvidas no

camundongo C57Bl/6 e persistentes no camundongo BALB/c. Esse perfil de resistência e suscetibilidade é similar ao clássico obtido por infecção com *L. major* nestas linhagens murinas (Heinzel et al. 1989), porém o camundongo BALB/c não morre por visceralização pelo menos até 12 semanas de infecção com os isolados IMG3 e RPL5. O perfil de resistência pode estar associado ao estabelecimento de resposta imune do tipo Th1 com forte resposta imune celular, sendo o IFN γ importante no mecanismo de controle da infecção, conforme descrito em trabalhos de infecção com *L. major* (Scott 1991; Scharon & Scott 1993; von Stebut & Udey, 2004). De fato, no presente trabalho, a ausência de IFN γ nos camundongos C57Bl/6 causou lesões que se desenvolveram rapidamente, havendo necessidade de sacrificar os animais infectados por IMG3, os quais apresentaram ulceração, e os infectados por RPL5, que atingiram medidas da lesão superiores a 5 mm entre quatro e seis semanas de infecção. Neste período, os camundongos infectados com o isolado IMG3 apresentaram crescimento da pata contralateral não infectada, indicando disseminação do parasito a partir do sítio de inóculo. A disseminação pode ocorrer por via hematogênica ou linfática. Os cortes histológicos das patas não infectadas que apresentaram inchaço mostraram vasos com margemamento leucocitário e um intenso infiltrado inflamatório rico em células polimorfonucleares e mononucleares, não sendo visualizados parasitos no interior destas células. Corroborando a sugestão de disseminação por estes resultados, além dos parasitos estarem presentes nos linfonodos drenantes da lesão, eles estavam também presentes nos baços de cerca de 50% dos camundongos C57Bl/6 IFN γ KO infectados com os isolados IMG3 ou RPL5. Estes resultados foram similares para os dois isolados, mostrando que o IFN γ é importante para a contenção dos parasitos no sítio da lesão. Nossos resultados estão de acordo com aqueles de Souza-Neto et al. (2004) e são similares aos obtidos por Dekrey et al. (1998), que mostraram que o tratamento de camundongos BALB/c infectados por *L. (V.) braziliensis* com anticorpos neutralizantes de IFN γ , exacerba a lesão e impede a resolução da infecção. Vale ressaltar que quando o isolado RPL5 foi obtido do paciente, por inóculo do macerado de biópsia em camundongos deficientes de IFN γ , foi observada extensa disseminação do parasito, atingindo vários órgãos e tecidos, tais como baço, fígado, testículos e cauda, sob análise macroscópica e microscópica (dados não mostrados).

As análises histopatológicas das patas infectadas com os isolados IMG3 e RPL5 mostraram típico infiltrado inflamatório com numerosos macrófagos vacuolizados e repletos de parasitos nos animais deficientes de IFN γ bem como nos camundongos BALB/c infectados por 12 semanas. O isolado IMG3 induziu uma ulceração na lesão,

sendo mostrado um quadro de necrose fibrinóide no local. Os aspectos histológicos observados estão de acordo com aqueles obtidos de análises realizadas previamente em camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/01/BA788 (de Moura et al. 2005).

A resolução da infecção nos animais C57Bl/6, no presente estudo, está associada à produção de IFN γ e pode ser dependente da produção de NO, como previamente demonstrado por Rocha et al. 2007. De fato, a co-cultura de macrófagos murinos RAW264.7 com formas promastigotas dos isolados IMG3 induziu a produção de NO pelos macrófagos, especialmente na presença de IFN γ . Na infecção de macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 com o isolado IMG3 houve produção de NO quando as culturas foram tratadas com IFN γ e LPS e, nestes macrófagos, o tratamento com aminoguanidina, um inibidor de iNOS (Misko et al. 1993), aumentou a infecção pelo isolado IMG3, sugerindo a participação do NO no controle da infecção. Mesmo não tendo sido detectado NO nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais infectados sem tratamento com IFN γ , a aminoguanidina aumentou a infecção, sugerindo que mesmo quantidades pequenas, indetectáveis pela reação de Griess, podem contribuir para a eliminação dos parasitos. Estes resultados corroboram os resultados de Rocha et al. (2007), que utilizando camundongos geneticamente deficientes em iNOS, mostraram um crescimento descontrolado da lesão, indicando o NO como uma importante molécula microbicida agindo para controlar a infecção por *L. (V.) braziliensis*.

Neste trabalho, a co-cultura de macrófagos murinos RAW 264.7 com os isolados IMG3 e RPL5 mostrou que estes isolados não alteram a produção de NO induzida por IFN γ e LPS. O IFN γ é uma citocina que age sinergisticamente com produtos microbianos para a produção de NO (Ding et al. 1988). O envolvimento de TLR na infecção por *L. major* tem sido sugerido por experimentos em camundongos deficientes em TLR4 e em molécula importantes para a sinalização via TLR, tais como o MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), mostrando uma debilitação no controle da infecção e polarização Th2 nestes animais (de Veer et al. 2003; Muraille et al. 2003; Debus et al. 2003; Kropf et al. 2004a; Kropf et al. 2004b). Kropf et al. (2004a e b) mostraram que o TLR4 contribui para a ativação da via iNOS e produção de NO quando ocorre a infecção por *L. major*. Assim, em nossos experimentos, tanto o LPS quanto os isolados *L. (V.) braziliensis* podem estar utilizando o TLR4 para indução de NO nos macrófagos, não havendo alteração na produção de NO quando os parasitos são adicionados às culturas tratadas com IFN γ e LPS por já haver uma produção máxima de NO nas concentrações

destes estimuladores usados. Ensaios com diferentes concentrações e combinações dos estímulos, bem como o uso de anticorpos neutralizantes de TLR4, devem ser realizados para definir as interações entre os agonistas de TLR4 e o IFN γ neste modelo.

A importância do NO para conter a infecção por *Leishmania* tem sido demonstrada em camundongos C57Bl/6 infectados com *L. major* (Stenger et al. 1996; Bogdan et al. 2000) ou com *L. (V.) braziliensis* (Rocha et al. 2007). No entanto, recentemente, Giudice et al. (2007) mostraram que nem todos os isolados de *L. (V.) braziliensis* são suscetíveis ao NO. Diferenças na indução de NO *in vitro* tem sido relatada para diferentes espécies de *Leishmania*, sendo que enquanto *L. major* induz NO, e como demonstrado aqui, também *L. (V.) braziliensis*, enquanto *L. (L.) amazonensis* inibe NO induzido por LPS (Balestieri et al. 2002). Portanto, diferenças na indução e suscetibilidade ao NO depende da espécie e dos isolados dentro de uma mesma espécie, sendo que o nosso isolado IMG3, além de induzir NO, mostrou-se suscetível à ação microbicida desta molécula.

Durante a resposta imune inata, a ativação das células gera a produção de mediadores lipídicos da inflamação, tais como os leucotrienos, que além de serem muito importantes para várias etapas da inflamação, tais como o aumento da permeabilidade vascular, o aumento da expressão de moléculas de adesão e o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório, podem ter importante função nos mecanismos microbicidas (Crooks & Stockley 1998; Peters-Golden et al. 2004; Kim & Luster 2007; Flamand et al. 2007). Os resultados do presente trabalho mostram que os leucotrienos endógenos não modulam a produção de NO nas células RAW 264.7, uma vez que um inibidor de 5-LO e um bloqueador de LTB₁ não alteraram significativamente a produção de NO. Estes resultados foram similares para as células ativadas com IFN γ , IFN γ /LPS na ausência ou presença dos parasitos. Houve uma leve redução na produção de NO quando os macrófagos infectados ou não foram ativados com IFN γ /LPS e tratados tanto com o inibidor quanto com o antagonista de leucotrienos. Estes dados foram similares aos obtidos com os macrófagos peritoneais dos camundongos C57Bl/6 infectados com o isolado IMG3. Os dados sugerem que os leucotrienos podem modular a via de produção de NO induzida pelo receptor para o LPS (TLR4).

Hulkower et al. (1996) mostraram que células RAW 264.7 ativadas com IFN- γ e LPS não liberam LTB₄ e a inibição da 5-LO não altera a produção de NO induzida por um ionóforo de cálcio nestas células. Ainda, estes autores mostraram que o tratamento destas células com LTB₄ exógeno não altera a produção de NO. No presente estudo não

foi mensurado a liberação de LTB₄ nos sobrenadantes das co-culturas de células RAW 264.7 e os isolados IMG3 e RPL5, ou avaliado o efeito de LTB₄ exógeno na indução de NO nestas células ou nos macrófagos peritoneais. Estudos com macrófagos primários, porém, mostram que os leucotrienos endógenos modulam a produção de NO em macrófagos peritoneais de ratos (Imai et al. 1993) e de camundongos (Ryoyama et al. 1993). Assim como também, Serezani et al. (2006) mostraram que a adição de LTB₄ aos macrófagos murinos infectados com *L. (L.) amazonensis* aumenta a produção de NO e a atividade microbicida dos macrófagos. Estes autores também demonstraram que macrófagos de camundongos resistentes à infecção produzem maior quantidade de leucotrienos do que os suscetíveis. Estes resultados contraditórios podem ser devido ao uso de inibidores menos seletivos em alguns estudos e ao tipo de células, linhagem celular *versus* células primárias, além dos estímulos para indução de NO. Além de ter sido demonstrada a indução de leucotrienos por *L. (L.) amazonensis* (Serezani et al. 2006), a indução de leucotrienos por *L. donovani* em macrófagos também já foi descrita (Reiner & Malemud 1985), no entanto, até o momento não se sabe se *L. (V.) braziliensis* é capaz de induzir produção de leucotrienos nos macrófagos.

No presente trabalho, a inibição da produção de leucotrienos *in vivo* foi realizada com o fármaco Zileuton, usando um esquema de tratamento previamente descrito por Serezani et al. (2006). Estes autores demonstraram que os leucotrienos são importantes na fase inicial da infecção por *L. (L.) amazonensis*, pois sem os leucotrienos as lesões aumentaram de tamanho e, além disto, a produção de NO por macrófagos peritoneais murinos foi diminuída, causando diminuição da atividade microbicida dos macrófagos. Contrariamente, os nossos resultados mostram que o tratamento com zileuton não alterou o curso da infecção nos camundongos, sugerindo que os leucotrienes não estão envolvidos nos mecanismos microbicidas desencadeados por *L. (V.) braziliensis* *in vivo*.

As células da imunidade inata desempenham importante papel no controle inicial das infecções e também influenciam o perfil das respostas imunes adaptativas. Os mediadores lipídicos da inflamação, além de participarem efetivamente na montagem da resposta inflamatória, são potentes ativadores de leucócitos e podem ser necessários para a melhor eficácia destas células na eliminação de microrganismos patogênicos. Apesar dos resultados do presente trabalho indicarem que os leucotrienos endógenos não estão envolvidos na eliminação dos parasitos, sugerindo que *L. (V.) braziliensis* não induz produção de leucotrienos nos camundongos C57Bl/6, uma ativação dos macrófagos por

leucotrienos exógenos, usados farmacologicamente, não pode ser completamente descartada. Leucotrienos, agindo de maneira parácrina, podem ativar os macrófagos e contribuir para a eliminação dos parasitos. Esta é uma hipótese que tem ainda que ser investigada.

6. CONCLUSÕES

6.1. Conclusão geral

Os isolados *L. V. braziliensis* IMG3 e RPL5 apresentaram comportamentos similares *in vitro* e *in vivo* em camundongos, induzindo uma lesão persistente nos camundongos BALB/c e resolução da lesão nos camundongos C57BL/6. Os leucotrienos endógenos não parecem desempenhar um papel importante na resistência à infecção.

6.2. Conclusões específicas

- Os pacientes dos quais os parasitos foram isolados apresentavam LCL, sendo que o RPL diferiu do paciente IMG por apresentar lesão ulcero-crostosa com formação de granuloma.
- O crescimento dos isolados *in vitro* não difere, e *in vivo*, ambos os isolados induzem lesões que evoluem para a cura clínica em camundongos C57Bl/6, enquanto nos camundongos BALBc, a lesão persiste até a décima segunda semana de infecção.
- O IFN γ é essencial para o controle da infecção causada tanto pelo isolado IMG3 quanto pelo RPL5.
- Os isolados IMG3 e RPL5 induziram produção de NO por células RAW 264.7 somente quando estas foram estimuladas com IFN γ e a produção de NO não foi alterada pelos leucotrienos endógenos. A atividade microbicida de macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 infectados com IMG3 é dependente de NO.
- A inibição da produção dos leucotrienos *in vivo* não alterou o curso da infecção pelo isolado IMG3 nos camundongos C57BL/6.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A 2000. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun* 68(4): 1760-1764.

Almeida MC, Cuba-Cuba CA, Sa CM, Pharnoa MM, Howard KM, Miles MA 1993. Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in vitro: evidence that lentil lectin is a marker of complement resistance and enhanced infectivity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87(3):325-329.

Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. 2003. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(7): 861-870.

Amato VS, Rabello A, Rotondo-Silva A, Kono A, Maldonado TPH, Alves IC, Floeter-Winter LM, Neto VA, Shikanai-Yasuda MA 2004. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with lipid formulations of amphotericin B in two immunocompromised patients. *Acta Tropica* 92: 127-132.

Anderson CF, Mendez S, Sacks D 2005. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol* 175: 2934-2941.

Andrade ASR, Gomes RF, Fernandes O, Melo MN 2001. Use of DNA-based diagnostic methods form human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica* 78: 261-267.

Andrade MS, Brito MEF, Silva ST, Lima BS, Almeida EL, Albuquerque EL, Júnior JFM, Ishikawa E, Cupolillo E, Brandão-Filho SP 2005. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(3): 229-233.

Andrade-Filho JD, Galati EAB, Falcão AL 2007. *Nyssomyia intermédia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)

geographical distribution and epidemiological importance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(4): 481-487.

Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emergind and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269-1281.

Bailey MS & Lockwood DNJ 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 25(2):203-211.

Bailie MB, Standiford TJ, Laichalk LL, Coffey MJ, Strieter R, Peters-Golden M 1996. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol* 157(12): 5221-4.

Ballestieri FMP, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Netto M, Abrahamsohn IA 2002. *Leishmania (L) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect* 4(1): 23-9.

Barral A, Barral-Netto M, Almeida R, De Jesus AR, Grimaldi Jr G, Netto EM, Santos I, Bacellar O, Carvalho EM 1992. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *Am J Trop Med Hyg* 47: 587-592.

Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM 1995. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 53: 256-259.

Barral-Netto M, Cardoso SA, Barral A 1987. Different patterns of disease in two inbred mouse strains infected with a clone of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Acta Tropica* 44: 5-11.

Bezerra HS & Teixeira MJ 2001. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(3): 349-351.

Bogdan C & Rittig MG 2000. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today* 16(7): 292-297.

Bogdan C, Rölinghoff M, Diefendbach A 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173: 17-26.

Boscá L, Zeini M, Través PG, Hortelano S 2005. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology* 208: 249-258.

Bourreau E, Gardon J, Pradinaud R, Pascalis H, Prévot-Linguet G, Kariminia A, Pascal L 2003. Th2 responses predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and precede the development of Th1 responses. *Infect Immun* 71(4): 2244-2246.

Brown M, Noursadeghi M, Boyle J, Davidson RN 2005. Successful liposomal amphotericin B treatment of *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *Br J Dermatol* 153: 203-205.

Brunet LR 2001. Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunopharmacol* 1(8):1457-1467.

Bürkert E, Szellas D, Radmark O, Steinhilber D, Werz O 2003. Cell type-dependent activation of 5-lipoxygenase by arachidonic acid. *J Leukoc Biol* 73: 191-200.

Carvalho MLR, Andrade ASR, Fontes CJF, Hueb M, Silva SO, Melo MN 2006. *Leishmania (Viannia) braziliensis* s the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. *Acta Tropica* 98: 277-285.

Castilho RM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM 2003. New PCR assay using Glucose-6-Phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol* 41(2): 540-546.

Castro EA, Soccol VT, Membrive N, Luz E 2002. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. *Rev Soc Bras Med Trop* 35(5): 445-452.

Celeste BJ & Guimarães MCS. 1988. Growth curves of *Leishmania braziliensis braziliensis* promastigotes and surface antigen expression before and after adaptation to scheider's drosophila medium as assessed by anti-leishmania human sera. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 30 (2): 63-67.

Childs GE, Lightner LK, McKinney LA, Groves M, Price E, Hendricks L 1984. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana* and *L. aethiopica*. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 25-34.

Coffey MJ, Serezani CHC, Phare SM, Flamand N 2007. NADPH oxidase deficiency results in reduced alveolar macrophage 5-lipoxygenase expression and decreased leukotriene synthesis. *J Leukoc Biol* 82(6):1585-1591.

Convit J, Ulrich M, Fernandez CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Cates M, Rondon AJ 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87(4):444-448.

Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M 1995. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4), IL-10 and PGE₂) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 206(2): 667-673.

Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, De-Luca P 1998. Immunologic patterns associated with cure in human american cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 31: 139-142.

Crooks SW & Stockley RA 1998. Molecules in focus Leukotriene B₄. *Int J Biochem Cell Biol* 30(2):173-178.

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MP, Brito MEF, Falqueto A, Naiff MF, Grimaldi G Jr 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of

Leishmania (Viannia) braziliensis from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 41(7): 3126-3132.

D'Oliveira JRA, Machado P, Bacellar O, Cheng LH, Almeida RP, Carvalho EM 2002. Evaluation IFN- γ and TNF- α as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 35(1): 7-10.

Da Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF 2007. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of american cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(2): 149-153.

Da Silva R & Sacks DL 1987. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun* 55: 2802-2806.

Da-Cruz AM, Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SCF, Coutinho SG 1996. Tumor Necrosis Factor- α in human american tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91(2): 225-229.

De Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, Indiani de Oliveira C 2005. Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 73(9): 5827-5834.

De Moura TR, Oliveira F, Novais FO, Miranda JC, Clarêncio J, Follador I, Carvalho EM, Valenzuela JG, Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Indiani de Oliveira C 2007. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. *PLoS Negl Trop Dis* 1(2):e84.

De Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol* 33: 2822-2831.

Debus A, Gläsner J, Röllinghoff M, Gessner A 2003. High levels of susceptibility and T helper 2 response in MyD88-deficient mice infected with *Leishmania major* are interleukin-4 dependent. *Infect Immun* 71(2): 7215-7218.

Dekrey GK, Lima HC, Titus RG 1998. Analysis of the Immune Responses of Mice to Infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 66 (2): 827-829.

Del Prete A, Shao WH, Mitola S, Santoro G, Sozzani S, Haribabu B 2006. Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B₄ receptors: a role for LTB₄ in up-regulation of CCR7 expression and function. *Blood* 109(2): 626-631.

Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27(5):305-318.

DiMeo D, Tian J, Zhang J, Narushima S, Berg DJ 2007. Increased interleukin-10 production and Th2 skewing in the absence of 5-lipoxygenase. *Immunology* 123(2):250-62.

Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 141: 2407-2412.

Dorta ML, Gosh CS, Dorta RO, Pereira LLA, Pereira AJSC, Ribeiro-Dias F 2003. American cutaneous leishmaniasis in a rural area of Goiás state, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 45(13): 149.

Faber WR, Oskam L, Gool T, Kroom NCM, Kneegt-Junk KJ, Hofwegen H, Wal AC, Kager PA 2003. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 49:70-74.

Flamand L, Borgeat P, Lalonde R, Gosselin J 2004. Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B₄ to humans. *J Infect Dis* 189(11):2001-219.

Flamand N, Mancuso P, Serezani CHC, Brock TG. 2007. Leukotrienes: mediators that

have been typecast as villains. *Cell Mol Life Sci* 64 (19-20):2657-70.

Floeter-Winter LM & Shaw JJ 2004. New horizons in the identification and taxonomy of the *Leishmania* and the diagnoses of the leishmaniasis: the expansion of molecular techniques. *Res Adv in Microbiology* 4: 63-79.

FUNASA 2000. Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana. Ministério da Saúde, 5ª edição 1-62.

Funk CD 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294(5548):1871-1875.

Gaudreault E, Stankova J, Rola-Pleszczynski M 2005. Involvement of leukotriene B4 receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 75(1-4):25-34.

Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira JMB, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP 2007. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in tegumentary leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 7(7): 1-12.

Gomes IN, Calabrich AFC, Tavares RS, Wietzerbin J, Freitas LAR, Veras PST 2003. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes Infect* 5:251-260.

Gomes RF, Macedo AM, Pena SDJ, Melo MN 1995. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA Fingerprinting and RAPD. *Exp Parasitol* 80: 681-687.

Gontijo B & Carvalho MLR 2003. Leishmaniose tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(1): 71-80.

Goodarzi K, Goodarzi M, Tager AM, Luster AD, Andrian UH 2003. Leukotriene B4 and

BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nat Immunol* 4(10): 965-973.

Gordon S 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3(1): 23-35.

Gosch CS 2005. Caracterização imunobiológica de isolados de leishmanias de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana. 55f., il color., 30cm. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) -*Instit Patol Trop Sau Pub* . Goiânia.

Grimaldi Jr G & Tesh RB 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Reviews* 6(3): 230-250.

Grimaldi Jr G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV 1991. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 44(6): 645-661.

Guevara-Mendonza, Une C, Carreira F, Orn A 1997. Experimental infection of Balb/c mice with *Leishmania panamensis* and *Leishmania mexicana*: induction of early IFN γ but not IL-4 is associated with the development of cutaneous lesions. *Scand J Immunol* 46: 35-40.

Handman E 1999. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol* 44: 01-39.

Handman E 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 14(2): 229-243.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM 1989. Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. *J Exp Med* 169: 59-72.

Hepburn NC 2003. Cutaneous leishmaniasis: an overview. *J Postgrad Med* 49(1):50-54.

Hölscher C, Arendse B, Schwegmann A, Myburgh E, Brombacher F 2006. Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. *J Immunol* 176: 1115-1121.

Hondowicz B & Scott P 1999. Influence of host and parasite factors on the innate immune response and Th2 stability following infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect* 1(1):65-71.

Hulkower KI, Pollock JS, Walsh RE, Huang R, Otis ER, Brooks CDW, Bell RL 1996. Leukotrienes do not regulate nitric oxide production in Raw 264.7 macrophages. *Prostaglandins, leukotrienes and Essential Fatty Acids* 55(3): 145-149.

Imai Y, Kolb H, Burkart V 1993. Nitric oxide production from macrophages is regulated by arachidonic acid metabolites. *Biochem Biophys Res Commun* 197 (1): 105-109.

Indiani de Oliveira C, Teixeira MJ, Teixeira CR, Jesus JR, Rosato AB, Silva JS, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A 2004. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect* 6: 977-984.

Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Corraliza I 2001. The inhibition of arginase by N^ω-Hydroxy-L-Arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* 193(6): 777-783.

Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelen J, Mirón C, Alonso C, Corraliza I 2002. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.* 24(3): 113-118.

Islam SA, Thomas SY, Hess C, Medoff BD, Means TK, Brander C, Lilly CM, Tager AM, Luster AD 2006. The leukotriene B4 chemoattractant receptor BLT1 defines antigen-primed T cells in humans. *Blood* 107 (2): 444-453.

Jones DE, Ackermann MR, Wille U, Hunter CA, Scott P 2002. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect Immun* 70(4): 2151-2158.

Jorens PG, Matthys KE, Bult H 1995. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Med Inflammation* 4: 75-89.

Jozefowski S, Biedron R, Bobek M, Marcinkiewicz J 2005. Leukotrienes modulate cytokine release from dendritic cells. *Immunology* 116: 418-428.

Kamhawi S 2000. *Microbes Infect* 2(14): 1765-1773.

Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290(5495): 1351-1354.

Kim ND & Luster AD 2007. Regulation of immune cells by eicosanoid receptors. *ScientificWorldJournal* 7: 1307-1328.

Kochar DK, Aseri S, Sharma BV, Bumb RA, Mehta RD, Purohit SK 2000. The role of rifampicin in the management of cutaneous leishmaniasis. *Q J Med* 93: 733-737.

Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 471-479.

Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Müller I 2004. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 72(4): 1920-1928.

Kropf P, Freudenberg N, Kallis C, Modolell M, Herath S, Galanos C, Freudenberg M, Müller I 2004. Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. *J Leuk Biol* 76: 48-57.

Lemestre JL, Darcy F, Kweider M, Capron A, Santoro F 1988. Requirements of defined

cultivation conditions for Standard growth of *Leishmania* promastigotes in vitro. *Acta Tropica* 45: 99-108.

Liew FY, Li Y, Millot S 1990. Tumor necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. *Immunol* 71: 556-559.

Liew FY, Li Y, Moss D, Parkinson C, Rogers MV, Moncada S 1991. Resistance to *Leishmania* major infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur J Immunol* 21: 3009-3014.

Lima HC & Titus RG 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun* 64(12): 5442-45.

Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Lanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J 1993. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg* 49(3): 348-356.

Machado ER, Ueta MT, Lourenço EV, Aníbal FF, Sorgi CA, Soares EG, Roque-Barreira MC, Medeiros AI, Faccioli LH 2005. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine Strongyloidiasis. *J Immunol* 175: 3892-3899.

Machado-Coelho GLL, Assunção R, Mayrink W, Caiaffa WT 1999. American cutaneous leishmaniasis in southeast Brazil: space-time clustering. *Int J Epidemiol* 28: 982-989.

Maioli TU, Takane E, Arantes RME, Fietto JLR, Afonso LCC 2004. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57Bl/6. *Parasitol Res* 94: 207-212.

Malaviya R & Abraham SN 2000. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leuk Biol* 67: 841-846.

Mancuso P, Nana-Sinkam P, Peters-Golden M 2001. Leukotriene B₄ augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 69(4): 2011-2016.

Manoel ER & Martins F 2003. Epidemiologia das Leishmanioses no Estado de Goiás –

2002. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(Sup II): 19-20.

Manoel ER & Martins F 2003. Epidemiologia das leishmanioses no Estado de Goiás – 2002. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(Sup II): 19-20.

Marques MJ, Volpini AC, Machado-Coelho GLL, Machado-Pinto J, Costa CA, Mayrink W, Genaro O, Romanha AJ 2006. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 54(1):37-43.

Mayer B, Hemmens B 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22 477-481.

McMahon-Pratt D & Alexander J 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev* 201: 206-224.

Milano S, Arcoleo F, Dieli M, D'Agostino R, Nucci G, D'Agostino P, Cillari E 1996. *Ex vivo* evidence for PGE2 and LTB4 involvement in cutaneous leishmaniasis: relation with infection status and cytokine production. *Parasitol* 112: 13-19.

Mills CD 2001. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Crit Rev Immunol* 21(4): 399-426.

Ministério da Saúde 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª ed. Brasília – DF.

Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Williamson JR, Currie MG 1993. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 233: 119-125.

Mossalayi MD, Arock M, Mazier D, Vincendeau P, Vouldoukis I. 1999. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitology Today*. 15(8): 342-344.

Mukbel RM, Patten Jr C, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg* 76(4): 669-675.

Muraille E, Trez C, Brait M, Baetselier P, Leo O, Carlier Y 2003. Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized Th2 response. *J Immunol* 170: 4237-4241.

Murphy R & Gijón MA 2007. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J* 405: 379-395.

Nagai K & Katori M 1987. Chemotactic effects of leukotriene B₄ in the microcirculation. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 17B:905-7.

Neal RA & Hale C 1983. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. *Parasitology* 87: 7-13.

Nigg AP, Zahn S, Rückerl D, Hölscher C, Yoshimoto T, Ehrchen JM, Wölbing F, Udey MC, Von Stebut E 2007. Dendritic cell-derived IL-12p40 homodimer contributes to susceptibility in cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *J Immunol* 178: 7251-7258.

Noël W, Raes G, Ghassabeh GH, De Baetselier P, Beschin A 2004. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol* 20(3): 126-133.

Nunes VLB, Dorva MEC, Oshiro ET, Noguchi RC, Arão LB, Filho GH, Espíndola MA, Cristaldo C, Rocha HC, Serafini LN, Santos D 1995. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul - Estudo na população humana. *Rev Soc Bras Med Trop* 28(3): 185-193.

O'Daly JA, Rodriguez MB 1988. Differential growth requirements of several *Leishmania* spp. In chemically defined culture media. *Acta Tropica* 45: 109-126.

Oliveira CCG, Lacerda HG, Martins DRM, Barbosa JDA, Monteiro GR, Queiroz J W,

Sousa JMA, Ximenes MFFM, Jeronimo SMB 2004. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Tropica* 90: 155-162.

Panaro MA, Acquafreda A, Lisi S, Lofrumento DD, Trotta T, Satalino R, Saccia M, Mitolo V, Brandonisio O 1999. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide. *Int J Clin Lab Res* 29: 122-127.

Panaro MA, Brandonisio O, Sisto M, Acquafredda A, Leogrande D, Fumarola L, Mitolo V 2001. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. *Clin Exp Med* 1(3):137-143.

Peres CM, Aronoff DM, Serezani CH, Flamand N, Faccioli LH, Peters-Golden M 2007. *J Immunol* 179: 5454-5461.

Peres CM, Paula L, Medeiros AI, Sorgi CA, Soares EG, Carlos D, Peters-Golden M, Silva CL, Faccioli LH 2007. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 9: 483-489.

Peters N & Sacks D 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* 213: 159-179.

Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ 2004. Leukotriene: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 173: 589-594.

Peterson AT, Shaw J 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *Int J Parasitol* 33: 919-913.

Pettersson A, Sabirsh A, Bristulf J, Kidd-Ljunggren K, Ljunggren B, Owman C, Karlsson U 2005. Pro- and anti-inflammatory substances modulate expression of the leukotriene B4 receptor, BLT1, in human monocytes. *J Leuk Biol* 77: 1018-1025.

Pinheiro R O & Rossi-Bergmann B 2007. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(1): 79-82.

Pinto-da-Silva LH, Camurate M, Costa KA, Oliveira SMP, Cunha-e-Silva NL, Saraiva EMB 2002. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective form macrophages in vitro and hamsters in vivo. *Int J Parasitol* 32: 1371-1377.

Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C 2002. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 70(8): 4638-4642.

Qi H, Ji J, Wanase N, Soong L 2004. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 72(2): 988-995.

Radmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B 2007. 5-lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci* 23(7): 332-341.

Reiner NE & Malemud CJ 1985. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. *J Immunol* 134(1): 556-63.

Reithiner R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 7: 581-596.

Reithinger R & Dujardin JC 2007. Minireviews. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 45(1): 21-25.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581-596.

Rey JA, Travi BL, Valencia AZ, Saraiva NG 1990. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 43(6): 623-

Rhee EG, Mendez S, Shah JA, Wu C, Kirman JR, Turon TN, Davey DF, Davis H, Klinman DM, Coler RN, Sacks DL, Seder RA 2002. Vaccination with heat-killed *Leishmania* antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses and protection against *Leishmania major* infection. *J Exp Med* 195(12): 1565-1573.

Ribeiro-Dias F, Barbuto JAM, Tsujita M, Jancar S 2000. Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine spleen cells by MTT assay: differential inhibition by PGE₂ and EDTA. *J Immunol Methods* 241: 121-129.

Rocha FJS, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C 2007. Cytokine, signaling pathways and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infect Immun* 75(8): 3823-3832.

Romero GAS, Guerra MVF, Paes MG, Macedo VO 2001. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clin Infect Dis* 32: 1304-1312.

Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE 1995. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J* 9: 200-209.

Royle MC, Töttemeyer S, Alldridge LC, Maskell DJ, Bryant CE. 2003. Stimulation of Toll-like receptor 4 by lipopolysaccharide during cellular invasion by live *Salmonella typhimurium* is a critical but not exclusive event leading to macrophage responses. *J Immunol* 170(11):5445-5454.

Ryoyama K, Nomura T, Nakamura S 1993. Inhibition of macrophage nitric oxide production by arachidonate-cascade inhibitors. *Cancer Immunol Immunother* 37: 385-391.

Sacks D & Anderson C 2004. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol Rev* 201: 225-238.

Sacks D & Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews* 2: 845-858.

Sacks DL 1989. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 69: 100-103.

Salay G, Dorta ML, Santos NM, Mortara RA, Brodskyn C, Oliveira CI, Barbieri CL, Rodrigues MM 2007. Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the new world. *Clin Vaccine Immunol* 14(9): 1173-1181.

Saldanha ACR, Romero GAS, Merchan-Harmann E, Magalhães AV, Macedo VO 1999. Estudo comparativo entre estibogluconato de sódio BP 88^R e antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea: I. eficácia e segurança. *Rev Soc Bras Med Trop* 32(4): 383-387.

Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R 1991. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J Exp Med* 173: 49-54.

Scharton T & Scott P 1993. Natural killer cells are a source of interferon γ that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* 178: 567-577.

Scharton-Kersten T, Afonso LCC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P 1995. IL-12 is required for Natural Killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 154: 5320-5330.

Scott P 1991. IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 147(9): 3149-3155.

Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S 2006. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol* 177: 3201-3208.

Serezani CHC, Aronff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M 2005. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae*

though the activation of NADPH oxidase. *Blood* 106(3): 1067-1075.

Serezani CHC, Aronoff DM, Jancar S, Peters-Golden M 2005. Leukotriene B4 mediates p47phox phosphorylation and membrane translocation in polyunsaturated fatty acid-stimulated neutrophils. *J Leuk Biol* 87: 1-9.

Shaw J 2007. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(5): 541-547.

Shaw JJ 1994. Taxonomy of the Genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89(3): 471-478.

Shin EH, Lee HY, Bae YS 2006. Leukotriene B4 stimulates human monocyte-derived dendritic cell chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 606-611.

Showell HJ, Breslow R, Conklyn MJ, Hingorani GP, Koch K 1996. Characterization of the pharmacological profile of the potent LTB₄ antagonist CP-105,696 on murine LTB₄ receptors *in vitro*. *Brit J Pharmacol* 117: 1127-1132.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP 2004. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(3): 239-251.

Sinagra A, Riarte A, Luna C, Campanini A, Segura EL 1997. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: biological behavior in golden hamsters of isolates from Argentine patients. *Am J Trop Med Hyg* 57(1): 115-118.

SINAM (2006) Secretaria de vigilância em saúde/MS. www.saude.gov

Solomon M, Baum S, Barzilai A, Scope A, Trau H, Schwartz E 2007. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. *J Am Acad Dermatol* 56:612-616.

Sousa AQ, Parese ME, Pompeu ML, Coelho Filho JM, Vasconcelos IAB, Lima JWO, Oliveira EG, Vasconcelos AW, David JR, Maguire JH 1995. Bubonic leishmaniasis: a

common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceará, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 53: 380-385.

Souza-Neto SM, Carneiro CM, Vieira LQ, Afonso LCC 2004. *Leishmania braziliensis*: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(3) 289-294.

Stenger S, Donhauser N, Thüning H, Rölinghoff, Bogdan C 1996. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 183: 1501-1514.

Sundar S & Rai M 2002. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 15: 593-598.

Surette ME, Krump E, Picard S, Borgeat P 1999. Activation of leukotriene synthesis in human neutrophils by exogenous arachidonic acid: inhibition by adenosine A_{2a} receptor agonists and crucial role of autocrine activation by leukotriene B₄. *Molecular Pharmacology* 56: 1055-1062.

Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, Teixeira MM 2002. Leukotriene B₄ induces nitric oxide synthesis in Trypanosoma cruzi-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect Immun* 70(8): 4247-4253.

Teixeira MJ, Fernandes JD, Teixeira CR, Andrade BB, Pompeu ML, Silva JS, Brodskyn CI, Barral-Netto M, Barral A 2005. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect Immun.* 73(2): 1191-1195.

Nascimento MDSB. 1986. Leishmaniose tegumentar no Estado de Goiás: Análise dos dados epidemiológicos de infecção humana, registrados de 1965 a 1984. *Rev Pat Trop* 15(2): 99-214.

Toledo VPCP, Mayrink W, Gollob KJ, Oliveira MAP, Costa CA, Genaro O, Pinto JA, Afonso LCC 2001. Immunochemotherapy in american cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(1): 89-98.

Tripathi P, Singh V, Naik S 2007. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 229-242.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson Jr WD, Carvalho EM 2002. Disseminated leishmaniasis: A new and emerging form of leishmaniasis observed in Northeastern Brazil. *J Infect Diseases* 186: 1829-1834.

Uliana SRB, Ishikawa E, Stempliuk VA, Souza A, Shaw JJ, Floeter-Winter LM 2000. Geographical distribution of neotropic *Leishmania* of the subgenus *Leishmania* analysed by ribosomal oligonucleotide probes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 261-264.

Uliana SRB, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM 1994. Discrimination amongst *Leishmania* by Polymerase Chain Reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J Euk Microbiol* 41(4): 324-330.

Vardy D, Barenholz Y, Cohen R, Zvulunov A, Biton A, Klaus S, Frankenburg S 1999. Topical amphotericin B for cutaneous leishmaniasis. *Arch dermatol* 135: 856-857.

Vieira LQ, Hondowicz BD, Afonso LCC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P 1994. Infection with *Leishmania major* induces interleukin-12 production in vivo. *Immunol Letters* 40: 157-161.

Von Stebut E & Udey MC 2004. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect* 6: 1102-1109.

Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Bécherel P, Debré P, Moncada S, Mossalayi MD 1995. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcRII/CD23 surface antigen. *Proc Natl Acad Sci* 92: 7804-7808.

Wang L, Goillot E, Tepper RI 1994. IL10 inhibits alloreactive cytotoxic T lymphocyte generation in vivo. *Cell Immunol* 159(2): 152-69.

Wei X, Charles IG, Smith A, Ure JFG, Huang F, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY

1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375: 408-411.

Werz O & Steinhilber D 2005. Development of 5-lipoxygenase inhibitors-lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem Pharmacol* 70: 327-333.

Wirth JJ & Kierszenbaum F 1985. Effects of leukotriene C4 on macrophage association with and intracellular fate of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Bio Parasitol* 15: 1-10.

World Health Organization, WHO 2005. Leishmaniasis. Endereço eletrônico: Who.int/tdr/dw/leish2002.htm.

Xie Q, Nathan C 1994. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol* 56(5): 576-82

Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T 2001. Leukotriene B4: Metabolism and signal transduction. *Arch Biochem*