Márcia Dalastra Laurenti

Patologia e patogenia das leishmanioses

Tese apresentada ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Professor Livre-Docente

São Paulo

2010

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Laurenti, Márcia Dalastra

Título: Patologia e patogenia das leishmanioses

Tese apresentado ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Professor Livre-Docente

Data___/___/__

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha familia, meu porto seguro;

À minha mãe, Adair, pelo exemplo de vida;

Ao meu esposo, Luiz Natal, pelo constante apoio, amor e dedicação;

As minhas filhas, Natalia e Giovana, razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos Eduardo Pereira Corbett, pelos constantes ensinamentos, pelo incentivo, pela dedicação, pelo apoio, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação e supervisão, por ter recebido meus alunos sempre com muito entusiasmo e disponibilizando toda a estrutura do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) do Departamento de Patologia da FMUSP para o desenvolvimento dos projetos, por ter acreditado em mim.

Ao Prof. Idércio Luiz Sinhorini, que abriu as portas do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP para mim, pela orientação no mestrado e doutorado, pelo constante apoio, pela confiança e pelo excelente convívio durante toda minha formação acadêmica.

Ao Dr. Paulo Pimenta e Dra. Nágila Secundino, pela oportunidade de desenvolver meu programa de pós-doutoramento no Laboratório de Entomologia Médica da FIOCRUZ, pelo constante entusiasmo durante o desenvolvimento dos difíceis experimentos com saliva de flebotomíneo e pelo apoio irrestrito na execução dos xenodignósticos em cães.

Ao Prof. Fernando Tobias Silveira, pela oportunidade de conhecer um pouco da doença humana, da área endêmica, da ecologia e epidemiologia das leishmanioses na Amazônia brasileira, pelos bons momentos divididos no laboratório, pelas frutíferas discussões científicas.

Ao Dr. Anders Örn, pela supervisão, ao pesquisador Matin Rottemberg, a técnica Lena Sporong e aos colegas de pós-graduação, na época, Dan Sunnemark, Clas Une, Azael Saldaña, Orlando Guevara, Jessica Vesquez, pelo aprendizado e excelente convívio durante minha permanência no Microbiology and Tumorbiology Center - Karolinska Institute, em Estocolmo, Suécia, onde desenvolvi parte dos meus experimentos de doutorado com o apoio de uma bolsa sanduiche CAPES.

Ao Prof. Jordi Alberola, Dra. Alheli Rodriguez-Cortez, Dra. Felicitat Todeli, do Laboratório de Leishmanioses da Univertitat Autonoma de Barcelona – Espanha, pela excelente receptividade durante minha visita científica, por todos os ensinamentos sobre leishmaniose canina e pelas frutíferas análise de dados e discussões.

Às colegas, colaboradoras e amigas da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP – Campus de Araçatuba, Profa. Mary Marcondes e Profa. Cecília Luvizoto, pelo oportunidade de cada vez mais conhecer um pouco da leishmaniose canina, pelo constante apoio e confiança.

A Dra. Vera Camargo, pesquisadora da SUCEN, na época, Coordenadora do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, e Dra Rita da Silva, pesquisado do Insituto Adolfo Lutz de Rio Claro (SP), pela oportunidade de trabalhar na revisão do Manual de Controle da Leishmaniose Visceral do Estado de São Paulo na área de diagnóstico sorológico da leishmaniose canina.

Ao Prof. Carlos Eduardo Larson, pela oportunidade na prestação de serviços junto ao Depto. de Clínica Hospital Veterinário HOVET da FMVZ-USP com o diagnóstico sorológico para leishmaniose canina e pela oportunidade de colaborar com projetos de pesquisa que são desenvolvidos pelos seus alunos nesta área.

Às minhas colegas de trabalho, de sala e de jornada, Dra. Vânia Lúcia Ribeiro da Matta e Dra. Cláudia Maria de Castro Gomes, por todos os momentos dividos no laboratório, pelas constantes discussões sobre projetos, relatórios e manuscritos; pela divertida companhia nos eventos científicos nacionais e internacionais.

Aos meus alunos de doutorado Luiz Felipe Domingues Passero e Daniela Faria Larangeira; de mestrado Marcio Antônio Batistela Moreira, Francisco Carlos Seeberg Aranha, Veruska Marques dos Santos Silveira, Tadeu Pernichelli, Ana Kely de Carvalho, pelo convívio, pelas novas idéias trazidas e pelo bom desempenho que muito enriqueceram a produtividade do nosso grupo.

Aos alunos de Pós-Graduação da Profa. Mary Marcondes da UNESP – Campus Araçatuba, Fabiana Ikeda, Cláudio Rossi, pelo apoio na coleta de material junto ao Centro de Controle de Zoonoses e na sedação dos animais para o xenodiagnóstico; Maurício, Thiago, Juliana, Ludmila pelos desafios no diagnóstico sorológico de cães e gatos de área endêmica para leishmaniose visceral.

Aos meus alunos de aprimoramento técnico Mussya Cisotto Rocha, Michelli Ibarra; de iniciação científica Daniela Mayumi Ura, Rafael Lemos Rizzardi, Juliano Volpi Sacormori; e do Programa de Pré Iniciação Científica, Carolina Elizabeth Samogy Costa

e Edna Maria Scena de Souza pelo gratificante convívio e pela oportunidade não só de ensinar, mas também de aprender.

À Lia Negrão, secretária do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) do Depto. de Patologia da FMUSP, pelo constante e irrestrito apoio em todos os diferentes relatórios, nas solicitações de material de consumo para o laboratório, na administração geral dos recursos, na finalização das teses dos meus alunos e pelo impecável empenho na digitação e finalização do meu memorial, agora apresentado.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) do Depto. de Patologia da FMUSP, onde sempre desenvolvi minhas atividades de pesquisa, docência e prestação de serviços, Thaíse Tomokane e Edson Tadeu, pelo constante e irrestrito apoio em todas as atividades

Aos colegas do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, docentes, funcionários e alunos, pelo excelente convívio, e apoio em todas as atividades desenvolvidas quer seja, na pesquisa, na docência, na prestação de serviços ou atividades administrativas.

Aos colegas do Depto. Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, docentes, funcionários e alunos, que sempre me receberam de braços abertos, me apoiando em todas as atividades lá desenvolvidas.

As agências de fomento à pesquisa, FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro em projetos regulares; bolsas de iniciação científica, mestrado e doutorado; assim como na divulgação dos resultados.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente me apoiaram durante todo o percurso da minha vida acadêmica.

RESUMO

LAURENTI, M. D. **Patologia e patogenia das leishmanioses.** [Pathology and pathogenesis of leishmaiasis]. 2010. 84 f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Esta tese é apresentada como uma compilação de trabalhos publicados oriundos de projetos de pesquisa que foram desenvolvidos ao longo de minha vida acadêmica, na área de patogenia e patologia das leishmanioses. Os dados a seguir referem-se a resultados obtidos dentro da minha principal linha de pesquisa, acima referida, assim como de colaborações que vêm sendo estabelecidas ao longo desta jornada.

Em relação ao hospedeiro, elementos da imunidade inata como o sistema complemento mostrou ter um papel importante na disseminação de *L. (L.) chagasi* para vísceras, embora pareça ser um fator limitante para o estabelecimento da infecção por *L. (L.) amazonensis*. Mediadores inflamatórios, como a fosfolipase A2, e fatores de crescimento, como o insulin growth factor-I, favorecem o crescimento de parasitos, interferindo no desenvolvimento do processo inflamatório desencadeado pela inoculação de *Leishmania*. Em relação às células que participam da imunidade inata, os neutrófilos foram capazes de fagocitar e destruir parasitos, as células Natural Killer de controlar o parasitismo por citotoxicidade e os macrógafos, dependendo de prévia opsonização do complemento, favorecem a sobrevivência e multiplicação dos parasitos. Os estudos referentes à imunidade específica nos mostraram que hospedeiros resistentes têm as células TCD4+ tipo Th1 preferencialmente ativadas, favorecendo o controle da infecção, enquanto nos hospedeiros suscetíveis a ativação preferencial é de células TCD4+ Th2, favorecendo a progressão da doença.

Em relação ao parasito, espécies e cepas mais virulentas no homem mostraram ser capazes também de determinar patologias mais graves em modelos experimentais, direcionando a resposta do hospedeiro para o pólo de suscetibilidade.

Em relação ao vetor, a saliva inoculada no processo de transmissão do parasito, mostrou ser um facilitador do estabelecimento da infecção, em maior ou menor intensidade, na dependência da sua origem, se proveniente de vetor colonizado em laboratório ou de campo.

Os resultados obtidos nos nossos estudos tanto experimentais quanto em humanos apontam que fatores inerentes ao hospedeiro, ao parasito e ao vetor podem interferir na patogenia e patologia das leishmanioses e, desta forma, na expressão clínica da doença, determinando um amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas que pode variar desde a forma cutânea localizada, disseminada borderline, anérgica difusa, mucosa ou mucocutânea até a forma visceral.

Palavras-chave: *Leishmania*, leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea, patologia, patogenia

ABSTRACT

LAURENTI, M. D. Pathology and pathogenesis of leishmaniasis. [Patologia e patogenia das leishmanioses]. 2010. 84 f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

This thesis is presented as a compilation of published reports originated from research projects developed throughout my academic life in the area of pathogenesis and pathology of leishmaniases. The following data refer to the results obtained in my main research line, cited above, as well as from collaborations that I have been establishing along this journey.

Concerning to the host, elements of the innate immunity as complement system show an important role in the dissemination of *L. (L.) chagasi*, although it seems to be a limiting factor for the establishment of *L. (L.) amazonensis* infection. Inflammatory mediators, as phospholipase A2, and growth factors, as insulin growth factor-I favor the parasite growth, interfering on the development of inflammatory process caused by *Leishmania* sp. inoculation. Concerning to the cells involved in innate immunity, neutrophils are able to phagocyte and destroy parasites, Natural Killer cells of controlling the parasitism by cytotoxicity and the macrophages favor the parasite survival and multiplication, depending of previous complement opsonization. Studies regarding the specific immunity showed that resistant hosts have the TCD4+ Th1 cells preferentially activated, favoring the control of the infection, while in the susceptible hosts the preferential activation is the TCD4+ Th2 cells, favoring the progression of the disease.

In relation to the parasite, species and strains that are more virulent in humans showed to be capable of also determine more severe pathologies in experimental models, leading the host response to the susceptibility pole.

In addition, sand fly saliva inoculated in the transmission process of the parasite showed to be a facilitating factor in the establishment of the infection, in higher or lower intensity, according with the source, if originated from laboratory colonized vector or from sand fly captured in the field.

The results obtained in our experimental and humans studies point out that factors inherent to the host, to the parasite and vectors can interfere in the pathogenesis and pathology of leishmaniasis, and, consequently, in the clinical expression of the disease, determining a wide spectrum of clinical and immunological manifestations that can range from the localized cutaneous, borderline disseminated, anergic diffuse, mucosal or mucocutaneous forms until the visceral form.

Keywords: *Leishmania*, visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis, pathology, pathogenesis.

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS 11
1.1 Leishmanioses 11
1.2 Distribuição geográfica 12
1.3 Ecologia e Epidemiologia 15
1.4 Agente Etiológico 17
1.5 Ciclo Biológico 20

2 PATOGENIA 22
2.1 Fatores do hospedeiro que interferem na infecção por *Leishmania* 23
2.1.1 Sistema complemento 23
2.1.2 Células inflamatórias, leucócitos polimorfonucleares e mononucleares 27
2.1.3 Células “Natural Killer” 32
2.1.4 Células dendríticas de Langerhans 35
2.1.5 Imunidade adquirida 38
2.2 Fatores do parasito que interferem na infecção por *Leishmania* 43
2.3 Fatores do vetor que interferem na infecção por *Leishmania* 45

3 ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES 49
3.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) 50
3.1.1 Espectro clínico, histopatológico e imunológico da LTA 51
3.1.1.1 *Leishmaniose Cutânea Localizada* 52
3.1.1.2 *Leishmaniose Cutânea-Mucosa / Leishmaniose Mucosa* 53
3.1.1.3 *Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa* 55
3.1.1.4 *Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline* 57
3.2 Leishmaniose Visceral Americana 58
3.2.1 Formas clínicas 59
3.2.2 Patologia 61
3.2.2.1 *Fígado* 61
3.2.2.2 *Baço* 63
3.2.2.3 *Linfonodo* 64
3.2.2.4 *Pulmão* 65
3.2.2.5 *Rim* 66
3.2.2.6 *Medula óssea e alterações hematológicas* 67

4 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES 68
4.1 Diagnóstico Laboratorial 68
4.1.1 Pesquisa do parasito 68
4.1.2 Avaliação da imunidade celular 70
4.1.3 Avaliação da imunidade humoral 71

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 72

REFERÊNCIAS 75

ANEXOS 85

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são representadas por um grupo de doenças com caráter zoonótico que acometem o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos. Causadas por protozoário digenético pertencente à família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, têm seu ciclo biológico realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado.

Os hospedeiros vertebrados incluem grande variedade de mamíferos, entre eles: roedores, edentados, marsupiais, canídeos e primatas, incluindo o homem. Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, a prevalência mundial das diferentes formas clínicas da doença, tegumentar e visceral, ultrapassa 12 milhões de casos. Ressalta-se, no entanto, que uma população de 350 milhões de indivíduos encontra-se em áreas de risco de contração da infecção (WHO, 2001).

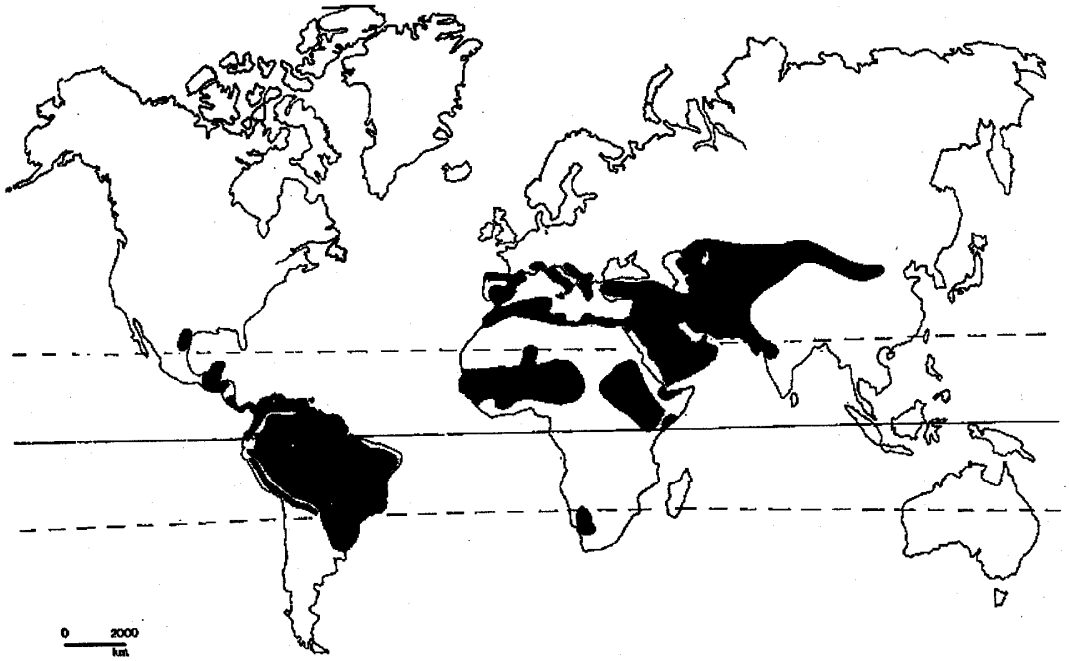
As leishmanioses são endêmicas nos cinco continentes, em 88 países localizados em regiões tropicais e sub-tropicais. A notificação é obrigatória somente em 32 dos 88 países onde a doença é prevalente. Desta forma, dos dois milhões de novos casos que são estimados anualmente, somente 600 mil são oficialmente notificados, o que mostra uma elevada taxa de sub-notificação (WHO, 2001).

As mudanças sócio-econômicas e comportamentais decorrentes do processo de globalização dificultam não só o controle da enfermidade como também aumentam o número de vítimas. Exemplo bastante contundente, refere-se ao claro processo de urbanização das leishmanioses, processo esse intimamente relacionado ao êxodo rural, desemprego, expansão de favelas, guerras, entre outros.

1.2 Distribuição geográfica

A **leishmaniose tegumentar** (LT) tem ampla distribuição mundial, ocorrendo em vários países do Velho e do Novo Mundo (Figura 1). Na Europa, é encontrada principalmente nos países da Bacia do Mediterrâneo, tais como: Portugal, Espanha, França, Itália, Grécia e Turquia. Na África, a doença tem maior concentração nos países das regiões Leste (Sudão, Etiópia, Somália e Quênia) e Norte (Marrocos, Argélia, Líbia e Egito). Na Ásia, é detectada principalmente nos países do Oriente Médio, tais como: Irã, Iraque, Arábia Saudita, Paquistão, Afeganistão e parte da China (WHO, 2001).

No Novo Mundo, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta uma ampla distribuição, desde o extremo sul dos Estados Unidos, na América do Norte, atravessando a América Central e chegando até o norte da Argentina, na América do Sul, onde apenas o Chile e o Uruguai não apresentam registros dessa protozoose. Neste continente, o Brasil representa a área endêmica de maior extensão territorial e um dos países com as mais elevadas taxas de notificação da infecção. Além disso, a doença tem sido confirmada em todos os Estados brasileiros, sendo causada principalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) shawi*, esta última encontrada apenas na região amazônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).



Fonte: Lainson (1983)

Figura 1 - Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar no mundo

A **leishmaniose visceral** (LV) ocorre também em vários países do Velho e Novo Mundo e é causada por *Leishmania (Leishmania) donovani* em regiões da Índia, Bangladesh, Sudão, Paquistão, Nepal e regiões do leste da China. Essa espécie do parasito pode causar a leishmaniose dérmica pós-calazar, além da forma visceral clássica, que é transmitida de homem para homem, o que caracteriza uma antroponose. É possível que no Sudão a transmissão ocorra à semelhança da Índia, porém outros mamíferos foram encontrados parasitados. Dentre eles, três espécies de roedores (*Arvicanthis niloticus*, *Acomys albigena* e *Rattus rattus*) e dois carnívoros (*Genetta genetta* e *Felis cat*). *Phlebotomus argentipes* é o vetor da leishmaniose em regiões da Índia e *Phlebotomus alexandri*, na China (WHO,2001).

Ainda no Velho Mundo, a doença apresenta extensa distribuição na Ásia Central, Norte e Nordeste da China, Sudoeste da Ásia (Iraque, Arábia Saudita, Iêmen, Irã e Afeganistão), África (Algéria, Etiópia, Tunísia, Líbia, Egito, República Central Africana, Congo, Chad, Gabão, Quênia, Nigéria, Malawi, Marrocos, Níger, Senegal, Somália, Sudão, Alto Volta, Zaire e Zâmbia), assim como na Europa, nos países pertencentes à Bacia do Mediterrâneo, Hungria e Romênia. Nessas regiões,

a LV é causada por *L. (L.) infantum*. O hospedeiro doméstico é o cão, *Canis familiaris,* considerado o principal reservatório da infecção para o homem. São identificados como hospedeiros silvestres o chacal, *Canis aureus*, o lobo, *Canis lupus*, e a raposa, *Vulpes vulpes*. Na China, foi referido também o canídeo *Nyctereutes procyonides* como reservatório. Na Geórgia e Arzebaijão a infecção acomete os texugos, *Meles meles* e a raposa *Vulpes corsak*. Os flebotomíneos responsáveis pela transmissão e disseminação da doença, de acordo com a região, são *Phlebotomus ariasi, P. perniciosus, P. major, P. alexandri, P. chinensis, P. perfiliewi, P. tobbi, P. longicuspis, P. kandelaki, P. mongolensis e P. caucasicus*.

No Novo Mundo, a LV ocorre na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Paraguai, Venezuela, Guatemala, Guadalupe, Honduras, Martinica, México e El Salvador e o agente causal é o protozoário *L. (L.) chagasi*. Os hospedeiros silvestres no Brasil são as raposas, *Dusicyon vetulus* e *Lycalopex vetulus*, na região Nordeste, *Cerdocyon thous*, na Amazônia, e o gambá, *Didelphis marsupialis*. O cão doméstico é considerado como a principal fonte de infecção para o homem e *Lutzomyia longipalpis*, o vetor incriminado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) (Figura 2).

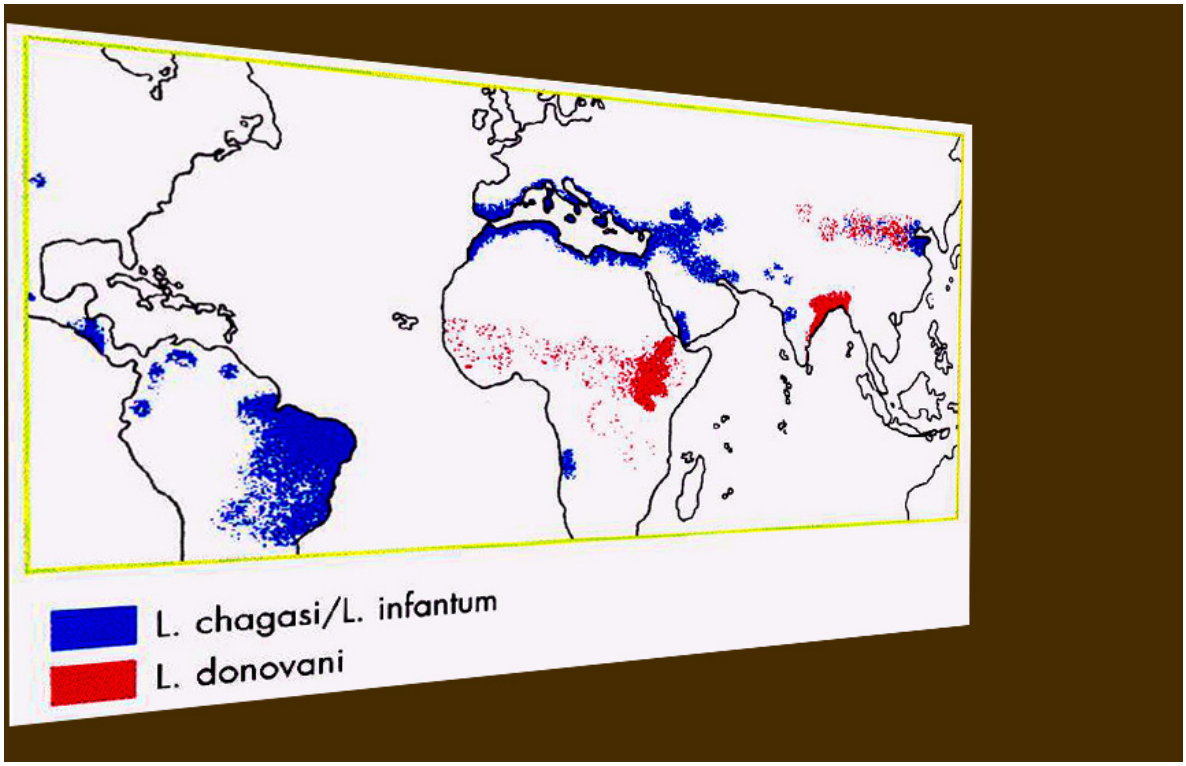


Figura 2 – Distribuição mundial da leishmaniose visceral

1.3 Ecologia e Epidemiologia

As leishmanioses representam uma das endemias parasitárias de maior importância em termos de saúde pública no Mundo, haja vista a sua extensa distribuição em nosso continente, especialmente na região que compreende a América Latina, desde o México até a Argentina (LAINSON, 1983). Entretanto, não obstante o reconhecimento da doença em larga faixa da população mundial, muito pouco é sabido sobre suas taxas de prevalência e de incidência na população comprometida, já que o sistema de notificação da doença é falho, apesar do seu registro ser considerado obrigatório em muitos países, entre eles o Brasil. Por essa razão, os índices de prevalência e/ou de incidência encontrados na divulgação oficial desses países sabidamente não expressam o grau de comprometimento real da população.

No Brasil, embora a sub-notificação represente um problema constante nas áreas de transmissão da enfermidade, a Fundação Nacional de Saúde tem registrado um aumento crescente no número de casos da doença nos últimos 20 anos, tanto em magnitude como em expansão geográfica, observando-se surtos epidêmicos em todas as regiões do país.

Nas Américas, a LTA é considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, desdentados e primatas, principalmente), entre os quais as diferentes espécies de *Leishmania* são transmitidas pela picada de insetos flebotomíneos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (LAINSON; SHAW, 1987). Dessa forma, o homem adquire a infecção ao entrar em contato com as áreas florestais onde existem as enzootias pelas diferentes espécies do parasito. Em vista disso, a doença assume um caráter ocupacional, ocorrendo, principalmente, naquelas categorias profissionais que expõem o homem ao contato íntimo com a mata (geólogos, garimpeiros, agricultores, construtores de estradas, entre outros). Embora a doença não discrimine o sexo e nem a idade, nota-se a sua maior incidência no sexo masculino e nos indivíduos na faixa de 20 a 40 anos, por serem aqueles que desenvolvem atividades mais ligadas à mata (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Ressalta-se que em determinadas regiões que sofreram mudanças ambientais importantes, como aquelas de colonização mais antiga, é possível que

alguns animais domésticos possam estar envolvidos em ciclos secundários dos parasitos sem, contudo, estar garantida a sua participação na manutenção dos parasitos na natureza. Nessas regiões, as mudanças ambientais exercem grande influência também no comportamento biológico das espécies de flebotomíneos vetores da doença, de tal maneira que as espécies mais resistentes são capazes de adaptarem-se às transformações ambientais, procurando nos ambientes peri-domiciliares um novo nicho ecológico para sua sobrevivência.

A leishmaniose visceral é considerada atualmente uma doença emergente e reemergente, tanto em áreas rurais como em áreas urbanas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima uma incidência global anual de 500 mil casos (WHO, 2001). Embora a LV seja conhecida até hoje como uma doença tipicamente rural, vários surtos epidêmicos urbanos têm sido relatados, devido as condições epidemiológicas favoráveis, principalmente em função da expansão das favelas com grande densidade populacional que possuem péssimas condições sanitárias, onde indivíduos e cães infectados, provenientes de áreas endêmicas, encontram sua opção de moradia nas grandes cidades.

Atualmente a OMS vem chamando a atenção com relação ao aumento do número de casos de co-infecção HIV/leishmaniose visceral, especialmente no sul da Europa. Nesta região a infecção por HIV ocorre nas áreas rurais e suburbanas em que a leishmaniose visceral é endêmica. Muitos destes casos estão associados com drogas injetáveis devido ao hábito de alguns grupos de usuários em compartilhar seringas e agulhas descartáveis. Este tipo de transmissão tem se expandido para os países nórdicos da Europa tais como Alemanha, Finlândia, Noruega, mudando o perfil epidemiológico clássico de transmissão, sem a presença do inseto vetor e do reservatório canino.

Outro aspecto relevante dentro deste contexto de expansão e urbanização da leishmaniose visceral em todo o mundo e, principalmente, no Brasil é a possibilidade de se contrair a doença através de transfusão sangüínea. Este fato é agravado em função do diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral não estar ainda incluído na triagem dos doadores em todo o país.

Podemos delinear dois ciclos epidemiológicos distintos para a leishmaniose visceral, o ciclo silvestre e o ciclo doméstico ou peri-doméstico. No ciclo epidemiológico silvestre estão envolvidos como vetor, a *Lutzomyia longipalpis*, e

como reservatório, as raposas, que habitam nichos ecológicos ainda não perturbados pelo homem, seja em áreas de floresta ou sertão.

Os cães são os reservatórios domésticos e têm sido encontrados infectados em todos os focos de doença humana, sendo considerados o principal reservatório na cadeia de transmissão da LV. O ciclo epidemiológico doméstico ocorre no ambiente rural ou periurbano onde estão envolvidos como vetor o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* que se reproduz e se mantém no ambiente peri-domiciliar transmitindo a infecção para o homem e para o cão. O cão passa a ter um papel importante na manutenção da infecção no local, servindo como fonte de alimentação e de infecção para os insetos. A transmissão ocorre subsequentemente para o homem, que também é capaz de servir de fonte de infecção para o vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Estes dois ciclos podem se sobrepõem, uma vez que o homem e o cão ao penetrarem no ambiente silvestre podem adquirir a infecção pela picada do flebotomíneo e, ao voltarem para o domicílio, servem como fonte de infecção para os vetores locais, iniciando a transmissão no ambiente domiciliar. Outra forma seria através dos hábitos migratórios das raposas que percorrem grandes distâncias a procura de suas presas, utilizando ambientes comuns aos flebotomíneos para se abrigarem. Quando estas raposas chegam às proximidades de fazendas ou sítios a procura de alimento, principalmente pequenos animais domésticos como galinhas, estarão servindo como fonte de infecção para os flebotomíneos peridomiciliares locais, instalando aí a transmissão da doença, onde o cão passará a manter o foco como reservatório doméstico. Os reservatórios apresentam parasitismo cutâneo intenso, sendo comum também o isolamento do parasito no sangue, desta forma constituem excelente fonte de infecção para os flebotomíneos, mantendo o ciclo da doença (GENARO, 2002).

1.4 Agente Etiológico

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam-se sob duas formas principais: a promastigota, encontrada no tubo digestivo das fêmeas dos hospedeiros

invertebrados, e a amastigota, observada dentro de células do Sistema Fagocitário Mononuclear em tecidos dos hospedeiros vertebrados (GENARO, 2002).

A forma promastigota é alongada em cuja região anterior emerge um flagelo livre. No citoplasma observa-se o núcleo que pode ser ovóide ou esférico situado na região central da célula. O cinetoplasto é geralmente ovóide e situa-se entre a extremidade da região anterior da célula e o núcleo. O tamanho das formas promastigotas é variável, mesmo dentro da mesma espécie, podendo medir entre 16,0- 40,0 x 1,5- 3,0 μm, incluindo o flagelo, que freqüentemente é maior que o corpo do parasito (Figura 3A).

A forma amastigota apresenta-se tipicamente ovóide ou esférica. Em seu citoplasma encontramos núcleo único esférico ou ovóide e o cinetoplasto em forma de pequeno bastão situado próximo ao núcleo. A amastigota não possui flagelo livre, apenas um rudimento que está presente na bolsa flagelar, caracterizada como uma pequena invaginação da membrana do parasito. Seu tamanho varia dependendo da espécie, podendo medir entre 1,5- 3,0 x 3,0- 6,5 μm (Figura 3B).

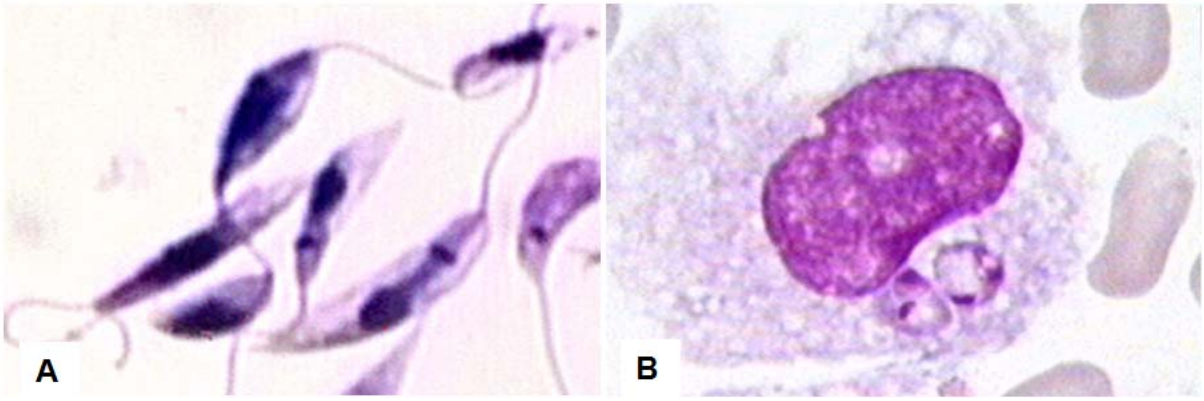
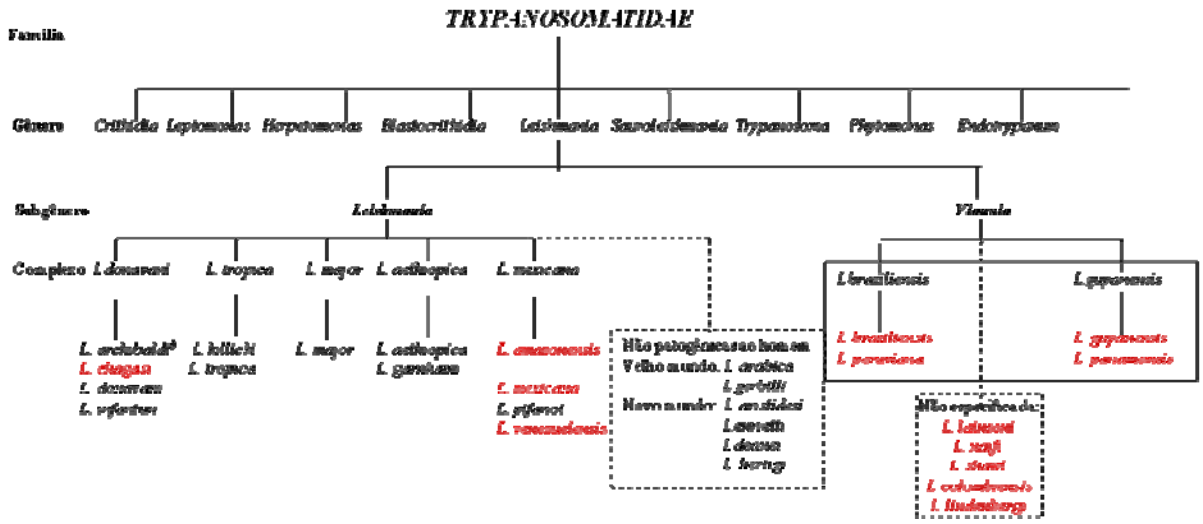


Figura 3 – Formas (A) promastigota e (B) amastigota de *Leishmania*

Atualmente são conhecidas 22 espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem. A partir da década de 80, os estudos sobre leishmaniose, principalmente nas Américas, conduziram ao isolamento de um grande número de amostras oriundas de animais silvestres, domésticos e do homem. A identificação destes parasitos passou a exigir a aplicação de um maior número de critérios, até então não utilizados, para evitar a ocorrência de erros taxonômicos desses parasitos. Desta forma, a base para a classificação voltou-se para caracteres intrínsecos do parasito,

sendo que os mais utilizados são: os biológicos como, morfologia do parasito e características de seu desenvolvimento em hospedeiros vertebrados e invertebrados e em meios de cultura; os imunológicos como o reconhecimento por anticorpos mono e policlonais; os bioquímicos como estudos do DNA e RNA, caracterização de isoenzimas e estudo da composição da membrana através de lecitinas e os de distribuição geográfica e aspectos clínicos da infecção humana. Em 1987, Lainson e Shaw propuseram uma nova classificação das espécies que parasitam o homem em dois subgêneros, de acordo com o desenvolvimento do parasito no hospedeiro invertebrado (LAINSON; SHAW, 1987). Assim, as espécies que estabelecem uma infecção inicial na região posterior do trato digestivo, na região pilórica e no intestino médio abdominal, migrando para as porções mais anteriores durante o seu desenvolvimento foram grupadas no sub-gênero *Viannia*. Esses parasitos apresentam um comportamento peripilárico e seus representantes são unicamente encontrados no Novo Mundo. Já as espécies que mostram um comportamento suprapilárico, com desenvolvimento restrito a porção anterior ao piloro do trato digestivo, sobretudo nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio foram grupadas no sub-gênero *Leishmania*. Nesse grupo encontram-se parasitos representantes tanto do Velho como do Novo Mundo (Figura 4).

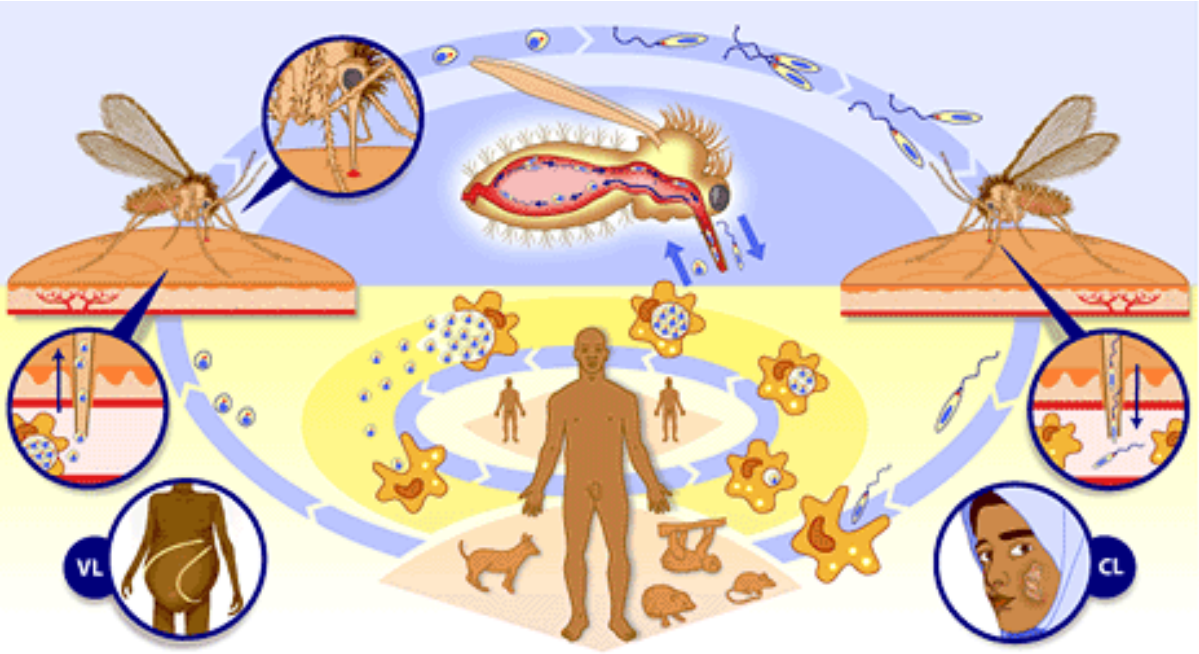


Fonte: Organização Mundial da Saúde – OMS.

Figura 4 – Chave taxonômica dos parasitos do gênero *Leishmania*

1.5 Ciclo Biológico

O ciclo evolutivo dos parasitos do gênero *Leishmania* compreende uma fase nos hospedeiros invertebrados onde as formas promastigotas se multiplicam por divisão binária no tubo digestivo das fêmeas dos flebotomíneos, e outra fase nos hospedeiros vertebrados, reservatórios mamíferos, nos quais as formas amastigotas vivem e se multiplicam, também por divisão binária, no interior dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos (Figura 5).



Fonte: TDR Wellcome/Trust

Figura 5 – Ciclo biológico da de parasitos do gênero *Leishmania*

A infecção do inseto ocorre quando a fêmea pica o vertebrado para exercer o repasto sanguíneo e ingere macrófagos infectados por formas amastigotas. Esses macrófagos se rompem liberando as amastigotas, que se transformam rapidamente em promastigotas multiplicando-se ainda no sangue ingerido que está envolto por uma matriz peritrófica secretada pelas células do estômago do inseto. Após a digestão do sangue, a matriz peritrófica se rompe, liberando as promastigotas que vão colonizar diferentes regiões do tubo digestivo do vetor, dependendo da espécie do parasito (LAINSON; SHAW, 1987). Nesses locais, as promastigotas permanecem

aderidas pelo flagelo ao epitélio do intestino, ainda em processo de multiplicação. Após transformação bioquímica observada no tamanho das porções glicídicas das moléculas de lipofosfoglicano (LPG) ancoradas nas membranas das promastigotas, processo este chamado de metaciclogênese, elas migram para a parte anterior do tubo digestivo do vetor atingindo o estágio infectivo. A infecção no hospedeiro vertebrado se estabelece no momento em que a fêmea do flebotomíneo infectada, ao realizar novo repasto sanguíneo, regurgita formas promastigotas metacíclicas infectantes na pele do mamífero. Nessa ocasião, acredita-se que a maioria dos parasitos é eliminada pela ação lítica do sistema complemento e pela ação dos neutrófilos e eosinófilos presentes no sangue que flui para o ponto da pele lacerada pela probóscida do inseto vetor. Entretanto, algumas formas promastigotas que escapam dos mecanismos de defesa inatos do hospedeiro são fagocitadas por macrófagos da pele, alojando-se no interior dos vacúolos parasitóforos, para em seguida se transformarem em formas amastigotas. Após sucessivas divisões binárias, os inúmeros parasitos provocam um aumento da pressão intracitoplasmática no interior do macrófago, rompendo, assim, a célula hospedeira. A seguir, as formas amastigotas liberam-se no meio extracelular e são fagocitadas por outros macrófagos, iniciando-se uma reação inflamatória que será responsável pela manutenção do parasito na pele ou escape para vísceras, dependendo a espécie de *Leishmania* inicialmente inoculada pelo vetor (GENARO, 2002).

Ressalta-se aqui que o parasito infectante lança mão de mecanismos que promovem a sua sobrevivência no hospedeiro. A própria transformação em formas amastigotas no hospedeiro vertebrado é entendida como um mecanismo de evasão importante, uma vez que a fagocitose de amastigotas desencadeia menor metabolismo oxidativo no macrófago quando comparadas às formas promastigotas (PEARSON et al., 1983). Além disso, as formas amastigotas do parasito são mais resistentes à lise porque produzem a enzima catalase (CHANNOAN; BLACKWELL, 1985) e a superóxido dismutase que as protege dos metabólitos do oxigênio produzidos pelos macrófagos durante o processo de fagocitose.

Salienta-se que após a internalização do parasito, o vacúolo parasitóforo sofre fusão com lisossomas secundários (ALEXANDER; VICKERMAN, 1975; BERMAN; DWYER, 1981) e essa fusão resulta em uma maior acidez do fagolisossoma (ANTOINE et al., 1990), tornando este microambiente muito hostil ao parasito. A transformação de forma promastigota em forma amastigota mais uma vez assegura

a sobrevivência do parasito, já que estudos do metabolismo das amastigotas e de culturas axênicas em meio ácido indicam que estas formas são acidofílicas e resistentes às hidrolases lisossomais e, deste modo, totalmente adaptadas às condições externas de pH encontradas nos lisossomos (ANTOINE et al., 1990; ALEXANDER; RUSSEL, 1992). A ação de uma bomba de prótons com atividade ATPase, situada no lado citoplasmático da membrana das formas amastigotas e responsável pela manutenção do pH interno no seu citoplasma, fornece mais uma estratégia de sobrevivência das amastigotas nos lisossomos (ZIBERSTEIN; DWYER, 1988).

Por último, destaca-se que a gp63, glicoproteína encontrada em abundância na superfície de formas amastigotas, também favorece a sobrevivência do parasito por degradar enzimas lisossômicas e exibir atividade ótima sob as condições acidofílicas do fagolisossoma.

2 PATOGENIA

A patogenia das leishmanioses é fortemente influenciada por fatores inerentes ao hospedeiro, como suas características genéticas e resposta imunológica; por fatores inerentes ao parasito, como a virulência da espécie de *Leishmania* infectante e por fatores inerentes ao vetor, como sua capacidade vetorial. Como resultado dessa interação entre as diferentes espécies do parasito, do vetor e os mecanismos da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado, um espectro de manifestações clínicas, histopatológicas e imunopatológicas é observado no homem.

A participação de elementos da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro, assim como a infectividade de diferentes espécies e cepas do parasito, bem como o papel da saliva do inseto vetor na infecção por *Leishmania* têm sido objeto de interesse de estudo do nosso grupo de pesquisa, com contribuições importantes, principalmente em estudos *in vivo*.

2.1 Fatores do hospedeiro que interferem na infecção por *Leishmania*

2.1.1 Sistema complemento

A inoculação de formas promastigotas pelo inseto vetor no hospedeiro vertebrado desencadeia mecanismos de defesa anteriores à resposta imune específica, através do desenvolvimento de resposta inflamatória inespecífica com a participação de componentes séricos e celulares.

Em relação aos elementos séricos, o sistema complemento tem sido amplamente estudado, principalmente empregando-se ensaios *in vitro.* Papéis antagônicos são atribuídos ao sistema complemento: capacidade lítica de parasitos extracelulares e o favorecimento da sobrevivência intracelular do protozoário pelo auxílio da fagocitose de *Leishmania* sp pelo macrófago, via receptores de complemento encontrados na superfície desta célula. Os efeitos líticos do soro normal podem ser desencadeados pela ativação da via clássica ou alternativa do sistema complemento pelo parasito (MOSSER et al., 1986). Porém, a suscetibilidade de *Leishmania* aos fatores do complemento, depende fundamentalmente, do estágio de desenvolvimento do parasito. Estudos mostram que promastigotas de *L. (L.) donovani* em fase logarítmica de crescimento são mortas na sua totalidade pela ação do soro humano normal, enquanto 10 a 20% sobrevivem à ação deste soro quando se encontram em fase estacionária (FRANKE et al., 1985; HOWARD et al., 1987). No entanto, a diferença na suscetibilidade dos parasitos aos componentes do complemento parece não depender da quantidade de C3 depositado na superfície do parasito que é semelhante nas duas fases (PUENTES et al., 1989), mas sim da diferença no tamanho e na composição da molécula do LPG na fase estacionária de crescimento do parasito que pode impedir a deposição do complexo C5b-9, promotor da lise celular (SACKS et al., 1990). Além disso, uma proteína quinase (LPK-1), disposta externamente nas promastigotas em fase estacionária de crescimento, fosforila componentes do complemento, podendo interferir na ativação de componentes terminais deste sistema, protegendo assim a lise do parasito (HERMOSO et al., 1991, BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998).

Entretanto, o sistema complemento pode atuar não a favor do hospedeiro e sim a favor do parasito já que os fragmentos C3b e C3bi, gerados após a sua ativação, podem ser depositados na superfície das promastigotas metacíclicas e interagir com os receptores CR1 e CR3, presentes na superfície do macrófago (RUSSEL; TALAMAS-ROHAMA, 1989), facilitando sua internalização e posterior sobrevivência dos parasitos por desencadear uma menor resposta oxidativa no interior da célula hospedeira (WRIGHT; SILVERSTEIN, 1983).

Experimentos *in vivo* desenvolvidos em nosso laboratório confirmaram a importância do sistema complemento na fagocitose de *Leishmania* pelas diferentes células inflamatórias presentes no ponto subcutâneo de inoculação dos parasitos, com repercussão na evolução da infecção (**Anexo-1**). A depleção de componentes do sistema complemento, utilizando Cobra Venom Factor que funciona como uma C3-convertase clivando o componente C3 do complemento levou a mudanças na dinâmica do processo inflamatório desencadeado pela inoculação de promastigotas de *L. (L.) chagasi*; mudanças essas caracterizadas por um maior número de neutrófilos e menor de macrófagos com uma fagocitose reduzida por estas células inflamatórias nas primeiras horas de infecção. A repercussão dos eventos iniciais foi avaliada na fase crônica da infecção, aos 240 dias, momento este em que os animais depletados em complemento não apresentavam amastigotas íntegras em vísceras, baço e fígado; enquanto os animais não depletados, e que mostraram depósito de C3 nas primeiras horas de infecção no ponto de inoculação dos parasitos, apresentavam evidente infecção visceral com a presença de formas amastigotas em baço e fígado e quadro histopatológico característico de leishmaniose visceral. Nossos resultados mostraram que o sistema complemento foi importante para o escape de parasitos do ponto da inoculação.

Por outro lado, promastigotas de espécies de *Leishmania* que causam doença cutânea são mais sensíveis à lise pelo soro normal humano, independente da presença de anticorpos específicos, sugerindo que a ativação do sistema complemento *in vitro* ocorre através da ativação da via alternativa (MOSSER et al., 1986). Nossos estudos sobre leishmaniose cutânea experimental comprovaram também a suscetibilidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* às proteínas do sistema complemento *in vivo*. (**Anexo-2**). Nesse trabalho por nós desenvolvido, camundongos BALB/c depletados em sistema complemento mostraram uma diminuição da resposta inflamatória no sítio dérmico de inoculação em relação aos

animais-controle, comprovando a importância dos fragmentos do complemento na quimiotaxia de elementos celulares, principalmente na fase aguda da infecção, gerando aumento na carga parasitária da lesão. Os animais-controle, não depletados, mostraram participação do componente C3 do sistema complemento no sítio da inoculação na fase aguda da infecção, o que provavelmente repercutiu numa resposta inflamatória mais intensa e com menor parasitismo na fase crônica da infecção. Esses experimentos nos mostraram que o sistema complemento tem um papel importante no controle do número de parasitos na lesão como também pode ser um dos elementos que impede a disseminação de cepas cutâneas, como *L. (L.) amazonensis*, para as vísceras.

É importante ressaltar que existem outros elementos solúveis que podem ser encontrados por *Leishmania* sp quando inoculadas no hospedeiro ou mesmo depois de sua internalização nos macrófagos, como é o caso da fosfolipase A2 (PLA2). Esta enzima é responsável por uma série de eventos farmacológicos que ocorrem nos processos inflamatórios (CÂMARA et al., 2003) e é uma das enzimas-chave para a geração das prostaglandinas e leucotrienos, que poderiam estar relacionados com a infectividade e a patogenia de *Leishmania.* Isso foi investigado por nosso grupo.

Em nossos estudos pudemos observar que a fosfolipase A2 purificada do veneno de *Crotalus durissus collilineatus* induziu um maior crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis in vitro*. Em estudos *in vivo*, camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pré-tratadas com PLA2 mostraram aumento da lesão quando comparados aos controles, animais infectados sem o prévio tratamento dos parasitos com a PLA2. O quadro histopatológico destes animais caracterizou-se por um processo inflamatório mais severo com um maior número de neutrófilos e macrófagos, áreas focais de necrose e maior parasitismo. Estudos adicionais *in vitro* nos mostraram moderados níveis de IL-2 e altos de IL-10 em sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Porém, quando estas culturas foram tratadas com PLA2, houve supressão na produção de IL-2, mas não de IL-10. Além disto, macrófagos infectados e tratados com PLA2 foram capazes de gerar prostaglandina E2 (**Anexo-3**). Em suma, estes estudos indicaram que a PLA2 é fator de crescimento para *Leishmania*, está relacionada à progressão da leishmaniose cutânea, assim como modula a resposta imune do hospedeiro ao parasito, uma vez

que a PLA2 suprime a produção de IL-2, citocina associada à resposta imune celular tipo Th1 que auxilia o controle da infecção através da ativação das células Natural Killer, e gera além de IL-10, citocina associada à resposta Th-2 que auxilia a progressão da infecção, a prostaglandina E2, um mediador lipídico inflamatório associado à progressão da infecção. Neste mesmo estudo, também pudemos verificar, através de análises enzimáticas, que os próprios antígenos secretados/excretados e antígenos intracelulares de *L. (L.) amazonensis* apresentam atividade PLA2. Mais recentemente (dados não publicados) detectamos, através da reação em cadeia da polimerase, um fragmento gênico representativo da PLA2 em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* o que de fato, corrobora a produção desta enzima por estes protozoários.

Outro elemento solúvel que pode ser encontrado por formas promastigotas de *Leishmania* assim que inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado e subsequentemente depois de sua internalização nos macrófagos é o insulin growth factor-I (IGF-I). IGF-I é um polipeptídeo produzido principalmente pelo fígado, que estimula a proliferação e diferenciação de uma grande variedade de tipos celulares (JONES; CLEMMONS, 1995) e é importante fator endócrino presente nos processos inflamatórios, na ativação imunológica e na cicatrização de feridas (KRATZ et al., 1993). Sua importância na leishmaniose tem sido demonstrada pelo nosso grupo. Experimentos *in vitro*, mostraram que IGF-I estimula um rápido crescimento de formas promastigotas e amastigotas axênicas (GOMES et al., 1997) e sua ligação específica à superfície dos parasitos induz fosforilação de moléculas intracelulares indutoras de proliferação celular (GOMES et al., 1998). Além disto, estudos iniciais *in vivo* mostraram significante aumento no tamanho da lesão e no número de parasitos em cortes de pele de camundongos infectados com promastigotas de *Leishmania* pré-ativadas com IGF-I (GOTO et al., 1998). Posteriormente, a dinâmica do processo inflamatório desencadeado pela inoculação de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pré-ativadas com IGF-I em camundongos BALB/c foi estudado. Nós observamos um infiltrado inflamatório mais intenso nestes animais caracterizado por um maior número de neutrófilos de 3 a 24 horas após a infecção e de macrófagos das 48 horas até a fase crônica da infecção (30 dias), acompanhado de um maior número de parasitos viáveis detectados através do ensaio de diluição limitante. Além de um maior número de macrófagos infectados, é importante ressaltar que um maior número de parasitos por célula foi observado (**Anexo-4**). Esses resultados nos

sugeriram que o IGF-I é um importante fator no desenvolvimento da leishmaniose cutânea, com influência tanto na dinâmica do processo inflamatório como no crescimento de parasitos.

2.1.2 Células inflamatórias, leucócitos polimorfonucleares e mononucleares

Em relação aos elementos celulares que participam da resposta inflamatória aguda inicial, os leucócitos polimorfonucleares mostram-se importantes na fagocitose dos parasitos, com o auxílio de imunoglobulinas e do sistema complemento. Na década de 80, os relatos *in vitro* apontavam para um papel importante dos neutrófilos na morte de parasitos por ativação do sistema microbicida dependente de oxigênio (PEARSON; STEIGBIGEL, 1981). Da mesma maneira, foi também demonstrado que os eosinófilos fagocitavam e destruíam promastigotas de *L. (L.) donovani* por mecanismos microbicidas destas células e/ou outros constituintes lisossomais (PEARSON et al., 1987). Comparativamente, no entanto, foi demonstrado que os neutrófilos foram mais eficazes no processo de fagocitose, sem opsonização específica por soro imune, das formas amastigotas de *L. (L.) donovani* seguidos dos monócitos e dos eosinófilos (CHANG, 1981).

Em estudo *in vivo*, utilizando hamsters infectados com *L. (L.) chagasi* e camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, nós pudemos observar que os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos são as primeiras células que migram para o ponto de inoculação dos parasitos. Há um afluxo intenso dessas células e direcionado para a região onde os protozoários foram inoculados; a fagocitose acontece e leishmânias com aspectos de degeneração celular são observadas no citoplasma dos neutrófilos (Figura 6) (**Anexo-1, Anexo-2**). A drenagem do processo inflamatório desencadeado pela inoculação de parasitos no tecido subcutâneo do coxim plantar é rápida, uma vez que neutrófilos com parasitos degenerados no seu citoplasma são vistos em linfonodos poplíteos de drenagem 2 horas após a infecção, local onde a resposta imune específica ao parasito se desencadeará (Figura 7) (**Anexo-5**). Os dados observados por nós reforçam o importante papel dos leucócitos polimorfonucleares na lise de parasitos contribuindo para o controle da infecção.

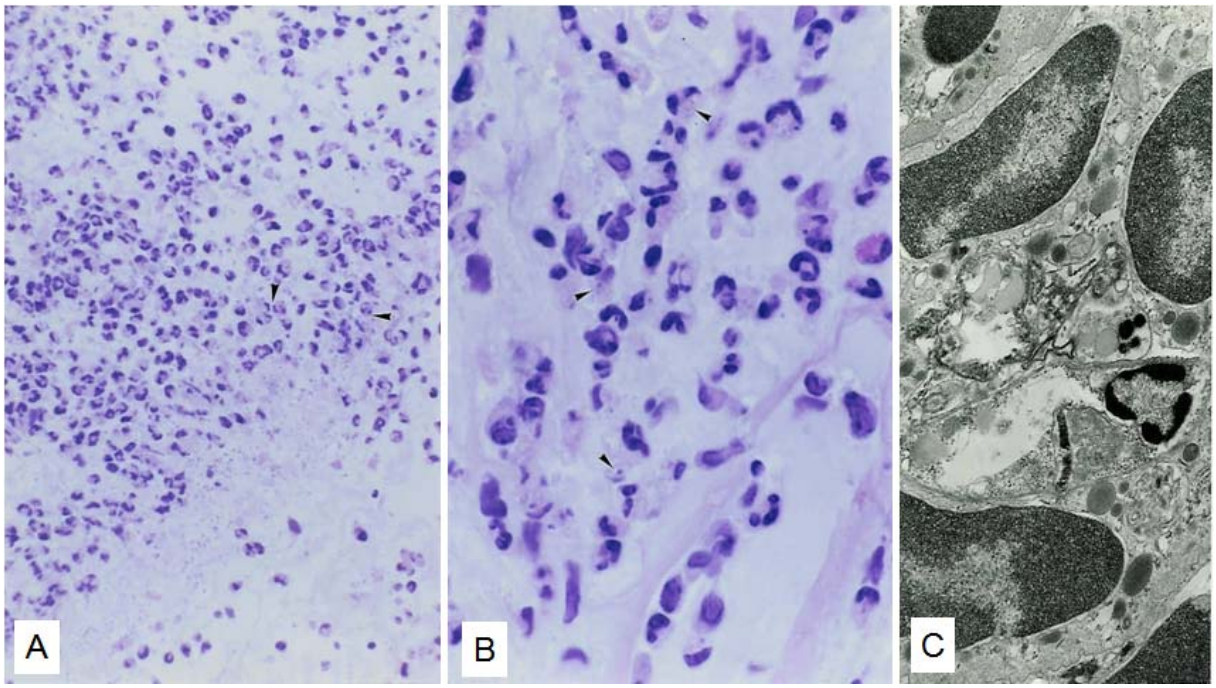


Figura 6 – Corte histológico de pele de hamster infectado com *L. (L.) chagasi* mostrando infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos na derme 2 horas pós-infecção (A). Presença de parasitos no citoplasma de neutrófilos 2 horas pós-infecção (B) (seta). Microscopia eletrônica mostrando *Leishmania* com aspecto degenerativo no citoplasma de neutrófilo (C)

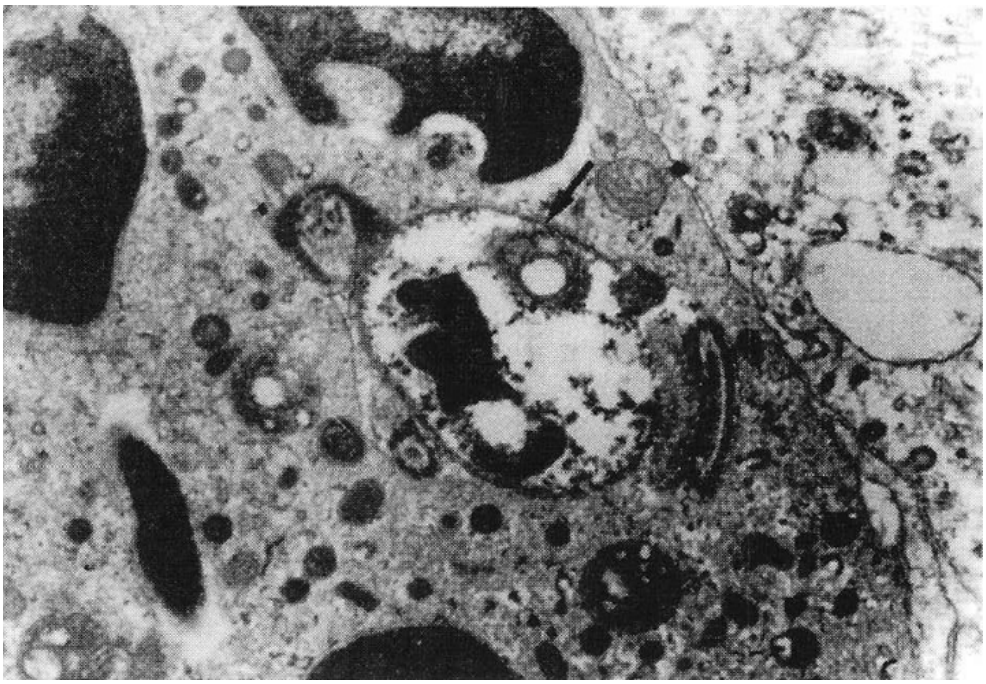


Figura 7 – Microscopia eletrônica mostrando parasito com aspecto degenerativo no citoplasma de neutrófilo em linfonodo poplíteo de drenagem de hamster infectado com *L. (L.) chagasi* 2 horas pós-infecção

Porém, estudos recentes têm postulado uma nova teoria para o papel dos neutrófilos na interação com parasitos do gênero *Leishmania*, chamada de “Cavalo de Tróia” (VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Usando microscopia intravital e citometria, Peters e colaboradores em 2008 mostraram que promastigotas de *Leishmania major* invadem eficientemente neutrófilos, que são recrutados para o local da picada do vetor ou da inoculação experimental, e que os parasitos permanecem viáveis dentro destas células. A depleção de neutrófilos reduziu a habilidade dos parasitos em estabelecer uma infecção produtiva. Desta maneira, os neutrófilos seriam células hospedeiras temporárias de *Leishmania*, pois permitiriam uma entrada silenciosa dos parasitos nos macrófagos, que facilmente ingerem os neutrófilos apoptóticos infectados, sem ativar mecanismos microbicidas nestas células (ROGERS et al., 2009).

Independente da entrada direta do parasito no macrófago, sua célula hospedeira definitiva, ou através do neutrófilo; uma vez dentro do macrófago, novos desafios devem ser vencidos para que a infecção se estabeleça com sucesso.

Embora os leucócitos mononucleares sejam as células predominantes no foco inflamatório somente em torno das 72 horas de infecção, as poucas células mononucleares presentes na derme nas primeiras horas após a inoculação de *Leishmania* podem fagocitar os parasitos (Figura 8) (**Anexo-1**). Nós observamos no tecido subcutâneo da pele de hamsters inoculados com promastigotas de *L. (L.) chagasi*, parasitos no citoplasma de macrófagos já 2 horas pós-infecção. Através do estudo dos linfonodos poplíteos de drenagem por microscopia eletrônica, nós pudemos detectar macrófagos contendo parasitos preservados ou já com aspectos degenerativos 2 horas após a infecção; e macrófagos com amastigotas em divisão após 24 horas de infecção, sugerindo que o escape de *L. (L.) chagasi* do ponto dérmico de inoculação é rápido, favorecendo a visceralização da doença (Figura 9) (**Anexo-5**).

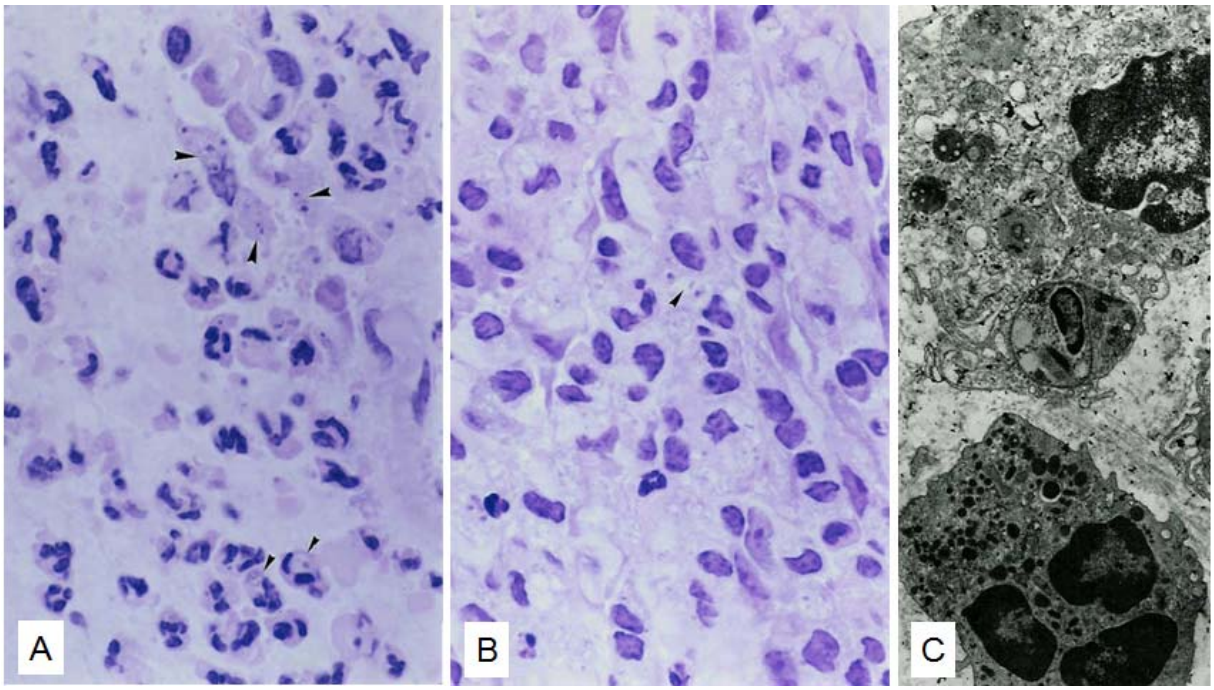


Figura 8 – Corte histológico de pele de hamster infectado com *L. (L.) chagasi* mostrando infiltrado inflamatório da derme. Presença de parasitos no citoplasma de macrófagos 2 horas (A) e 72 horas pós-infecção (B) (seta). Microscopia eletrônica mostrando amastigota de *Leishmania* no citoplasma de macrófago 2 horas pós-infecção

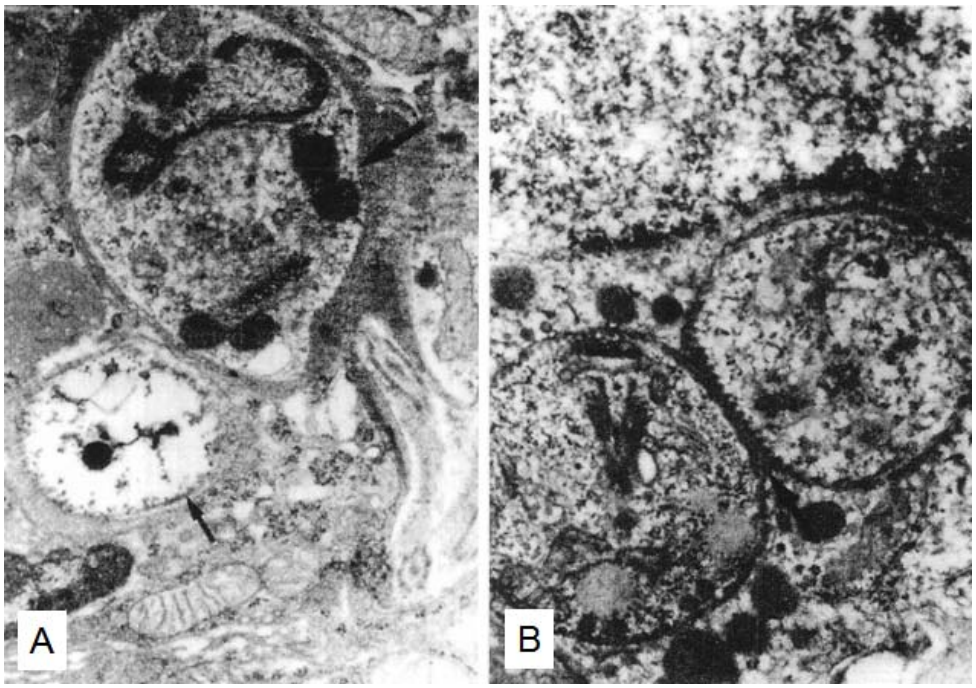


Figura 9 – Microscopia eletrônica mostrando amastigotas de *Leishmania* com aspecto degenerativo (seta fina) e íntegro (seta grossa) no citoplasma de macrófago no linfonodo poplíteo de drenagem 2 horas pós-infecção (A); e amastigota em fase final de divisão celular 24 horas pós-infecção (B)

A interação de *Leishmania* com sua célula hospedeira, o macrófago, envolve uma interação ligante-receptor entre as moléculas de superfície de ambos, seguida por uma série de reações bioquímicas que pode levar à ativação ou à inibição das funções microbicidas da célula hospedeira (RITTING; BOGDAN, 2000).

O parasito se liga a diferentes receptores encontrados na superfície dos macrófagos, tais como: receptor para a porção Fc das imunoglobulinas, receptores para frações do complemento CR1 e CR3, receptor para fibronectina e receptor para manose e fucose. Dentre as diferentes moléculas da membrana dos parasitos envolvidas nesta interação encontram-se glicoconjugados tais como glicoproteínas e glicolipídeos; entre eles uma glicoproteína de peso molecular de 63 kD (gp63) e o lipofosfoglicano (LPG). Esta ligação ocorre principalmente com o receptor CR3 do macrófago, mesmo na ausência de opsoninas do soro. Além da ligação ao CR3, a gp63 pode se ligar à célula hospedeira através do receptor para manose e fucose.

Ressalta-se que a sobrevida dos parasitos na célula hospedeira depende da sua capacidade de evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro vertebrado. Uma das principais defesas do vertebrado à infecção por *Leishmania* refere-se aos mecanismos microbicidas do macrófago, cuja principal função é matar o parasito. A ligação das formas promastigotas metacíclicas à superfície da célula hospedeira desencadeia um fenômeno oxidativo celular, gerando metabólitos tóxicos de oxigênio, superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-) e, especialmente, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que tem sido responsabilizado pela principal atividade leishmanicida do macrófago (MURRAY, 1981; PEARSON et al., 1982; ROSEN et al., 1995). Além da resposta oxidativa, o macrófago possui outros mecanismos microbicidas, como é o caso do óxido nítrico (NO), gerado a partir da reação do aminoácido L-arginina com o oxigênio molecular (O_2) (LIEW et al., 1990).

A inibição da produção de radicais oxidativos do macrófago é considerada um dos principais mecanismos de evasão do parasito. Após a infecção, há ativação do sistema complemento que gera fragmentos C3b e C3bi que, por sua vez, se depositam na membrana do parasito e passam então a atuar como ligantes dos receptores CR1 e CR3, respectivamente. Quando o parasito utiliza principalmente estes receptores da membrana do macrófago para a sua adesão e internalização, um baixo metabolismo oxidativo da célula hospedeira é desencadeado constituindo, assim, um mecanismo essencial para a sobrevivência intracelular da forma promastigota infectiva (WRIGHT; SILVERSTEIN, 1983; BOGDAN et al., 1990).

2.1.3 Células “Natural Killer”

Além dos leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, as células “Natural Killer” (NK) parecem ter um papel importante na modulação da infecção por *Leishmania*. Camundongos depletados em células NK por anticorpos monoclonais anti-asialo GM1 ou anti-NK1.1 apresentaram um aumento na suscetibilidade à infecção por *Leishmania major,* mostrando uma participação ativa destas células na fase inicial da infecção, as quais exercem atividade leishmanicida que controla o tamanho da lesão e o número de parasitos (LASKAY et al., 1993). Ressalta-se que a depleção de células através da utilização de anticorpos usada nesse estudo leva à lise celular por ativação do sistema complemento. Tomando ciência desse estudo e querendo excluir qualquer efeito secundário advindo da ativação do sistema complemento, já estudado por nós (**Anexo 1**), conduzimos experimento sobre o papel de células NK na infecção de camundongos causada por *L. (L.) amazonensis*, empregando tratamento intraperitoneal com estrôncio radioativo (^{90}Sr). Este elemento químico compete com o cálcio nos ossos, deslocando-o. Após uma irradiação local da medula óssea, uma hipoplasia da medula com depleção das células NK é obtida já que estas células dependem do ambiente medular para sua maturação. Em nossos experimentos, a depleção das células NK levou à diminuição da atividade citotóxica destas células concomitante ao aumento do número de parasitos na lesão na fase inicial da infecção, confirmando o papel destas células no controle do parasitismo tecidual (Figura 10) **(Anexo-6).**

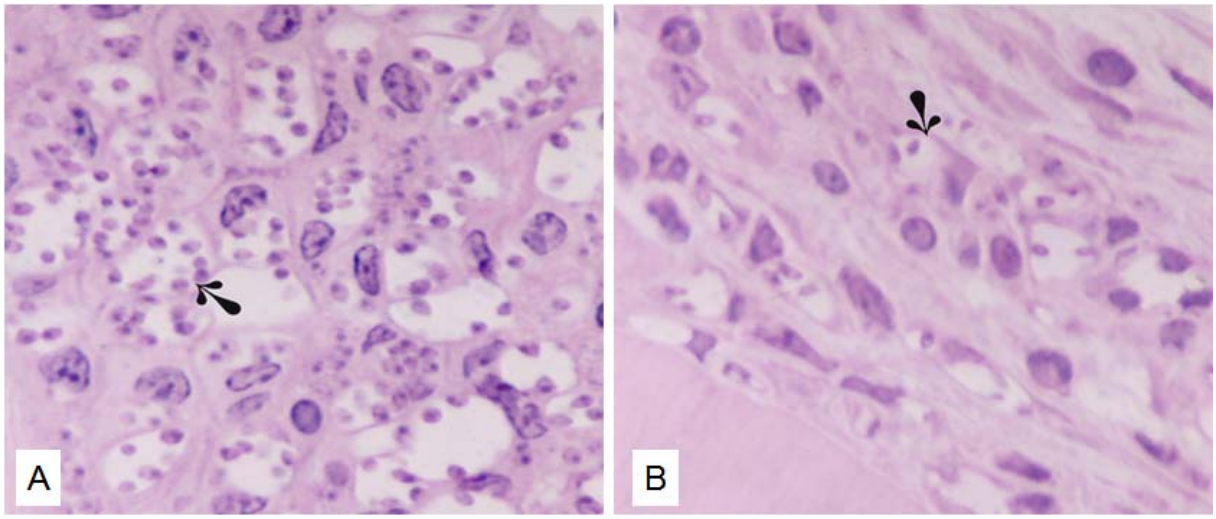


Figura 10 – Corte histológico de pele de camundongo depletado (B) e não depletado (A) de células Natural Killer e infectados com *L. (L.) amazonensis*, mostrando o parasitismo (seta)

Outros estudos mostram o papel das células NK como importante fonte de IFN-γ, com potencial para desencadear uma resposta imune celular do tipo $CD4^+$ Th1, já na primeira semana de infecção na leishmaniose cutânea, induzindo à resistência. Dessa forma, camundongos depletados de células NK mostram diminuição na produção de IFN-γ e aumento na produção de IL-4 em células de baço e gânglio de drenagem, concomitantemente ao aumento da carga parasitária da lesão (SCOTT, 1991; SCHARTON; SCOTT, 1993). Resultados parcialmente contraditórios foram observados por nós em experimentos desenvolvidos em camundongos BALB/c depletados em células NK pelo tratamento intraperitoneal com o isótopo radioativo ^{90}Sr e infectados posteriormente com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Esses animais, além de mostrarem diminuição da atividade citotóxica das células NK com aumento simultâneo da carga parasitária na lesão, mostraram aumento na expressão de IL-12 e IL-4 às 24 horas e 7 dias no sítio dérmico de infecção. A observação contraditória refere-se ao aumento de IFN-γ nesses dois períodos, uma vez que as células NK representam fonte de produção desta citocina, embora não única. O tratamento com ^{90}Sr leva à depleção permanente das células NK que dependem do ambiente medular para sua maturação; no caso as NK5E6. Ressalta-se, no entanto, que houve aumento na expressão de células NK1.1 após o tratamento, pois estas dependem de maturação tímica e não medular. Embora se desconheça a razão do aumento do IFN-γ, o aumento das células NK1.1 que produzem principalmente IL-4 poderia representar um dos mecanismos que colaboraria para a progressão da infecção, uma vez que esta citocina pode bloquear a ação do IFN-γ na ativação de macrófagos para a lise de parasitos na lesão de pele (**Anexo-7**).

Na tentativa de melhor elucidar o papel das células NK na infecção por *L. (L.) amazonensis*, nós avaliamos a interação *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com células NK derivadas de esplenócitos ativados *in vitro* por IL-2 recombinante (células A-NK). (**Anexo-8**). Os estudos morfológicos através de microscopia óptica e eletrônica nos revelaram predominância de debris parasitários dentro de macrófagos que estavam em contato íntimo com as células A-NK e este fenômeno foi proporcional à concentração de células A-NK utilizada nos ensaios (Figura 11). A recuperação dos parasitos ainda viáveis nas culturas de macrófagos infectados e

expostos às diferentes concentrações de células A-NK nos mostrou que o número de parasitos recuperados era inversamente proporcional à concentração de células A-NK utilizadas, isto é, quanto maior a concentração de células A-NK nas culturas menor era o número de parasitos viáveis. As concentrações de IFN-γ e IL-12 nos sobrenadantes das culturas foram diretamente proporcionais ao número de células A-NK, porém nenhuma diferença foi encontrada nas concentrações de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes dos diferentes experimentos, sugerindo um papel direto das células A-NK na lise dos parasitos e não através de citocinas produzidas por estas células que poderiam ativar a produção de NO pelos macrófagos. Esta hipótese foi comprovada ao se observar que as células A-NK mostraram capacidade lítica direta de formas promastigotas, quando adicionadas à cultura de parasitos. Experimentos *in vivo* evidenciaram também que camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e tratados com células A-NK após 24 horas de infecção, apresentavam uma menor lesão na derme, com menos parasitos e alterações histopatológicas mais discretas caracterizando uma melhor resposta do hospedeiro à infecção (**Anexo-8**).

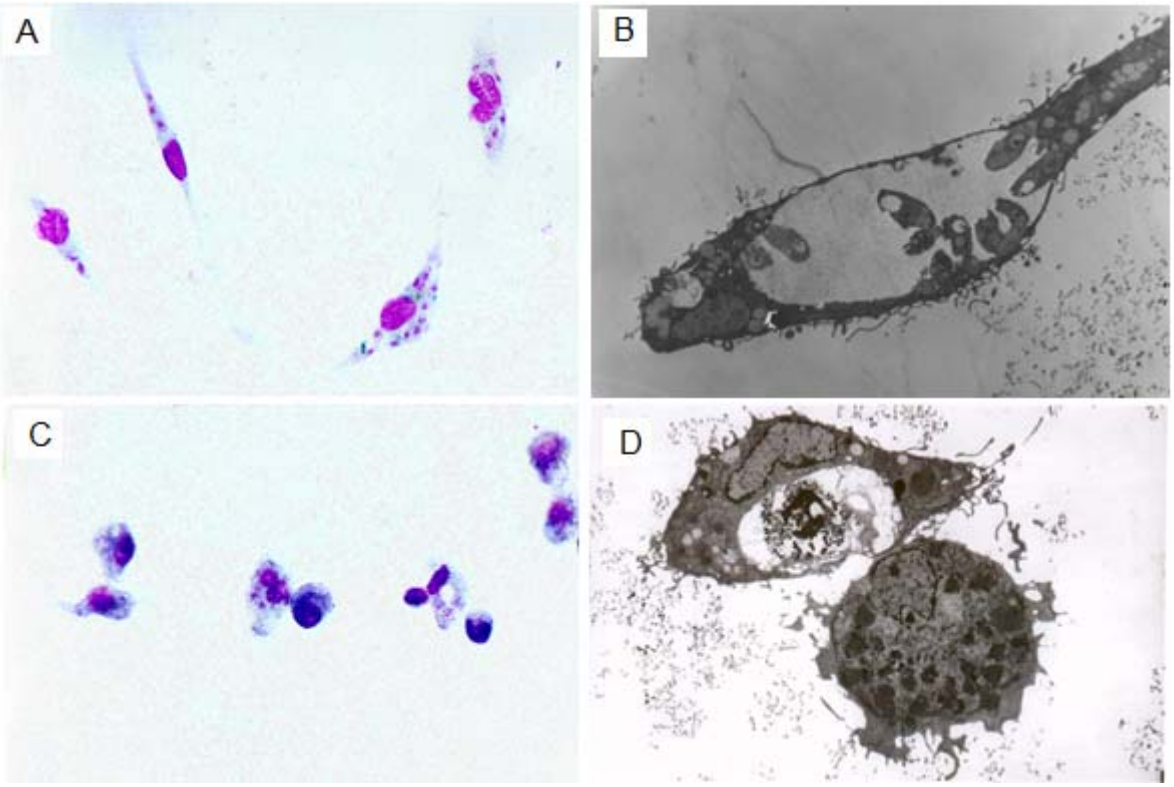


Figura 11 – Cultura de macrófago peritoneal de camundongo BALB/c infectado com *L. (L.) amazonensis* (A e B). Macrófago peritoneal de camundongo BALB/c infectado com *L. (L.) amazonensis* em contato íntimo com células A-NK (C e D)

2.1.4 Células dendríticas de Langerhans

Na leishmaniose, os macrófagos da derme são as células hospedeiras mais parasitadas (LOCKSLEY et al., 1988) sendo também as células efetoras mais importantes para a produção de óxido nítrico, potente agente leishmanicida (STENGER et al., 1994). Por sua vez, as células epidérmicas de Langerhans são normalmente infectadas com uma ou duas amastigotas por célula e restringem a replicação parasitária de maneira independente do óxido nítrico (BLANK et al., 1996), mas são críticas na indução da resposta imune específica (WILL et al., 1992) por serem responsáveis pelo transporte de parasitos aos linfonodos regionais, local onde esta resposta se inicia (MOLL, 1993; MOLL et al., 1995).

Deste modo, a células de Langerhans desempenha um papel crucial na patogênese da leishmaniose, já que representa o veículo que promove o primeiro contato do antígeno com a resposta imune, resultando na estimulação diferencial das sub-populações dos linfócitos T $CD4^+$, Th1 e Th2, cujas citocinas irão regular positivamente (IL-2, IFN-γ e TNF-α) ou negativamente (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) a atividade do macrófago na eliminação do parasito. A ativação do macrófago, através da resposta imune $CD4^+$ Th1, resulta na produção do óxido nítrico, que juntamente com os radicais derivados do oxigênio representam importante mecanismo de eliminação do parasito (LIEW et al, 1990; STENGER et al., 1994).

Porém, recentemente, estudos realizados sobre o papel das células de Langerhans na imunopatogênese da leishmaniose cutânea por *L. major* em camundongos BALB/c tem evidenciado que, diferente do pressuposto sobre a importância destas células no desenvolvimento da resposta imune celular, são as células dendríticas da derme as responsáveis pela estimulação antígeno-específica das células T (RITTER et al., 2004). Foi observado que camundongos geneticamente deficientes em células de Langerhans apresentavam hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) sensivelmente exacerbada (KAPLAN et al., 2005), sugerindo que quanto menor a presença das células de Langerhans na infecção por *Leishmania*, mais forte poderia ser a resposta de hipersensibilidade. Posteriormente, experimentos evidenciaram que as células de Langerhans eram capazes de processar e apresentar antígenos parasitários através dos receptores classe II do MHC para as células T $CD4^+$, as quais se diferenciam em células T

regulatórias (Treg), sugerindo que as células de Langerhans poderiam inibir os eventos inflamatórios na infecção por *L. major* (RITTER; OSTERLOH, 2007). Em conclusão, estes estudos sugerem que as células de Langerhans representariam, de fato, um mecanismo de evasão do parasito da resposta imune por células T, induzindo um estado de supressão imunológica.

Nesta direção, nosso grupo recentemente avaliou a densidade das células de Langerhans no espectro clínico-imunológico da leishmaniose cutânea humana, causado por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (**Anexo-9**).

Nós pudemos observar que nas lesões cutâneas localizadas causadas por *L. (V.) braziliensis,* cujos pacientes mostravam intradermorreação positiva (IDR^+) e potente ao antígeno de *Leishmania*, representando responsividade imune celular, as células de Langerhans se apresentavam em menor número em relação às lesões causadas por *L. (L.) amazonensis,* cujos pacientes apresentavam IDR menos expressiva ou mesmo ausente. Dentre as lesões causadas por esta última espécie, quanto mais grave a forma clínica e menor responsividade ao teste intradérmico, maior a densidade de células de Langerhans na lesão, ou seja, aumento progressivo destas células nas lesões de pacientes com a forma cutânea localizada, disseminada e anérgica difusa com IDR negativa, respectivamente (**Figura 12**). Observou-se também uma correlação negativa entre a densidade de células de Langerhans e a densidade de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ no espectro da leishmaniose cutânea americana, ou seja, um progressivo declínio destes tipos celulares quanto mais grave a manifestação clínica e maior o número de células de Langerhans na lesão. Na comparação entre os agentes causadores da leishmaniose, lesões cutâneas por *L (L.) amazonensis* mostraram menor densidade de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ e maior de células de Langerhans em comparação às lesões determinadas *por L. (V) braziliensis*. Estes resultados reforçam o papel das células de Langerhans na indução de um estado de imunosupressão também no hospedeiro humano, fato que já havia sido observado em estudos experimentais recentes, acima citados.

É possível que as células de Langerhans possam também estar ativando especificamente células T $CD4^+$ do tipo Th2, e quanto maior a sua densidade, mais potente seria esta ativação, fortalecendo os mecanismos de evasão do parasito como o seu estabelecimento e proliferação. Para testar esta hipótese, um novo estudo encontra-se em andamento.

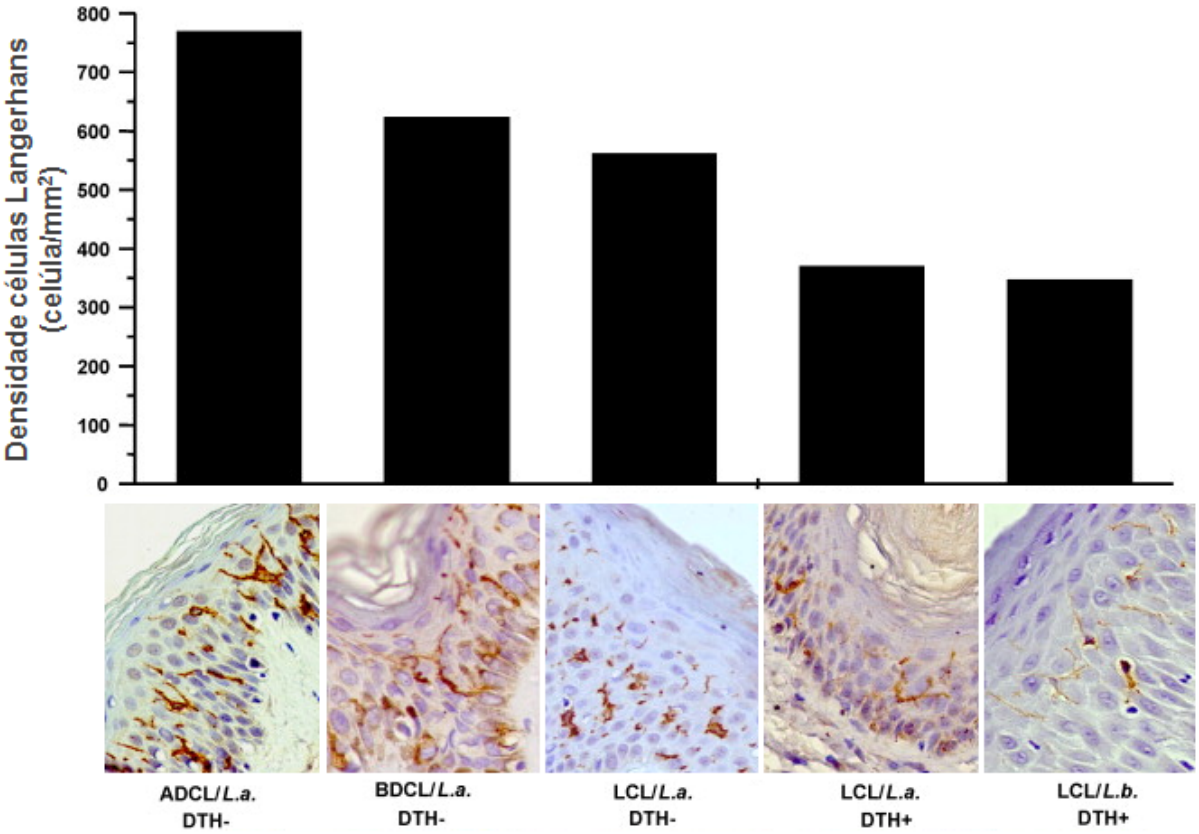


Figura 12 – Densidade das células de Langerhans na epiderme de pacientes com leishmaniose cutânea, dentro do espectro de manifestações clínicas e imunológicas

Neste estudo, camundongos foram infectados com *L.(V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* para avaliarmos a correlação da densidade das células de Langerhans com a resposta imune celular através da determinação da densidade de T CD4+ e CD8+ na pele e o perfil de citocinas produzidas por células do linfonodo de drenagem estimuladas *in vitro* com antígeno específico. Resultados preliminares, ainda não publicados, mostraram maior densidade das células de Langerhans na pele dos camundongos infectados com *L (L.) amazonensis* acompanhada da produção de citocinas Th2, enquanto camundongos infectados com *L (V.) braziliensis* mostraram uma menor densidade destas células e produção de citocinas predominantemente do tipo Th1, aos 30 e 60 dias pós-infecção.

2.1.5 Imunidade adquirida

Em relação à imunidade adquirida ou específica na leishmaniose, trabalhos experimentais têm mostrado que a resposta imune associada à resistência está relacionada à proliferação e ativação de células T CD4+ do tipo Th1 e T CD8+ que são responsáveis pela ativação de macrófagos e conseqüente morte dos parasitos intracelulares e/ou através da lise de células infectadas por uma complexa rede de citocinas. Em contraste, a suscetibilidade estaria relacionada à expansão das células T CD4+ do tipo Th2, associada à uma ativação policlonal de células B (LIEW et al., 1990; REINER; LOCKSLEY, 1995).

A correlação entre as sub-populações Th1 e Th2 de células T CD4+ com suscetibilidade ou resistência à infecção foi descrita pela primeira vez no modelo experimental da leishmaniose (MOSMANN et al., 1986; LOCKSLEY et al., 1988). Quando camundongos foram inoculados com *L. major* verificou-se que as células T CD4+ da linhagem BALB/c, consideradas suscetíveis, secretavam preferencialmente IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas que caracterizam a sub-população Th2. No entanto, células T CD4+ de camundongos C57BL/6, considerados resistentes, secretavam preferencialmente IL-2, IFN-γ e TNF-α, citocinas que caracterizam a sub-população Th1 (LOCKSLEY et al., 1988; ROGERS et al., 2002). Empregando estes mesmos modelos experimentais, foi mostrado que o controle na leishmaniose cutânea pode diferir significantemente na dependência da espécie infectante, uma vez que a infecção por *L. (V.) braziliensis* é capaz de induzir discreto inchaço na pata com cura da lesão em poucas semanas (MAIOLI et al., 2004) e *L (L.) amazonensis* causa uma patologia severa e progressiva (ABREU-SILVA et al., 2004), independente da linhagem de camundongo utilizada. Características imunopatológicas desencadeadas pela infecção por espécies de parasitos do Velho Mundo podem ser diferentes daquelas elicitadas por parasitos do Novo Mundo. Diferenças foram encontradas no perfil de citocinas, nas vias de sinalização e em moléculas efetoras no curso clínico da leishmaniose experimental causada por *L. major* e *L. braziliensis* (ROCHA et al., 2007). Além disto, a dicotomia da reposta imune celular (Th1 ou Th2) parece não ocorrer quando a infecção é causada por outras espécies que não *L. major*. Fato bastante peculiar e surpreendente acontece em infecções por *L. (L.) amazonensis*: o pico na replicação de parasitos ocorre de forma concomitante ao

aumento na produção de IFN-γ, revelando a habilidade deste parasito em utilizar mecanismos de defesa do hospedeiro em seu próprio beneficio (QI et al., 2004).

Em relação à infecção causada por parasitos do Novo Mundo, nós tivemos a oportunidade de caracterizar o curso da infecção e os aspectos da imunidade humoral e celular em camundongos BALB/c infectados por *L. (V.) shawi*, um parasito recentemente isolado e caracterizado na Amazônia brasileira (LAINSON; SHAW, 1989). Esses animais desenvolvem lesão de pele que aumenta com o tempo de evolução da infecção associado a um intenso infiltrado inflamatório difusamente distribuído na derme com grande número de macrófagos infectados, caracterizando um modelo experimental de suscetibilidade (**Anexo-10**). Utilizando o mesmo modelo experimental, pudemos perceber que a resposta imune humoral é predominantemente formada por alto nível de IgG1, isotipo que tem sido associado com uma resposta imune do tipo Th2 e progressão da doença (**Anexo-11**). A atividade funcional das células T CD4+ e CD8+ , por sua vez, mostrou significante aumento no nível de RNAm para TNF-α associado com reduzida expressão de IFN-γ pelas células T CD4+ e pelas populações duplamente negativas, CD4-CD8-. Altos níveis de expressão de IL-4 foram detectados em células T CD8+ e CD4-CD8- e de TGF-β pelas células T CD4+ e CD8+, enquanto IL-10 foi expressa em alta quantidade pelas três populações celulares. Nossos resultados mostram um evidente desbalanço entre TNF-α e IFN-γ que é desfavorável para o controle da replicação de parasitos. Além disto, *L. (V.) shawi* parece induzir diferentes populações celulares a expressar citocinas desativadoras dos mecanismos de resistência do hospedeiro como, IL-4 IL-10 e TGF-β para escapar da sua própria destruição (**Anexo-11**).

A resposta imune celular na leishmaniose cutânea humana também tem sido abordada, principalmente, com base no perfil dos linfócitos T CD4+ e CD8+ e de citocinas produzidas por estas células (BARRAL-NETO et al., 1998; RIBEIRO DE JESUS, et al., 1998).

Baseando-se nos estudos realizados por nossos colaboradores (SILVEIRA et al, 1991; 1998; 2004), revisamos com eles a resposta imunológica que ocorre na leishmaniose cutânea causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (**Anexo-12**).. Nessa revisão, relatamos que pacientes com a forma localizada causada por *L (V.) braziliensis* apresentam reatividade para o teste intradérmico de Montenegro e

mostram uma proliferação de linfócitos maior do que pacientes com a forma localizada causada por *L. (L.) amazonensis*, o que sugere que esta última espécie apresenta mecanismos mais eficientes de escape da resposta imune celular e que a modulação da resposta imune celular pode ser influenciada pela espécie do parasito. Além disso, relatamos a aumentada expressão de RNAm para IFN-γ e nenhuma expressão de RNAm para IL-4 nas lesões de pacientes com a forma localizada causada por *L. (V.) braziliensis*, em oposição ao que ocorre nas lesões de pacientes com a forma localizada causada por *L. (L.) amazonensis*, onde detecta-se aumento na expressão de RNAm para IL-4, embora não haja diminuição na expressão de RNAm para IFN-γ, sugerindo que a IL-4 pode estar competindo com IFN-γ e contribuindo para inibição da resposta de hipersensibilidade tardia.

Nessa mesma revisão, abordamos que nas formas mucosa ou mucocutânea, associadas à forte resposta de hipersensibilidade tardia e linfoproliferação, o perfil das células T CD4+ e CD8+ no infiltrado inflamatório das lesões caracteriza-se por predomínio de células T CD4+, sugerindo a possibilidade de níveis elevados de IFN-γ e TNF-α, já que estas citocinas estão fortemente associadas à resposta de hipersensibilidade. Assim, parece possível que a exacerbação da resposta imune celular nesta forma clínica possa representar o resultado de um prolongado estímulo antigênico, uma vez que o início da lesão mucosa aparece cerca de cinco anos depois da lesão cutânea primária.

Por fim, relatamos que na forma anérgica difusa, a reação de hipersensibilidade tardia e o ensaio de linfoproliferação mostram-se sempre negativos, indicando um forte bloqueio da resposta imune celular. Este bloqueio está associado à menor densidade de células T CD4+ e CD8+ no infiltrado inflamatório, assim como menor expressão de RNAm para IFN-γ e maior expressão de RNAm para IL-4 nas lesões dos pacientes, confirmando que a resposta imune celular é claramente do tipo Th2 nestes pacientes. Já nos casos da forma disseminada, salientamos que durante a disseminação da infecção, tanto a reação de hipersensibilidade como a proliferação de linfócitos estão parcialmente inibidas, o que sugere uma ativação mista de células T CD4+, do tipo Th1 e Th2
(Figura 13).

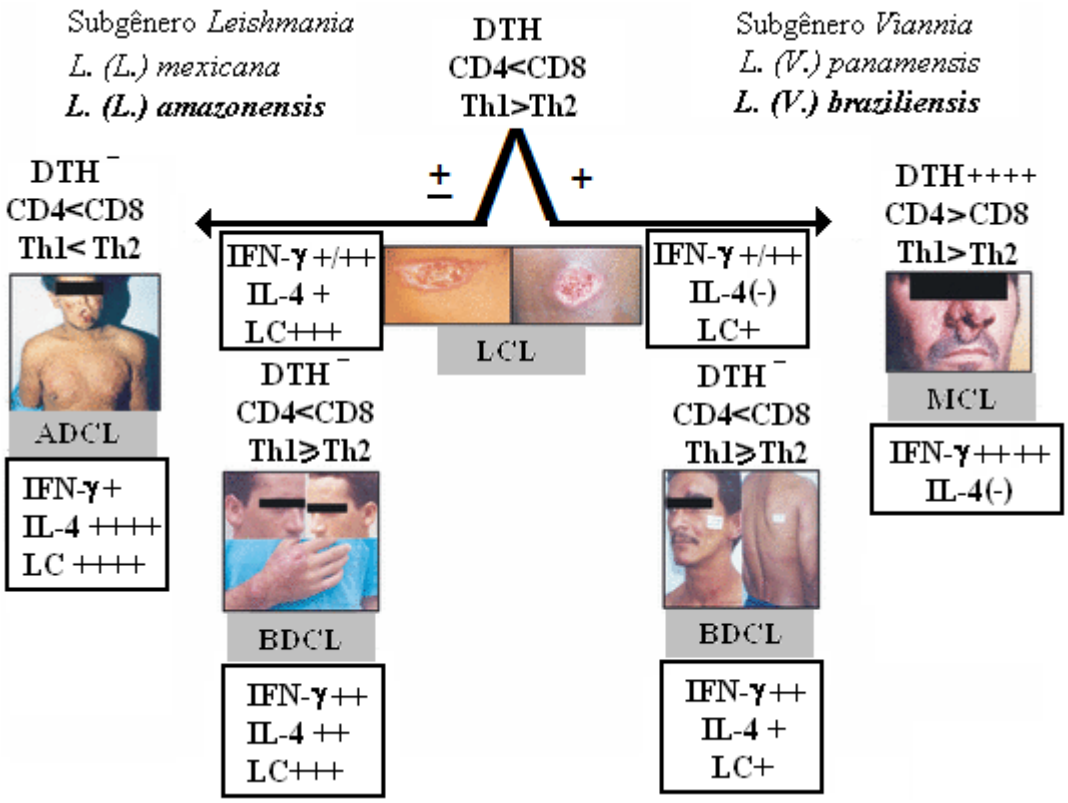


Figura 13 – Espectro clínico e imunológico da leishmaniose cutanea americana

Em relação à leishmaniose visceral humana, um espectro de formas clínicas tem sido observado, podendo variar desde a forma assintomática da infecção, vista em indivíduos resistentes que conseguem montar uma eficiente resposta imune do tipo celular, caracterizada pelo teste de hipersensibilidade tardia (intradermorreação) e ensaios de linfoproliferação positivos juntamente com alta produção de IFN-γ; até uma forma sintomática observada em indivíduos suscetíveis que mostram uma resposta imune suprimida de células T que pode levar à forma clássica da leishmaniose visceral (HOLADAY et al., 1993). Contudo, entre estas duas formas polares da infecção, há descrição da forma sub-clínica oligossintomática, com características clínicas e imunológicas ainda não bem definidas (PEARSON; SOUZA, 1996).

No Brasil, alguns estudos têm sido desenvolvidos no intuito de melhor compreensão do espectro clínico-imunológico da infecção causada por *L. (L.) chagasi.* Esses estudos foram baseados na resposta específica de anticorpos, que avalia a imunidade humoral, ou na resposta de hipersensibilidade tardia, que avalia a imunidade celular em indivíduos infectados (BADARÓ et al., 1986; JERÔNIMO et al., 2000). Salienta-se que esses estudos podem ter subestimado as variações

clínico-imunológicas de indivíduos que vivem em área endêmica por não terem avaliado concomitantemente ambas as respostas imunes contra a infecção por *L. (L.) chagasi*.

Empregando-se conjuntamente ensaios que avaliam tanto a imunidade humoral (reação de imunofluorescência indireta) quanto a celular (teste intradérmico de Montenegro), ambos aplicados em área endêmica de leishmaniose visceral, nós recentemente pudemos compor um quadro clínico e imunológico mais amplo em relação ao o até hoje descrito. Ressalta-se que os ensaios foram baseados na alta especificidade dos antígenos, uma vez que no teste sorológico e no teste intradérmico foram empregadas, respectivamente, formas amastigotas e promastigotas de *L. (L.) chagasi* isolada na área endêmica em estudo. Em um primeiro momento foi feito um estudo transversal (**Anexo-13**), no qual a prevalência da infecção foi determinada e, em um segundo momento, um estudo longitudinal foi conduzido (**Anexo-14**). De acordo com os dados obtidos, foi possível compor um largo espectro clínico - imunológico da infecção humana causada por *L. (L.) chagasi*, consistindo nos seguintes perfis: **infecção assintomática** (IA), **infecção sintomática** (IS), **infecção subclínica oligossintomática** (ISO), **infecção subclínica resistente** (ISR) e **infecção inicial indeterminada** (III). Os indivíduos assintomáticos representam o pólo de resistência à infecção com uma resposta de hipersensibilidade tardia positiva e sorologia negativa. No outro lado do espectro, caracterizando o pólo de suscetibilidade, estão os indivíduos sintomáticos com a forma clínica clássica da doença, mostrando altos títulos de anticorpos na sorologia e anergia ao teste intradérmico de Montenegro. A infecção inicial indeterminada estaria no centro deste espectro, encontrada em indivíduos com teste cutâneo negativo e baixos títulos de anticorpos, podendo evoluir tanto para o pólo de resistência como para o pólo de suscetibilidade da infecção. As formas intermediárias deste espectro seriam caracterizadas pela infecção subclínica resistente que evolui para infecção assintomática, mostrando os pacientes, neste caso, resultados fracamente positivos para ambos os testes; já na infecção sub-clinica oligossintomática, os pacientes apresentam teste cutâneo negativo com sorologia positiva podendo evoluir tanto para a infecção assintomática como para a sintomática (Figura 14) (**Anexo-15**).

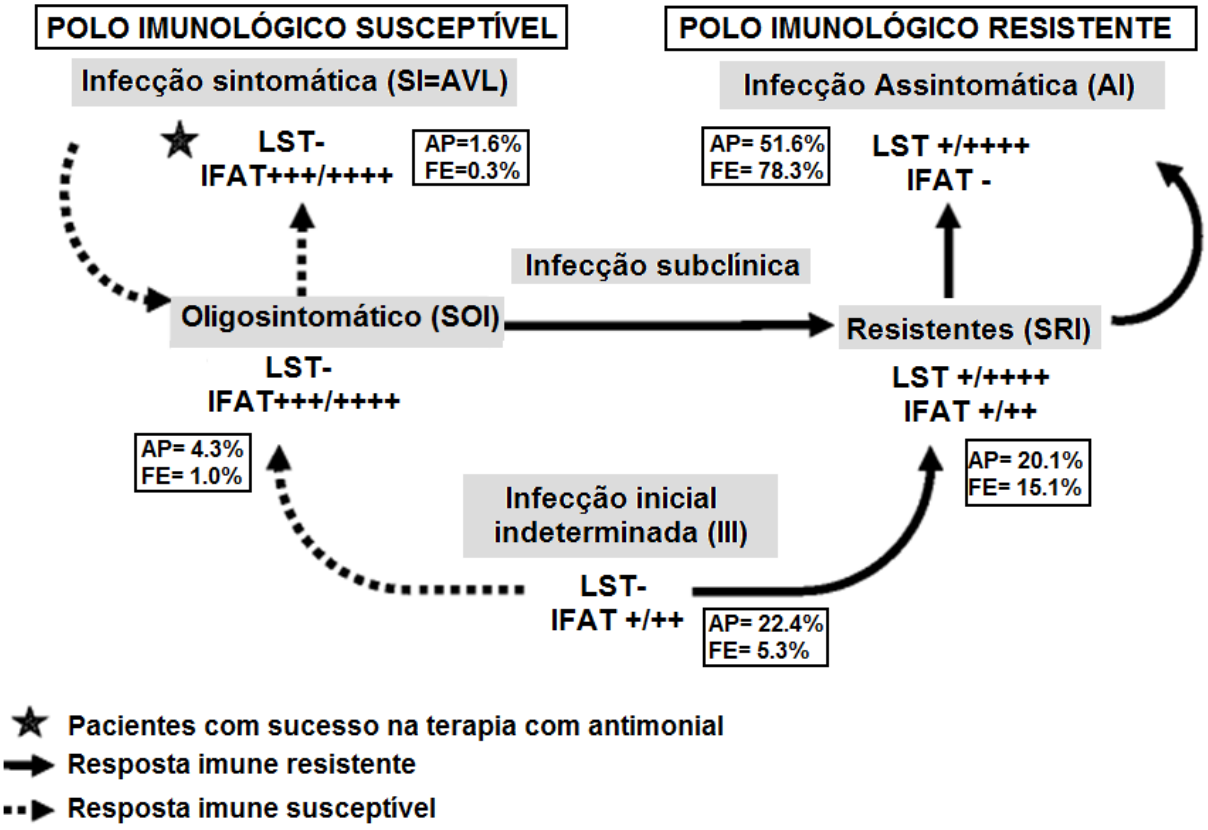


Figura 14 – Espectro clínico e imunológico de indivíduos residentes em área endêmica de visceral visceral americana

2.2 Fatores do parasito que interferem na infecção por *Leishmania*

O papel da espécie e da cepa do parasito, assim como a carga parasitária infectante, a forma parasitária e a via de inoculação empregada para a infecção de animais experimentais já era discutido desde o final da década de 50 (STAUBER, 1958). Neste sentido, Schnur e colaboradores em 1973 mostraram que cepas ditas viscerotrópicas, mesmo quando inoculadas na pele de hamsters, se disseminavam para as vísceras com o tempo, permanecendo no local da inoculação dos parasitos uma infecção que ele chamou de críptica. Da mesma maneira, as cepas cutâneas, mesmo quando inoculadas em víscera (baço), acabavam chegando à pele com a evolução da infecção.

Nós tivemos a oportunidade de trabalhar com duas cepas de *Leishmania*, ambas isoladas no estado de Minas Gerais, uma caracterizada como *L. (L.) chagasi,* isolada de caso humano de leishmaniose visceral, e outra caracterizada como *L.*

major-like, isolada de fígado de cão (**Anexo-16**). Estes parasitos foram inoculados intraperitonealmente em hamsters e a carga parasitária assim como as alterações histopatológicas de baço e fígado foram avaliadas na evolução da infecção. A carga parasitária do baço e fígado mostrou um aumento progressivo com o tempo de infecção e foi maior no grupo de animais inoculados com *L. (L.) chagasi*. A densidade parasitária foi maior no baço do que no fígado nos animais inoculados com *L. major*-like e mostrou-se similar entre baço e fígado nos animais inoculados com *L. (L.) chagasi*. As alterações histopatológicas caracterizaram-se por intensa hiperplasia e hipertrofia do sistema fagocítico mononuclear com alto parasitismo na infecção por *L. (L.) chagasi* enquanto a infecção por *L. major*-like mostrava um envolvimento focal destes órgãos com a formação de nódulos de macrófagos discretamente parasitados. Estes resultados nos mostraram comportamentos biológicos distintos entre cepas isoladas de doença visceral, ambas caracterizadas inicialmente como viscerotrópicas.

Posteriormente, em 1990, nós mostramos que hamsters infectados com formas amastigotas de *L. (L.) chagasi*, espécie viscerotrópica do parasito, no tecido dérmico subcutâneo do coxim plantar traseiro, apresentaram infecção inicial na pele que se resolveu com a evolução da infecção (**Anexo-17**). No entanto, aos 7 e 15 dias pós-infecção, foi observado na pele um infiltrado inflamatório mononuclear com intenso parasitismo. Este processo evoluiu para um esboço granulomatoso aos 30 dias e finalmente granulomas bem formados com a presença de corpúsculos de Schaumann e presença somente de material antigênico particulado a partir dos 45 dias de infecção. A visceralização da infecção, caracterizada pelo encontro de formas amastigotas nas vísceras, ocorreu antes da formação do granuloma e resolução do processo infeccioso na pele.

A competência de duas espécies do parasito, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, em determinar diferentes formas clínicas da leishmaniose cutânea no homem, foi revisada recentemente por nós de acordo com achados encontrados no espectro clínico e imunopatológico da leishmaniose cutânea americana (**Anexo-18**). Foi possível determinar uma dicotomia na interação entre essas espécies de *Leishmania* e a resposta imune mediada por células T. Enquanto *L. (V.) braziliensis* mostra uma clara tendência de levar a infecção da forma cutânea localizada (caracterizada por uma moderada e eficiente resposta imune celular de células T e encontrada no centro do espectro) até a forma mucocutânea, pólo hiperérgico

caracterizado por acentuada resposta imune celular do tipo Th-1; *L. (L.) amazonensis* mostra uma tendência oposta, levando a infecção da forma cutânea localizada para a forma anérgica difusa caracterizada por uma hiporreatividade das células T e expressiva resposta imune do tipo Th-2. Entre as formas localizadas e as duas formas polares, a mucocutânea e a anérgica difusa, a infecção pode apresentar forma intermediária conhecida como leishmaniose cutânea disseminada borderline, caracterizada por uma resposta imune celular mista com predominância de Th-1 sobre Th-2 (SILVEIRA et al., 2004).

Além de diferenças no comportamento biológico de diferentes espécies de *Leishmania*, diferentes cepas de uma mesma espécie de parasito têm mostrado diferenças tanto *in vitro* como *in vivo* (dados não publicados). Experimentos *in vitro* desenvolvidos em nosso laboratório mostraram que o índice de infecção de macrófagos infectados com cepas de *L. (L.) amazonensis* isoladas de caso humano de leishmaniose anérgica difusa foi significantemente maior quando comparado à infecção por cepas isoladas de casos da forma disseminada, seguida da localizada. A expressão de iNOS e os níveis de NO em sobrenadante destas culturas mostraram-se inversamente associados ao índice de infecção. Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* isoladas de pacientes com a forma anérgica difusa quando cultivadas na presença de um elemento químico precursor de NO mostraram-se mais resistentes que as cepas oriundas de pacientes com a forma disseminada seguida da localizada. Da mesma maneira, experimentos *in vivo* têm mostrado uma lesão maior, mais grave e com parasitismo mais acentuado nos camundongos BALB/c infectados com a cepa proveniente de caso com leishmaniose anérgica difusa do que cepa da forma disseminada e localizada, nesta ordem.

2.3 Fatores do vetor que interferem na infecção por *Leishmania*

Os artrópodes hematófagos enquanto laceram a pele do hospedeiro à procura de sangue, salivam no local, facilitando o repasto sanguíneo pela ação de componentes farmacologicamente ativos encontrados na secreção salivar que rompem os processos hemostáticos do hospedeiro, auxiliando o estabelecimento do patógeno (KAMHAWI et al., 2000). O papel da saliva do inseto vetor no

desenvolvimento da infecção por *Leishmania* foi revisado por nós em 2009, em um artigo submetido à Revista do Instituto Adolfo Lutz (**Anexo-19**).

Os primeiros relatos sobre o papel da saliva do flebotomíneo na infecção por *Leishmania* mostraram que a inoculação de camundongos com *L. major* juntamente com lisado de glândula salivar (LGS) de *Lutzomyia longipalis* levava a um aumento no tamanho e na carga parasitária da lesão, mesmo quando um número reduzido de parasitos era utilizado (TITUS; RIBEIRO, 1988 e 1990). Esse mesmo efeito do LGS de *Lu. longipalpis* foi obtido quando outras espécies de *Leishmania* foram utilizadas na infecção experimental, entre elas: *L. (V.) braziliensis* (SAMUELSON et al., 1991) e *L. (L.) amazonensis* (THEODOS et al., 1991). Porém, surpreendentemente, os mesmos resultados não foram obtidos em relação ao binômio natural vetor/parasito, ou seja, o curso da infecção em cães (PARANHOS-SILVA et al., 2003), tampouco em hamsteres (GOMES et al., 2008) não foi agravado quando ao inóculo de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* foi adicionado o LGS de *Lu. longipalpis*, vetor natural da espécie.

Em outros binômios naturais, no entanto, o efeito exacerbador da infecção pelo LGS do vetor foi observado, uma vez que LGS de *Lu. whitmani* promoveu aumento de lesões cutâneas em camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (BEZERRA; TEIXEIRA, 2001); assim como exacerbação das lesões cutâneas e o aumento do parasitismo têm sido consistentemente encontrados nas infecções por *L. major* na presença de saliva de *Phlebotomus papatasi*, vetor natural do parasito no Velho Mundo (BELKAID et al., 1998).

Importante salientar que a fonte das glândulas salivares em todos os estudos até então publicados sempre foi de insetos colonizados e mantidos por várias gerações em laboratório, embora, na natureza, o parasito seja transmitido ao hospedeiro vertebrado por vetor do campo e não colonizado em laboratório. Pela possibilidade de estar sendo introduzindo um viés pelo uso de insetos colonizados, nós desenvolvemos experimentos comparando a evolução da infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* co-inoculada com lisado de glândula salivar de *Lu. longipalpis* colonizada em laboratório e capturada no campo (**Anexo-20**). O tamanho da lesão desenvolvida em camundongos C57BL/6 foi significantemente maior quando LGS de vetor colonizado era adicionado ao inóculo infectante em relação ao tamanho da lesão desenvolvida nos camundongos co-inoculados com LGS de vetor capturado no campo. Estudos morfológicos quantitativos das lesões de pele (sítio de

inoculação) revelaram um afluxo menor de neutrófilos e maior de macrófagos na fase aguda da infecção na presença do LGS de vetor colonizado em relação ao de campo; o que provavelmente refletiu na fase crônica da infecção, caracterizada pela presença predominante de macrófagos intensamente parasitados no grupo co-inoculado com saliva de vetor colonizado. Os animais co-inoculados com LGS de vetor de campo, por sua vez, mostraram, à semelhança do grupo controle inoculado somente com o parasito, a presença de um infiltrado inflamatório mononuclear formado por macrófagos moderadamente parasitados, linfócitos e plasmócitos com áreas focais de necrose (**Figura 15**). Caracterização bioquímica desses lisados nos mostrou diferenças na composição e quantidade de proteínas nas glândulas salivares. Estes resultados sugerem que na infecção natural, a saliva do vetor pode não ter um papel tão expressivo na facilitação da infecção por *Leishmania*, como têm sugerido os prévios estudos experimentais que utilizam saliva de vetor colonizado em laboratório.

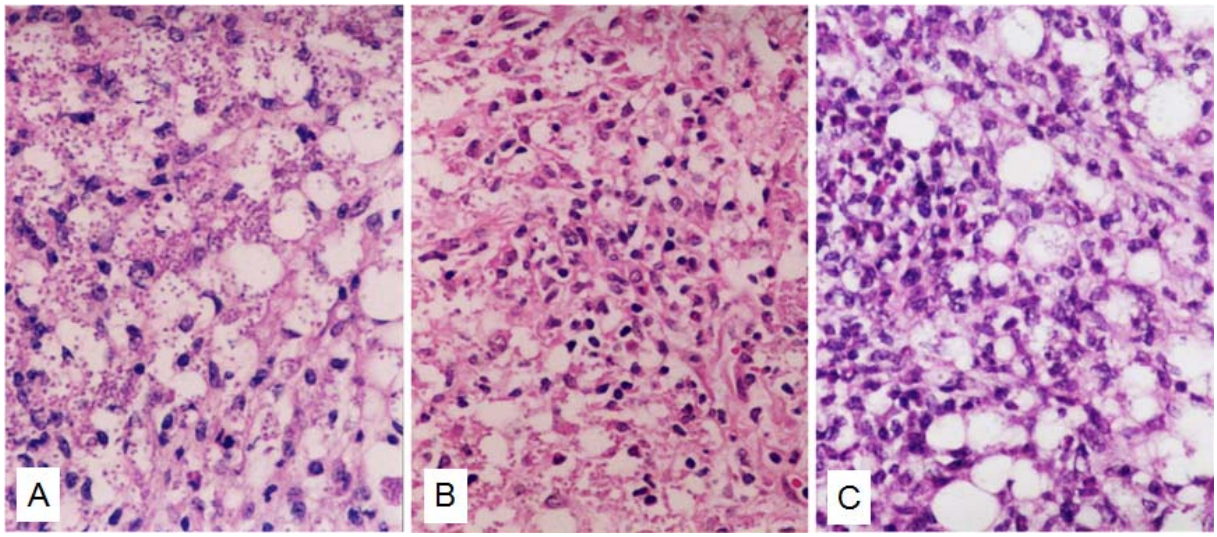


Figura 15 – Corte histológico de pele de camundongo C57BL/6 infectado com *L. (L.) amazonensis* na presença do extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis* colonizado em laboratório (A), capturado no campo (B) e na ausência do extrato de glândula salivar (C)

Quanto aos efeitos imunomoduladores da saliva, experimentos *in vitro* tem mostrado que, na presença de lisado de glândula salivar de *Lu. longipalpis*, macrófagos de camundongos se tornam incapazes de apresentar antígenos, prejudicando a indução da proliferação de linfócitos T específicos ao parasito, ficam refratários à ativação por IFN-γ, citocina que ativa os mecanismos leishmanicidas dos macrófagos, e reduzem drasticamente a produção de hidróxido de hidrogênio e

óxido nítrico, seus principais agentes leishmanicidas (TITUS; RIBEIRO, 1990; THEODOS; TITUS, 1993; HALL; TITUS, 1995). Resultados similares têm sido obtidos quando glândulas salivares de vetores do Velho Mundo são empregadas (ROGERS; TITUS, 2003). Além do efeito supressor da resposta imune do hospedeiro, foi demonstrado que saliva de *Phlebotomus duboscqi,* vetor de *L. major* no Quênia, é quimiotática para macrófagos e que esta atração pode fazer parte dos mecanismos pelos quais a saliva do vetor garanta o sucesso do parasitismo destas células no hospedeiro susceptível ao protozoário (ANJILI et al., 1995). Os efeitos *in vivo* do lisado de glândula salivar de *Lu. longipalpis* ou de *P. papatasi* na resposta imune em infecções experimentais de camundongos mostram já um quadro bem mais complexo e heterogêneo de resultados, na dependência da espécie do parasito inoculado e o *background* genético do animal (MBOW et al., 1998, NORSWORTHY et al., 2004).

A caracterização de componentes da saliva de *Lu. longipalpis* mostrou a presença de um principal componente, o Maxadilan, potente vasodilatador (LERNER et al., 1992); cuja ação na imunomodulação da resposta imune foi confirmada posteriormente (QURESHI et al., 1996). Nos vetores do Velho Mundo a presença de Maxadilan não foi detectada, porém outros componentes como adenosina e seu precursor foram encontrados e mostraram propriedades vasodilatadora e de anti-agregação plaquetária com efeitos imunomoduladores também comprovados (RIBEIRO et al., 1999).

Ressalta-se que vários trabalhos foram publicados mostrando ação imunomodulatória da saliva dos vetores em infecções experimentais por *Leishmania*, mas, como já salientado anteriormente, houve o emprego de glândula salivar de insetos colonizados em todos os estudos. Em continuidade nosso trabalho acima mencionado (**Anexo 20**), avaliamos desta vez o efeito da saliva de *Lu. longipalpis* capturada no campo na imunomodulação da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos C57BL/c e comparamos este efeito com o da saliva de vetores colonizados (**Anexo-21**). Pudemos observar que a co-infecção com lisado de glândula salivar de vetor do campo induziu, além de uma lesão menor e com menos parasitos, uma menor infiltração de macrófagos no sítio de inoculação e menor produção de citocinas associadas à resposta de suscetibilidade (IL-4 e IL-10) quando comparada à co-infecção com o lisado de vetor colonizado; reforçando os

dados previamente obtidos e apontando para o viés dos estudos desenvolvidos com saliva de vetor colonizado em laboratório.

É importante destacar que estudos recentes têm mostrado que componentes da saliva do inseto vetor podem ser candidatos à vacina para as leishmanioses (BRODSKYN et al., 2003), uma vez que a pré-exposição à saliva pode resultar em proteção. O efeito de exacerbação da infecção por *L. major* em camundongos na presença do lisado de glândula salivar de *P. papatasi* foi abolido quando os animais foram pré-expostos à saliva do vetor (BELKAID et al., 1998). A proteção conferida pela pré-sensibilização com a saliva do vetor parece estar associada a uma resposta de hipersensibilidade tardia, uma vez que habitantes de áreas endêmicas exibem forte resposta de hipersensibilidade tardia à picada do vetor (THEODOR, 1935). Estudos em área endêmica sugerem que a exposição natural à picada de flebotomíneo não infectado pode influenciar a epidemiologia da doença. Indivíduos residentes em área endêmica de leishmaniose visceral mostram a presença de anticorpos contra saliva de *Lu. longipalpis* (BARRAL et al, 2000). Simultaneamente ao desenvolvimento de resposta imune humoral à saliva, imunidade mediada por células contra *Leishmania* também é observada nestes indivíduos (GOMES, et al, 2002).

Porém grandes desafios terão que ser vencidos no desenvolvimento de uma vacina baseada em componentes da saliva do vetor, pois tem sido descrito que a resposta protetora desencadeada por componentes da saliva do inseto vetor parece ser parasito/vetor específica (THIAKAKI, et al., 2005). Além disso, no desenvolvimento de uma imunidade eficaz contra leishmaniose devem ser levadas em consideração as diferentes proteínas existentes na saliva de flebotomíneo, já que podem induzir diferentes respostas imunológicas que podem se correlacionar com resistência ou suscetibilidade (OLIVEIRA et al, 2008).

3 ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES

De acordo com os aspectos discutidos anteriormente sobre a patogenia das leishmanioses, e considerando que diferentes espécies do parasito são transmitidas por diferentes espécies do vetor, para diferentes hospedeiros vertebrados em

diferentes ecossistemas, a infecção pode manter-se de forma inaparente ou assintomática ou resultar em um leque espectral de manifestações clínicas, histopatológicas e imunológicas que pode variar desde as formas cutâneas até a forma visceral, muito grave e letal quando não tratada.

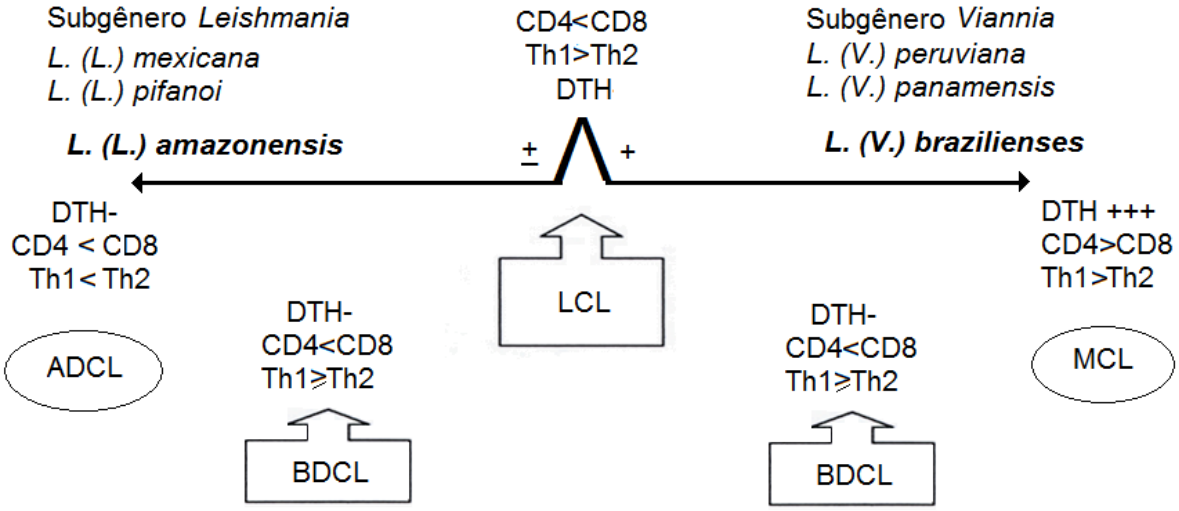
3.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A leishmaniose tegumentar é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, causada por diferentes espécies de parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. Caracteriza-se, principalmente, pelo comprometimento do tecido cutâneo e, secundariamente, dependendo da espécie de *Leishmania* e de fatores imunogenéticos do hospedeiro, pode haver lesão do tecido mucoso nasobucofaríngeo. É uma doença considerada polimorfa, devido à grande variedade dos tipos de lesões que podem manifestar-se na pele, tais como: impetiginóide, ectimatóide, vegetante, verrucóide, tuberoso, nodular, infiltrativo, lupóide e outros. Entretanto, a úlcera leishmaniótica representa, sem dúvida, a manifestação cutânea mais comum da doença, apresentando as seguintes características: contornos circulares, bordas salientes e infiltradas, fundo com granulação grosseira avermelhada e com discreto exsudato. Na ausência de infecções secundárias, bacteriana ou micótica, apresenta pouca sensibilidade, podendo ser indolor. A lesão pode, ainda, estar recoberta por crosta sero-hemática ou sero-purulenta, a qual, após ser removida, expõe o aspecto ulcerado típico.

Quando ocorre comprometimento mucoso, que pode surgir junto com as lesões cutâneas ou, o que é mais freqüente, meses ou vários anos depois da cicatrização das lesões de pele, este inicia-se por eritema e discreta infiltração da mucosa, seguido de granulação e ulceração, chegando por último à perfuração do tecido cartilaginoso do septo nasal ou do palato.

3.1.1 Espectro clínico, histopatológico e imunológico da LTA

Conforme referido anteriormente, a patogenia da leishmaniose tegumentar é fortemente influenciada por dois fatores: os relacionados às características imunogenéticas do hospedeiro e os relacionados à virulência da espécie de *Leishmania* infectante, que são inúmeras no caso da LTA. Como resultado dessa interação foi definido um espectro de manifestações clínicas, histopatológicas e imunológicas na LTA, que serão comentadas adiante (Figura 16).



Fonte: Silveira et al. (2004).

Figura 16 – Espectro da leishmaniose cutânea do Novo Mundo: classificação clínica e imunopatológica

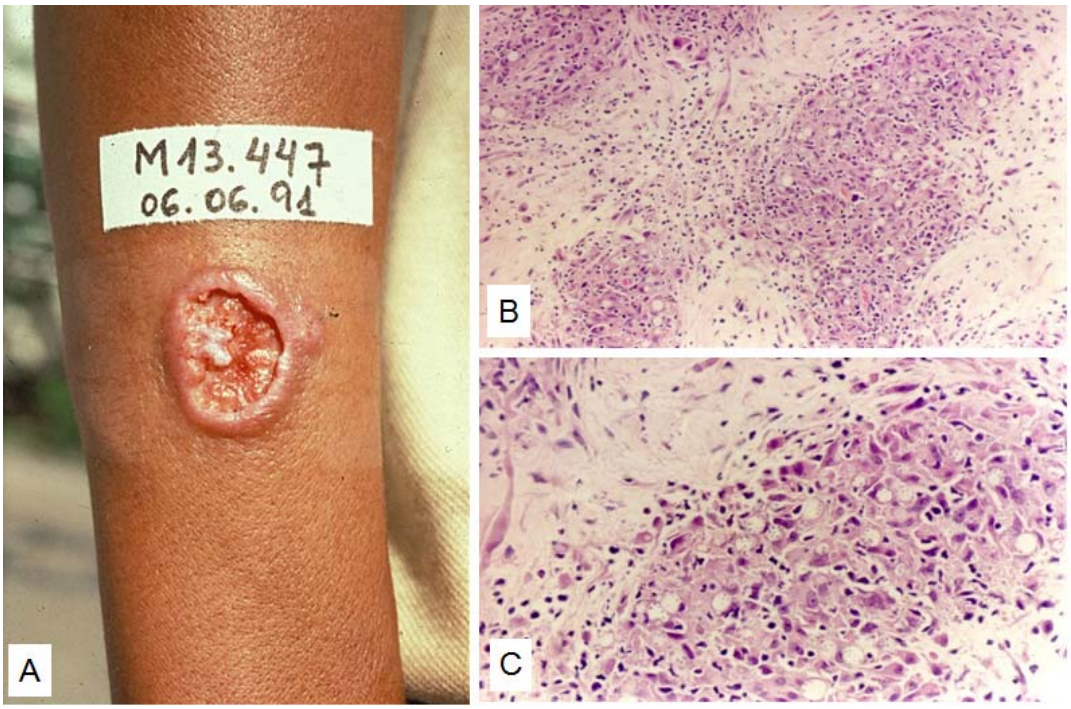
A infecção pode manter-se de forma inaparente ou assintomática em indivíduos com uma imunidade inata capaz de conter a infecção ou, como acontece com a maioria dos indivíduos, resultar em um leque espectral de manifestações clínicas na pele e/ou na mucosa nasobucofaríngea, traduzidas por lesões cutâneas isoladas (leishmaniose cutânea localizada - LCL), lesões cutâneas disseminadas (leishmaniose cutânea disseminada borderline - LCDB), lesões cutâneo-mucosas (leishmaniose cutâneo-mucosa - LCM), lesões mucosas isoladas (leishmaniose mucosa - LM) e lesões cutâneas difusas (leishmaniose cutânea anérgica difusa - LCAD) (SILVEIRA, et al., 2004; SILVEIRA et al., 2005).

3.1.1.1 *Leishmaniose Cutânea Localizada*

Considerando este leque de manifestações, a forma LCL ocuparia o centro do espectro e seria caracterizada, na grande maioria dos casos, por uma ou mais lesões ulceradas na pele do indivíduo, tendo como agente etiológico qualquer das espécies de *Leishmania* dos subgêneros *Viannia* ou *Leishmania* que ocorrem nas Américas (LAINSON; SHAW, 1987). Além disso, dependendo do fenótipo da célula T CD4+ estimulado, se Th1 ou Th2, as lesões de alguns pacientes podem até cicatrizar espontaneamente, porém, na maioria dos casos há necessidade de tratamento específico para a cura definitiva das lesões cutâneas (Figura 17A). Em geral, os pacientes portadores de LCL apresentam uma resposta imune celular mais equilibrada, porém, com predominância de resposta T CD4+ Th1, que resulta na produção de níveis elevados de IFN-γ capazes de induzir a ativação do macrófago e a conseqüente eliminação do parasito (SILVEIRA *et al*., 2004). Trabalhos recentes têm evidenciado também a participação dos linfócitos T CD8+ nos mecanismos de resistência e/ou de cura da leishmaniose tegumentar, tanto na forma LCL causada por *L. (V.) braziliensis*, como na forma LCL causada pela *L. (L.) amazonensis* (SILVEIRA et al*.,* 2004).

Há evidências demonstrando que a resposta imune celular pode também ser influenciada pelo tipo de antígeno parasitário, como discutido anteriormente. Nessa direção, foi observada uma prevalência significativamente mais elevada de resultados positivos nos testes intradérmicos de hipersensibilidade tardia e testes de proliferação de linfócitos em pacientes com LCL causada por *L. (V.) braziliensis* em relação aos com infecção por *L. (L.) amazonensis*. Por outro lado, embora não exista um consenso quanto ao papel da resposta imune humoral na contenção da infecção, vários trabalhos tem demonstrado a presença de anticorpos IgG específicos anti-*Leishmania* em níveis relativamente moderados no soro de pacientes portadores de LCL nas diferentes fases evolutivas da doença. Por último, no tocante à resposta histopatológica, sem dúvida um dos aspectos marcantes relacionados aos casos determinados por *L. (L.) amazonensis* é a presença de um infiltrado dérmico mononuclear onde a presença de macrófagos vacuolizados com parasitos se sobressai junto à reação linfoplasmocitária (**Figura 17B e C**). Por outro lado, na infecção causada por *L. (V.) braziliensis* o infiltrado dérmico é predominantemente

linfoplasmocitário e raramente observa-se a presença de macrófagos parasitados. Além desse quadro habitual, podem ser vistas, ainda, áreas de necrose tecidual associadas ou não a granulomas epitelióides adjacentes, provavelmente relacionados aos fenômenos de hipersensibilidade tardia que são induzidos pela *L. (V.) braziliensis* (SILVEIRA *et al*., 1998).



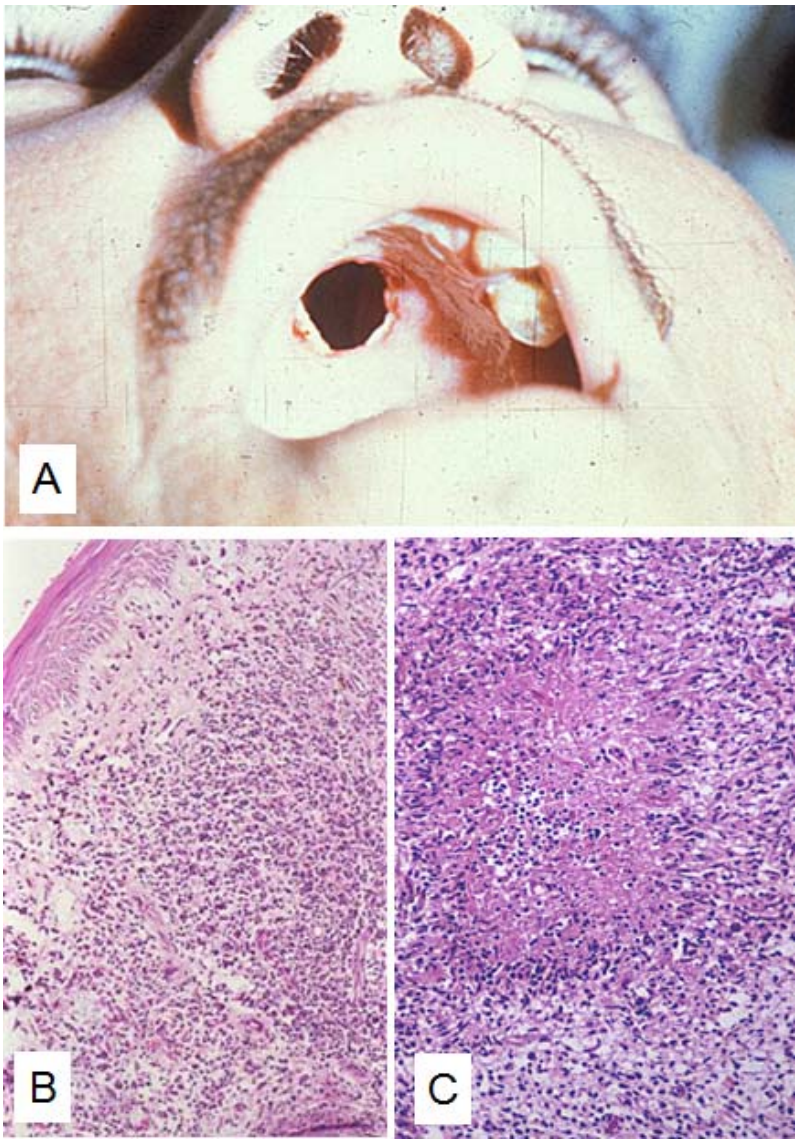
Fonte: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira.

Figura 17 – Aspecto clínico (A) e característica histológica da lesão de pele (B e C) na leishmaniose cutânea localizada

3.1.1.2 *Leishmaniose Cutânea-Mucosa / Leishmaniose Mucosa*

Do centro do espectro (LCL), os casos não controlados pelos mecanismos da resposta imune celular podem evoluir para um dos dois pólos do espectro: pólo de hipersensibilidade celular, representado pela leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) e leishmaniose mucosa (LM), ou o pólo de hipossensibilidade, caracterizado pela leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD). Esta polarização é também influenciada pela espécie do parasito, se do subgênero *Viannia* ou *Leishmania*. A espécie *L. (V.) braziliensis* é a causadora da LCM e LM e *L.(L.) amazonensis* é

responsável pela LCAD. No pólo de hipersensibilidade celular do espectro, alguns pacientes podem apresentar, simultaneamente, manifestações de comprometimento cutâneo e mucoso (LCM), porém, na maioria dos casos, encontra-se lesão ativa somente em tecido mucoso (LM), embora os indivíduos relatem antiga história prévia de lesão cutânea (Figura 18A). Uma característica dessas formas de leishmaniose tegumentar é a presença de necrose do tecido mucoso nasobucofaríngeo associada a uma forte resposta da imunidade celular, evidenciada pelo teste de hipersensibilidade celular tardia e pelo teste de proliferação de linfócitos (SILVEIRA et al., 1998) (Figura 18B e C). Embora já tenha sido observada uma resposta mista Th1 e Th2, recente estudo demonstrou nítida resposta do fenótipo T CD4+ Th1 em pacientes portadores de LCM e LM, associada à presença de altos níveis de RNA mensageiro para IFN-γ em biópsias de lesões mucosas e em monócitos do sangue periférico e ausência de RNA mensageiro para IL-4 nas mesmas amostras (SILVEIRA et al., 2004). A potente resposta de hipersensibilidade celular tardia evidenciada nos testes intradérmicos desses pacientes guarda correlação com a forte reação linfoplasmocitária, com presença ou não de granuloma tuberculóide, vista nos cortes histológicos das lesões mucosas. Por último, a resposta imune humoral desses pacientes tem revelado baixos a moderados níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania*.



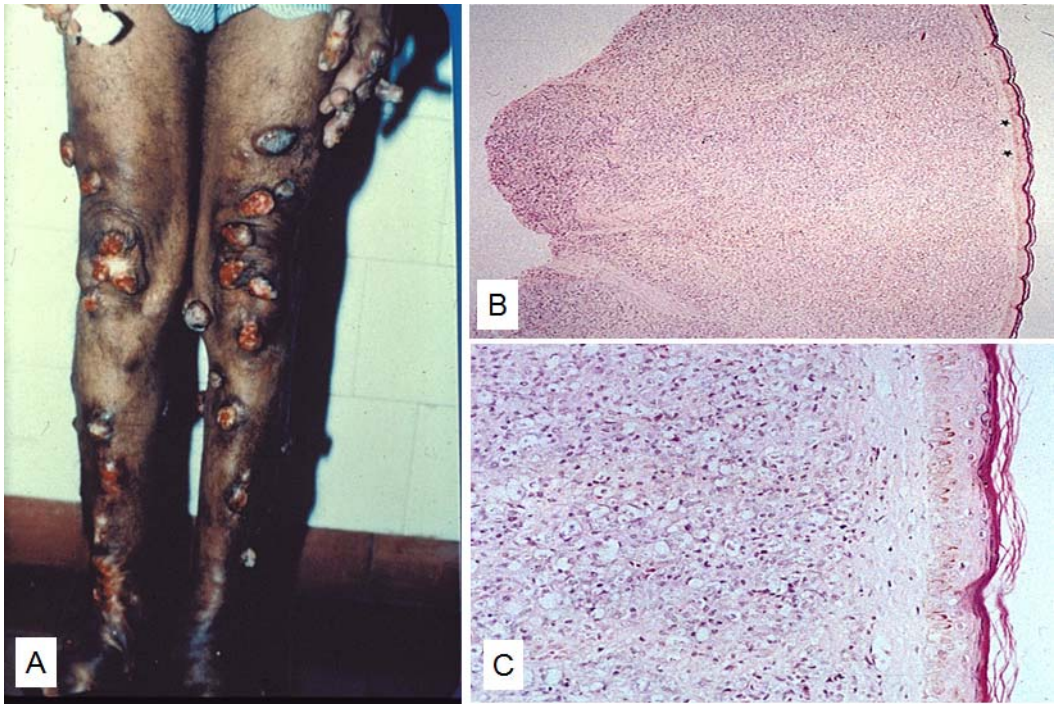
Fonte: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira.

Figura 18 – Aspecto clínico (A) e característica histológica da lesão de pele (B e C) na leishmaniose mucosa

3.1.1.3 *Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa*

No lado oposto do espectro, a LCAD caracteriza a forma clínica de maior representatividade do pólo de hipossensibilidade celular da leishmaniose tegumentar. Constitui uma forma relativamente rara da leishmaniose cutânea no Novo Mundo, causada por espécies de parasitos do subgênero *Leishmania*. No Brasil, a *L. (L.) amazonensis* é considerada a única espécie que atua como agente da LCAD (SILVEIRA *et al*., 1997). Esta forma da doença é caracterizada por um

número incontável de lesões nodulares, papulares, tuberosas e placas infiltradas na pele, que raramente ulceram. Nos casos de evolução mais antiga, com mais de cinco anos, as lesões podem ocupar quase toda a superfície do corpo, porém, a localização predominantemente é nas extremidades e raramente as lesões envolvem o tecido mucoso nasobucofaríngeo (Figura 19A). Na derme, o quadro histopatológico é caracterizado por um infiltrado difuso de macrófagos vacuolizados, repletos de formas amastigotas nos vacúolos parasitóforos, com raros linfócitos e plasmócitos, o que confere ao infiltrado o aspecto de um granuloma macrofágico (SILVEIRA et al., 2004) (Figura 19B e C). A resposta intradérmica e o teste de proliferação de linfócitos são sempre negativos, indicando que nesta forma da LTA ocorre um bloqueio dos mecanismos da resposta imune celular específico ao parasito *Leishmania*, impossibilitando aos pacientes o controle da infecção na pele (SILVEIRA et al., 1998). Corroborando esses aspectos imunopatológicos, verificou-se que os pacientes mostram resposta de linfócitos predominantemente do tipo Th2 com altos níveis de RNA mensageiro para IL-4. Ressalta-se que a terapia convencional é freqüentemente acompanhada de recaídas da doença (SILVEIRA, et al., 2004). Por fim, embora exista uma exacerbação da resposta imune humoral nos pacientes com LCAD, nos quais é demonstrada uma grande concentração de anticorpos IgG específicos anti-*Leishmania*, diferentemente dos pacientes com LCM e LM, as evidências indicam que essa resposta de anticorpos IgG não tem nenhuma atuação no controle da infecção.



Fonte: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira.

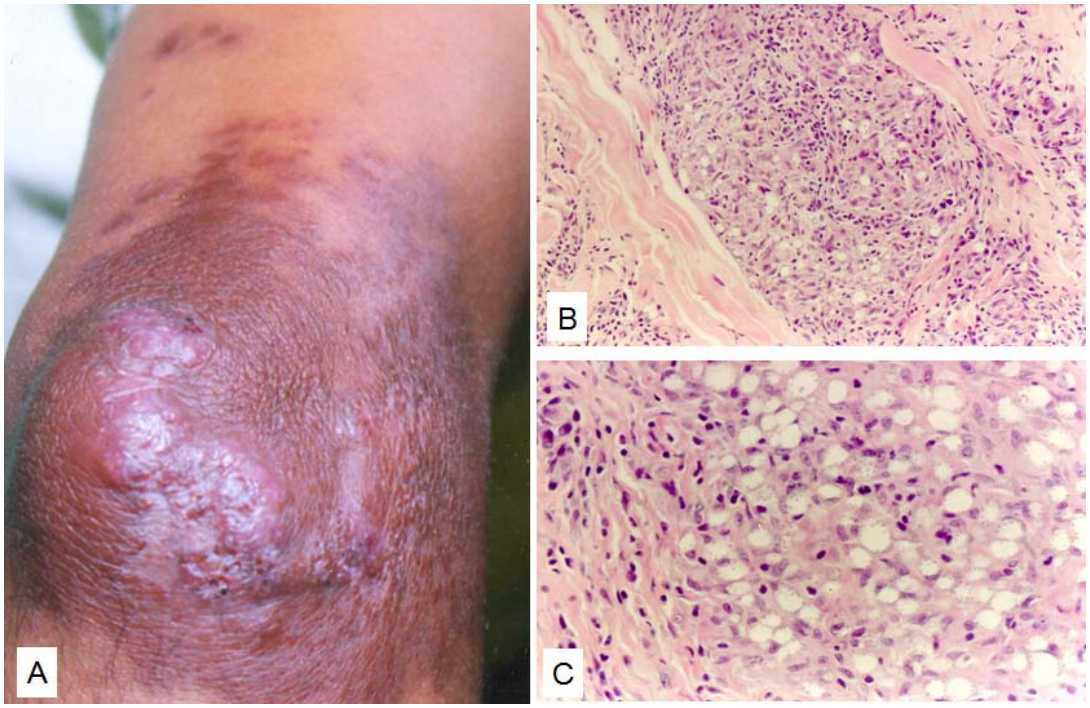
Figura 19 – Aspecto clínico (A) e característica histológica da lesão de pele (B e C) na leishmaniose cutânea anérgica difusa

3.1.1.4 *Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline*

Continuando a seqüência do espectro, caberia agora comentar os aspectos clínicos, histopatológicos e imunopatológicos da forma LCDB, a qual assume uma posição intermediária nesse leque de manifestações da leishmaniose tegumentar, entre a forma LCL e as formas polares LCM/LM e LCAD. Desse modo, a LCDB seria representada por casos de infecção disseminada cujo agente poderia ser a *L. (V.) braziliensis* ou outra espécie do subgênero *Viannia*, com potencial de evolução da infecção no sentido do pólo da hipersensibilidade celular (LCM/LM). Se causada pela *L. (L.) amazonensis* ou outra espécie do subgênero *Leishmania*, poderia evoluir no sentido oposto, para o pólo da hipossensibilidade celular (LCAD).

Os pacientes com LCDB apresentam lesões metastáticas entre um período que pode variar de 6 a 12 meses após a aparição da lesão primária; e se caracterizam macroscopicamente por aspecto eritematoso e placas infiltrativas (Figura 20A). A disseminação linfática é comum e os linfonodos apresentam-se

aumentados. A resposta de hipersensibilidade tardia é negativa antes do tratamento, ocorrendo sua conversão após terapia específica. Há bom prognóstico de cura após intervenção medicamentosa, diferente dos casos de LCAD. Os principais achados histopatológicos são infiltração de células mononucleares na derme, com o predomínio de macrófagos vacuolizados e parasitados, junto com a presença de linfócitos e plasmócitos (SILVEIRA et al., 2005) (Figura 20B e C). Há uma resposta imune celular preferencialmente de linfócitos T CD8+ em relação às células T CD4+ nas lesões (SILVEIRA et al., 2004).



Fonte: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira.

Figura 20 – Aspecto clínico (A) e característica histológica da lesão de pele (B e C) na leishmaniose cutânea disseminada borderline

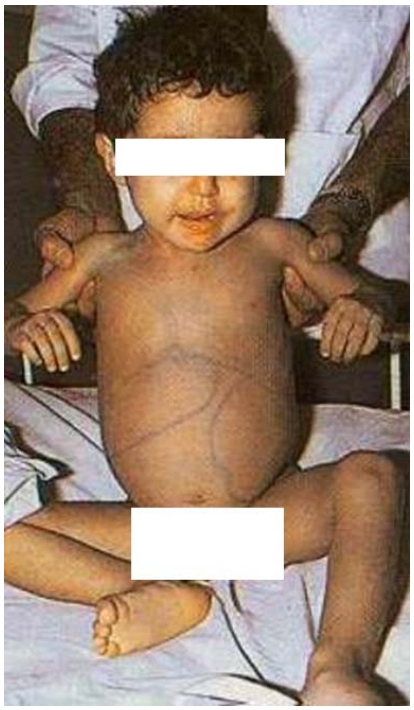
3.2 Leishmaniose Visceral Americana

A leishmaniose visceral é uma enfermidade infecciosa generalizada, crônica, classicamente caracterizada por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo levando à caquexia e, finalmente, ao óbito se o paciente não

for submetido ao tratamento específico. Atualmente se considera a leishmaniose visceral uma doença com formas clínicas diversas, podendo ocorrer desde casos de cura espontânea até manifestações clínicas severas. A leishmaniose visceral americana e a européia são consideradas zoonoses, enquanto na Índia ela é considerada uma antroponose.

3.2.1 Formas clínicas

A leishmaniose visceral humana pode assumir um caráter espectral, que determina diversas formas clínicas, variando de uma forma silenciosa assintomática, às formas sub-clínicas ou oligossintomáticas, agudas, até a forma clássica (BADARÓ et al., 1986). A **forma assintomática** é caracterizada por indivíduos sem história clínica aparente, mas com reação sorológica positiva e teste intradérmico de Montenegro freqüentemente reativo. Essa é a forma mais comum encontrada em áreas endêmicas. A **forma oligossintomática** ou subclínica é a forma mais freqüente da doença, caracterizada por uma sintomatologia inespecífica que se manifesta por febre baixa recorrente, tosse seca, diarréia, sudorese e prostração. Formas amastigotas do parasito podem ser encontradas principalmente em baço, linfonodo e órgãos hematopoiéticos. A **forma aguda** é semelhante à septicemia e caracterizada por diarréias, febre alta e tosse. Observam-se discretas alterações hematopoiéticas, discreta hepatoesplenomegalia e geralmente não ultrapassa dois meses de evolução. Pode ser confundida clinicamente com febre tifóide, malária, esquistossomose, doença de Chagas aguda, toxoplasmose aguda, histoplasmose entre outras. Os pacientes apresentam altos níveis de IgG anti-*Leishmania* e o parasitismo mais freqüente é o de baço e fígado. A **forma sintomática**, crônica ou clássica é uma forma de evolução prolongada da doença, com desnutrição protéico-calórica, presença de edema generalizado, abdome aumentado em função da hepatoesplenomegalia. O emagrecimento é progressivo e leva o paciente à caquexia acentuada. É comum a dispnéia, cefaléia, dores musculares, perturbações digestivas, epistaxes e evolução para o óbito. Uma vez que a leishmaniose visceral é uma doença de caráter debilitante e imunodepresssivo, infecções bacterianas secundárias são comuns e podem levar os pacientes ao óbito (Figura 21).



Fonte: Foto gentilmente cedida pela Dra. Mônica Elinor Alves Gama.

Figura 21 – Forma clínica clássica da leishmaniose visceral caracterizada por hepatoesplenomegalia

Em estudos transversais e longitudinais conduzidos no estado do Pará, pudemos caracterizar um espectro de manifestações clínicas em área endêmica de LVA (**Anexos 13, 14 e 15**). De acordo com a avaliação da imunidade celular e humoral, cinco perfis clínico-imunológicos foram identificados: **infecção assintomática**, caracterizada por forte resposta imune celular; **infecção sintomática**, caracterizada por forte resposta imune humoral; **infecção sub-clínica oligossintomática**, caracterizada por fraca resposta imune celular e forte humoral podendo evoluir para forma sintomática ou resistente; **infecção sub-clinica resistente**, caracterizada por forte resposta imune celular e moderada humoral podendo evoluir para a forma assintomática e a **infecção inicial indeterminada**, caracterizada por fraca resposta imune humoral podendo evoluir para o pólo de resistência ou suscetibilidade do espectro da infecção.

3.2.2 Patologia

A leishmaniose visceral caracteriza-se por acometimento progressivo do sistema fagocítico mononuclear (SFM), levando a sua hiperplasia, hipertrofia e parasitismo. Vale ressaltar a participação reativa do interstício dos diferentes órgãos, com modificação de seus componentes celulares, fibrilares e da matriz extracelular, além do infiltrado de células mononucleares. A reatividade do SFM e do interstício, ao lado da dilatação e congestão dos seios venosos, determina o aumento do volume e do peso dos órgãos atingidos.

3.2.2.1 *Fígado*

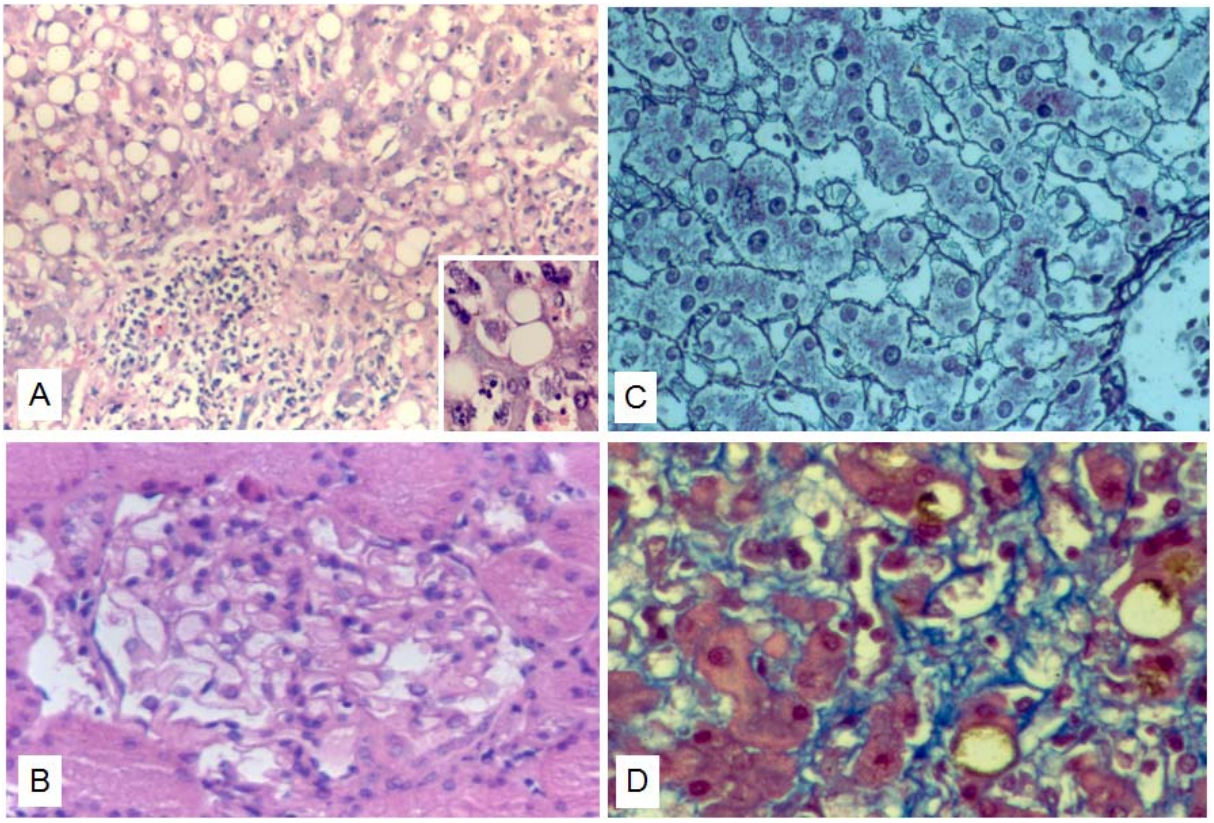
As alterações hepáticas podem ser definidas em padrões histopatológicos resultantes do tipo de resposta imune do hospedeiro frente à parasitose (DUARTE; CORBETT, 1987). O **padrão típico**, usualmente encontrado na doença plenamente manifesta, caracteriza-se por hipertrofia e hiperplasia acentuada das células de Kupffer, muitas delas densamente parasitadas, que ocupam a luz dos sinusóides. São observados também pequenos focos de infiltrado linfoplasmocitário intralobulares. Os espaços portais se encontram moderadamente expandidos por infiltrado de macrófagos, às vezes parasitados, plasmócitos e linfócitos, com preservação da placa limitante lobular. Os hepatócitos apresentam esteatose de intensidade variada, além de escassas alterações regenerativas ou necrose de células isoladas (Figura 22A).

Em modelo experimental, pudemos observar aspectos histopatológicos semelhantes ao padrão típico encontrado na doença humana em hamsteres inoculados intraperitonealmente com formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* (**Anexo 16**).

O **padrão nodular** caracteriza-se por acúmulo de macrófagos, plasmócitos e linfócitos, formando agregados nodulares distribuídos irregularmente nos lóbulos e espaços portais, em geral com pequeno número de amastigotas. As células de Kupffer exibem discreto grau de hiperplasia e hipertrofia, usualmente sem

parasitismo; e os espaços portais mostram infiltrado inflamatório mononuclear. Este tipo de acometimento parece representar uma resposta mais eficaz do hospedeiro frente à infecção, no sentido de controlar a infecção e evoluir para a cura, com ou sem o auxílio de terapêutica (Figura 22B). Alterações histopatológicas semelhantes ao padrão nodular encontrado na doença humana foram vistos por nós em hamster inoculados intraperitonealmente com formas amastigotas de *L. major*-like, uma cepa causadora de doença cutânea no Velho Mundo, porém isolada de fígado de cão no estado de Minas Gerais, aqui no Brasil (**Anexo 16**).

O **padrão fibrogênico** é reconhecido pelo aumento intralobular de fibras reticulínicas e/ou feixes de fibras colágenas no espaço perissinusoidal. As células de Kupffer mostram discreta hiperplasia e hipertrofia, com parasitismo ocasional. Ocorre também discreto infiltrado inflamatório mononuclear portal e intralobular, hiperplasia e hipertrofia das células de Ito e aumento significativo da matriz extracelular, não fibrilar, no espaço de Disse. A fibrogênese pode ocorrer em focos múltiplos, com intensidade variada. Ocasionalmente, ocorre neoformação conjuntiva intralobular difusa, sem fibrose portal ou nódulos regenerativos, caracterizando a fibrose de Rogers. Os pacientes apresentam hipertensão portal e insuficiência hepática. Após o tratamento específico, pode ocorrer total regressão da fibrose intralobular difusa (CORBETT et al., 1993) (Figura 22C e D).

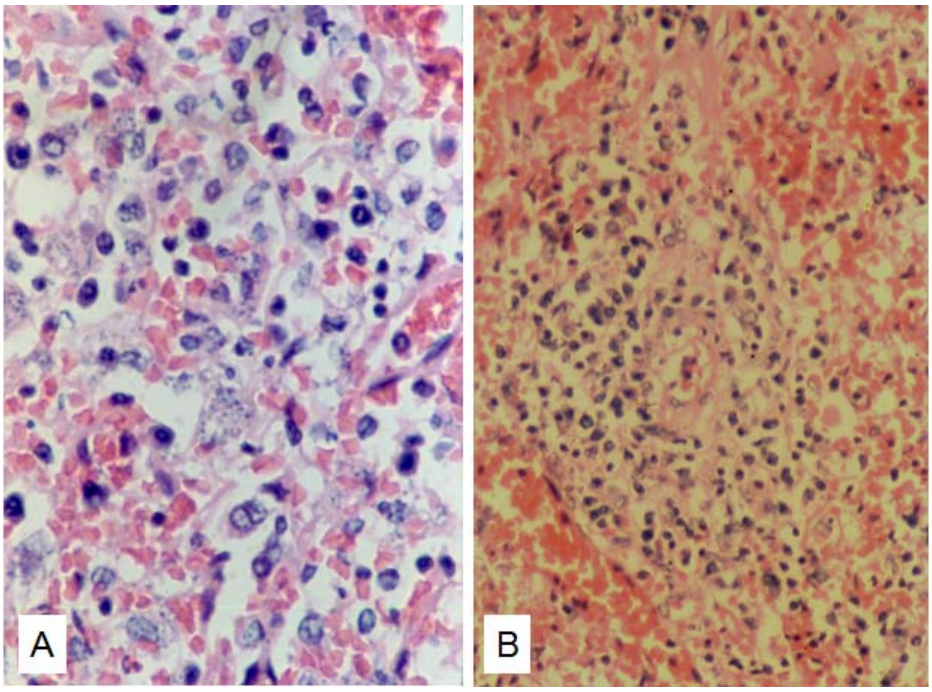


Fonte: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett.

Figura 22 – Lesões hepáticas na leishmaniose visceral. (A) Padrão clássico, (B) padrão nodular e (C e D) padrão fibrogênico

3.2.2.2 *Baço*

A leishmaniose visceral causa grande esplenomegalia, e o baço freqüentemente chega à fossa ilíaca. Microscopicamente, à semelhança do que ocorre na doença humana, pudemos observar em hamsters inoculados intraperitonealmente com formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* que os aspectos mais evidentes são a hiperplasia e hipertrofia do SFM com intenso parasitismo. As células mononucleares parasitadas são abundantes na polpa vermelha e formam grandes agrupamentos, tornando a estrutura sinusoidal pouco evidente (Figura 23A). A polpa branca apresenta diminuição da densidade celular, particularmente nas áreas T dependentes, redução dos linfócitos e polimorfismo celular. Isto resulta na diminuição seletiva de linfócitos T e aparecimento de plasmócitos e macrófagos, que podem estar parasitados (**Anexos 16 e 22**) (Figura 23B).

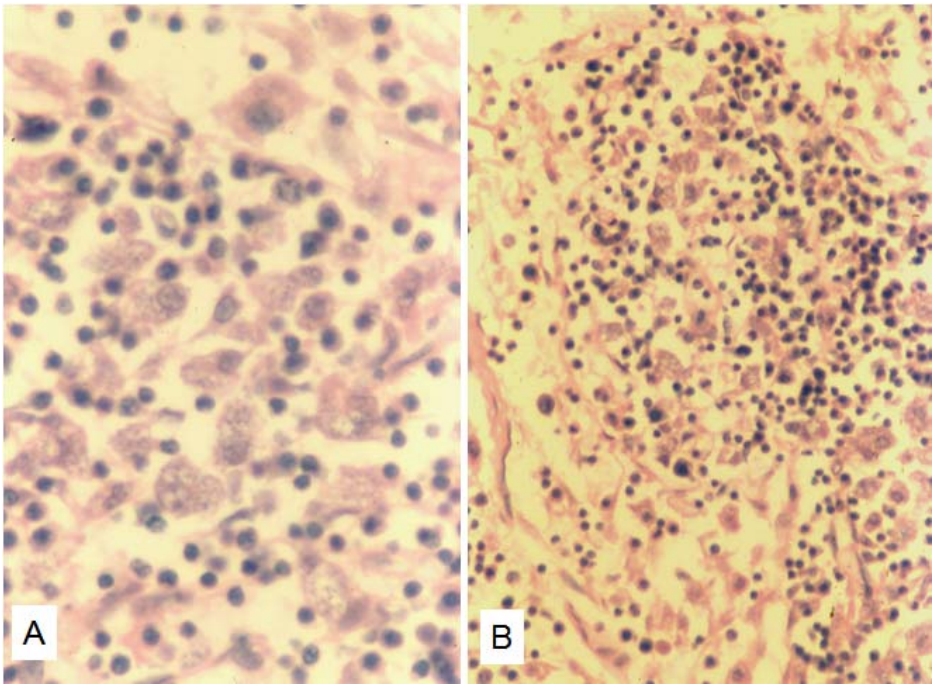


Fonte: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett

Figura 23 – Histopatologia do baço na leishmaniose visceral. (A) Polpa vermelha e (B) polpa branca

3.2.2.3 *Linfonodo*

Os linfonodos encontram-se aumentados de volume e mostram proliferação e parasitismo das células do SFM (Figura 24A). Em modelos experimentais, à semelhança da doença humana, pudemos observar que os folículos linfóides exibem atividade dos centros germinativos ou aumento da celularidade perifolicular, enquanto a área paracortical apresenta depleção linfocitária (**Anexo 22**) (Figura 24B). Esta dinâmica de proliferação folicular e diferenciação de linfócitos em plasmócitos pode explicar a hipergamaglobulinemia que os pacientes apresentam principalmente na forma clássica da doença.



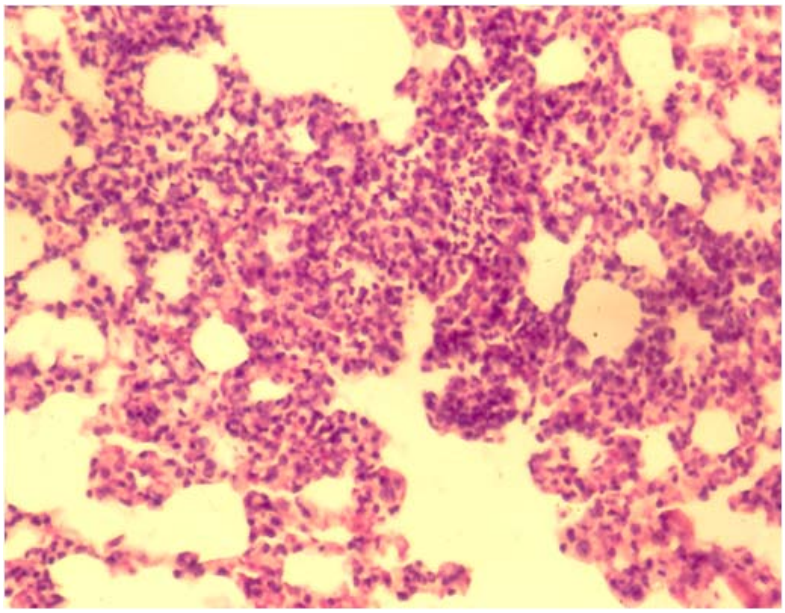
Fonte: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett

Figura 24 – Microscopia do linfonodo na leishmaniose visceral. (A) Hiperplasia e hipertrofia do SFM com parasitismo e (B) depleção linfocitária

3.2.2.4 *Pulmão*

Relatos clínicos caracterizam um tipo de tosse seca, persistente, que surge no início da infecção, e permanece inalterada durante o período de estado da doença, desaparecendo com a cura. Isto foi atribuído à pneumonite intersticial. A histopatologia mostra espessamento dos septos intralveolares por macrófagos, plasmócitos e linfócitos, sendo evidentes células intersticiais septais com inclusões lipídicas (Figura 25). O infiltrado inflamatório não tem preferência por qualquer área do parênquima, sendo irregularmente distribuído e de intensidade variada. Podem ocorrer focos de fibrose septal fina com distribuição irregular. Parasitos íntegros ou degenerados são visualizados em todos os casos com pneumonite intersticial (**Anexo 23**). Estes aspectos da pneumonite intersticial também foram caracterizados por nós em cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* (**Anexos 24 e 25**). É necessário ressaltar que as broncopneumonias bacterianas constituem as infecções secundárias mais freqüentes nos pacientes com LV. A preferência de infecção nos

pulmões em relação aos outros órgãos poderia ser explicada pelas alterações na dinâmica respiratória em virtude da pneumonia intersticial leishmaniótica.



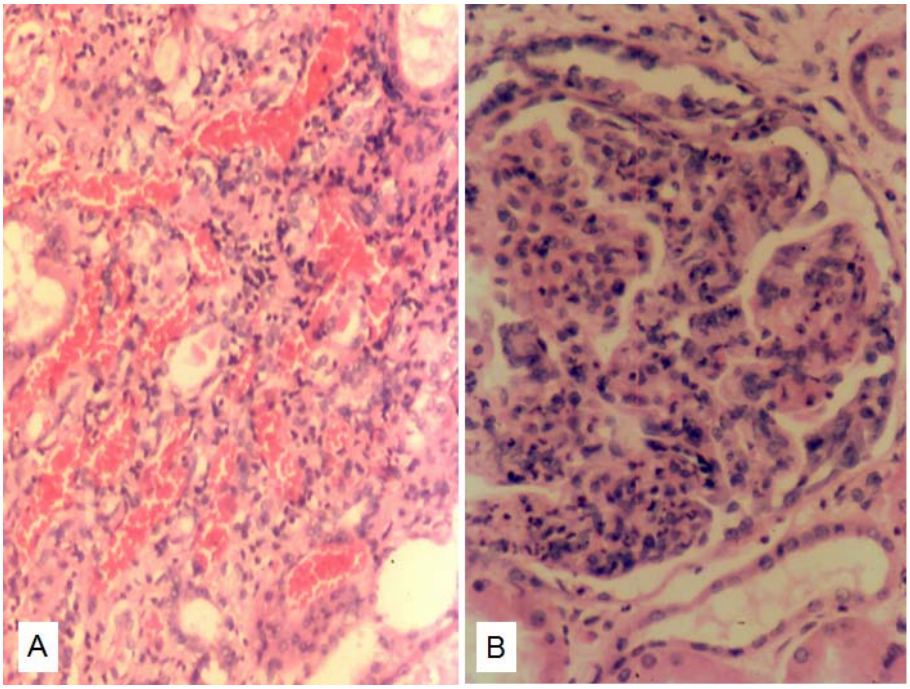
Fonte: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett

Figura 25 – Lesão pulmonar na leishmaniose visceral caracterizada por espessamento do septo por células inflamatórias

3.2.2.5 *Rim*

Microscopicamente, nefrite intersticial é encontrada praticamente em todos os casos que evoluem para óbito. A cortical é a região mais acometida, sendo que a intensidade do processo varia entre os graus discreto, moderado e intenso. No interstício encontra-se edema e infiltrado inflamatório com plasmócitos, linfócitos e macrófagos, preferencialmente em torno de pequenos vasos, não sendo observadas vasculite nem agressão da membrana basal tubular ou do epitélio tubular (Figura 26A). O encontro de formas amastigotas é raro. Nos glomérulos, ocorre hiperplasia e hipertrofia das células do mesângio e da matriz mesangial, sem comprometimento importante da membrana basal glomerular (DUARTE, et al., 1983) (Figura 26B). Há deposição de imunocomplexos circulantes no mesângio. Nós pudemos observar que em cães, além das alterações acima descritas, pode ocorrer amiloidose glomerular extensa e grave por exaustão do SFM em virtude da estimulação antigênica

constante e prolongada, porém, no homem é raramente encontrada (dados não publicados).



Fonte: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett.

Figura 26 – (A) Nefrite intersticial e (B) proliferação de células mesangiais glomerulares na leishmaniose visceral

3.2.2.6 *Medula óssea e alterações hematológicas*

O mielograma apresenta geralmente hipocelularidade granulocítica e bloqueio de promielócitos na série neutrofílica, portanto, há leucopenia e neutropenia. Ocorre hipercelularidade macrofágica com alto parasitismo. Também há plasmocitose, mas é evidente a escassez ou ausência de eosinófilos. A série vermelha apresenta hipocelularidade relativa em relação à granulocítica, com predominância microeritroblástica. A anemia é devida a bloqueio de produção na medula óssea, seqüestro esplênico e hemólise por mecanismo imune. A série megacariocítica é normo ou hipocelular, mas hipoplaquetogênica. A trombocitopenia, geralmente moderada, é a causa de hemorragias e é atribuída à diminuição de maturação medular e destruição periférica. Hipoalbuminemia é freqüente e decorre do aumento do catabolismo protéico, fatores nutricionais e comprometimento de jejuno com

perda entérica de albumina. Hipergamaglobulinemia está sempre presente, é elevada e decorre da ativação policlonal de linfócitos B.

4 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES

O diagnóstico das leishmanioses deve levar em conta os aspectos clínicos, os dados epidemiológicos e, em especial, os exames laboratoriais.

O diagnóstico clínico da LTA pode ser feito com base nas características da lesão, devendo-se excluir outras dermatoses granulomatosas que apresentam lesões semelhantes, tais como tuberculose cutânea, hanseníase, blastomicose, esporotricose, úlcera tropical e neoplasias.

O diagnóstico clínico da LVA pode ser feito com base em indicações como, febre baixa e recorrente, envolvimento linfático, hepatomegalia e esplenomegalia, combinados com história de residência ou passagem por áreas endêmicas. O quadro clínico da LVA pode ser confundido com outras enfermidades, entre elas: malária, toxoplasmose, leucemia, esquistossomose e brucelose. Com base na freqüência com que ocorre a inversão na relação albumina/globulina na LVA, a eletroforese sérica torna-se instrumento auxiliar, sendo útil até para o acompanhamento terapêutico. Também o hemograma pode representar um método auxiliar no diagnóstico da LVA, uma vez que pacientes com a doença plenamente manifesta podem apresentar pancitopenia (GENARO, 2002).

4.1 Diagnóstico Laboratorial

4.1.1 Pesquisa do parasito

O diagnóstico parasitológico baseia-se no encontro do parasito em tecido cutâneo no caso da LTA e principalmente em medula óssea no caso da LVA. Esfregaços ou *imprint* do material colhido podem ser corados diretamente por

corantes hematológicos e observados em microscópio óptico. O material colhido pode também ser semeado em meios de cultivo apropriados como o NNN ou isolado em animal experimental. Cortes histológicos de biópsias corados por HE e pela técnica de imunoistoquímica podem também ser empregados para o diagnóstico etiológico. Recentemente a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que detecta DNA do parasito, tem sido utilizada com alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006 e 2007).

Nós avaliamos a eficácia de métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares empregados no diagnóstico parasitológico de cães de área endêmica de leishmaniose visceral com e sem sintomatologia da doença (**Anexo 26**). Através da análise histopatológica de baço, fígado, linfonodo e medula óssea, concluímos que o linfonodo foi o órgão que apresentou maior sensibilidade para o diagnóstico parasitológico, sendo que a utilização da reação de imunoistoquímica com o emprego de anticorpo anti-*Leishmania* aumentou sua sensibilidade (Figura 27). De acordo com estes resultados, diferentes metodologias foram aplicadas em punção aspirativa de linfonodo poplíteo para o diagnóstico parasitológico, entre elas: o exame direto corado pelo Panótico, a reação de imunofluorescência direta, a reação de imunocitoquímica e a PCR. A pesquisa direta de parasitos mostrou boa correlação com a reação de imunofluorescência direta e apresentou maior sensibilidade para o diagnóstico de cães sintomáticos, provavelmente devido ao grande número de parasitos presentes nestes animais, os quais mostram uma supressão na resposta imunológica e doença plenamente manifesta. O aumento na sensibilidade do diagnóstico parasitológico com a utilização da reação de imunocitoquímica foi comprovado por 100% de sensibilidade no grupo de animais assintomáticos, mostrando a importância da utilização de técnicas de imunomarcação quando a infecção ainda está em fase inicial ou quando a imunidade do hospedeiro está favorecendo o controle do parasitismo. Já a PCR, mostrou-se muito sensível para o diagnóstico parasitológico tanto da forma sintomática, como da oligossintomática e assintomática, confirmando a alta sensibilidade deste método.

Vale ressaltar que a reação de imunofluorescência direta, empregando anticorpo anti-*Leishmania* conjugado com fluoresceína, mostrou-se eficiente para confirmação diagnóstica de cães de área endêmica de leishmaniose visceral com suspeita da doença (**Anexo 27**). Dos 60 cães com suspeita clinica de leishmaniose

visceral, 30 foram confirmados pelo exame direto em esfregaço de punção aspirativa de linfonodo corado pelo Romanowsky. Nós observamos que a utilização da reação de imunofluorescência direta aumentou a sensibilidade no diagnóstico parasitológico mostrando uma positividade de 93,3% (56 casos), não só no material suspeito como em casos anteriormente considerados negativos.

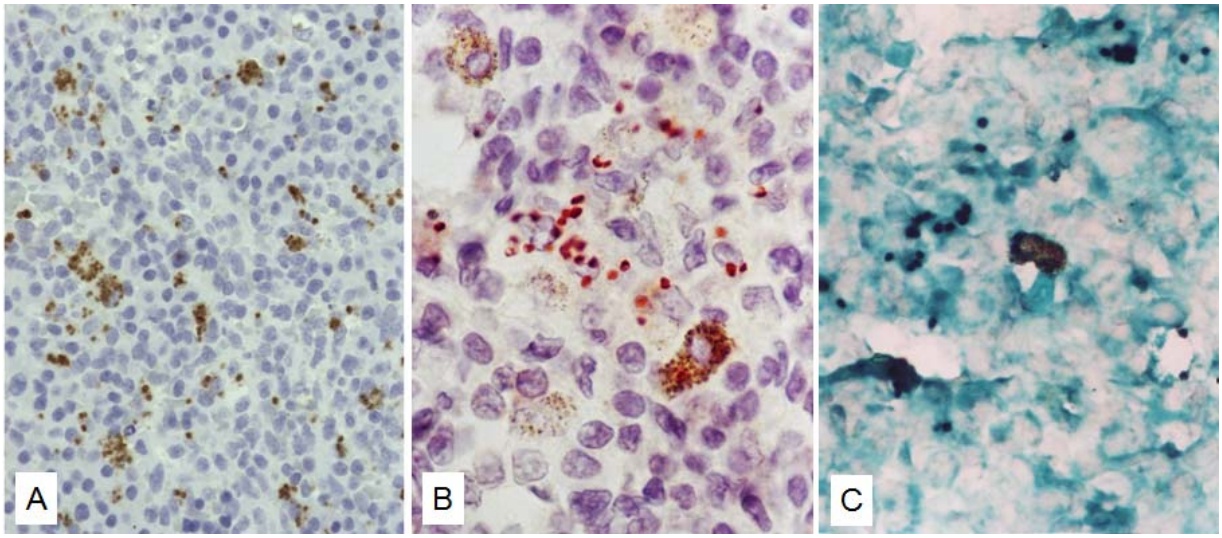


Figura 27 – Reação de imunoistoquímica mostrando formas amastigotas de *Leishmania* em corte histológico de linfonodo de cão com leishmaniose canina, revelados com diaminobenzidina – DAB (A), amino-ethil-carbasol - AEC (B) e DAB com níquel (C)

4.1.2 Avaliação da imunidade celular

O teste intradérmico de Montenegro que avalia a resposta de hipersensibilidade tardia frente ao antígeno de *Leishmania* é muito empregado para avaliação do *status* imunológico dos indivíduos com LTA e também para fins diagnósticos. De maneira geral, o teste é positivo nos casos de leishmaniose cutânea localizada e fortemente positivo nos casos de mucocutânea ou mucosa. Já na forma cutânea anérgica difusa, assim com na leishmaniose visceral ativa ele costuma ser negativo. Vários antígenos podem ser empregados, porém antígeno preparado com formas promastigotas mortas foi padronizado e oferece melhores resultados. O teste consiste no inóculo de 0,1ml do antígeno, por via intradérmica, na face interna do braço. No caso de reações positivas, verifica-se o

estabelecimento de uma reação inflamatória local que forma um nódulo ou pápula com diâmetro igual ou maior a 5 mm em 48 a 72 horas, regredindo posteriormente.

4.1.3 Avaliação da imunidade humoral

As reações sorológicas são muito empregadas tanto no diagnóstico como nos inquéritos populacionais humanos e caninos. Os métodos mais utilizados para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania* são: a reação de **imunofluorescência indireta** (RIFI) e o **ensaio imunoenzimático** ELISA. Importante ser lembrado que nos métodos sorológicos podem ocorrer reações cruzadas com outras enfermidades, principalmente aquelas causadas por outros tripanosomatídeos. Assim, a confirmação da infecção deveria ser feita por métodos parasitológicos. Na LVA a imunocromatografia que utiliza o antígeno recombinante rK39, conhecido comercialmente como TraLd, tem sido bastante empregada pela fácil utilização em campo; além de tratar-se de um método sensível, específico e de rápida execução.

Nós tivemos a oportunidade de avaliar o desempenho do antígeno rK39 no formato de imunocromatografia (TraLd) em cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos com diagnóstico parasitológico positivo e comparamos estes resultados com aqueles obtidos no ELISA empregando antígeno bruto (**Anexo 28**). A sensibilidade do rK39 foi de 83% enquanto a sensibilidade para o antígeno bruto foi de 95%, e a especificidade de ambos foi de 100%. Embora com sensibilidade inferior ao antígeno bruto, estes resultados mostram que o TraLd foi eficiente para o diagnóstico de cães oligossintomáticos e assintomáticos, podendo ser empregado com sucesso em áreas endêmicas, o que proporcionaria um rápido diagnóstico e eliminação do cão infectado, o que colaboraria de maneira bastante eficiente para o programa de controle da LVA no nosso país.

O programa de controle da leishmaniose visceral em nosso país a cargo do Ministério da Saúde utiliza kits fornecidos por BioManguinhos para a realização do ELISA e RIFI. Porém, estes kits empregam formas promastigotas de *Leishmania major*-like como antígenos e desta forma acabam produzindo resultados falso-positivos e negativos. Em recente estudo, comparamos a técnica de RIFI-

Biomanguinhos com a RIFI empregando antígeno específico de *L. (L.) chagasi*. Ao analisarmos diferentes diluições de soros e eluatos de papel de filtro e considerando diferentes intensidades de reação positiva em análise TG-ROC, nós pudemos estimar linhas de cortes (*cut off*) mais adequadas para o teste de RIFI-Biomanguinhos em material de cão oriundo de área endêmica para evitar resultados falso-positivos e/ou negativos, implementando, desta forma, a utilização deste kit (**Anexo 29**).

A correlação entre o diagnóstico sorológico e o diagnóstico parasitológico foi revisada por mim em 2009 (**Anexo 30**). Apesar da reatividade cruzada encontrada por muitos autores no diagnóstico sorológico das leishmanioses, nós mostramos uma boa correlação entre o diagnóstico sorológico, empregando-se o ELISA com antígeno bruto, e o parasitológico em cães de área endêmica de leishmaniose visceral (**Anexo 26**). Entretanto, mesmo com boa correlação entre estes dois métodos, o diagnóstico parasitológico deve ser considerado como o padrão ouro no diagnóstico das leishmanioses, tanto na doença humana, antes da instalação do tratamento específico, como na doença canina, antes de indicação da eliminação do animal.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese tentei abranger, de maneira sucinta, aspectos da patogenia e patologia das leishmanioses, com dados publicados na literatura, assim como obtidos em nossas pesquisas. A discussão detalhada de cada tópico pode ser encontrada nos diferentes anexos. Sendo assim, nas considerações finais gostaria de traçar um pequeno panorama da doença e expor alguns pontos de vista sobre a complexa relação hospedeiro-parasito-vetor nas leishmanioses.

Os parasitos do gênero *Leishmania* originaram-se em épocas bastante remotas, sendo os répteis os seus primeiros hospedeiros vertebrados com adaptação posterior aos mamíferos silvestres.

A doença tegumentar humana foi retratada nas Américas, no século I DC, em vasos cerâmicos pré-Incas na região do Peru e Equador que mostravam representações de lesões de pele e deformidades faciais. Nesse mesmo período,

também foram encontradas descrições sobre a ocorrência da doença na Ásia Central. Essa antiga relação parasito-hospedeiro resultou em uma grande adaptação, vista pelos casos assintomáticos, sempre em maior número nas regiões endêmicas, assim como por parte do parasito que usa mecanismos de defesa do hospedeiro em seu próprio beneficio.

As formas promastigotas assim que são depositadas na pele do hospedeiro vertebrado devem encontrar sua célula hospedeira definitiva, o macrófago; para que consigam sobreviver e se multiplicar. Elementos da resposta imune inata auxiliam a entrada dos parasitos na célula hospedeira, uma vez que proteínas do sistema complemento opsonizam as leishmânias facilitando sua fagocitose e sobrevivência no interior dessas células. Além disso, os neutrófilos que até pouco tempo foram consideradas células capazes de fagocitar e destruir os parasitos, hoje se mostram como elemento importante no escape do protozoário permitindo a sua entrada silenciosa no macrófago. Além disso, moléculas encontradas na superfície do parasito são capazes de inibir a ação lítica do sistema complemento, impedindo a lise extracelular do protozoário; como também podem auxiliar a sua sobrevivência dentro do vacúolo parasitóforo, cujo ambiente é extremamente ácido.

A polarização da resposta imune celular adaptativa descrita no modelo experimental de roedores infectados por *Leishmania major* não é observada quando outra espécie de parasito é utilizada e tampouco na doença humana e canina; onde, na maior parte dos casos, uma resposta imune celular mista e regulatória predomina, ambas benéficas a sobrevivência do parasito.

Outro elemento digno de atenção é a saliva do inseto vetor que faz parte integrante do conteúdo injetado pelo flebotomíneo na pele do hospedeiro vertebrado no processo de transmissão do parasito e que mostra ter um papel importante na facilitação do estabelecimento da infecção.

A complexidade da relação hospedeiro-parasito-vetor, onde diferentes espécies de *Leishmania* são transmitidas por diferentes espécies vetoras para diferentes hospedeiros reservatórios em diferentes ecossistemas, podem determinar um amplo espectro de manifestações clinicas, imunológicas e histopatológicas no homem, dificultando, entre outros, o diagnóstico diferencial com outras patologias com sintomatologia e sinais clínicos semelhantes. Esta complexidade dificulta também a implantação das medidas de controle da doença que estão baseadas, principalmente, na eliminação de reservatórios infectados, controle vetorial e

tratamento específico e precoce da doença humana. Como conseqüência, dados oficiais mostram que as leishmanioses se encontram em franco processo de expansão por todo o território nacional como também de urbanização, fato agravante principalmente em relação à leishmaniose visceral, hoje já encontrada em grandes centros.

Dessa forma, estudos que contribuam para a melhor compreensão dos mecanismos patogenéticos e imunológicos das infecções causadas por parasitos do gênero *Leishmania* devem ser continuados para que os conhecimentos gerados possam contribuir, de forma direta ou indireta, para o avanço no diagnóstico clínico e laboratorial, no tratamento e no desenvolvimento de vacinas no sentido de poderem minimizar, em conjunto, o quadro bastante alarmante visto hoje no mundo, onde cerca de 12 milhões de pessoas encontram-se infectadas nos 88 países onde ocorre transmissão do parasito e mais de 350 milhões de indivíduos estão sob risco de contrair a infecção.

REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; CUPOLILO, S. M.; CARDOSO, F. O.; SOUZA, C. S.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 179-187, 2004.

ALEXANDER, J.; RUSSEL, D. G. The interaction of Leishmania species with macrophages. **Advances in Parasitology**, v. 31, p. 175-254, 1992.

ALEXANDER, J.; VICKERMAN, K. Fusion of host-cell secondary lysosomes with parasitophorus vacuoles of *Leishmania mexicana* - infected macrophages. **Journal Parasitology,** v. 22, p. 502-508, 1975.

ANJILI, C. O.; MBATI, P. A.; MWANGI, R. W.; GITHURE, J. I.; OLOBO, J. O.; ROBERT, L. L.; KOECH, D. K. The Chemotatic effect of Phlebotomus duboscqi (Diptera: Psychodidae) salivary gland Lysates to murine monocytes. **Acta Tropica**, v. 60, p. 97-100, 1995.

ANTOINE, J. G.; PRINA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. Parasitophorus vacuoles of *Leishmania amazonensis* - infected macrophages maintain an acid pH. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 779-787, 1990.

BADARÓ, R.; JONES. T. C.; LORENÇO, R. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, p. 639-649, 1986.

BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A.; COSTA, J.; VINHAS, V.; ROWTON, E. D.; VALENZUELA, J. G.; CHARLAB, R.; BARRAL-NETO, M.; RIBEIRO, J. M. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, p. 740-745, 2000.

BARRAL-NETO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Human-leishmaniasis@cytokines.bahia.br. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 149-155, 1998.

BELKAID Y.; KAMHAWI, S.; MODI, G.; VALENZUELA, J.; NOBEN- TRAUTH, N.; ROWTON, E.; RIBEIRO, J.; SACKS, D. L. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis : Powerful effects of a vector salivar and saliva preexposure on the long-term outcome of Leishmania major infection in the mouse ear dermis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 1941-1953, 1998.

BERMAN, J. D.; DWYER, D. M. Expression of *Leishmania* antigen surface membrane of infected human macrophage *in vitro*. **International Experimental Immunology**, v. 44, p. 342-348, 1981.

BEZERRA, H. S.; TEIXEIRA, M. J. Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 96, p. 349-51, 2001.

BLANK, C.; BOGADAN, C.; BAUER, C.; ERB, K.; M.; MOLL, H. Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase. European **Journal of Immunology,** v. 26, p. 792-796, 1996.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasión. International Journal of Parasitology, v. 28, p. 121-134, 1998.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. **Parasitology Today**, v. 14, p. 171-183, 1990.

BRODSKYN, C.; de OLIVEIRA, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. **Expert Review of Vaccines**. v. 2, p. 705-717, 2003.

CÂMARA, P. R.; ESQUISATTO, L. C.; CAMARGO, E. A.; RIBELA, M. T.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NUCCI, G. de; ANTUNES, E. Inflammatory oedema induced by phospholipases A2 isolated from *Crotalus durissus* sp. In the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. **Toxicon**, v. 41, p. 823-829, 2003.

CORBETT, C. E. P.; DUARTE, M. I. S.; BUSTAMANTE, S. E. Regression of diffuse intralobular liver fibrosis associated with visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, p. 616-624, 1993.

CHANG, K. P. Antibody-mediated inhibition of phagocytosis in *Leishmania donovani*-human phagocyte interactions *in vitro*. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 30, p. 334- 339, 1981.

CHANNOAN, J. Y.; BLACKWELL, J. M. A study of sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes to hydrogen peroxide. II. Possible mechanism involved in protective H_2O_2 scavenging. **Parasitology**, v. 91, p. 207- 217, 1985.

DUARTE, M. I. S.; CORBETT, C. E. Histopathology pattems of the liver involvement in visceral leishmamasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 29, p. 131-136, 1987.

DUARTE, M. I. S.; SILVA, M. R. R.; GOTO, H.; NICODEMO, E. L.; AMATO NETO, V. Interstitial nephritis in human kala-azar. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 531-537, 1983.

FRANKE, E. D.; MCGREVY, P. B.; KATZ, S. P.; SACKS, D. L. Growth cycle dependent generation of complement resistant Leishmania promastigotes. **Journal of Immunology**, v. 134, p. 2713- 2718, 1985.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar America / Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. P. (Ed.). **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 36-72.

GOMES, C. M. C.; GOTO, H.; CORBETT, C. E. P.; GIDLUND, M. Insulin-like growth factor (IGF)-I is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes. **Acta Tropica**, v. 64, p. 225-228, 1997.

GOMES, C. M. C.; MONTEIRO, H. P.; GIDLUND, M.; CORBETT, C. E. P.; GOTO, H. (1998) Insulin-like growth factor (IGF)-I induces phosphorylation in Leishmania (Leishmania) mexicana promastigotes and amastigotes. Journal **of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, p. 352-355, 1998.

GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; TEIXEIRA, M. J.; OLIVEIRA, F.; MENEZES, M. J.; SILVA, C.; OLIVEIRA, C. I. de; MIRANDA, J. C.; ELNAIEM, D.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G.; BRODSKYN, C. I. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 105, p. 7845-7850, 2008.

GOMES, R. B.; BRODSKYN, C.; OLIVEIRA, C. I. de; COSTYA, J.; MIRANDA, J. C.; CALDAS, A.; VALENZUELA, J. G.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. **Journal Infectious Diseases**, v. 86, p. 1530-1534, 2002.

GOTO, H.; GOMES, C. M. C.; CORBETT, C. E. P.; MONTEIRO, H. P.; GIDLUND, M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for Leishmania promastigotes and amastigotes. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America,** v. 95, p. 13211-13216, 1998.

HALL, L. R.; TITUS, R. G. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production**. The Journal of Immunology**, v. 155, p. 3501- 3506, 1995.

HERMOSO, T.; FISHELSON, Z.; BECKER, S. I.; HIRSCHBERG, K.; JAFFE, C. L. Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. **The EMBO Journal**, v. 10, p. 4061- 4067, 1991.

HOLADAY, B. J.; POMPEU, M. M.; EVANS, T.; BRAGA, D. N.; TEXEIRA, M. J.; SOUZA ADE, Q.; SADICK, M. D.; VASCONCELOS, A. W.; ABRAMS, J. S.; PEARSON, R. D. Correlates of *Leishmania*-specific immunity in the clinical spectrum of infection with *Leishmania chagasi*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 411-417, 1993.

HOWARD, M. K.; SAYERS, G.; MILLES, M. A. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation in vitro, lectin agglutination, complement resistence and infectivity. **Experimental Parasitology**, v. 64, p. 147- 156, 1987.

JERONIMO, S. M.; TEIXEIRA, M. J.; SOUSA, A.; THIELKING, P.; PEARSON, R. D.; EVANS, T. G. Natural history of Leishmaia (Leishmania) chagasi infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 608-609, 2000.

JONES, J. I.; CLEMMONS, R. D. Insuin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Review**, v. 16, p. 3-34, 1995.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. protection against cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, v. 290, p. 1351- 1354, 2000.

KAPLAN, D. H.; JENISON, M. C.; SAELAND, S.; SHLOMCHIK, W. D.; SHLOMCHIK, M. J. Epidermal Langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. **Immunity,** v. 23, p. 611-620, 2005.

KRATZ, G.; LAKE, M.; GIDLUND, M. Insulin like growth factor-1 and -2 and their role in the re-epithelisation of wounds; interactions with insulin like growth factor binding protein type 1. **Scandinavian Journal of Plastic Reconstructive Surgery and Hand Surgery,** v. 28, p. 107-112, 2004.

LAINSON, R. The American leishmaniases: some observations on their ecology and epidemiology. Review. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 569-596, 1983.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine.** London: Academic Press Inc., 1987. v.1, p.1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: COX, F. E. G.; KREIER, J. P.; WAKELIN, D. (Ed.). **Topley & Wilson microbiology and microbial infections**. 9. ed. Arnold: Hodder Headline, PLC, 1989. v. 5, p. 241- 266.

LASKAY, T.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Natural Killer cells participate in the early defense against Leishmania major in mice. **Europian Journal of Immunology**, v. 23, p. 2237-2241, 1993.

LERNER, E. A.; SHOEMARK, C. B. Maxadilan, cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 26, p. 1062-1066, 1992.

LIEW, F. Y.; MILLOT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M. J. Macrophage killing of *Leishmania* parasites in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, v. 144, p. 4794, 1990.

LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; FRANKHAUSER, J. E.; NELSON, C. S.; SADICK, M. D. Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. **Infection and Immunity,** v. 56, p. 336- 342, 1988.

MAIOLI, T. U.; TAKANE, E.; ARANTES, R. M.; FIETTO, J. L.; AFONSO, L. C. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. **Parasitology Research**, v. 94, p. 207-212, 2004.

MBOW, M. L.; BLEYENDENBERG, J. A.; HALL, L. R.; TITUS, R. G. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate dwn-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. **Journal of Immunology**, v. 161, p. 5571- 5577, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília – DF, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2ª ed. Brasília – DF, 2007.

MOLL, H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. **Immunology Today,** v. 14, p. 383-7, 1993.

MOLL, H.; FLOHÉ, S.; RÖLLINGHOFF, M. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antingen-specific T-cell immune response. **European Journal of Immunology,** v. 25, p. 693-699, 1995.

MOSMANN, T.; CHERWINSKY, H.; BOND, M. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 2348- 2357, 1986.

MOSSER, D. M.; BURKE, S. K.; CONTAVAS, E. E.; WEDGWOOD, J. F.; EDELSON, P. J. *Leishmania* species: mechanisms of the complement activation by five strains of promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 62, p. 394- 404, 1986.

MURRAY, H. W. Susceptibility of Leishmania to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. **Journal Experimental Medicine**, v. 153, p. 1302- 1315, 1981.

NORSWORTHY, N. B.; SUN, J.; ELNAIEM, D.; LANZARO, G.; SOONG, L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 1240-1247, 2004.

OLIVEIRA, F.; LAWYER, P. G.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases,** v. 2, n. 4, p. 1-9, 2008. e226.

PARANHOS-SILVA, M.; OLIVEIRA, G. G.; REIS, E. A.; MENEZES, R. M. de; FERNANDES, O.; SHERLOCK, I.; GOMES, R. B.; PONTES de CARVALHO, L. C.; SANTOS, W. L. dos. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 97-111, 2003.

PEARSON, D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of human serum upon *Leishmania donovani.* **Journal of Immunology**, v. 125, p. 2195-2201, 1981.

PEARSON, R. D.; MARCUS, J. L.; ROBERTS, D.; DONOVITZ, G. R. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. **Journal of Immunology**, v. 131, p. 1994-1999, 1983.

PEARSON, R. D.; MARCUS, J. L.; SYMES, P. H.; ROMITO, R.; DONOVITZ, G. R. Failure of the phagocytic oxidative response to protect human monocyte-derived macrophages from infection by *Leishmania donovani.* **Journal of Immunology**, v. 129, p. 1282-1286, 1982.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Disease,** v. 22, p. 1-13, 1996.

PEARSON, R. D.; UYDESM, I. L.; CAMPMAN, S. W. Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani.* **American Journal Tropical Medicine Parasitology**, v. 81, p. 735- 739, 1987.

PUENTES, S. M.; DWYER, D. M.; BATES, P. A.; JOINER, K. A. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. **Journal of Immunology**, v. 143, p. 3743- 3749, 1989.

QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. Enhanced replication of Leishmania amazonensis amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for thepathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 988-995, 2004

QURESHI, A. A.; ASAHINA, A.; OHNUMA, M.; TAJIMA, M.; GRANSTEIN, R. D.; LERNER, E. A. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sannd fly salivary gland extracts. **Americal Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, p. 665- 671, 1996.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major.* **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 151- 177, 1995.

RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; LESSA, H.; BACCELAR, O.; CARVALHO, E. M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 31, p. 143-148, 1998.

RIBEIRO, J. M.; KARTZ, O.; PANNEL, L. K.; WAITUMBI, J.; WARBURG, A.; Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacological active amounts of adenosine and 5'-AMP. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 1551-1559, 1999.

RITTER, U.; MEISSNER, A.; SCHEIDING, C.; KÖRNER, H. CD8a- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 34, p. 1542-1550, 2004.

RITTER, U.; OSTERLOH, A. A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.,** v. 196, p. 51-59, 2007.

RITTING, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities an alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, p. 292-297, 2000.

ROCHA, F. J.; SCHLEICHER, U.; MATTENER, J.; ALBER, G.; BOGDAN, C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 3823-3832, 2007.

ROGERS, K. A.; DE KREY, G. K.; MBOW, M. L.; GILLESPIRE, R. D.; BRODSKYN, C. I.; TITUS, R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **Microbiology Letters,** v. 209, p. 1- 7, 2002.

ROGERS, K. A.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite Immunology**, v. 25, p. 127-134, 2003.

ROGERS, M.; KROPF, P.; CHOI, B. S.; DILLON, R.; PODINOVSKAIA, M.; BATES, P.; MULLER, I. Proteophosophoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected and flies target the L.arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival, **PLOS Pathogens**, v. 5, p. e1000555, 2009.

ROSEN, G. M.; POU, S.; RAMOS, C. L.; COHEN, M. S.; BRITIGAN, B. E. Free radicals and phagocytic cells. **The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, p. 200-209, 1995.

RUSSEL, D. G.; TALAMAS-ROHAMA, P. Leishmania and macrophage: a mariage of inconvenience. **Immunology Today,** v. 10, p. 328- 333, 1989.

SACKS, D. L.; BRODIN, T. N.; TURCO, S. J. Development modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during matacyclogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 42, p. 225-233, 1990.

SAMUELSON, J.; LERNER, E.; TESH, R.; TITUS, R. J. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **Journal Experimental Medicine**, v. 173, n. 1, p. 49- 54, 1991.

SCOTT, P. IFN-γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v.147, p. 3149-3155, 1991.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural Killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cells subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 567-577, 1993.

SCHNUR, L.; ZUCKERMAN, A.; MONTILO, B. Dissemination of leishmanias to the organs of Syrian hamsters following intra-splenic inoculation of promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 34, p. 432-447, 1973.

SILVEIRA, F. T.; BLACKWELL, J. M.; ISHIKAWA, E. A.; BRAGA, R. R.; SHAW, J. J.; QUINNELL, R. J.; SOONG, L.; KIMA, P.; MCMAHON-PRAT, D.; BLACK, G. F.; SHAW, M. A. T cell response to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia.* **Parasite Imunology**, v. 20, p. 19-26, 1998.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 99, p. 239-251, 2004.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v, 100, p. 525-534, 2005.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; DE BRITO, A. C.; OLIVEIRA, M. R. F.; PAES, M. G.; DE SOUZA, A. A. A.; DA SILVA, B. M. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: LEÃO, R. N. Q. (Ed.). **Doenças infecciosas e parasitárias**: enfoque Amazônico. Belém: CEJUP, 1997. p. 619-630.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; De SOUZA, A. A. A.; ISHIKAWA, E. A.; BRAGA, R. R. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 735-738, 1991.

STAUBER, L. A. Host resistance to the kartoum strain of *L. donovani*. **Rince Institut Pamphect**, v. 45, p. 80-96, 1958.

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 783-793, 1994.

THEODOR, O. A study of thereaction to *Phlebotomus* bites with some remarks on harara. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, p. 273- 284, 1935.

THEODOS, C. M.; RIBEIRO, J. M.; TITUS, R. G. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on Leishmania infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 1592-1598, 1991.

THEODOS, C. M.; TITUS, R. G. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhitory effect on macrophage function *in vitro*. **Parasite Immunology**, v. 15, p. 481-487, 1993.

THIAKAKI, M.; ROHOUSOVA, I.; VOLFOVA, V.; VOLF, P.; CHANG, K. P.; SOTERIADOU, K. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. **Microbes and Infection** v. 7, p. 760-766, 2005.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne diseases. **Parasitology Today**, v. 6, p. 157-160, 1990.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. C. Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhance Leishmania infectivity**. Science**, v. 239, p. 1306-1308, 1988.

VAN ZANDBERGEN, G. KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GERBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of Immunology**, v. 173, p. 6521-6525, 2004.

WILL, A.; BLANK, C.; ROLLINGHOFF, M.; MOLL, H. Murine epidermal Langerhans cells are potent stimulators of an antigen-specific T cell response to Leishmania major, the cause of cutaneous leishmaniasis. **European Journal of Immunology,** v. 22, p. 1341-1347, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The World Health Report 2001. Geneva.

WRIGHT, S. D.; SILVERSTEIN, S. C. Receptors for C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 158, p. 2016- 2023, 1983.

ZIBERSTEIN, D.; DWYER, D. M. Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the protozoan parasite *Leishmania donovani.* **The Biochemical Journal**, v. 256, p. 13, 1988.

ANEXO-1

The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Laurenti, M.D.; Corbett, C.E.P.; Sotto, M.N.; Sinhorini, I.L; Goto, H.

International Journal of Experimental Pathology 1996; 77(1): 15-24

Int. J. Exp. Path. (1996), 77, 15–24

The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host–parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania (Leishmania) chagasi*

M.D. LAURENTI*, C.E.P. CORBETT*, M.N. SOTTO*†, I.L. SINHORINI‡ AND H. GOTO*§

*Infectious Diseases Pathology Laboratory, Department of Pathology, University of São Paulo Medical School; †Division of Dermatology, Hospital das Clínicas of São Paulo Medical School; ‡Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, University of São Paulo, and §Department of Preventive Medicine, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

Received for publication 18 April 1995
Accepted for publication 2 November 1995

Summary. Tecidual reaction at the inoculation site of *L. (L.)chagasi* promastigotes in hamsters depleted and non-depleted of complement was studied within 2, 6, 12, 24, 48 and 72 hours of infection. The inflammatory reaction was characterized by early predominance of polymorphonuclear cells (PMN) at 2, 6 and 12 hours of infection, mixed infiltrate of PMN and mononuclear cells (MN) at 24 hours, followed by predominance of MN at 48 and 72 hours after infection. The group depleted of complement showed a higher number of PMN at 2 hours and lower numbers of MN at 72 hours after infection ($P<0.0001$). In the depleted group the phagocytosis by PMN was lower at 2 and 24 hours and by MN was lower at 24, 48 and 72 hours after infection. Electron microscopy showed extracellular intact and degenerated parasites, and lysed intracellular parasites, in PMN; and, rarely, preserved intracellular parasites in MN at 2, 6 and 12 hours after infection. The groups examined at 24, 48 and 72 hours of infection showed only cellular and parasite debris in mononuclear inflammatory cells. C_3b deposits were detected by immunofluorescence in the interstitium and in the cytoplasm of inflammatory cells in non-depleted group at 2, 6 and 12 hours of infection. No immunoglobulin was detected in either group. Visceralization was detected 240 days after infection. The complement system has an important role in the inflammatory reaction and phagocytosis. The ultrastructural findings showed that the escape of the parasite probably occurs soon after inoculation.

Keywords: visceral leishmaniasis, acute inflammation, complement system, *Leishmania (Leishmania) chagasi*, pathogenesis, pathology

Correspondence: Márcia Dalastra Laurenti, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-Depto. Patologia, Av. Dr. Arnaldo 455, 1° andar, sala 26, 01246903 São Paulo (SP), Brasil.

Visceral leishmaniasis develops when, after inoculation, the *Leishmania* parasites survive the attack of non-specific innate immune elements, such as phagocytic cells and the complement system, and disseminate to viscera evading the specific immune mechanisms.

© 1996 Blackwell Science Ltd

At the start of the infection, phagocytes and complement have an important role in the control and establishment of the infection. In *in vitro* studies, polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and eosinophils were seen to be efficient in killing the phagocytized parasites through a high oxidative burst mechanism (Pearson & Steigbigel 1981; Chang 1981b; Pearson *et al.* 1987). On the other hand, the monocytes from susceptible animals are inefficient in killing; rather, they harbour the parasites and allow them to grow due to the low oxidative burst (Chang & Dwyer 1978; Pearson *et al.* 1982). It is known from *in vitro* studies that promastigotes of *Leishmania (Leishmania) donovani* activate either classic (Pearson & Steigbigel 1980; Mosser *et al.* 1986) or alternative pathways of complement, and the amastigotes, the alternative pathway of the complement system (Hoover *et al.* 1984; 1985). The consequences of the activation of the complement pathways in culture depend on the parasites' growth phase. One hundred per cent of the *L. donovani* promastigotes in logarithmic culture growth are lysed by normal human serum action, while 10–20% of *L. donovani* promastigotes in the stationary phase survive this serum action (Howard *et al.* 1987).

Complement is involved in the phagocytosis of *L. (L.) donovani* by PMNs, eosinophils (Chang 1981a; Pearson & Steigbigel 1981; Pearson *et al.* 1987) and monocytes (Pearson *et al.* 1982; 1983). The phagocytosis of opsonized *Leishmania* parasites by monocytes occurs via CR1 and CR3 complement receptors and a low oxidative burst that favours parasite survival has been observed (Wright & Silverstein 1983; Blackwell 1985).

Since there are no studies in the literature on the role of the complement system in visceral leishmaniasis *in vivo*, we studied the dynamics of the acute inflammatory process, parasite–host cell interaction and the long-term evolution of infection in complement C_3 depleted and non-depleted hamsters, subcutaneously inoculated with promastigotes of *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Material and methods

Animals

Male, 45–60-days-old, outbred hamsters (*Mesocricetus auratus*), obtained from the General Colony of Medical School of University of São Paulo were maintained in our laboratory during the experiments.

Parasite

Promastigotes of *L.(L.) chagasi* (MHOM/BR/73/strain 46) were used throughout the experiments. Amastigotes were obtained from the spleen of infected hamsters 3 months after infection. Spleen fragments were put in NNN/LIT medium and maintained at 25°C. Parasites were counted daily to determine the stationary phase. In this phase, parasites were harvested and washed 3 times in sterile saline (4000 r.p.m./20 minutes). The parasite concentration was adjusted to 10^8 promastigotes/ml and 0.1 ml was injected subcutaneously in the hind footpad of hamsters.

Complement depletion

Two doses of 0.3 mg/kg of cobra venom anti-complementary factor (CVF) from *Naja naja Kaouthia* (Sigma) in saline were given at −24 and −12 hours to one group of animals by the intraperitoneal route before infection. The complement depletion was maintained with new doses at 0, 24 and 48 hours after parasite inoculation. The complement depletion was evaluated by immunohaemolysis using plates covered with agar containing haemolysin sensitized to sheep red blood cells. The sera from the depleted animals were placed in the wells in the plate and the lysis was evaluated by measuring the diameter of haemolysis. The depletion was evaluated before the inoculation of the parasites and at the time the animals were sacrificed. A standard curve was made with increasing dilutions of normal hamster serum.

Infection

Two groups of 28 hamsters, depleted and non-depleted complement, were inoculated subcutaneously in the hind footpads with 10^7 promastigotes of *L. (L.) chagasi*. Control animals were inoculated with sterile saline.

Light and transmission electron microscopic and immunohistopathological studies

Fragments from the hind footpads were taken at 2, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation, fixed in 0.01 M phosphate buffered 4% paraformaldehyde and embedded in plastic resin (Technovit 7100). The semi-thin section were stained by haematoxylin–eosin and examined with a light microscope. Fragments also were taken for transmission electron microscope studies and processed according to Duarte *et al.* (1992).

For studies of complement and immunoglobulin deposits, using direct immunofluorescence technique, the anti-hamster C3 antibody (produced in our laboratory) was used in 1/10 dilution and anti-hamster total

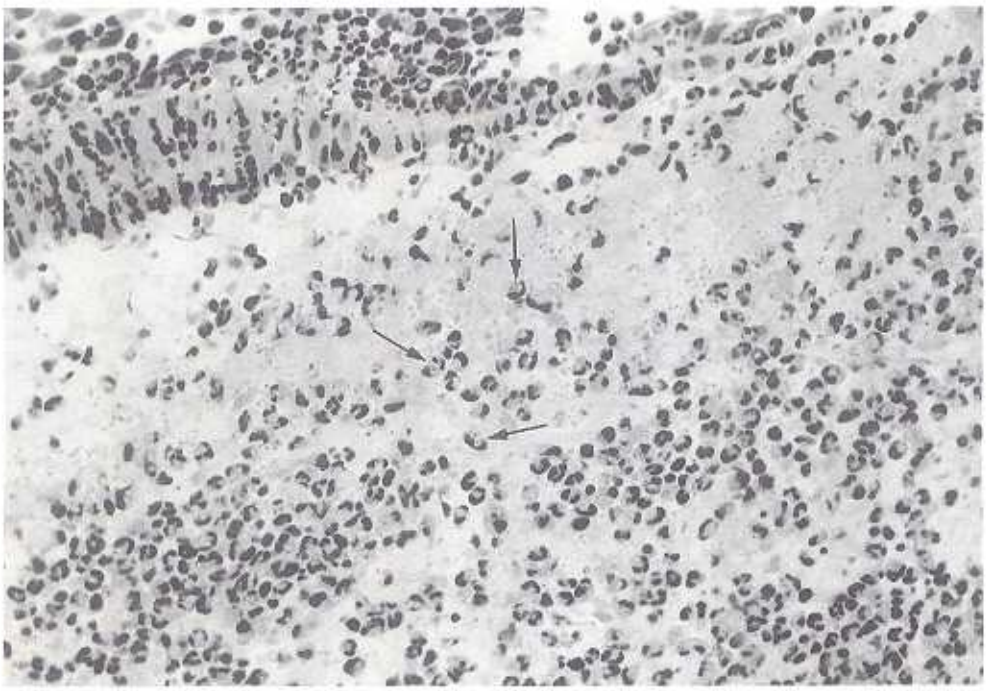


Figure 1. Polymorphonuclear neutrophil infiltrate in the dermis with parasites phagocytosis (→). HE–OM. ×40.

immunoglobulin antibody (produced in our laboratory) in 1/20 dilution. As a positive control for C3 deposition, the Arthus reaction produced in hamster footpads after intravenous inoculation of bovine albumin and subcutaneous inoculation of anti-bovine albumin in the hind footpads was used. As a positive control for immunoglobulin deposits, hamster spleen tissue was used.

The visceralization of the infection was evaluated in liver and spleen 240 days after inoculation. Antigenic deposits were studied using polyclonal anti-leishmania antibody by peroxidase anti-peroxidase technique (PAP) (Sotto *et al.* 1989).

Quantitative morphometric studies

The morphometric analysis was made on 3 different levels of semi-thin section per animal using a graticule eyepiece in an area of 0.01 mm^2 with an Olympus planapochromatic immersion objective lens (×100).

In these levels, 900 cells were counted, where each cell type constituted at least 10% of the total, to keep the relative standard error below 0.1%, according to Weibel and Gomez (1962). Samples from four experimental animals were analysed in each of these points and the data submitted to statistical analysis.

Statistical analysis

The Anowa multiple range test was used with Statgraphics version 5.1 Statistical Program. The difference was considered significant when $P < 0.05$.

Results

The dynamic of histopathological changes was initially characterized in the control animals, non-depleted in complement and, inoculated subcutaneously with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. At 2 hours after infection, oedema and polymorphonuclear neutrophil infiltration, phagocytosis of the parasites by these cells and many extracellular parasites in the dermis were observed (Figure 1). The polymorphonuclear neutrophil infiltrate was still predominant at 12 hours after infection but leucocytoclasia, resulting from the breakdown of polymorphonuclear neutrophils, and fewer extracellular parasites were seen (Figure 2). At 24 hours, a mixed infiltrate of polymorphonuclear neutrophils and mononuclear cells was present (Figure 3), and there were rare parasites phagocytozed by both cell types. At 48 and 72 hours, predominantly mononuclear cells with few parasites in their cytoplasm were seen (Figure 4).

To study the effect of complement system depletion on inflammatory process and on parasite–host cell

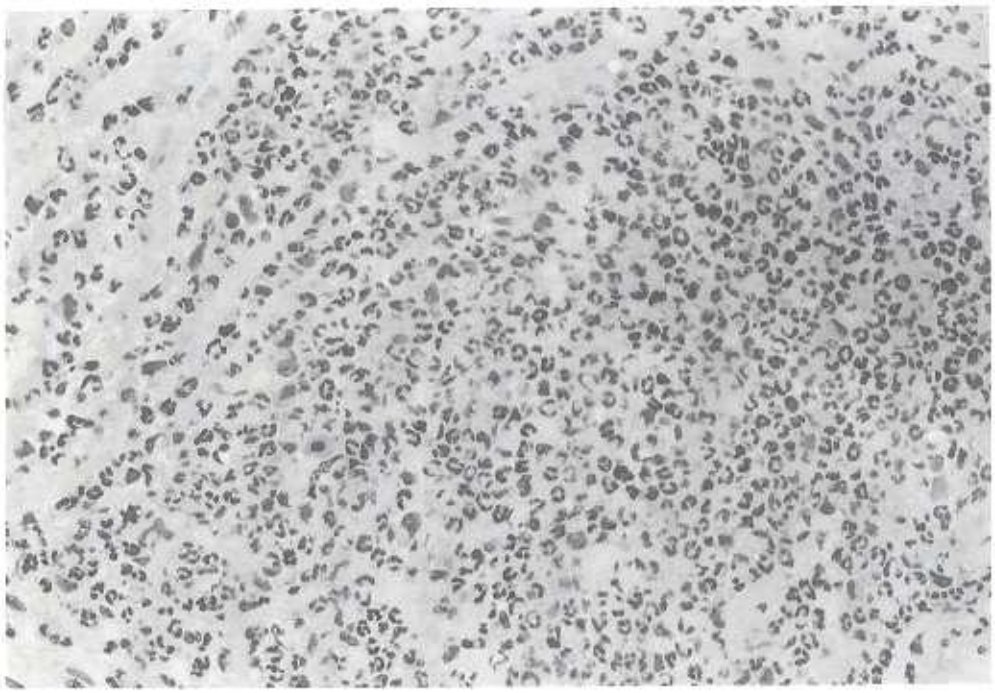


Figure 2. Leucocytoclastic effects. HE—OM. ×40.

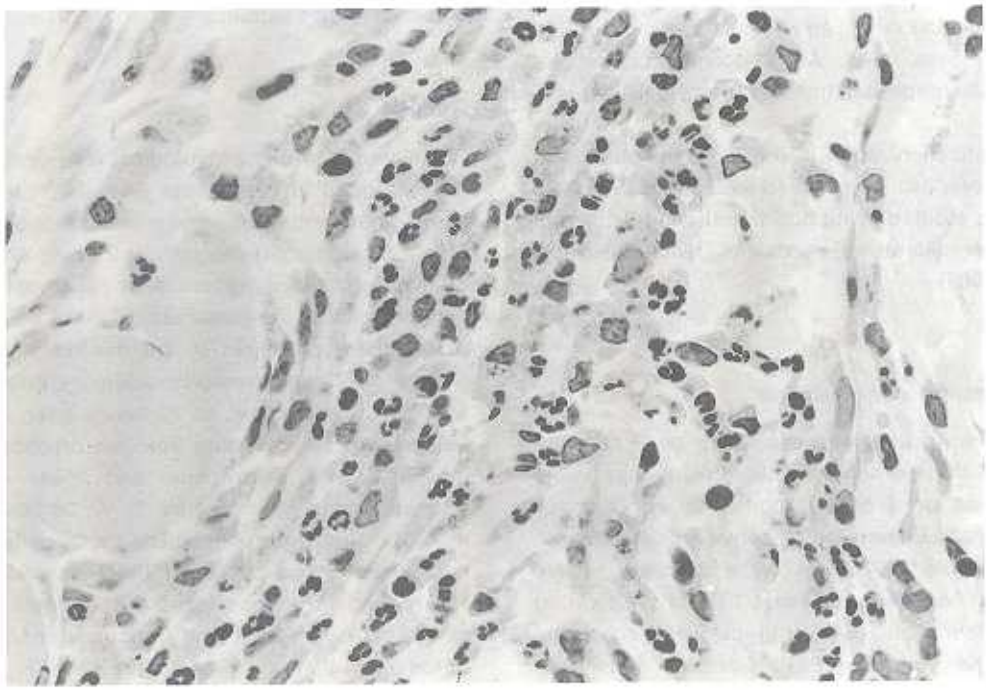


Figure 3. Mixed infiltrate by neutrophils and macrophages in the dermis. HE—OM. ×63.

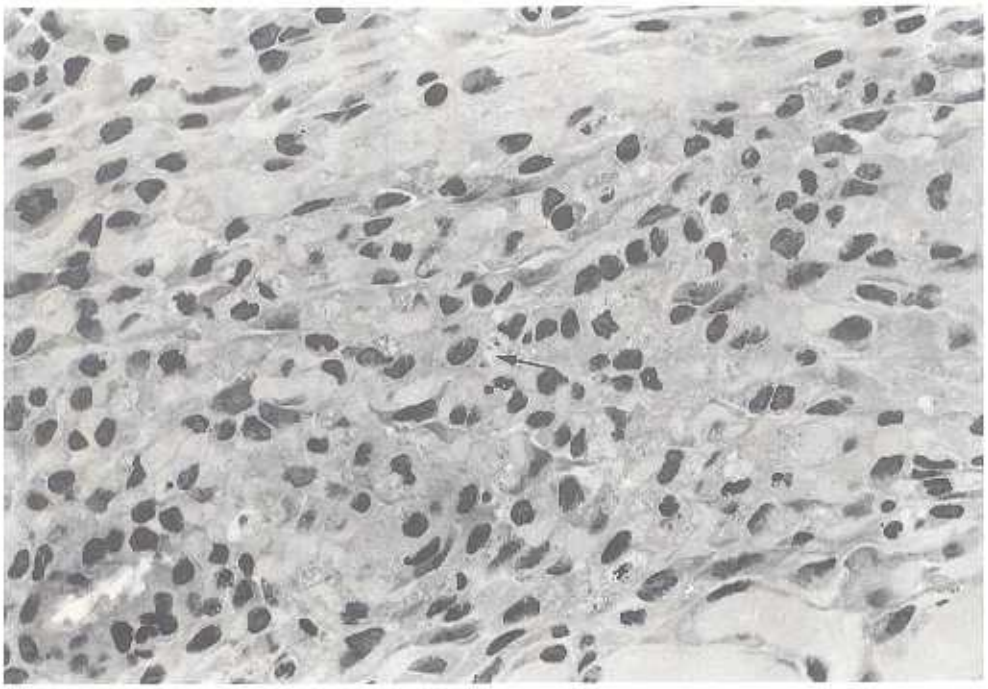


Figure 4. Macrophage infiltration in the dermis with parasite phagocytosis (→). HE—OM. ×63.

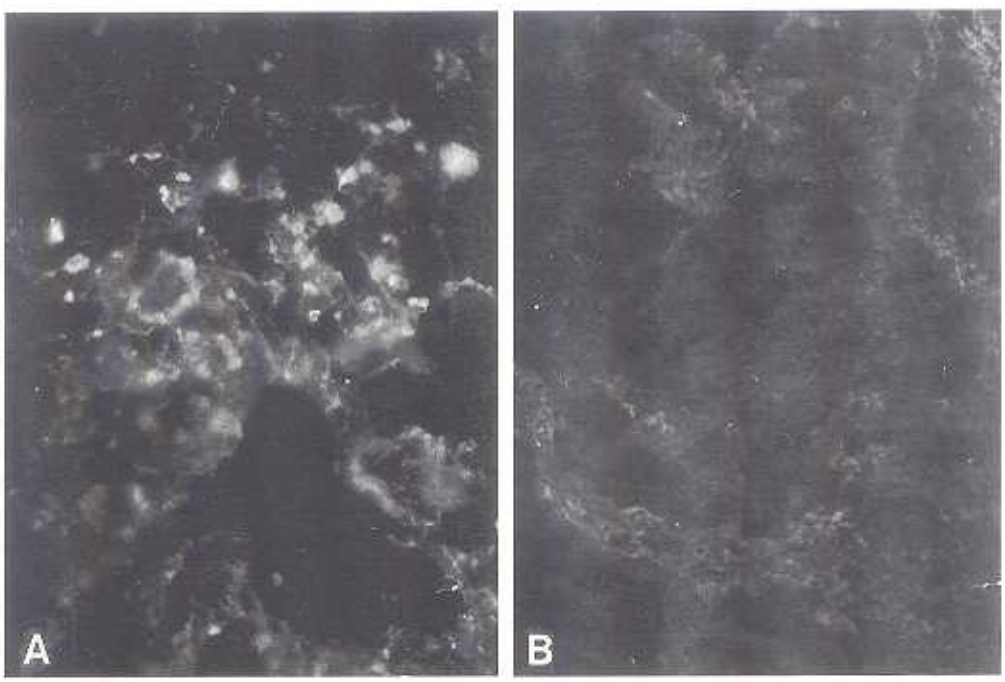


Figure 5. Immunofluorescence reaction. A, Non-depleted animals showing C3 deposits in the dermis interstitium and in the cytoplasm of inflammatory cells. OM, ×40. B, Depleted animals showing absence of C3 deposits in the dermis. OM. ×40.

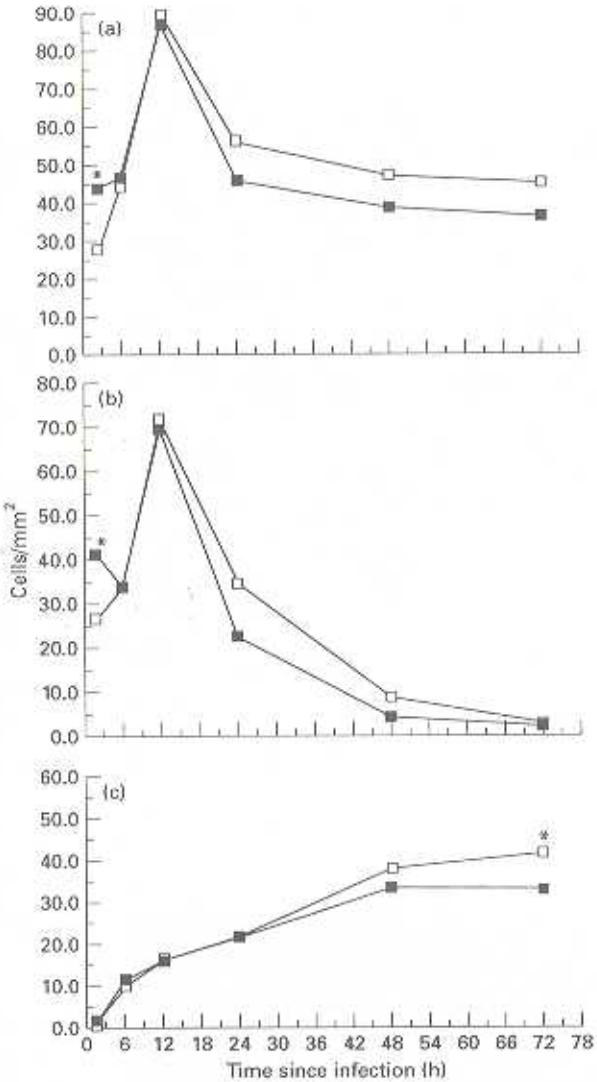


Figure 6. Evolution of cell density (cells/mm^2 in □, non-depleted animals and ■, C3 depleted animals. a, Total cells; b, neutrophils; c, macrophages. $*P < 0.0001$.

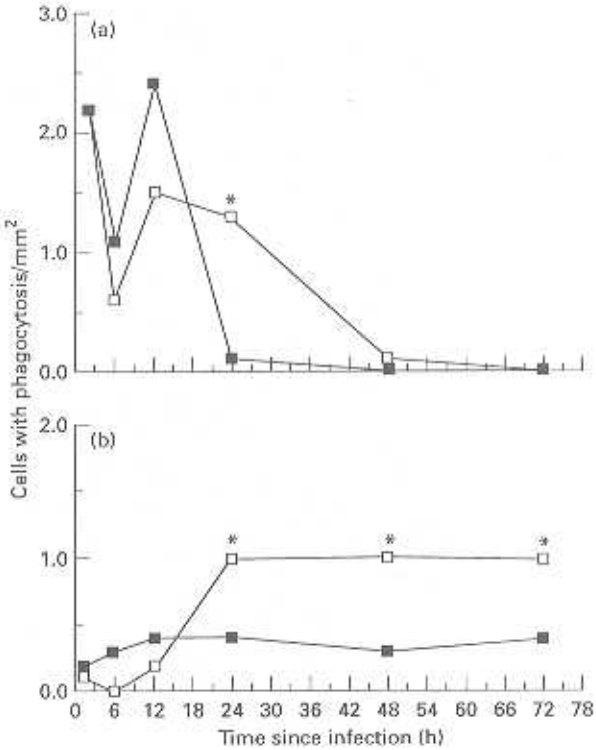


Figure 7. a, Neutrophils and b, macrophages phagocytosis density at the different times of infection in □, non-depleted and ■, C3 depleted animals. $*P < 0.0001$.

interaction, hamsters were injected with CVF 24 and 12 hours before infection in all animals and at 0, 24 and 48 hours after infection in animals maintained for experiment for more than 6 hours. All animals were depleted in serum complement activity by the time they were inoculated with parasites. In the few animals in which complement activity was detected, it was less than 10%. In addition, at the inoculation site of complement depleted animals, no complement C_3 fraction deposit was detected at any time, while in the non-depleted groups, it was present in the interstitium of the dermis, in the cytoplasm of inflammatory cells and in perivascular tissue at 2, 6 and 12 hours after infection (Figure 5a and b). The immunoglobulin deposits were absent in both groups.

Histopathology in the complement depleted animals showed a less pronounced reaction, although the dynamics of the inflammatory process was similar when compared with the control animals. The leucocytoclasia was mild and the phagocytosis of parasites by polymorphonuclear neutrophils and mononuclear cells was less intense.

Since the qualitative differences were not so obvious, morphometric quantitative studies were performed. Cell density (cells/mm^2) was studied initially (Figure 6a–c) and, in the complement depleted animals, a significantly higher number of total cells and neutrophils was observed at 2 hours after infection ($P < 0.0001$), and a significantly lower number of the mononuclear cells at 72 hours of infection ($P < 0.0001$). No difference was noticed in the number of mast cells.

The phagocytosis of leishmania parasites in the complement depleted animals was significantly lower both by polymorphonuclear neutrophils at 24 hours post infection (Figure 7a) and by mononuclear cells at 24, 48 and 72 hours after infection (Figure 7b).

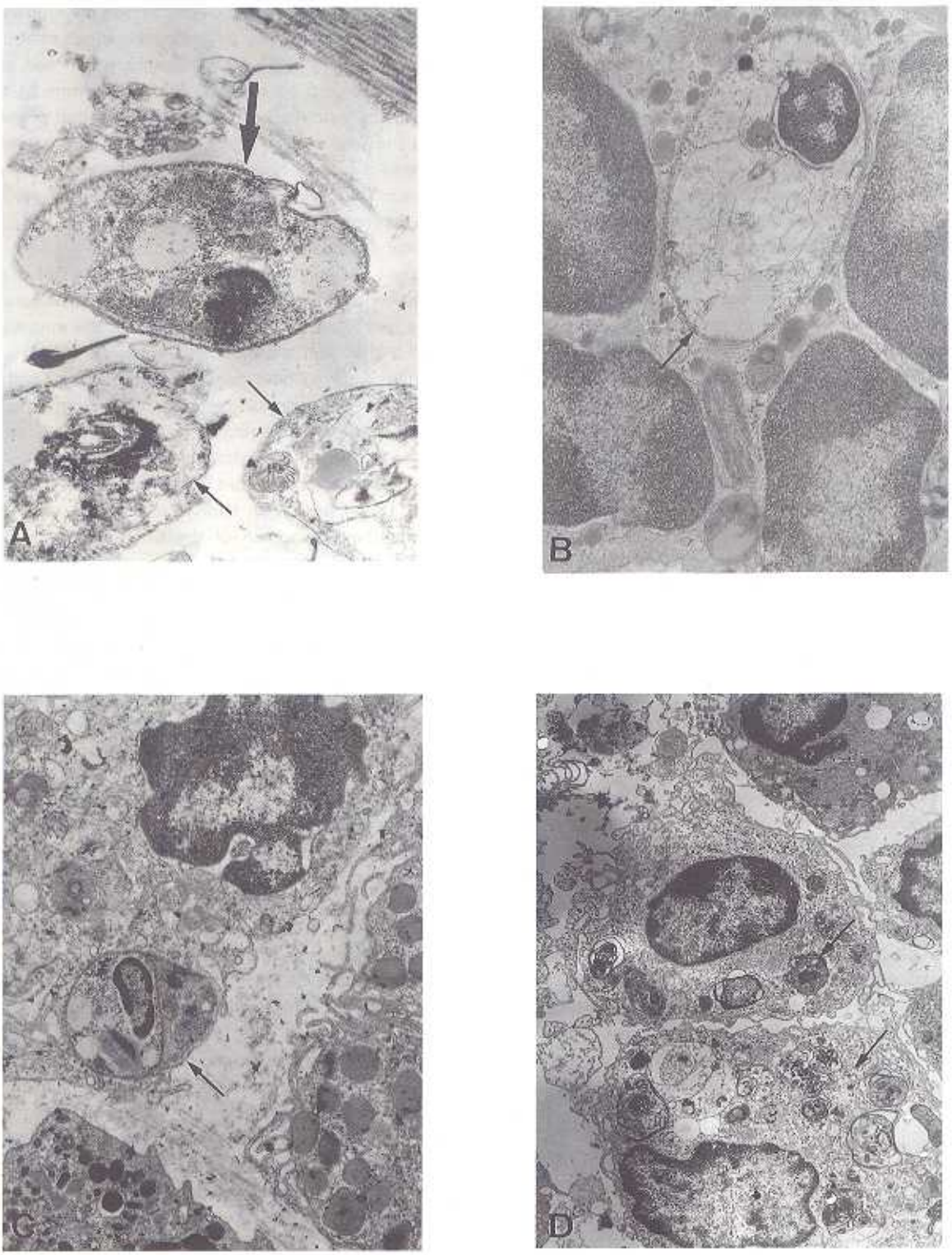


Figure 8. Electron microscopy of non-depleted animals showing: A, Degenerated (→) and intact (→) extracellular parasites at 2 hours of infection. OM. ×9500. B, Parasite with degenerated aspects inside of neutrophil cytoplasm (→) at 6 hours of infection. OM. ×9500. C, Intact parasite inside of macrophage cytoplasm (→) at 2 hours after infection. OM. ×4900. D, Cellular and/or parasite debris in the macrophages' cytoplasm (→) at 72 hours after infection. OM. ×1900.

The percentage of both cell types and phagocytosis by the different cell types were analysed to clarify the effect of complement system depletion in the process. There was no statistical difference in the percentage of inflammatory cell types at any time of infection; on the other hand, the percentage of phagocytosis by neutrophils in the complement depleted animals at 2 hours after infection was lower than in the non-depleted animals ($P < 0.005$). There was no difference in the percentage of phagocytosis by mononuclear cells ($P > 0.05$).

Under transmission electron microscopy, the complement depleted and non-depleted groups presented similar appearances. At 2 hours after infection, we observed many intact and lysed parasites extracellularly (Figure 8a), parasites with degenerate aspects in the cytoplasm of neutrophils (Figure 8b), and intact parasites in the cytoplasm of mononuclear cells (Figure 8c). After 6 and 12 hours, the picture was similar, but there were fewer parasites. There were few intact parasites in the cytoplasm of mononuclear cells as well as predominantly lysed parasites. Cellular debris was seen in the cytoplasm of both types of phagocytes. At 24, 48 and 72 hours, we saw debris of parasites and/or cells only in the cytoplasm of mononuclear cells (Figure 8d).

The long-term effect of complement system depletion was also studied in terms of the establishment of infection in the liver and the spleen. Animals from both groups were examined at 240 days after infection. The histopathological changes were similar in both groups. The liver showed peri-portal and intraparenchymal mononuclear cell infiltrate with nodules of macrophages, mild hyperplasia and hypertrophy of the Kupffer cells. In the spleen there were intense hyperplasia and hypertrophy of the mononuclear cells forming nodules and discrete depletion in the white pulp. The difference was seen with immunohistochemistry using anti-leishmania antibody. Amastigotes within the cytoplasm of mononuclear cells were detected in all 10 control animals, but no amastigotes, only homogeneous antigenic material, in the cytoplasm of mononuclear cells in the macrophages nodules in 5 of the 6 complement depleted hamsters (Figure 9a and b).

Discussion

The role of complement system in the dynamics of the acute inflammatory process, in the parasite–host cell interaction and in the long-term evolution of infection was studied for the first time *in vivo* in leishmaniasis. Early events during the infection of hamsters inoculated with *L. (L.) chagasi* were characterized by infiltration of skin predominantly by polymorphonuclear neutrophils (PMNs) until 12 hours after infection, which was gradually substituted by mononuclear cells from 24 hours onward. This dynamic is different from that presented in a previous *in vivo* study, where the authors showed mixed inflammatory infiltrate at one hour after infection (Wilson *et al.* 1987). This discrepancy can be attributed to a different leishmania strain and/or a different experimental protocol.

When we studied the effect of depletion of complement on the dynamics of the acute inflammatory process, we found the depletion affected the migration of both PMNs and mononuclear cells. At 2 hours after infection, more PMNs migrated to the lesion, and at 72 hours, fewer mononuclear cells were seen compared with non-depleted controls.

The increased migration of PMNs can be attributed either to the effect of cobra venom factor itself (Hausman *et al.* 1972; Regal *et al.* 1993) or to the generation of C5a during the breakdown of the C5 fraction during the activation of complement pathway by cobra venom factor (Ryan & Majno 1977). However, in our study, the presence of C5a seems unlikely since the tissue samples were taken more than 24 hours after the depletion had started and the fraction C3b generated in the same process was not detected in the tissue by immunostaining. Therefore, it might be that the complement system interferes with migration promoted by other factors such as interleukins (Ewan & Yoshida 1979) and leukotriene B4 (Ford-Hutchinson *et al.* 1980), which effect becomes more evident when the complement is absent.

On the other hand, fewer mononuclear cells seen in the depleted animals can be attributed either to the absence of C5a fragments, as a consequence of the depletion of complement, or to the milder inflammatory process with less of factors such as fibronectin fragments (Nonis *et al.* 1982) and neutrophil derived factors (Ward & Hill 1970) being produced during the tissue damage.

Another parameter studied was phagocytosis since in the literature *in vitro* data have shown the importance of complement receptors for phagocytosis of leishmania both by PMNs and macrophages (Blackwell 1985). The depletion of complement in our study decreased the phagocytosis of parasites by both PMNs and macrophages which affect the evolution of the infection in opposite ways. Since PMNs are effective in killing the leishmanias (Pearson & Steigbigel 1981; Pearson *et al.* 1987; Chang 1981b), the decrease in phagocytosis by PMNs leads to less destruction of parasites. On the other hand, non-activated macrophages constitute a

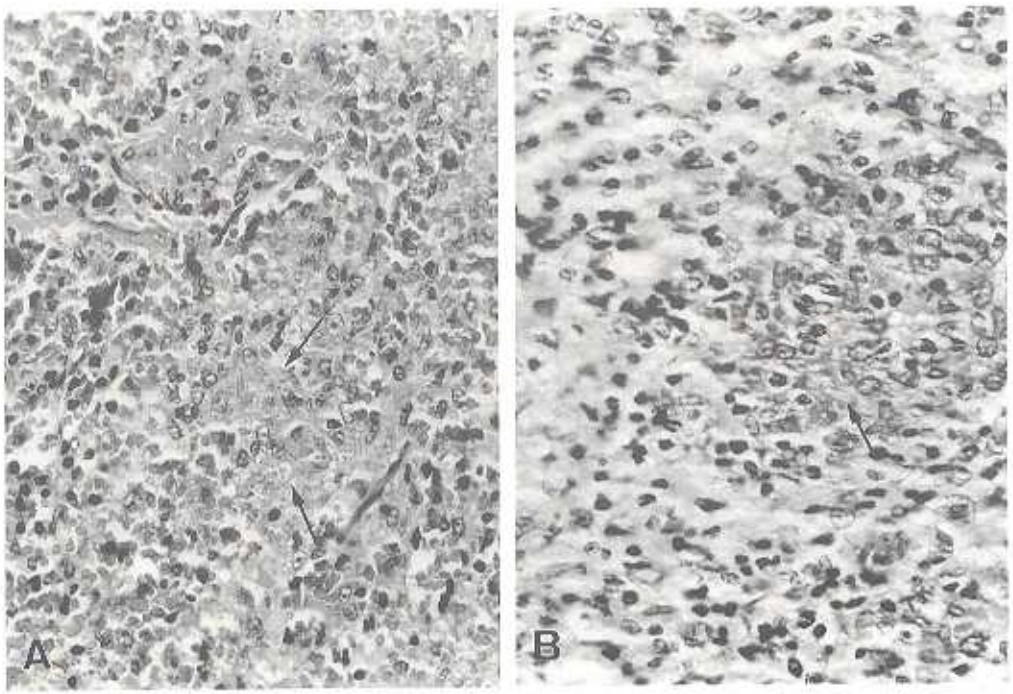


Figure 9. A, Non-depleted animal, 240 days of infection: hyperplasia and hypertrophy of mononuclear phagocytosis system with many parasites (→). PAP—OM. ×40. B, C3-depleted animal 240 days after infection: macrophage nodule with antigenic material (→). PAP—OM. ×40.

natural habitat for them, allowing their intracellular proliferation (Pearson *et al.* 1982; 1983). The decrease in phagocytosis by macrophages affects the progression of the infection.

Leishmania survival is enhanced by phagocytosis at one of the macrophage cell surface receptors. The phagocytosis of leishmanias by macrophages can involve the mannose–fucose receptor, the immunoglobulin Fc receptor and the fibronectin receptor, besides CR1 and CR3 complement receptors (Chang & Chaudhuri 1990). Phagocytosis through CR1 and CR3 receptors are considered to be inefficient at triggering the oxidative burst in the macrophages which favours the survival of parasites within the cells (Wright & Silverstein 1983; Blackwell 1985). This is not the case when the phagocytosis occurs through other receptors (Chang & Chaudhuri 1990). Considering the decrease in phagocytosis by macrophages and the probable use of non-complement receptors in non-depleted animals, we did not expect the infection to progress in them. Indeed, in the chronic phase, we observed some phagocytozed parasites in macrophages but, in the spleen and liver of complement depleted animals, only fragments of antigenic material and no morphologically intact parasites were found.

The sequential findings of our study showed that the depletion of complement in the initial phase attracted more PMNs to the lesion, but less phagocytosis of leishmanias by PMNs occurred. The remaining parasites were partially destroyed extracellularly, as we observed in ultrastructural studies, probably by factors other than complement. In the sequence, intact parasites were phagocytozed in a lesser degree by macrophages that were also present, in lower numbers, in complement depleted animals, probably through other receptors than CR1 and CR3. Fewer parasites were phagocytozed by the lower number of macrophages, and the leishmanias probably did not have the chance to survive for long within the cells, due to the effective oxidative burst triggered in these cells. As a consequence, in the chronic phase of infection, we were unable to detect morphologically intact amastigotes in spleen and liver in complement depleted animals. Our data suggest that in leishmaniasis, *in vivo*, the complement system has a fundamental role for the progression of the infection. The lytic effect in the extracellular compartment seemingly has no crucial importance for the destruction of the parasites and no significant repercussion on the evolution of the disease.

Acknowledgements

This work was supported by FINEP (4.2.90.0215.00) and LIM-50/HC-FMUSP. We thank H.F. Andrade Jr for statistical analysis and discussion, M. Gidlund, for critical review, R. Chebabo for parasite supply, C.F. Hirata Takakura and E.H. Yanashiro-Kanashiro for technical assistance, M.D. Morais for secretarial help and M.C. Batista for assistance for the pictures.

References

Blackwell J.M. (1985) Receptors and recognition mechanisms of leishmania species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**, 606–612.

Chang K.P. (1981a). Antibody-mediated inhibition of phagocytosis in *Leishmania donovani*—human phagocyte interactions *in vivo*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**, 334–339.

Chang K.P. (1981b) Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**, 322–333.

Chang K.P. & Chaudhuri G. (1990) Molecular determinants of leishmania virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* **44**, 499–529.

Chang K.P. & Dwyer D.M. (1978) *Leishmania donovani*. Hamster macrophage interactions *in vitro*. cell entry, intracellular survival and multiplications of amastigotes. *J. Exp. Med.* **147**, 515–530.

Duarte M.I.S., Mariano O.N. & Takakura C.F.H. (1992) A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. *Ultrastruct. Pathol.* **16**, 475–482.

Ewan V. & Yoshida T. (1979) Lymphokines and cytokines. In *Chemical Messengers of the Inflammatory Process*. Ed. I.C. Henck Oxford. Elsevier/North Holland. pp. 197–227.

Foro-Hutchinson A.W., Bray M.A., Doig M.V., Shipley M.E. & Smith M.J.H. (1980) Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* **286**, 264–265.

Hausman M.S., Snyderman R. & Mergenhagen S.E. (1972) Humoral mediators of chemotaxis of mononuclear leukocytes. *J. Infect. Dis.* **125**, 595–602.

Hoover D.L., Berger M., Macy C.A., Hockmeyer W.T. & Meltzer M.S. (1984) Killing of *Leishmania tropica* amastigotes by factors in normal human serum. *J. Immunol.* **132**, 893–897.

Hoover D.L., Berger M., Oppenheim M.H., Hockmeyer W.T. & Meltzer M.S. (1985) Cytotoxicity of human serum for *Leishmania donovani* amastigotes: antibody facilitation of alternate complement pathway-mediated killing. *Infect. Immun.* **47**, 247–252.

Howard M.K., Sayers G. & Milles M.A. (1987) *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation *in vitro*, lectin agglutination, complement resistance and infectivity. *Exp. Parasitol.* **64**, 147–156.

Mosser D.M., Burke S.K., Contavas E.E., Wedgwood J.F. & Edelson P.J. (1986) Leishmania species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *Exp. Parasitol.* **62**, 394–404.

Nonis D.A., Clark R.A.F., Swigart L.M., Huff J.C., Weston W.L. & Howell S.E. (1982) Fibronectin fragment(s) are chemotatic for human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* **129**, 1612–1618.

Pearson R.D., Harcus J.L., Symes P.H., Ramito R. & Donovitz G.R. (1982) Failure of the phagocytic oxidative response to protect human monocytes-derived macrophages from infection by *Leishmania donovani*. *J. Immunol.* **129**, 1282–1286.

Pearson R.D., Harcus J.L., Roberts D. & Donovitz G.R. (1983) Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. *J. Immunol* **131**, 1994–1999.

Pearson R.D. & Steigbigel R.T. (1980) Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J. Immunol.* **125**, 2195–2201.

Pearson R.D. & Steigbigel R.T. (1981) Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leucocytes. *J. Immunol.* **127**, 1438–1443.

Pearson R.D., Uydes I.L., Champan S.W. & Steigbigel R.T. (1987) Interaction of human eosinophilis with *Leishmania donovani*. *Am. Trop. Med. Parasitol.* **81**, 735–739.

Regal J.F., Fraser D.G., Anderson D.E. & Solem L.E. (1993) Enhancement of antigen-induced bronchoconstriction after intravascular complement activation with cobra venom factor—Reversal by granulocyte depletion. *J. Immunol.* **150**, 3496–3505.

Ryan G.B. & Majno G. (1977) Acute inflammation—a review. *Am. J. Pathol.* **86**, 185–274.

Sotto M.N., Yamashiro-Kanashiro E.H., Matta V.L.R. & Brito T. (1989) Cutaneous leishmaniasis of the New World: Diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. *Acta Tropica*. **46**, 121–130.

Ward P.A. & Hill J.H. (1970) C5 chemotatic fragments produced by an enzyme in lysosomal granules of neutrophils. *J. Immunol.* **104**, 535–543.

Weibel E.R. & Gomez D.M. (1962) A principle for counting tissue structures on randon sections. *J. Appl. Physiol.* **17**, 343–348.

Wilson M.E., Innes D.J., Sousa A.Q. & Pearson R.D. (1987) Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters. *J. Parasitol.* **73**, 55–63.

Wright S.D. & Silverstein S.C. (1983) Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp. Med.* **158**, 2016–2023.

ANEXO-2

The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice

Laurenti, M.D.; Örn, A.; Sinhorini, I.L.; Corbett, C.E.P.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2004; 37(3): 427-434

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2004) 37: 427-434
ISSN 0100-879X

The role of complement in the early phase of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in BALB/c mice

M.D. Laurenti[1], A. Örn[2], I.L. Sinhorini[3] and C.E.P. Corbett[1]

[1]Laboratório de Patologia de Doenças Infecciosas, LIM-50, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil
[2]Microbiology and Tumorbiology Center, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
[3]Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Abstract

Complement-depleted and -non-depleted BALB/c mice were inoculated with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes into the hind footpad to study the role of the complement system in cutaneous leishmaniasis. Total serum complement activity was measured by hemolytic assay and C3 fragment deposit at the inoculation site was determined by direct immunofluorescence in the early period of infection, i.e., at 3, 24, 48 h and 7 days post-infection. The inflammatory reaction and the parasite burden were evaluated in the skin lesion at 7 and 30 days post-infection. Total serum complement activity decreased in the early phase of infection, from 3 to 24 h, in non-depleted mice compared to non-infected and non-depleted mice. C3 fragment deposit at the site of parasite inoculation was present throughout the period of infection in non-depleted mice. In contrast, no C3 fragment deposit was observed at the inoculation site in complement-depleted mice. Complement-depleted mice showed a significant decrease in the inflammatory response and a significant increase in the number of parasites (70.0 ± 5.3 *vs* 5.3 ± 1.5) at 7 days of infection ($P < 0.05$). A higher number of parasites were also present at 30 days of infection at the inoculation site of complement-depleted mice (78.5 ± 24.9 *vs* 6.3 ± 5.7). These experiments indicate that complement has an important role at the beginning of experimental cutaneous leishmaniasis caused by *L.* (*L.*) *amazonensis* by controlling the number of parasites in the lesion.

Correspondence
M.D. Laurenti
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina, USP
Av. Dr. Arnaldo, 455
1º andar, Sala 1209
01246-903 São Paulo, SP
Brasil
Fax: +55-11-3081-7799
E-mail: mdlauren@usp.br

Presented at the I Symposium on Advances in Medical Research, Institute of Medical Investigation Laboratories, HC-FMUSP, São Paulo, SP, Brazil, March 21-22, 2003.

Research supported by LIM-50, HC-FMUSP, FINEP and CAPES (PDEE 0025/95-20).

Publication supported by FAPESP.

Received June 12, 2003
Accepted October 14, 2003

Key words
- Cutaneous leishmaniasis
- *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*
- Complement
- Pathology

Introduction

Leishmaniasis develops when *Leishmania* survives the nonspecific defense mechanism or innate immunity, such as phagocytosis by inflammatory cells and the activity of the complement system. Subsequently, the control or the progress of the lesions depends on the cell immune response.

Most reports of the role of complement in leishmaniasis have been based on *in vitro* experiments. The mechanisms of promastigote opsonization in normal human serum are controversial; some data indicate that

promastigotes activate complement via the classical pathway (1,2), but most reports show that *Leishmania* activation of complement is antibody independent by activation of lectin or alternative complement pathway (3,4). Promastigotes of cutaneous strains of *Leishmania* are susceptible to lysis by normal serum, regardless of the presence of a specific antibody, suggesting that complement activation *in vitro* occurs through the alternative pathway (5). The susceptibility of the parasite to complement lysis also depends on the growth phase of the culture. Most of the promastigotes in the logarithmic phase of culture growth are lysed by the action of normal human serum, while promastigotes in the stationary phase, depending on the parasite species, may not be lysed (6). Serum resistance of infective promastigotes is not caused by their failure to bind and activate complement since both logarithmic and stationary forms have the ability to do it efficiently (7). Instead, serum resistance appears to be linked to the expression of surface antigens which differ between these two phases of parasite growth (8,9). Amastigotes of cutaneous strains are more susceptible to complement lysis than visceral strains, suggesting the important role of complement factors in limiting the infection in the skin (10).

On the other hand, opsonization of parasites by fragments of complement, such as iC3b and C3b, may enhance phagocytosis by specific receptors on the macrophage cell surface, which favors parasite survival, since phagocytosis through CR1 and CR3 receptors is considered to be inefficient in triggering the oxidative burst (11). In support of these data, an important role of complement in visceral leishmaniasis establishment in hamsters has been previously shown (12).

In order to study the role of the complement system in cutaneous leishmaniasis, complement-depleted and -non-depleted BALB/c mice were inoculated subcutaneously with promastigotes of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. Total serum complement activity and the C3 deposit in the skin lesion were studied together with the features of the inflammatory reaction and the parasite burden in the skin lesion during the early period of infection.

Material and Methods

Animals

Male BALB/c mice aged 8 to 10 weeks from the General Colony of the São Paulo University Medical School were kept in our laboratory during the experiments.

Parasite

Promastigotes of *L.* (*L.*) *amazonensis*, HSJD-1 strain, were used. Promastigotes in the stationary phase from the 3rd culture passage in supplemented RPMI 1640 medium (10% fetal calf serum, 5 mM HEPES, 50 µg/ml gentamicin, and 100 U/ml penicillin) were harvested and washed three times in sterile saline (1500 *g* for 10 min). The parasite concentration was adjusted to 2 x 10^8 promastigotes/ml and 50 µl was injected subcutaneously into the hind footpads of the mice.

Infection

Three groups of 25 complement-depleted BALB/c mice and 25 non-complement-depleted BALB/c mice were inoculated with 10^7 promastigotes of *L.* (*L.*) *amazonensis* by the subcutaneous route in the hind footpads. Complement depletion was induced by intraperitoneal administration of cobra venom anti-complement protein (Cobra Venom Factor, CVF) from *Naja naja kaouthia* (Sigma, St. Louis, MO, USA) at two doses of 6 µg 24 and 12 h before parasite inoculation. Complement depletion was maintained until 72 h after infection with additional doses at 0, 24

and 48 h after parasite inoculation. A non-infected group was used as control. Sera and fragments from the inoculation site were taken at 3, 24 and 48 h and 7 days after inoculation to evaluate the complement activity and C3 fragment deposit, respectively. Fragments of skin were taken on the 7th and 30th day of infection to evaluate the inflammatory reaction and the parasitism. Sera from non-infected BALB/c mice were collected as control for evaluation of complement hemolytic activity.

Complement hemolytic titration

The total complement activity was studied in each serum individually by the usual hemolytic assay, using triethanolamine buffer solution (TBS) (13) and the values are reported as the mean for five animals per group. Blood was collected from the retro-orbital sinus by puncture, immediately immersed in ice, and centrifuged (200 *g* for 10 min at 5ºC), and the sera obtained were stored at -80ºC until use. The sera which presented high spontaneous hemolysis were discarded. One hundred microliters hemolysin at 1/50 dilution (anti-sheep red blood cell polyclonal antibody, produced and kindly provided by Dr. Tambourgi, Immunochemical Laboratory of Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil, which reacts at up to 50 times dilution as determined by hemagglutination assay), 300 µl 5 x 10^8 sheep red blood cell solution in TBS, 100 µl test sera and 300 µl TBS, all kept in tubes in an ice bath, were added. Tubes were shaken and then incubated in a water bath at 37ºC for 1 h. Next, 200 µl saline solution was added to the tubes in an ice bath and the tubes were centrifuged at 5ºC (200 *g* for 10 min). The absorbance of the supernatant solution was measured with a spectrophotometer at 541 nm (Micronal Protometer, São Paulo, SP, Brazil). Percent lysis was calculated by considering the positive and negative controls. One hundred microliters of distilled water was added to the positive control tube instead of 100 µl test serum, and 100 µl TBS was added to the negative control tube instead of 100 µl test serum.

Direct immunofluorescence assay

Complement C3 fragment deposits were evaluated by direct immunofluorescence methods using fluorescein-conjugated anti-mouse C3 goat IgG (Cappel, Aurora, OH, USA) at a concentration of 80 µg/ml, in frozen sections of tissue obtained from the inoculation site.

Histopathological studies

The lesion and the parasitism at the inoculation site were evaluated on the 7th and 30th day of infection by light microscopy in paraffin-embedded section stained with hematoxylin and eosin. Morphometric analysis was performed at three different levels of each section per animal using a graticule eyepiece in an area of 1 mm^2 and an Olympus planapochromatic immersion objective lens (100X) (12).

Limiting dilution assay for parasite quantification

The assay was performed according to the method of Titus et al. (14) and Lima et al. (15). Skin fragments from the inoculation site between the heel and toes were taken from the footpad on the 7th and 30th day of infection, weighed and cut into several pieces in Schneider's medium (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA), supplemented with 10% fetal calf serum, 2% normal human urine, 5 µg/ml phenol red, 5 mM HEPES, pH 7.3, 50 µg/ml gentamicin, and 100 IU/ml penicillin. The pieces were then homogenized vigorously using a glass tissue grinder until complete tissue disruption. The ratio for each serial dilution of the protocol was three. One hundred microliters/well from each dilution

was dispensed into 16 wells of 96-well flat-bottom culture plates. Each plate was covered with Parafilm® tightly pressed to seal each well, covered with the lid and incubated at 25ºC for ten days. Absorbance at 450 nm was measured with a microtiter Multiscan apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Parasite growth was confirmed concomitantly under an inverted microscope (Zeiss, Jena, Germany). Data were analyzed based on Poisson statistics using the ELIDA software.

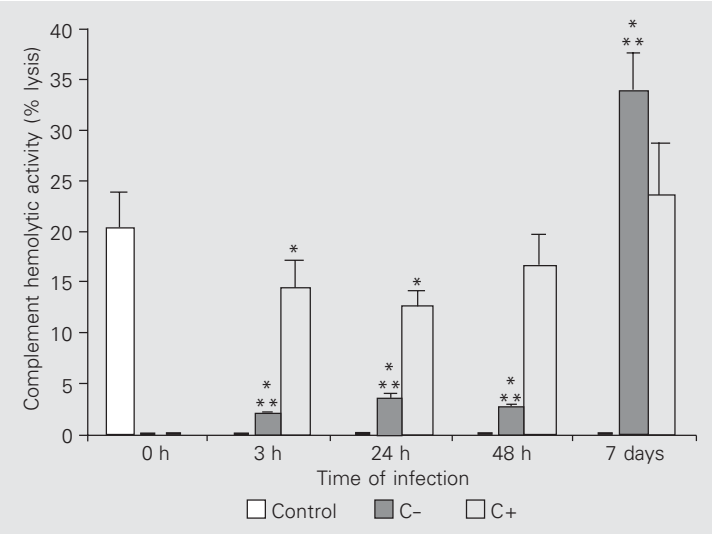


Figure 1. Complement hemolytic activity as percent lysis in the sera of complement-depleted (C–) and complement-non-depleted (C+) BALB/c mice infected with *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* promastigotes. Data are representative of three separate experiments yielding similar results. Data are reported as the mean ± SD for 5 animals per group. *P < 0.05 between control and infected + non-depleted mice and between control and infected + depleted mice. **P < 0.05 between infected + depleted and infected + non-depleted mice (one-way ANOVA).

Table 1. C3 fragment deposits at the *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* subcutaneous inoculation site of complement-depleted (C–) and complement-non-depleted (C+) BALB/c mice at 3, 24, 48 h and 7 days post-infection.

Mouse strain	Groups	Time post-infection			
		3 h	24 h	48 h	7 days
BALB/c	C–	–	–	–	–
	C+	++	++	+	+

The C3 fragment deposit was analyzed by direct immunofluorescence using FITC-conjugated goat anti-mouse C3. The method showed diffuse features in the inflammatory foci and intensity was scored as negative (–), mild (+), moderate (++) and intense (+++) on the basis of the controls. Data are from three separate experiments yielding similar results.

Statistical analysis

The one-way ANOVA multiple range test was used with the SigmaStat Statistical Software version 1.0 to analyze the differences in complement activity in the sera and the morphometric data of the lesion between experimental groups. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Serum complement evaluation

A decrease in complement hemolytic activity in the sera of mice infected with the parasite compared with non-infected controls was observed between 3 and 24 h ($P < 0.05$; Figure 1). At 48 h and at 7 days of infection, the complement activity in the sera was similar to control. Complement-depleted mice compared with non-depleted mice infected with *Leishmania* presented very low serum complement activity at 3, 24 and 48 h ($P < 0.05$). On the 7th day after infection, the complement hemolytic activity was higher in depleted mice than in non-depleted and control mice.

Tissue C3 fragments deposit

The C3 fragment deposit at the parasite inoculation site was diffuse in the inflammatory foci. It was persistent and characterized by a moderate deposit between 3 to 24 h and mild at 48 h and 7 days post-infection in non-depleted mice. In complement-depleted mice, no C3 deposit was observed at 3, 24 and 48 h or at 7 days (Table 1).

Inoculation site histopathology

A significant decrease in the inflammatory response was observed in complement-

depleted mice on the 7th day of infection ($P < 0.05$; Figure 2A), characterized by fewer polymorphonuclear (PMN) cells and mononuclear cells compared with non-depleted mice. The number of parasites was significantly higher in depleted mice on the 7th day of infection ($P < 0.05$; Figure 2B). On the 30th day of infection, the inflammatory process was mostly characterized by mononuclear cells and was similar in both groups. However, more PMN cells were seen in complement-depleted mice. Morphometric analysis showed that parasitism was significantly increased in depleted animals ($P < 0.05$) (Figure 3A,B).

Parasite quantification

The number of viable parasites at the inoculation site was higher in complement-depleted than in non-depleted mice on the 7th and 30th day post-infection ($P < 0.05$; Figure 4).

Discussion

The evolution of the infection in BALB/c mice infected with *L.* (*L.*) *amazonensis* showed a consumption of complement hemolytic activity in the sera at the beginning of the infection, between 3 and 24 h, with recovery from 48 h onwards. The presence of the C3 component at the subcutaneous inoculation site persisted throughout the study period, but varied from moderate to discrete. The activation of the complement system during the acute phase of *Leishmania* infection may contribute to resistance or to sus-

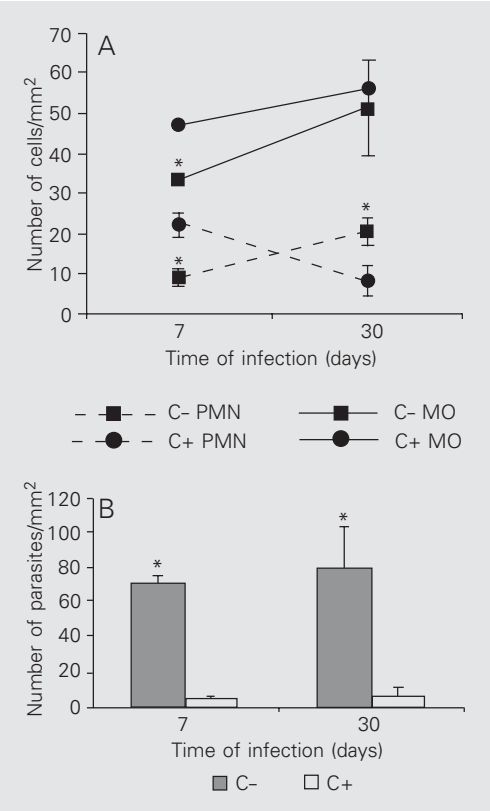


Figure 2. Morphometric analysis of the *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* subcutaneous inoculation site of complement-depleted (C-) and complement-non-depleted (C+) BALB/c mice, showing the inflammatory reaction (A) and the parasite burden of the lesion (B). Data are representative of three separate experiments yielding similar results. Data are reported as the mean ± SD for 5 animals per group. MO = mononuclear cells, PMN = polymorphonuclear cells. *P < 0.05 compared to non-depleted animals (one-way ANOVA).

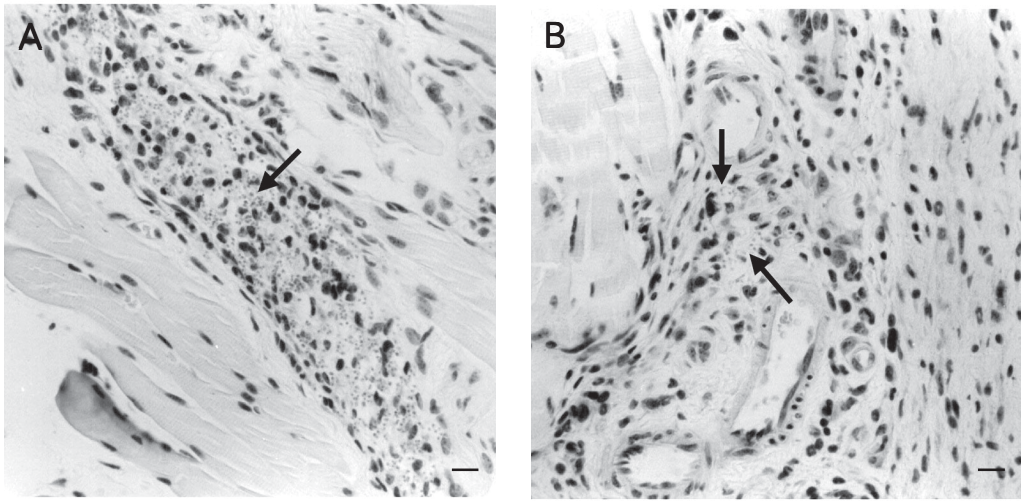


Figure 3. Histopathology of an *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* subcutaneous inoculation site at 7 days post-infection (H&E, magnification 40X). *A*, Complement-depleted mice showing high number of parasites sorounded by inflammatory cells (arrow). *B*, Non-depleted mice showing few parasites in the dermal inflammatory reaction (arrows). Bars = 50 µm.

ceptibility, since parasites inoculated into a vertebrate host lead to an acute inflammatory process with participation of humoral and cellular factors (12). *Leishmania* can activate the classical and alternative complement pathways simultaneously, *in vitro*. C3 binding by *L. amazonensis* promastigotes via the classical and alternative pathways is very rapid, reaching a maximum within 2 to 3 and 3 to 3.5 min, respectively. The real-time kinetics of *Leishmania* promastigote lysis in normal human serum showed that lysis is an extremely rapid reaction and 10% of *L. amazonensis* promastigotes in the stationary phase showed a degree of complement resistance (16).

In vitro experiments have shown that promastigotes of the cutaneous strain of *Leishmania* are susceptible to lysis by normal serum by activation of the complement alternative pathway (4,5). Amastigotes of cutaneous strains are more susceptible to complement lysis than visceral strains, suggesting a specific role of the complement factors limiting the infection in the skin (10). Therefore, complement activation in the early phase of *L.* (*L.*) *amazonensis* infection in BALB/c mice *in vivo*, with systemic consumption and local deposit at the inoculation site, could be a factor acting in parasite destruction on the skin.

Adsorbed normal human serum shows alternative pathway C3 deposition capacity, 89.5% for *L. amazonensis* and 66.3% for *L. donovani*, similar to that seen in normal human serum-EGTA, 86.5% for *L. amazonensis* and 47% for *L. donovani*. Promastigotes preincubated with normal human serum-EDTA or IgM-EDTA, conditions that prevent promastigote mannan-binding lectin (MBL) and C-reactive protein binding, and subsequently incubated with adsorbed normal human serum, trigger classical pathway C3 deposition. In contrast, promastigotes preincubated with IgG-EDTA contribute only 18% of total C3 bound. These data indicate that in normal human serum, natural IgM anti-*Leishmania* antibodies are the main triggering factor for classical pathway activation by promastigotes, and that serum MBL and C-reactive protein do not contribute significantly to this process (16). On the other hand, MBL levels correlated directly with the probability of developing visceral leishmaniasis and affected the functions of *L. chagasi*-infected monocytes since the monocytes infected with MBL-opsonized *Leishmania chagasi* promastigotes secreted high levels of TNF-α and IL-6 (17), cytokines which can inhibit the leishmanicidal capacity of macrophages infected with *L. mexicana* (18,19).

The development of the inflammatory reaction in the early phase of infection could also be considered to be a factor contributing to parasite destruction, since a large number of PMN cells migrate to the inoculation site during the first hours after infection (12). Complement is involved in the phagocytosis of *Leishmania* by PMN cells. *In vitro* experiments have shown that these cells are efficient in killing phagocytized parasites through a high oxidative burst mechanism (20).

In order to establish the role of complement in *L.* (*L.*) *amazonensis* mouse infection, mice were depleted of complement using CVF. The efficiency of CVF was confirmed by the significant decrease in complement activity in the sera when comparing depleted and non-depleted groups in the early

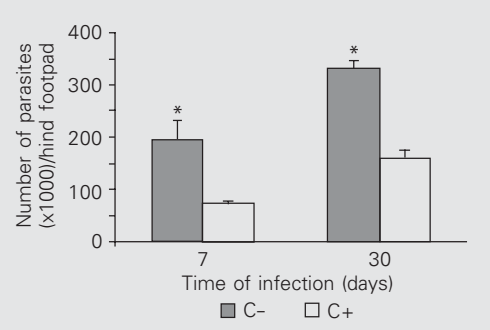


Figure 4. Number of viable parasites in the skin lesion caused by *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* at 7 and 30 days after infection in complement-depleted (C–) and complement-non-depleted (C+) BALB/c mice. Parasites were measured by limiting dilution. Data are representative of three separate experiments yielding similar results. Data are reported as the mean ± SD for 5 animals per group. The 95% confidence intervals showed by low limit (LL) and up limit (UL) were: 7th day of infection, (C–) LL 121.4 and UL 268.1, (C+) LL 60.5 and UL 83.5; 30th day of infection, (C–) LL 266.0 and UL 363.2, (C+) LL 126.9 and UL 190.9. *P < 0.05 compared to non-depleted BALB/c mice (one-way ANOVA).

phase of infection, up to 48 h. The high complement activity by the 7th day of infection in complement-depleted mice compared to non-depleted mice may have occurred due to a high systemic stimulus after intravascular complement activation with CVF, which acts as C3-covertase leading to systemic C3 consumption (21). The complement activity in non-infected, complement-depleted and non-depleted animals did not show significant differences on the 7th day after CVF injection. However, the complement activity in depleted mice was slightly higher than in animals which did not receive CVF (data not shown).

C3 fragments were not detected by direct immunofluorescence in the tissue from depleted mice during the first week after infection, in spite of complement recovery in the sera by the 7th day of infection. Morphometric analysis during the histopathologic examination of the inoculation site showed a decrease in the inflammatory response and an increase in parasite burden in depleted mice late in the acute phase, 7 days post-infection. A limiting dilution assay confirmed these results, since more viable parasites were observed in the skin of depleted animals. These data suggest that the presence of complement at the inoculation site during the early phase of infection could have a role in the control of parasite spreading in BALB/c mice infected with *L.* (*L.*) *amazonensis*, since *in vitro* experiments showed complement activation on the surface of *L. amazonensis* promastigotes leading to extracellular parasite lysis (22,23).

For some species of *Leishmania*, such as *L. major* and *L. enrietti*, the complement-dependent binding of promastigotes to macrophages represents the main mechanism of adhesion. In other species, such as *L. amazonensis*, the binding to macrophages occurs efficiently, even in the absence of serum, and the addition of exogenous complement enhances binding only slightly (24). A significant percentage of these organisms survive within the macrophages, a fact probably due to an inherent resistance of these organisms to macrophage-mediated killing mechanisms.

In order to establish the role of complement during the early phase of *Leishmania* infection in the evolution of disease, the histopathology and parasitism of the lesion were studied on the 30th day of infection. No differences were observed in the number of mononuclear cells between depleted and non-depleted mice, but a higher number of PMN cells was present in the lesions of complement-depleted mice. The number of viable parasites was higher in the lesions of depleted mice. The higher amount of PMN cells in the lesion of complement-depleted mice may be due to a higher parasitism, since fragments of parasites may act as a chemotactic factor for these cells (25) and may represent a late attempt by the host to destroy the parasite.

Differences between visceral and cutaneous parasite strains have been described with respect to both complement pathway activation (26) and effect of *in vitro* lysis by normal serum (5). In experimental visceral leishmaniasis, complement was reported to be an important factor for *L.* (*L.*) *chagasi* promastigotes to escape from the inoculation site to the viscera (12). On the other hand, the present experiments showed that complement has a role in the control of parasite spreading in the cutaneous leishmaniasis lesion caused by *L.* (*L.*) *amazonensis* infection in BALB/c mice.

Acknowledgments

We wish to thank Dr. Hiro Goto for assistance during the initial steps of the work.

References

1. Navin TR, Krug EC & Pearson RD (1989). Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infection and Immunity*, 57: 1343-1346.
2. Dominguez M & Toraño A (1999). Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 189: 25-35.
3. Green PJ, Feizi T, Stoll MS, Thiel S, Prescott A & McConville MJ (1994). Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannam-binding protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 66: 319-328.
4. Mosser DM & Edelson PJ (1984). Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *Journal of Immunology*, 132: 1501-1505.
5. Mosser DM, Burke SK, Contavas EE, Wedgwood JF & Edelson PJ (1986). *Leishmania* species: Mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *Experimental Parasitology*, 62: 394-404.
6. Franke ED, McGrevy PB, Katz SP & Sacks DL (1985). Growth cycle dependent generation of complement resistant *Leishmania* promastigotes. *Journal of Immunology*, 134: 2713-2718.
7. Puentes SM, Sacks DL, Silva RP & Joiner KA (1990). Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglucan. *Journal of Experimental Medicine*, 167: 887-902.
8. Silva RP, Hall BF, Joiner KA & Sacks DL (1989). CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *Journal of Immunology*, 143: 617-622.
9. Sacks DL, Broclin TN & Turco SJ (1990). Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 42: 225-234.
10. Hoover DL, Berger M, Macy CA, Hockmeyer WT & Meltzer MS (1984). Killing of *Leishmania tropica* amastigotes by factors in normal human serum. *Journal of Immunology*, 132: 893-897.
11. Wright SD & Siverstein SC (1983). Receptors for C3b and iC3b promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 158: 2016-2023.
12. Laurenti MD, Corbett CEP, Sotto MN, Sinhorini IL & Goto H (1996). The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *International Journal of Experimental Pathology*, 77: 15-24.
13. Whaley K (1985). Measurement of complement. In: Whaley K (Editor), *Methods in Complement for Clinical Immunologists*. Butler & Tanner Ltd., Frome and London, UK, 77-159.
14. Titus RG, Marchand M, Boon T & Louis JA (1985). A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissue of infected mice. *Parasite Immunology*, 7: 545-555.
15. Lima HC, Bleyenberg JA & Titus RG (1997). A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitology Today*, 13: 80-82.
16. Dominguez M, Moreno I, López-Trascasa M & Toraño A (2002). Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *Journal of Experimental Medicine*, 195: 451-459.
17. de Miranda Santos IKF, Costa CHN, Krieger H et al. (2001). Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 69: 5212-5215.
18. Barral-Netto M, Badaro R, Barral A, Almeida RP, Santos SB, Badaro F, Pedral-Sampaio D, Carvalho EM, Falcoff E & Falcoff R (1991). Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 163: 853-857.
19. Hatzigeorgiou DE, He S, Sobel J, Grabstein KH, Hafner A & Ho JL (1993). IL-6 down-regulates the cytokine-enhanced antileishmanial activity in human macrophages. *Journal of Immunology*, 151: 3682-3692.
20. Pearson RD & Steigbigel RT (1981). Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Immunology*, 127: 1438-1443.
21. Regal JF, Frase DG, Anderson DE & Solem LE (1993). Enhancement of antigen-induced bronchoconstriction after intravascular complement activation with cobra venom factor - Reversal by granulocyte depletion. *Journal of Immunology*, 150: 3496-3505.
22. Barral Neto M, Roters SB, Sherlock I & Reed SG (1987). Destruction of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes by normal human serum. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37: 53-56.
23. Nunes AC, Almeida Campos FR, Horta MF & Ramalho Pinto FJ (1997). *Leishmania amazonensis* promastigotes evade complement killing by interfering with the late steps of the cascade. *Parasitology*, 115: 601-609.
24. Mosser DM & Rosenthal LA (1993). *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Seminars in Cell Biology*, 4: 315-322.
25. Sorensen AL, Kharazmi A & Nielsen H (1989). *Leishmania* interaction with human monocytes and neutrophils: modulation of the chemotatic response. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 97: 754-760.
26. Bogdan C, Rollinghoff M & Solbach M (1990). Evasion strategies of promastigote parasites. *Parasitology Today*, 14: 171-183.

ANEXO-3

The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection

Passero, L.F.D.; **Laurenti, M.D.**; Tomokane, T.Y.; Corbett, C.E.P.; Toyama, M.H.

Parasitology Research 2008; 102(5): 1025-1033

Parasitol Res (2008) 102:1025–1033
DOI 10.1007/s00436-007-0871-6

ORIGINAL PAPER

The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection

Luiz Felipe Domingues Passero · Márcia Dalastra Laurenti · Thaise Y. Tomokane · Carlos Eduardo P. Corbett · Marcos H. Toyama

Received: 28 June 2007 / Accepted: 21 December 2007 / Published online: 8 January 2008
© Springer-Verlag 2007

Abstract In this study, the effect of phospholipase A2 (PLA2) derived from *Crotalus durissus collilineatus* was evaluated in vitro and in vivo on experimental cutaneous leishmaniasis. The promastigote and amastigote forms treated with PLA2 presented increased growth rate. In vivo studies showed that PLA2-treated *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes increased the size of lesions in BALB/c mice, and histopathological analysis showed numerous necrotic regions presenting a higher density of polymorphonuclear, mononuclear, and amastigote cells. Additionally, infected macrophages treated with PLA2 were able to generate prostaglandin E2 (PGE2). Cytokine quantification showed that the supernatant from infected macrophages presented moderate and high amounts of IL-2 and IL-10, respectively. However, in PLA2-treated infected macrophages, suppression of IL-2 levels occurred, but not of IL-10 levels. Observation also revealed that both the supernatant and lysate of *L.* (*L.*) *amazonensis* promastigotes exhibited PLA2 activity, which, in the presence of dexamethasone, showed no reduction in their activities; while glucocorticoid maintained the ability of promastigote forms to infect macrophages, which presented values similar to controls. In conclusion, the results indicate that PLA2 may be a progression factor for cutaneous leishmaniasis, since the PLA2 effect suppressed IL-2 levels and generated PGE2, an inflammatory lipid mediator.

L. F. D. Passero · M. H. Toyama
State University of São Paulo (UNESP),
Campus do Litoral Paulista,
Unidade de São Vicente, São Paulo, Brazil

M. D. Laurenti · T. Y. Tomokane · C. E. P. Corbett
Infectious Diseases Laboratory (LIM-50),
Department of Pathology, University of São Paulo,
Medical School,
São Paulo, Brazil

L. F. D. Passero (✉)
Av. Dr. Arnaldo, 455-1o andar-sala 1221, Cerqueira César,
01246-903 Sao Paulo, SP, Brazil
e-mail: felipepassero@usp.br

Introduction

Leishmania parasites are transmitted to humans and other vertebrates by sandfly bites that inoculate the promastigote forms in the mammalian host, where they are transformed into amastigote forms within antigen-presenting cells, such as macrophages and dendritic cells. There are two main types of the disease, visceral and cutaneous leishmaniasis, the latter type caused by many *Leishmania* species. Leishmaniasis is widespread in 22 countries in the New World and 66 nations in the Old World. The relevance and morbidity of this disease was considered an important health problem by World Health Organization, which, statistically, was shown to be the second main parasitic disease worldwide (Rath et al. 2003).

Leishmania sp. has developed a variety of adaptive mechanisms to live inside the vertebrate host and evade its immune response, such as the inhibition of MHC molecules (De Souza Leao et al. 1995), proinflammatory cytokines (Jardim et al. 1995), and reactive oxygen radicals (Passwell et al. 1994), and these actions are related to many molecules from *Leishmania* parasites.

These molecules, in many cases, can also modify the inflammatory response, through generation of beneficial or nonbeneficial precursors of inflammatory mediators, such as eicosanoids, whose functions in leishmaniasis remain unclear.

However, several studies have demonstrated the critical role of PGE2 in disease progression; moreover, cross regulation occurs between PGE2 and IL-10, a cytokine associated with leishmaniasis pathogenesis (Correa et al. 2007). This lipidic mediator also exerts an inhibitory action, reducing the maturation of dendritic cells and their ability to present antigen (Harizi et al. 2006). Thus evidence exists regarding the negative function of PGE2 in leishmaniasis progression.

Concerning leishmaniasis, many studies have concentrated on the final pathway of prostaglandins, and only a few have observed the role of PLA2, the initial enzyme of the arachidonic acid cascade, in the infection (Dwyer and Gottlieb 1983; Abdala et al. 2000).

PLA2 are present in many cell types and are classified into 12 main groups and several subgroups; however, two major PLA2 types exist, the cytosolic (cPLA2) and the secretory (sPLA2). cPLA2 is located in the cytosol and migrates to the perinuclear membrane and other intracellular compartments of stimulated cells; in contrast, sPLA2 is stored in cytoplasmatic granules and is released into the extracellular environment during appropriate cell activation (Triggiani et al. 2005). These enzymes catalyze the hydrolysis of phospholipids in position sn−2, releasing fatty acids and lysophospholipids. Passero et al. (2007a) showed that *Crotalus durissus* venoms lead to the inhibition of parasite growth; however, *Crotalus durissus collilineatus* venom increased the promastigote growth rate, and PLA2 (belonging to type II-A) present in the crotoxin protein fraction, was responsible for this stimulatory activity. Rattlesnake PLA2 has also been implicated in the production of eicosanoids, which are potent mediators of inflammation (Murakami et al. 1999).

PLA2 from snake venoms have been used as models to explain numerous pathophysiological processes (Rufini et al. 1999), since their structure is similar to human PLA2 (Hernandez et al. 1998).

Due the importance of PLA2 in many physiological processes and the significance of the study of molecules involved in the host/parasite interaction, the aim of this paper was to study the PLA2 enzyme in in vitro and in vivo interactions in experimental cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*.

Materials and methods

Purification of PLA2 from *C. durissus collilineatus* venom

C. durissus collilineatus whole venom (45 mg) was completely dissolved in 0.2 M ammonium bicarbonate buffer (pH 7.9) until complete homogenization, followed by a clarification step using high-speed centrifugation (4,500×*g* for 2 min). The supernatant obtained was recovered and applied on the high-performance liquid chromatography (HPLC) molecular exclusion chromatography column (1× 60 cm, Pharmacia) previously equilibrated with the same buffer used for venom dissolution. The main fractions of the venom were purified by a constant flow rate of 0.3 mL/min, the chromatography run was monitored at $A_{280\ nm}$, and then the crotoxin-like protein was eluted, pooled, and lyophilized for further reverse phase HPLC. The whole crotoxin was subjected to a second chromatographic step using a reverse phase HPLC. This crotoxin was dissolved in 200 μL of TFA 0.1% (buffer A) until complete dissolution, followed by clarification using high-speed centrifugation (4,500×*g* for 3 min). The supernatant was then loaded into a μ-Bondapack C18 reverse phase HPLC column (0.3×30 cm). Elution of the PLA2 was realized using a nonlinear gradient of buffer B (66.6% of acetonitrile in TFA 0.1%) at a constant flow rate of 1.0 mL/min. The chromatographic run was monitored at $A_{214\ nm}$, and the fraction obtained was then lyophilized. The degree of the purity of PLA2 was evaluated by Tricine sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to Laemmli (1970) and mass spectrometry, in a MALD/TOF mass spectrometer (data not shown).

Parasites

L. (*L.*) *amazonensis* promastigotes (MHOM/BR/73/M2269 strain) were isolated from a patient with cutaneous leishmaniasis in Pará, Brazil, and classified by monoclonal antibodies and isoenzymes in the Evandro Chagas Institute, Belém (PA), Brazil. The parasites, maintained in BALB/c mice, were isolated and expanded in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 0.25 mM HEPES, 1% penicillin, and gentamicin for all experiments. The promastigote forms in the stationary phase of growth were used for all experiments.

Macrophage cytotoxicity

Macrophage isolation was carried out according to Sampaio et al. (2006) in all experiments, and the cytotoxicity assay was conducted according to Passero et al. (2007b) with various concentrations of PLA2: 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, or 32 μg/mL for 24 h.

Macrophage culture and infection

Approximately 1×10^5 BALB/c mice peritoneal macrophages were placed in a 96-well plate in RPMI medium. *L.* (*L.*) *amazonensis* promastigotes in the stationary phase of culture growth were added with PLA2 to the macrophage monolayers at a ratio of ten parasites to one macrophage, followed by incubation of the culture in 5% CO_2 at 35°C.

After 24 h, the plate was washed three times with phosphate buffer (PBS) at 25°C to remove noninternalized promastigotes, and new culture medium was added at 25°C. After this step, PLA2 was added at different concentrations (1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, and 32.0 μg/mL), and PBS was added to the controls. After 24 h of treatment, ELISA in situ was carried out according to Piazza et al. (1994) with some modifications. The plates were fixed with methanol for 10 min, followed by three washes with PBS plus 0.05% Tween 20 (PBST). The wells were blocked with skimmed milk for 120 min at 37°C in a humidified atmosphere; next the hyperimmune serum of the patient presenting cutaneous leishmaniasis caused by *L.* (*L.*) *amazonensis* was added for 60 min at 37°C, and the wells were then washed three times with PBST. Goat anti-human IgG antibody (Sigma A3150) conjugated with alkaline phosphatase was used at a dilution of 1:1,000 in PBST for 45 min at 37°C. Finally, the plate was washed three times with PBST and a chromogenic substrate, *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma N9389) dissolved in carbonate–bicarbonate buffer 0.1 M, pH 9.6, was added. The reaction was performed for 60 min at room temperature, and the plate was read at 405 nm. Prior to these studies, our group standardized the ELISA in situ methodology using *L.* (*L.*) *amazonensis* and the serum used herein with successful results.

Sample preparation and measurement of PLA2 activity of supernatant and lysate from *L.* (*L.*) *amazonensis*

To verify whether the promastigote forms presented PLA2 activity, the parasites maintained in RPMI medium were harvested by centrifugation at 3,000 rpm at 4°C for 10 min, and the resulting supernatant was stored at −80°C until use. The pellet, containing 5.0×10^8 parasite/mL, was washed twice in PBS and lysed by 3 cycles of freezing and thawing in liquid nitrogen. The lysate was sterilized using a 0.22-μm membrane filter, and the supernatant was concentrated under vacuum pressure. Protein quantification was realized according to the Lowry method (Lowry et al. 1951), and the protein concentrations were adjusted to 1.0 mg/mL. Measurement of enzymatic activity was realized according to the method described by Holzer and Mackessy (1996), adapted to a 96-well plate. The assay solution consisted of 200 μL of buffer (10 mM Tris–HCl, 10 mM $CaCl_2$, 100 mM NaCl, pH 8.0), 20 μL of substrate (4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid; 4N3OBA), 20 μL of lysate or supernatant from *L.* (*L.*) *amazonensis* promastigotes, and 20 μL of Milli-Q water at a final volume of 260 μL. Dexamethasone (10 μg/mL) was used to verify whether enzymatic activity had been abolished. The assays were conducted at 35°C, and absorbance was read at 405 nm using a microplate reader. Enzymatic activity was calculated based on the absorbance values before 60 min of incubation time. The blanks were realized with RPMI medium under the same experimental concentrations of the *L.* (*L.*) *amazonensis* supernatant and showed no reaction with the substrate.

Attempts to inhibit the PLA2 from *L.* (*L.*) *amazonensis* in the infection (in vitro)

Once the PLA2 activity from *L.* (*L.*) *amazonensis* had been verified, attempts were made to inhibit *L.* (*L.*) *amazonensis* PLA2 prior to macrophage infection. For this purpose, the parasites were treated with 10 μg/mL of dexamethasone for 24 h, after which they were washed three times at 3,000 rpm at 4°C for 10 min, and their concentration was adjusted to ten parasites/macrophages (for details, see "Macrophage culture and infection"). After 24 h, ELISA in situ was performed to verify whether the infection has been inhibited (for details, see "Macrophage culture and infection").

Measurement of PGE2, IL-2, and IL-10 levels

Prostaglandin E2 was assayed in the supernatant of infected macrophage cultures that were stimulated with 10.0 PLA2 μg/mL using commercial kits (Amershan, RPA 530) or remained unstimulated, as previously described by Salmon (1978). IL-2 and IL-10 were assayed in the supernatant of macrophages infected with *L.* (*L.*) *amazonensis* and of infected macrophages treated with 10.0 μg/mL of PLA2. The IL-2 and IL-10 levels were measured by capture ELISA (B&D Bioscience), according to the manufacturer's instructions. IL-4 and IFN-γ levels were below the detection limit of the kit.

In vivo assay

L. (*L.*) *amazonensis* promastigotes were treated with 32 μg/mL PLA2 for 24 h. After this time, the parasites were washed three times at 3,000 rpm at 4°C for 10 min. The concentration was adjusted to 2×10^6 parasite/mL. Briefly, six BALB/c/group mice were inoculated subcutaneously with 10^5 *L.* (*L.*) *amazonensis* promastigotes into the hind footpads. The lesion sizes were measured weekly, and any histopathological changes were studied at day 40 of infection, when the animals were euthanized and biopsies from the hind footpads were collected. They were fixed in paraformaldehyde and embedded in paraffin. Semi-thin sections were obtained and stained with hematoxylin–eosin for histopathological analysis. Immunohistochemistry was performed to quantify the amastigotes in the BALB/c lesions, according to Tafuri et al. (2004), using a polyclonal anti-Leishmania serum produced in the dog as the primary antibody, followed by a LSAB kit (Dako, USA). This methodology showed no nonspecific coloration, and the images were acquired by a microscope coupled to an image

system. After acquisition and cell counting, several images were selected to mount the photomicrographs. Statistical analysis was performed by counting 30 fields in six different slides using an AxioVision 4.1 (Zeiss) image analyzer to calculate the mean ± standard deviation.

Statistical analysis

All the experiments were realized three times, and the results were expressed as means ± standard deviation. Data were analyzed using Student's *t*-test. The level of significance was set at $p<0.05$.

Results

C. durissus collilineatus venom fraction

The whole venom was submitted to different chromatographic steps, the first of which was molecular exclusion chromatography, which permitted purification of the whole crotoxin, as shown in Fig. 1a (grey peak), and was positive for PLA2 activity (line with circles). After this initial purification step, the whole crotoxin was purified by reverse phase HPLC, and the enzymatic activity of PLA2 proved positive (grey peak; Fig. 1b). SDS-PAGE electrophoresis showed that PLA2 purification led to a high degree of purity (Fig. 1c).

Cytotoxicity assay and evaluation of PLA2 in in vitro macrophage infection

Under all the conditions studied, no modification in cell viability was observed, as shown by the MTT assay (Fig. 2b). All the PLA2 concentrations used in this experiment induced an increase in the number of amastigotes inside the macrophages. This was shown by an increase in absorbance values after the incubation period. According to these results, 1.0 μg/well of PLA2 stimulated the greatest growth of amastigotes within the macrophages (Fig. 2a).

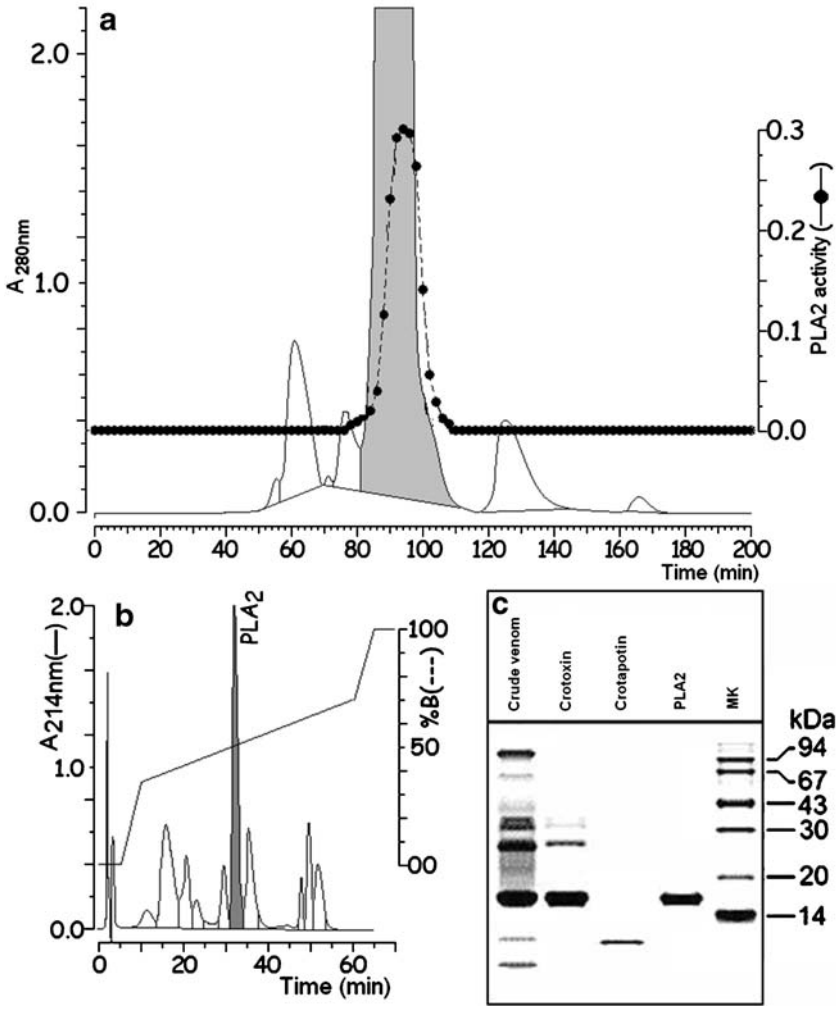


Fig. 1 The figure shows the purification steps of PLA2 derived from *C. durissus collilineatus* whole venom. **a** Molecular exclusion HPLC in which crotoxin was isolated. **b** Reverse phase HPLC in which PLA2 was isolated. **c** Electrophoretic profile of each of the PLA2 purification steps

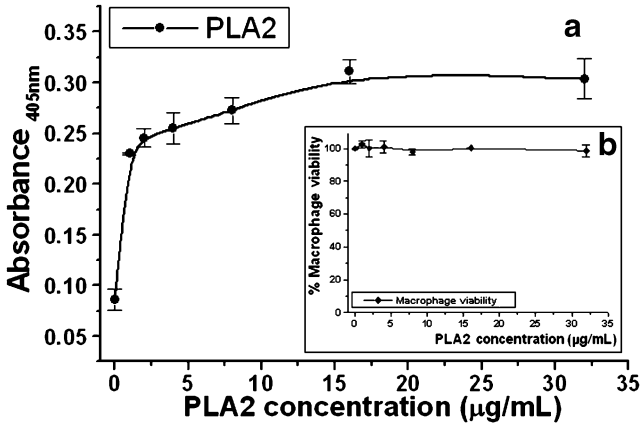


Fig. 2 No PLA2 proved cytotoxic in peritoneal macrophages of mice BALB/c, in the concentrations studied (**b**). PLA2 derived from *C. durissus collilineatus* venom induced an increase in amastigotes within macrophages. This assay verified that 1.0 μg/well of PLA2 induced a higher growth rate of amastigotes inside macrophages (**a**). (N=3, p<0.05)

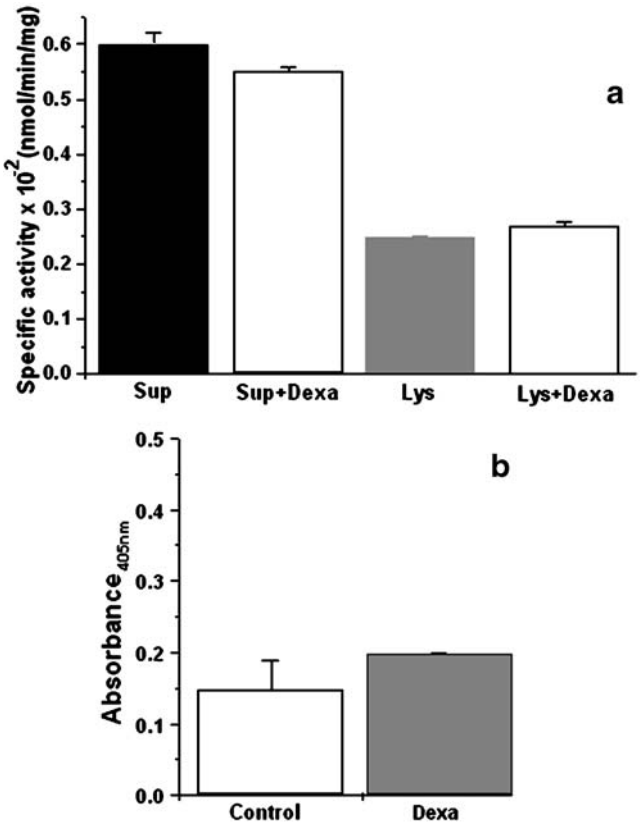


Fig. 3 Higher enzymatic activity was detectable in the supernatant (*Sup*) than the lysate (*Lys*) derived from promastigote forms. Inhibition analysis showed that dexamethasone (*Dexa*) was incapable of inhibiting the PLA2 activity of the supernatant or lysate derived from *L.* (*L.*) *amazonensis* (**a**). In addition, dexamethasone could not inhibit the infection by *L.* (*L.*) *amazonensis* in peritoneal macrophages (**b**). (N=3, p<0.05)

Measurement of PLA2 activity and inhibition assays with dexamethasone

The results showed that the supernatant presented a higher specific activity (about 0.60×10^{-2} nmol/min/mg protein), while that of the lysate was approximately 0.25×10^{-2} nmol/min/mg protein. Dexamethasone was unable to inhibit the PLA2 activity of either the supernatant or the lysate derived from *L.* (*L.*) *amazonensis* promastigotes (Fig. 3a).

Promastigote forms were treated with dexamethasone in an attempt to inhibit the PLA2 of the parasite itself. Analysis showed that the inhibitor was capable of diminishing the infection. Surprisingly, the treatment actually increased infection severity (Fig. 3b).

Measurement of PGE2, IL-2, and IL-10 in the supernatant of macrophages stimulated with PLA2

After 24 h of treatment, the supernatant of macrophages was collected and used to test the levels of IL-2, IL-10, and PGE2. The IL-2 levels were moderate in infected macrophages (17.0 pg/mL); however, infected macrophages treated with PLA2 presented reduced IL-2 levels (2.0 pg/mL; Fig. 4a). The IL-10 levels in infected macrophages and PLA2-treated infected macrophages showed similar values, around 120 pg/mL (Fig. 4b). The PLA2-treated infected macrophages presented higher levels of PGE2 in the supernatant (20 pg/mL) than the infected macrophages (8 pg/mL; Fig. 4c).

In vivo assay

After promastigote treatment with PLA2 (32 μg/mL), the parasites were used to infect BALB/c mice. Measurements of the lesion size showed that PLA2-treated promastigotes induced a greater lesion than that found in the control group after 25 days of infection (Fig. 5). At 45 days postinfection, the mice were sacrificed, and the histopathological analysis of the control group showed a high diffuse inflammatory infiltrate (Fig. 6a) with densities of 1,890 polymorphonuclear cells/mm^2 and 5,165 mononuclear cells/mm^2 (Fig. 6d). The mononuclear cells (Fig. 6c, black arrows) showed vacuoles with a density of 30,000 amastigotes/mm^2 (Fig. 6c, white arrows and e); a few necrotic regions occurred (Fig. 6a, white arrows). The histopathological analysis of BALB/c mice infected with PLA2-treated promastigotes showed a higher diffuse inflammatory infiltrate (Fig. 7a) with densities of 3,269 polymorphonuclear cells/mm^2 and 7,850 mononuclear cells/mm^2 (Fig. 7d). The mononuclear cells (Fig. 7c, black arrows) showed large vacuoles with a density of 50,000 amastigotes/mm^2 (Fig. 7c, white arrows and e). Diffuse necrotic areas occurred in the tissue (Fig. 7a, white arrows).

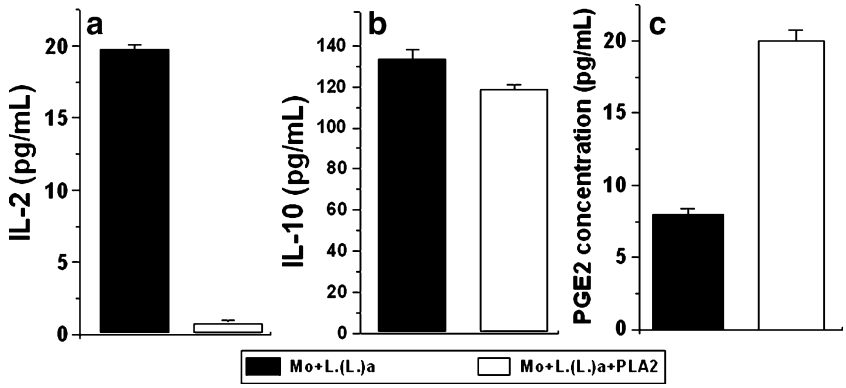


Fig. 4 Infected macrophages treated with PLA2 presented reduced levels of IL-2 compared to infected macrophages (**a**). IL-10 levels were similar in both groups (**b**). PGE2 levels were twofold higher in infected PLA2-treated macrophages than in infected macrophages (**c**). (N=3, p<0.05)

Discussion

The analysis of chromatographic profiles showed that PLA2 enzymes are the main representative of *C. durissus collilineatus* venom (about 60%), as shown by chromatograms and electrophoresis analyses. Numerous studies have characterized PLA2 from other crotalic venoms and found similar biochemical profiles (Ponce-Soto et al. 2002; Beghini et al. 2000).

Enzymatic activity indicates the presence of an enzyme in biological samples; thus, specificity exists between the substrate and the enzyme. PLA2 activity in the supernatant and lysate derived from *L.* (*L.*) *amazonensis* promastigotes was verified; however, specific activities were different between the samples, and the use of dexamethasone was unable to inhibit enzymatic activity. Thus, these results suggest the existence of PLA2 in *L.* (*L.*) *amazonensis* promastigotes. *Trypanosoma cruzi*, a protozoan parasite evolutionarily related to *Leishmania* sp., presents different types of phospholipases linked to cellular membrane remodeling and the invasion process (Bertello et al. 2000; Bronia et al. 1999).

Other eukaryotic pathogens also use phospholipases in the infectious process, such as *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, and *Entamoeba histolytica* (Vargas-Villarreal et al. 1998), and to verify the real action of PLA2 in these parasites, others researchers used exogenous PLA2 in the culture medium, similar to the work described here. The addition of PLA2 to *T. gondii*-infected fibroblasts increased the infection; in contrast, PLA2 inhibition drastically decreased the infection (Saffer et al. 1989). Moreover, it was verified that the lysate of *T. gondii* was capable of initiating arachidonic acid, as well as inflammatory metabolite release by lipoxygenase and cyclooxygenase pathways (Thardin et al 1993). In *C. parvum*, a similar profile was verified, the parasite lysate displayed PLA2 specific activity, and the use of an inhibitor was also capable of reducing the infection in the host cell in a dose-dependent manner. The authors also discussed its role in the host cell lyses and in the induction of inflammatory response (Pollok et al. 2003).

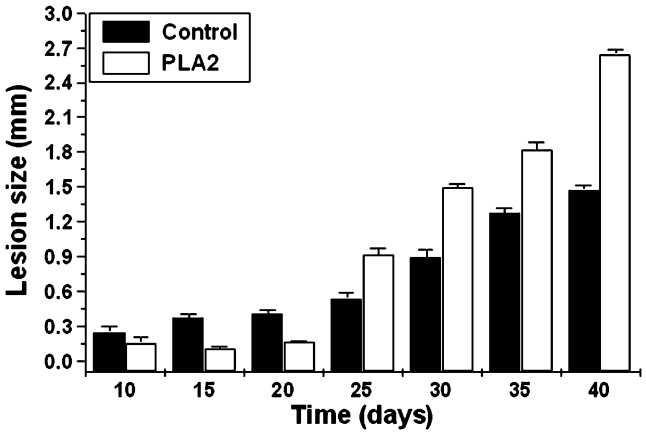


Fig. 5 PLA2-treated promastigotes induced a greater lesion size 25 days postinfection than that found in the control group

It is likely that PLA2 in *L.* (*L.*) *amazonensis* infection acts similarly to PLA2 from other protozoan parasites; therefore, a large increase in amastigotes within macrophages occurred when treated with PLA2 derived from *C. durissus collilineatus.* Moreover, these results indicate that this enzyme participates in the infection process, more specifically in disease progression; thus, the infected macrophages treated with PLA2 derived from *C. durissus collilineatus* were capable of generating larger amounts of PGE2, an inflammatory mediator related to disease progression, and in PLA2-treated infected macrophages, low levels of IL-2 and high levels of IL-10 were observed. PGE2 can down-regulate the levels of IL-2 mRNA (Yamamoto et al. 1986) and up-regulate IL-10 levels in macrophages (Strassmann et al. 1994) and both cytokines are related to leishmaniasis cure and progression, respectively.

Several studies demonstrated the importance of PGE2 in leishmaniasis progression. Matte et al. (2001) observed that human monocytes infected with *L. mexicana* produced high amounts of PGE2. An analogous profile was found in BALB/c mice spleen cells (Perez-Santos and Talamas-Rohana 2001). In experimental infections in vivo with

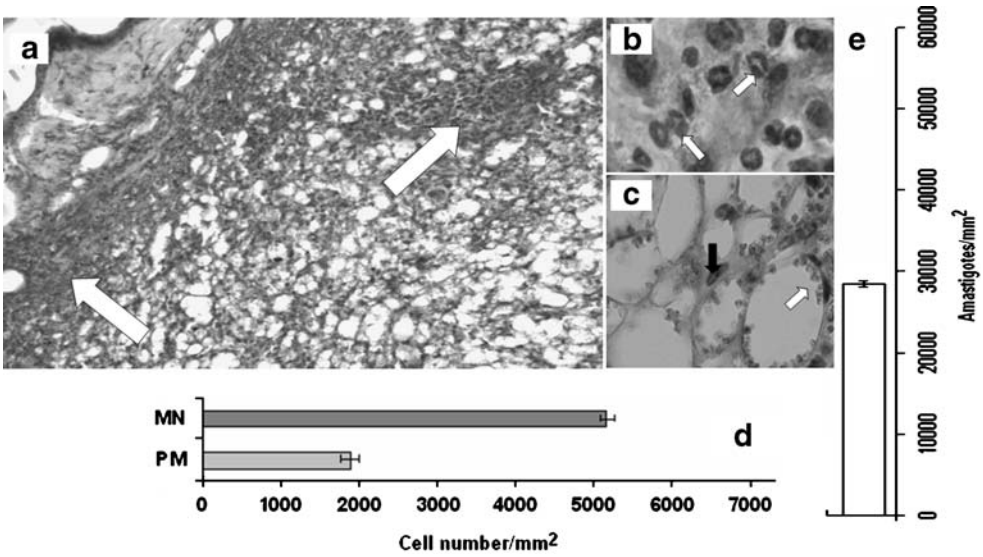


Fig. 6 **a** A few necrotic regions (*white arrows*) in the control group. **b** The polymorphonuclear cells (*white arrows*). **c** Amastigote forms in the biopsies (*white arrows*) and the *black arrows* show the macrophage nuclei. **d** The mononuclear and polymorphonuclear cell densities and **e** the amastigotes density

Leishmania sp., large amounts of macrophage depressor factors, including PGE2, were also found (Bogdan and Röllinghoff 1999). These studies also showed that certain eicosanoid cascade inhibitors, such as indomethacin, can modify the immune response toward Th1 response.

The data presented here indicate that dexamethasone was incapable of inhibiting the PLA2 derived from promastigote forms and, consequently could not reduce the infection. Several studies have demonstrated that it is not a good drug against leishmaniasis (Gangneux et al. 1999) and that in the treatment of dogs presenting leishmaniasis, an increase in the infection through immune system inactivation has been observed (Poot et al. 2005).

The in vivo experiments showed that *L.* (*L.*) *amazonensis* promastigotes treated with PLA2 induced a greater lesion size, and the histopathological analysis showed that larger regions of necrosis occurred, with a greater density of mononuclear, polymorphonuclear, and amastigote cells than in the control group. Many studies have shown that polymorphonuclear cells play a role in disease progression. When an infected sandfly bites a mammalian, the neutrophils are the first cells at the site of infection, and after phagocytosis, *Leishmania* sp. inhibits the microbicidal activity of neutrophils, also the protozoan inhibits their apoptosis. Two to 3 days after infection, macrophages enter the infection site and phagocytose the apoptotic infected neutrophils. This phagocytosis process does not activate the microbicidal activity of macrophages; thus, this is a path for silent entry into the macrophages, like the concept of the Trojan horse (Laskay et al. 2003).

High densities of inflammatory cells, such as neutrophil, eosinophil, and monocyte cells are present at the subcutaneous inoculation site of *Leishmania* sp.; moreover, these cells express different types of PLA2, whose collection can generate high amounts of eicosanoids, which cause worsening of the infection. Furthermore, several groups of PLA2 (such as V and XII, for example) are important in the differentiation, recruitment, and activation of Th-2 cells

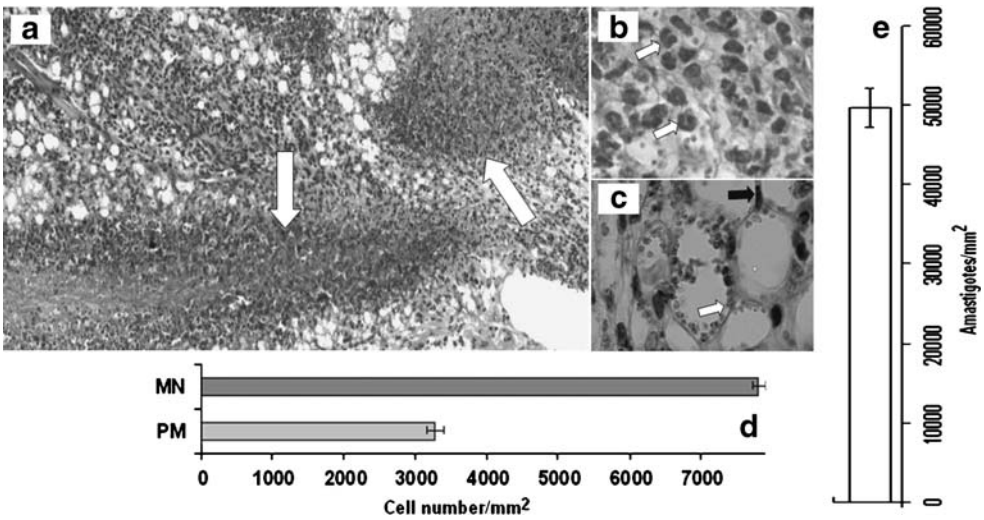


Fig. 7 **a** Many necrotic regions (*white arrows*) in the PLA2 group. **b** The polymorphonuclear cells (*white arrows*). **c** Amastigote forms in the biopsies (*white arrows*) and the *black arrows* show the macrophage nuclei. **d** The mononuclear and polymorphonuclear cell densities and **e** the amastigotes density

associated with leishmaniasis progression (Triggiani et al. 2005).

Due to the spread of PLA2 in different cells, inhibitors can be a useful alternative for treatment. Recently, several inhibitors were successfully used in pathophysiological processes (Assogba et al. 2005; Woodruff et al. 2005; Snyder et al. 1999) and could be used in leishmania infections.

In conclusion, the results shown herein indicate that PLA2 appears to be a progression factor for cutaneous leishmaniasis, since PLA2-treated macrophages presented increased PGE2 levels and inhibited IL-2 levels, a cytokine associated with Th-1 response. PGE2 could be generated by the PLA2 parasite itself, since PLA2 activity was found in both the supernatant and lysate from *L.* (*L.*) *amazonensis* and its action may be associated with an immunosuppressant role. Further chromatographic analysis will be performed to purify the PLA2 from *L.* (*L.*) *amazonensis* to continue studying its biochemistry profile, as well as the homology between PLA2 of other human pathogens.

Acknowledgments This project was supported by the FAPESP (04/04773-5) and LIM-50. The determination of prostaglandin E2 was supported by the laboratory of Suzana B. V. de Mello, Ph.D. (Medical School, Sao Paulo University).

References

Abdala H, Robert JM, Le Pape P, Wielgosz G, Robert-Piessard S, Le Baut G (2000) Synthesis and antileishmanial activity of new 1-(pyridin-2-yl)imidazolidin-2-ones derived from 2-amino-4, 6-dimethylpyridine. Arzneimittelforschung 50:479–484

Assogba L, Ahamada-Himidi A, Habich NM, Aoun D, Boukli L, Massicot F, Mounier CM, Huet J, Lamouri A, Ombetta JE, Godfroid JJ, Dong CZ, Heymans F (2005) Inhibition of secretory phospholipase A2. 1—Design, synthesis and structure–activity relationship studies starting from 4-tetradecyloxybenzamidine to obtain specific inhibitors of group II sPLA2s. Eur J Med Chem 40:850–861

Barreto-de-Souza V, Pacheco GJ, Silva AR, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Saraiva EM, Bou-Habib DC (2006) Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. J Infect Dis 194:846–854

Beghini DG, Toyama MH, Hyslop S, Sodek L, Novello JC, Marangoni S (2000) Enzymatic Characterization of a novel phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maracambóia) Venom. J Protein Chem 19:603–607

Bertello LE, Alves MJ, Colli W, de Lederkremer RM (2000) Evidence for phospholipases from *Trypanosoma cruzi* active on phosphatidylinositol and inositolphosphoceramide. Biochem J 345:77–84

Bogdan C, Rollinghoff M (1999) How do protozoan parasites survive inside macrophages? Parasitol Today 15:22–38

Bronia DH, Pereira BM, Lujan HD, Fretes RE, Fernandez A, Paglini PA (1999) Ganglioside treatment of acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice promotes long-term survival and parasitological cure. Ann Trop Med Parasitol 93:341–350

Correa AP, Dossi AC, de Oliveira VR, Munari DP, de Lima VM (2007) Evaluation of transformation growth factor beta(1), interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. Vet Parasitol 28:267–274

De Souza Leao S, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC (1995) Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. J Cell Sci 108:3219–3231

Dwyer DM, Gottlieb M (1983) The surface membrane chemistry of *Leishmania*: its possible role in parasite sequestration and survival. J Cell Biochem 23:35–45

Gangneux JP, Chau F, Sulahian A, Derouin F, Garin YJ (1999) Effects of immunosuppressive therapy on murine *Leishmania infantum* visceral leishmaniosis. Eur Cytokine Netw 10:557–569

Harizi H, Juzan M, Grosset C, Rashedi M, Gualbe N (2006) Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. Cell Mol Immunol 3:271–277

Hernandez M, Burilo SL, Crespo MS, Nieto ML (1998) Secretory phospholipase A2 activates the cascade of mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A2 in the human astrocytoma cell line 1321N1. J Biol Chem 2:606–612

Holzer M, Mackessy SP (1996) An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. Toxicon 34:1149–1155

Jardim A, Funk V, Caprioli RM, Olafson RW (1995) Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. Biochem J 1:307–313

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 15:680–685

Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W (2003) Neutrophil granulocytes—Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? Trends Microbiol 11:210–214

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275

Matte C, Maion G, Mourad W, Olivier M (2001) *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. Parasite Immunol 23:177–184

Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Higashino K, Arita H, Horiguchi M, Arita M, Arai H, Inoue K, Kudo I (1999) Different functional aspects of the group II subfamily (types IIA and V) and type X secretory phospholipases A(2)s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin regulation. Implication of cyclooxigenase-2 induction and phospholipids scramblase-mediated cellular membrane perturbation. J Biol Chem 29:31435–31444

Passero LFD, Tomokane TY, Corbett CEP, Laurenti MD, Toyama MH (2007a) Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. Parasitol Res 101:1365–1371

Passero LFD, Castro AA, Tomokane TY, Kato MJ, Paulinetti TF, Corbett CE, Laurenti MD (2007b) Anti-leishmania activity of semi-purified fraction of *Jacaranda puberula*. Parasitol Res 101:677–680

Passwell JH, Shor R, Smolen J, Jaffe CL (1994) Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. Int J Exp Pathol 75:277–284

Perez-Santos JL, Talamas-Rohana P (2001) In vitro indomethacin administration upregulates interleukin-12 production and polarizes the immune response towards a Th1 type in susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*. Parasite Immunol 23:599–606

Piazza RM, de Andrade Junior HF, Umezawa ES, Katzin AM, Stolf AM (1994) In situ immunoassay for the assessment of *Trypanosoma cruzi* interiorization and growth in cultured cells. Acta Trop 57:301–306

Pollok RC, McDonald V, Kelly P, Farthing MJ (2003) The role of *Cryptosporidium parvum*-derived phospholipase in intestinal epithelial cell invasion. Parasitol Res 90:181–186

Ponce-Soto LA, Toyama MH, Hyslop S, Novello JC, Marangoni S (2002) Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom. J Protein Chem 21:131–136

Poot J, Rogers ME, Bates PA, Vermeulen A (2005) Detailed analysis of an experimental challenge model for *Leishmania infantum* (JPC strain) in dogs. Vet Parasitol 10:41–53

Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesús MN, Marzal PC, Andrade-Junior HF, Tempone AT (2003) Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado de arte. Quím Nova 26:550–555

Rufini S, De Vito P, Balestro N, Pescatori M, Luly P, Incerpi S (1999) PLA2 stimulation Na^+/H^+ antiport and proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Am J Physiol 277:814–822

Saffer LD, Long Krug SA, Schartzman JD (1989) The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. Am J Trop Med Hyg 40:145–149

Salmon JA (1978) A radioimmunoassay for 6-keto-prostaglandin F1alpha. Prostaglandins 15:383–397

Sampaio SC, Santos MF, Costa EP, Rangel-Santos AC, Carneiro SM, Curi R, Cury Y (2006) Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. Toxicon 15:909–919

Snyder DW, Bach NJ, Dillard RD, Draheim SE, Carlson DG, Fox N et al (1999) Pharmacology of LY315920/S-5920, [[3-(aminooxoacetyl)-2-ethyl-1-(phenylmethyl)-1*H*-indol-4-yl]oxy] acetate, a potent and selective secretory phospholipase A2 inhibitor: a new class of anti-inflammatory drugs, SPI. J Pharmacol Exp Ther 288:1117–1124

Strassmann G, Patil-Koota V, Finkelman F, Fong M, Kambayashi T (1994) Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. J Exp Med 180:2365–2370

Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Goncalves R, de Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL (2004) An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. J Immunol Methods 292:17–23

Thardin JF, M, Rini C, Beraud M, Vandaele J, Frisach MF, Bessieres MH, Seguela JP, Pipy B (1993) Eicosanoid production by mouse peritoneal macrophages during *Toxoplasma gondii* penetration: role of parasite and host cell phospholipases. Infect Immun 61:1432–1441

Triggiani M, Granata F, Giannattasio G, Marone G (2005) Secretory phospholipases A2 in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes. J Allergy Clin Immunol 116:1000–1006

Vargas-Villarreal J, Olvera-Rodriguez A, Mata-Cardenas BD, Martinez-Rogriguez HG, Said-Fernandez S, Alagon-Cano A (1998) Isolation of an *Entamoeba histolytica* intracellular alkaline phospholipase A2. Parasitol Res 84:310–314

Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Newman ML, Ross PA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM (2005) A potent and selective inhibitor of group IIa secretory phospholipase A2 protects rats from TNBS-induced colitis. Int Immunopharmacol 5: 883–892

Yamamoto Y, Ohmura T, Kawakami K, Onoue K, Hidaka H (1986) Induction and regulation of human interleukin 2 gene expression: significance of protein kinase C activation. J Biochem (Tokyo) 100:333–340

ANEXO-4

Insulin-like growth factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis

Gomes, C.M.C.; Goto, H.; da Matta, V.L.R.; **Laurenti, M.D.**; Gidlund, M.A.; Corbett, C.E.P.

International Journal of Experimental Pathology 2000; 81: 249-255

Int. J. Exp. Path. (2000), **81**, 249–255

Insulin-like Growth Factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis

CLÁUDIA MARIA DE C. GOMES*,§, HIRO GOTO†, VANIA LÚCIA RIBEIRO DA MATTA*, MÁRCIA DALASTRA LAURENTI*, MAGNUS GIDLUND‡ AND CARLOS E.P. CORBETT*

** Laboratory of Pathology of Infectious Diseases, † Department of Preventive Medicine, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, ‡ Department of Pathology, Medical School of University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, and § Department of Pathology, University of Maranhao, Maranhao, Brazil*

Received for publication 29 October 1999
Accepted for publication 16 May 2000

Summary. While the control or progression of leishmaniasis depends on host immune responses, the initial inflammatory process represents a key event. This process involves the participation of several cytokines and growth factors induced during inflammation as well as factors already present at the site of infection such as insulin-like growth factor (IGF)-I. We have previously demonstrated a potential role for IGF-I in experimental cutaneous leishmaniasis based on the significant increase in lesion size seen in mice injected with *Leishmania* promastigotes preactivated with IGF-I. In the present study we show that preactivation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes with IGF-I induces an increase in the actual number of parasites at the lesion site from seven days postinfection, in addition to a more intense inflammatory infiltrate. There was a higher numerical density of polymorphonuclear neutrophils from 3 to 24 h, and of mononuclear cells from 48 h of infection onward. A higher density of polymorphonuclear neutrophils and mononuclear cells harboring parasites was also observed. The most important observation, however, was that more parasites per cell were present, revealing that IGF-I appears to favour parasite growth within the macrophages. These results strongly suggest an important role for IGF-I in the development of cutaneous leishmaniasis, where it influences both the inflammatory process and parasite growth.

Keywords: growth factor, inflammation, pathology, morphometry, phagocytosis.

Correspondence: Cláudia Gomes, Faculdade de Medicina da USP, Departamento de Patologia, Av Dr Arnaldo 455 sala 1209, 01246–903, São Paulo, Brazil. Fax: 55–11–881–7799; E-mail: ccorbett@usp.br

Leishmaniasis is an important public health concern in many countries and is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). The host–parasite interaction begins when *Leishmania* parasites are injected into the

© 2000 Blackwell Science Ltd

skin of the mammalian host by the sand fly. The evolution of infection depends on innate and specific immune responses of the host (Reiner & Locksley 1995). The initial inflammatory events involve the participation of factors induced during infection such as transforming growth factor β (Barral-Neto *et al.* 1992), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Barcinski *et al.* 1992) and TNF-α (Bogdan *et al.* 1990) as well as factors constitutively present such as IGF-I (Goto *et al.* 1998).

Since IGF-I is present in the blood, in many tissues and particularly in macrophages (Nagaoka *et al.* 1990; Arkins *et al.* 1993), it is one of the first factors encountered by the *Leishmania* promastigotes as soon as they are injected into the skin, and subsequently after internalization by macrophages. IGF-I is a polypeptide stimulating proliferation and differentiation of a wide variety of cell types (Jones & Clemmons 1995). IGF-I has been shown to affect cell metabolism and to be an important endocrine factor in inflammation, immune activation, and wound healing (Kratz & Gidlund 1993; Jones & Clemons 1995). Most cell types have the ability to produce IGF although the main site of production is the liver. It is detectable both in circulation and in the tissues.

The biological importance of IGF-I to *Leishmania* has been demonstrated by our observations showing that IGF-I induces a rapid growth response in *Leishmania* promastigotes and in cell-free amastigotes *in vitro*; IGF-I binds specifically to *Leishmania* and induces phosphorylation of intracellular molecules on stimulation (Gomes *et al.* 1997; Gomes *et al.* 1998; Goto *et al.* 1998).

In the initial *in vivo* study, we observed a significant increase in lesion size and in number of parasites in skin sections from mice injected with *Leishmania* promastigotes preactivated with IGF-I (Goto *et al.* 1998). However *in vivo* interactions are complex and IGF-I has a pleiotropic effect affecting metabolism and cell proliferation and differentiation (Kratz & Gidlund 1993; Jones & Clemmons 1995).

To distinguish between the effect of IGF-I on the parasite and on the host cells, we now provide a more detailed analysis of the effect of IGF-I on both inflammation and parasites. In the present study in mice injected with *L. (L.) amazonensis* preactivated with IGF-I, we observed an increase in lesion size related to the increase in the number of parasites, and an increase in the inflammatory cell infiltrate at the inoculation site. We also provide clear evidence that parasites pre-incubated with IGF-I affect the parasite–host interaction, favouring parasite growth within the macrophages.

Materials and methods

Mice. 6–10-week-old, inbred, BALB/c strain mice of both sexes were obtained from our breeding facility at the Medical School of the University of Sao Paulo and were maintained in our laboratory during the experiments.

Parasites. Leishmania (Leishmania) amazonensis, HSJD-1 strain, was isolated from a patient in Costa Rica and kindly characterized by Prof. J. J. Shaw (Instituto Evandro Chagas, Brazil) according to its reactivity to monoclonal antibodies specific for *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis* and for the subgenus *Viannia*. The strain was also characterized by Dr S.R. Uliana (Department of Parasitology, ICB, University of São Paulo, Brazil) according to its reactivity to subunit ribosomal DNA probes for *L. amazonensis* and the subgenus *Viannia* (Uliana *et al.* 1994). Parasites were maintained at 25 °C in NNN (Novy, Nicole, McNeal) medium overlayered by RPMI 1640 medium (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) and supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) (W.L. Imunoquímica, Rio de Janeiro, Brazil). The parasites were inoculated periodically *in vivo* in the footpad of BALB/c mice. The parasite culture was expanded in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS until the stationary phase of growth was attained. The parasites were washed in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, for use in the experiments.

Experimental protocol. After washing, the concentration of promastigotes was adjusted to 2×10^8 parasites/ml in PBS and incubated for 5 min with or without 50 ng/ml (previously established in Goto *et al.* 1998) human rIGF-I (kindly provided by M. Lake, Kabi-Pharmacia, Uppsala, Sweden or purchased from R & D Systems, Minneapolis, USA). 50 μl of parasite suspension were injected subcutaneously into the hind footpad of the mice. The contralateral footpad was inoculated with sterile PBS or rIGF-I as a control. At 3, 24 and 48 h, and 7, 30, 60 and 90 days postinfection (PI), five animals from each group were killed and skin specimens from the inoculation site were taken for qualitative and quantitative histopathological studies and quantification of the number of parasites in the lesion.

Histopathological studies and quantitative morphometric analysis. Samples were fixed in 0.01 M phosphate-buffered 4% paraformaldehyde and embedded in plastic resin (Technovit 7100, Kulzer, GmbH, Friedrichsdorf, Germany). Semi-thin sections were cut on a 11800 Pyramitome (LKB-BROMMA, Stockholm, Sweden) and stained with haematoxylin-eosin (H & E) for histological studies.

For quantitative morphometric analysis, semi-thin sections from three different levels in each sample were

 © 2000 Blackwell Science Ltd,

obtained and the cells and parasites were counted in 0.01 mm^2 area using an Olympus planachromatic immersion objective lens (×100) and an eyepiece graticule. 900 cells were counted in each level where each cell type constituted at least 10% of the total to maintain the relative standard error below 0.1% (Weibel 1979). Samples from five experimental animals were analysed up to 30 days PI and the data analysed using the Mann–Whitney test.

Limiting dilution assay for parasite quantification. This assay was performed according to that originally described by Titus *et al*. (1985) and modified by Lima *et al*. (1997). Briefly, the skin from the inoculation site between the heel and toes was taken from the footpad, weighed and cut into several pieces in Schneider's insect medium (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% foetal calf serum, 2% normal human urine, 5 μg/ml phenol red, 5 mM HEPES pH 7.3, 50 μg/ml gentamicin, 100 UI/ml penicillin. The pieces were then homogenized vigorously for several minutes using a glass tissue glinder until the tissue was completely disrupted.

After serial dilutions in the same medium 100 μl/well from each dilution were dispensed into at least 16 wells of 96-well flat-bottom culture plates (Costar, Cambridge, USA). Each plate was covered with Parafilm® (American National Can, Greenwich, CT, USA) which was pressed to tightly seal each well, covered with the lid and incubated at 25 °C for 10 days.

Absorbance at 450 nm was measured in a microtiter Multiscan (Bio-Rad, CA, USA). Parasite growth was confirmed concomitantly by examining the plate in an inverted microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). The data were analysed using the computer program ELIDA based on Poisson statistics.

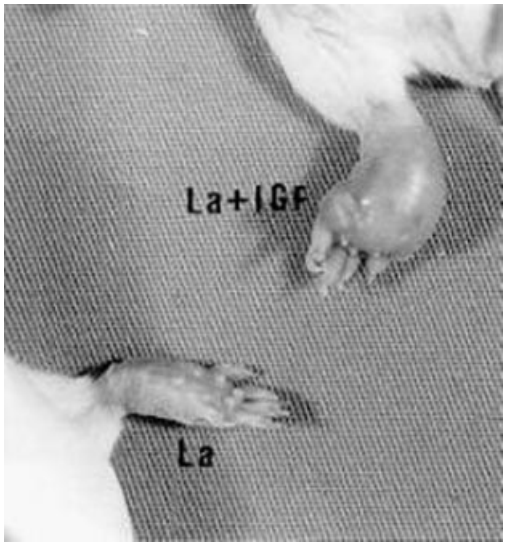


Figure 1. Cutaneous lesions in BALB/c mouse after 70 days infection with 10^7 *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes (LP) pre-incubated with 50 ng/ml IGF-I and control mouse infected with nonactivated parasites.

Results

Effect of IGF-I on the lesion size and on the parasite growth in the experimental cutaneous leishmaniasis. IGF-I activation of *L. (L.) amazonensis* promastigotes before injection results in visibly increased lesion size in BALB/c mice. Figure 1 shows the lesions from mice after 70 days of infection.

To better understand the effect of IGF-I on the host–parasite interaction in the lesion we studied parasite

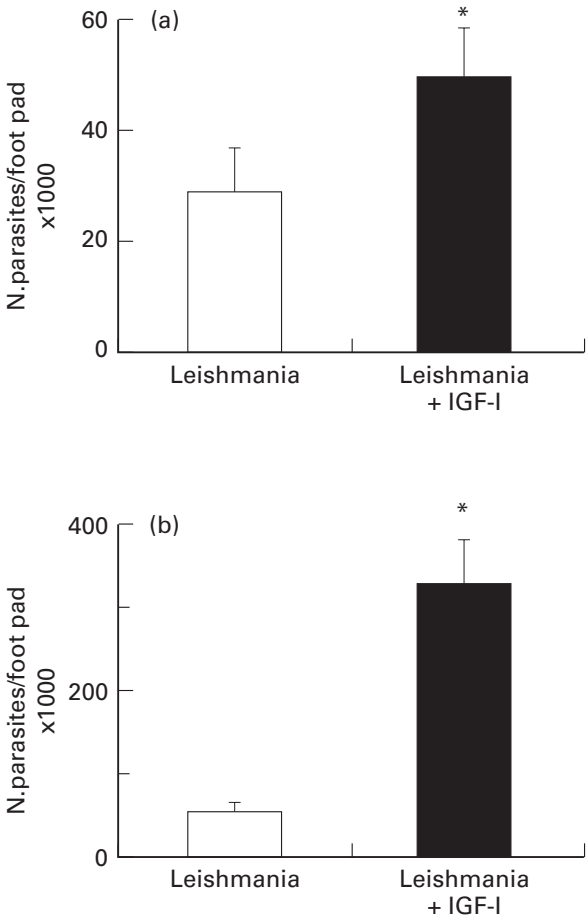


Figure 2. Number of parasites (mean ± SE) per footpad in BALB/c mice injected with 10^7 *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes pre-incubated with 50 ng/ml of IGF-I. Control mice were infected with nonactivated parasites. Number of parasites was quantified using the limiting dilution assay as given in the Materials and Methods. (a) 7 days postinfection; (b) 60 days postinfection. * $P \leq 0.05$ (Mann–Whitney test).

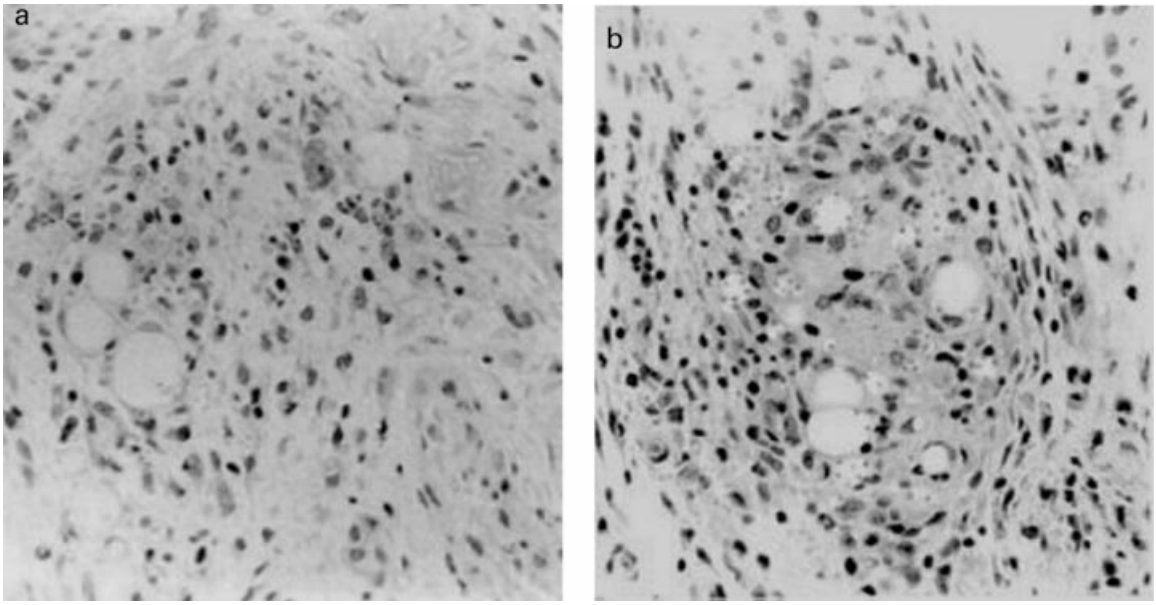


Figure 3. Skin lesions showing inflammation constituted by a mixed cell infiltrate in the footpad of BALB/c mice 48 h after infection with 10^7 *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes with or without IGF-I. (a) control footpad injected with promastigotes. (b) footpad injected with promastigotes pre-incubated with 50 ng/ml IGF-I. H & E × 40

growth and the inflammatory process at different infection intervals. Skin lesions were taken 7 and 60 days post-infection (PI) and the parasites were quantified using the limiting dilution assay. The number of parasites in the lesion from animals injected with IGF-I-stimulated *Leishmania* was already significantly higher after 7 days of infection (Figure 2a). The difference between groups increased substantially by 60 days PI (Figure 2b).

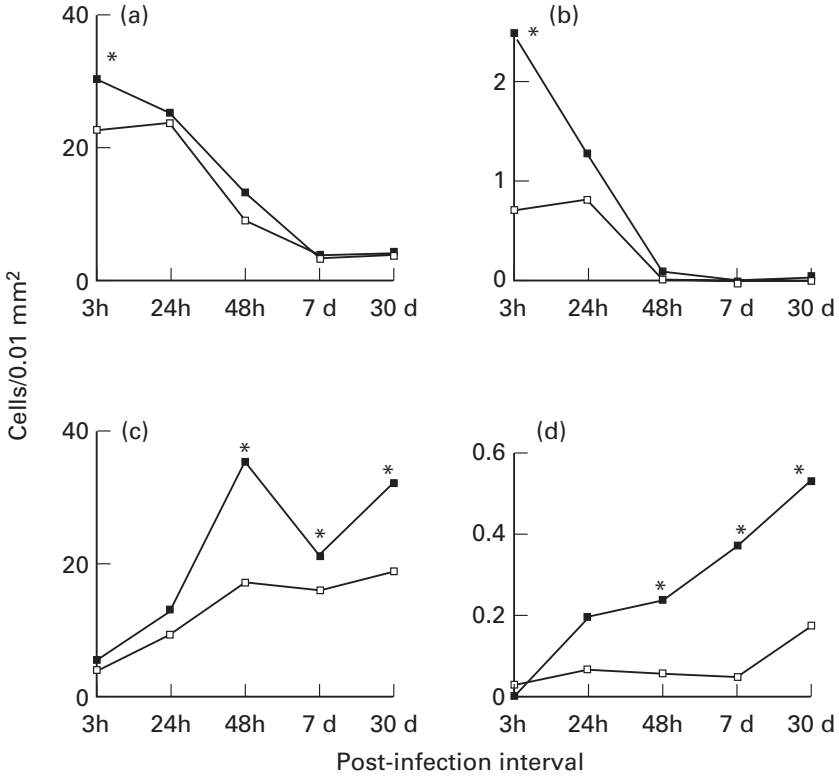


Figure 4. Numerical density (cells/0.01 mm^2) of inflammatory cells and cells harbouring parasites in the skin of BALB/c mice injected with 10^7 *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes pre-incubated with 50 ng/ml of IGF-I (■) and control mice infected with nonactivated parasites (□). (a) Polymorphonuclear neutrophils (b) Polymorphonuclear neutrophils harbouring parasites. (c) Mononuclear cells. (d) Mononuclear cells harbouring parasites. Number of cells was quantified using the quantitative morphometric analysis on semi-thin sections from three different levels of the skin. Values are expressed as mean ± SE. * $P \leq 0.05$ (Mann–Whitney test).

© 2000 Blackwell Science Ltd,

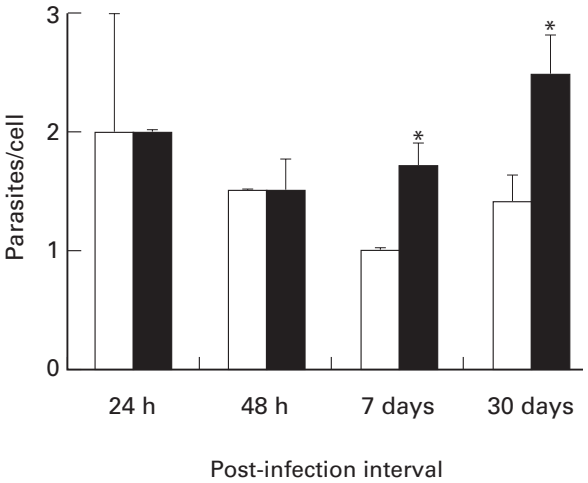


Figure 5. Number of parasites per cell (mean ± SE) from skin lesions in BALB/c mice injected with 10^7 *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes pre-incubated with 50 ng/ml of IGF-I (solid column). Control mice were infected with nonactivated parasites (open column). For further details see Materials and Methods. * $P \leq 0.05$ (Mann–Whitney test).

Effect of IGF-I on the inflammatory infiltrate and on the parasite–host cell interaction. Figure 3a,b shows the histopathology of the lesion in mice injected with IGF-I-activated or nonactivated *Leishmania* where the activated parasites caused a more intense inflammatory infiltrate. However, the inflammatory infiltrate was qualitatively similar showing an influx of polymorphonuclear neutrophils (PNMs) from 3 to 24 h and the subsequent appearance of mononuclear cells after 48 h of infection with or without pre-activation of the parasites by IGF-I. When IGF-I alone was injected into the footpad, a very mild mononuclear cell infiltrate was seen at 48 h post-inoculation when compared with PBS (data not shown).

Since a difference in the intensity of the inflammatory cellular response was apparent, quantitative morphometric analysis of the cells and parasites was performed on skin sections. This analysis revealed an increase in the density of both PMNs and of PMN with ingested parasites (Figure 4a,b) during the early phase at 3 h PI. After 48 h, a similar difference was seen in mononuclear cell density and in cells harboring parasites (Figure 4c,d). Finally, we quantified the number of parasites per mononuclear cell. As seen in Figure 5, pre-activation of the parasite led to a much higher parasite/cell ratio at both 7 and 30 days PI.

Discussion

In a previous study, we demonstrated that IGF-I exacerbates the skin lesion of mice injected with *Leishmania* pre-activated with IGF-I (Goto *et al.* 1998). In the present study, we expand these findings, evaluating the effect of IGF-I on the parasite burden in the skin lesion, on the dynamics of the inflammatory process, and on the parasite–host cell interaction.

The size of the leishmanial lesion depends mainly on the multiplication of the parasites and on the inflammatory infiltrate present in the dermis where the parasites were injected. The present study shows that the increase in lesion size with IGF-I-activated parasites was due to the presence of a greater number of parasites, unequivocally demonstrated by quantification of the number of parasites in the lesion by the limiting dilution assay, although in addition to a more intense inflammatory cellular infiltrate. The inflammatory process was qualitatively similar in both groups but more intense in mice injected with IGF-I-activated parasites. Polymorphonuclear neutrophils predominated in the infiltrate at the beginning of infection, and mononuclear cells from 48 h PI and during the course of experiment up to 30 days of infection.

How the pre-activated parasite contributes to the increase in the early and later cellular infiltrate is not well understood. *Leishmania* can rapidly interact and induce host cell responses including phosphorylation (Love *et al.* 1998) and presumably protein synthesis and secretory events in the host cells (Racoosin & Beverley 1997). The IGF-I-activated parasite may better promote the release of migration-inducing chemotactic factors such as chemokines (Luster 1998), leukotriene B4 and C5a (Gallin 1989) promoting PMN migration. The increase in infiltration by the mononuclear cells that follows the PMN migration may thus be partly due to a mechanism involving the neutrophil-dependent regulation of mononuclear cell migration (Gallin 1989). Since the injection of IGF-I alone promoted a mild infiltrate in the footpad skin of noninfected control mice, the effect may partially reside in the direct action of IGF-I on migration.

Analysis of the parasite–host cell interaction at different postinfection intervals reveals several interesting points. Different cell types harboring parasites increased, accompanying the more intense cellular infiltrate seen at the same time periods. The increased phagocytosis of parasites by PMNs at the onset of infection contradicts the finding of a more intense parasitism at later intervals since such cells are known to effectively kill the parasites (Chang 1981). However this effect may have been counteracted by the subsequently more intense mononuclear cell infiltration and phagocytosis of parasites by these cells, allowing evasion by the parasites.

Our major finding was an increase in the parasite/cell ratio after IGF-I activation. This shows that the increased

parasitism with IGF-I-activated parasites was due not only to the availability of more macrophages in the lesion but also to the increased growth of the parasites within the macrophages. The mechanisms and factors underlying this phenomenon may reside in the less explored interactions governing parasite–host interplay. A direct, growth-inducing effect on the parasites seen *in vitro* (Goto *et al.* 1998) is possible although the selection of parasite subpopulations with an advantage for intracellular growth, or protection of parasites in the macrophage enviroment against heat-induced death as shown with GM-CSF on *Leishmania* promastigotes (Barcinski *et al.* 1992) are other possibilities.

Considering the effect on the host cells, the fate of *Leishmania* within the macrophages is dependent on either macrophage-activating cytokines such as IFN-γ, TNF-α, macrophage migration inhibitory factor and granulocyte-macrophage colony–stimulating factor (Weiser *et al.* 1987; Heinzel *et al.* 1989; Bogdan *et al.* 1990; Juttner *et al.* 1998) or macrophage inactivating cytokines such as IL-10 (Vouldoukis *et al.* 1997), IL-13 (Juttner *et al.* 1998) and TGF-β (Barral *et al.* 1992). Thus, either a direct effect of IGF-I or an effect of IGF-I-activated parasites on the downregulation of the microbicidal mechanism of macrophages through effect of cytokine thus favouring parasite growth may operate.

To clearly define the *in vivo* effect of IGF-I we used IGF-I-preactivated parasites; however, data are available showing the presence of IGF-I in macrophages (Abbound *et al.* 1991; Arkins *et al.* 1993) and the increased production of IGF-I in activated macrophages (Arkins *et al.* 1993) and T cells (Baxter *et al.* 1991) on mitogen-stimulation and during wound healing (Antoniades *et al.* 1993). Thus in the lesion, IGF-I may act physiologically on the parasite both intracellularly and extracellularly during leishmaniasis.

In conclusion, we have shown that the enhancing effect of IGF-I on the lesion seen during *Leishmania* infection results from its effects on both the inflammatory process and on better parasite growth/survival within the host cell. These results strongly suggest an important role for IGF-I in cutaneous leishmaniasis.

Acknowledgements

We are grateful to Dr M. Lake for the gift of IGF-I, and Cleyton Alves, Daniela Mayumi Ura and Regiane Mathias for excellent technical assistance. This study was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Pesquisa and LIM/50 of the Hospital das Clínicas, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo.

References

Abbound S.L., Bethel C.R. & Aron D.C. (1991) Secretion of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding proteins by murine bone marrow stromal cells. *J. Clin. Invest.* **88,** 470–475.

Antoniades H.N., Galanopoulos T., Neville-Golden J., Kiristsy C.P. & Lynch S.E. (1993) Expression of growth factor and receptor mRNAs in skin epithelial cells following acute cutaneous injury. *Am. J. Pathol.* **142,** 1099–1110.

Arkins S., Rebeiz N., Biragyn A., Reese D.L. & Kelley K.W. (1993) Murine macrophages express abundant Insulin-like Growth Factor class Ea and Eb transcripts. *Endocrinology.* **133,** 2334–2343.

Barcinski M.A., Schehtman D., Quintão L.G., Costa D.A., Soares L.R.B., Moreira M.E.C. & Charlab R. (1992) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the infectivity of *L. amazonensis* by protecting promastigote from heat-induced death. *Infect. Immun.* **60,** 3523–3527.

Barral-Neto M., Barral A., Brownell C.E., Sheik Y.Y.A. Ellingsworth L.R., Twardzik D.R. & Reed S.G. (1992) Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science.* **257,** 545–548.

Baxter J.B., Blalock J.E. & Weighent D.A. (1991) Characterization of immunoreactive insulin-like growth factor from leukocytes and its regulation by growth hormone. *Endocrinology.* **129,** 1727–1734.

Bogdan C., Moll H., Solbach W. & Rollingoff M. (1990) Tumor necrosis factor -α in combination with interferon-gamma, but not interleukin-4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur. J. Immunol.* **20,** 1131.

Chang K.P. (1981) Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30,** 322–333.

Gallin J.I. (1989) Inflammation. In: *Fundamental Immunology.* (Eds. W. E. Paul) New York: Raven Press, pp. 721–733.

Gomes C.M.C., Goto H., Corbett C.E.P. & Gidlund M. (1997) Insulin-like growth factor (IGF)-1 is a growth promoting factor for *Leishmania* promastigotes. *Acta Trop.* **64,** 225–228.

Gomes C.M.C., Monteir H.P., Gidlund. M., Corbett C.E.P. & Goto H. (1998) Insulin-like growth factor (IGF) -I induces phosphorylation in *Leishmania (Leishmania) mexicana* promastigotes and amastigotes. *J. Euk. Microl.* **45,** 352–355.

Goto H., Gomes C.M.C., Corbett C.E.P., Monteiro H.P. & Gidlund. M. (1998) Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95,** 13211–13216.

Heinzel F.P., Sadick M.D., Holaday B.J., Coffman R.L. & Locksley R.M. (1989) Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. *J. Exp. Med.* **169,** 59–72.

Jones J.I. & Clemmons. D.R. (1995) Insulin-like Growth Factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Rev.* **16,** 3–34.

Juttner S., Bernhagen J., Metz C.N., Rollinghoff M., Bucala R. & Gessner A. (1998) Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. *J. Immunol.* **161,** 2383–2390.

Kratz G. & Gidlund M. (1993) The role of insulin-like growth

 © 2000 Blackwell Science Ltd,

factor-I and II in human wound healing. Modulating effect of IGF binding protein-1. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* **28,** 107–112.

Lima H.C., Bleyenberg J.A. & Titus R.G. (1997) A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitol. Today.* **13,** 80–82.

Love D.C., Mentink K. & Mosser D.M. (1998) *Leishmania amazonensis*: the phagocytosis of amastigotes by macrophages. *Exp. Parasitol.* **88,** 161–171.

Luster A.D. (1998) Chemokines - Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New. Engl. J. Med.* **338,** 436–445.

Nagaoka I., Trapnell B.C. & Crystal R.G. (1990) Regulation of Insulin-like Growth Factor-1 gene expression in the human macrophage cell line U937. *J. Clin. Invest.* **85,** 448–455.

Racoosin E.L. & Beverley S.M. (1997) *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of genes in murine macrophages. *Exp. Parasitol.* **85,** 283–295.

Reiner S.L. & Locksley R.M. (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* **13,** 151–177.

Titus R.G., Marchand M.T. & Boon & Louis J.A. (1985) A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol.* **7,** 545–555.

Uliana S.R., Nelson K., Beverly S.M., Camargo E.P. & Floeter-Winter L.M. (1994) Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J. Euk. Microbiol.* **41,** 324–330.

Vouldoukis I., Becherel P.A., Riveros-Moreno V., Arock M., Silva O., Debre P., Mazier D. & Mossalayi M.D. (1997) Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur. J. Immunol.* **27,** 860–865.

Weibel E.R. (1979) Practical methods for biological morphometry. In: *Steriological Methods*. London: Academic Press, Inc., pp. 1–415.

Weiser W.Y., Van Niel A., Clark S.C., David J.R. & Remold H.G. (1987) Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates intracellular killing of *Leishmania donovani* by human monocyte-derived macrophages. *J. Exp. Med.* **166,** 1436–1446.

ANEXO-5

Early detection of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in draining lympy node after subcutaneous inoculation in hamster

Corbett, C.E.P.; **Laurenti, M.D.**

Parasitology International 1998; 47: 307-310

ELSEVIER

Parasitology International 47 (1998) 307–310

Research note

Early detection of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in draining lymph node after subcutaneous inoculation in hamster

Carlos Eduardo Pereira Corbett*, Márcia Dalastra Laurenti

Laboratory of Pathology of Infectious Diseases, Department of Pathology of São Paulo, University Medical School, São Paulo, Brazil

Received 26 December 1997; accepted 1 August 1998

Abstract

To study the route of migration of *Leishmania (Leishmania) chagasi* to the viscera from the subcutaneous inoculation site, ultrastructural studies were carried out. These studies on popliteal draining lymph nodes of hamsters inoculated with 10^7 promastigotes of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in the hind footpad were carried out. Parasites were detected in lymph nodes just 2 h after inoculation. Parasites were either preserved or degenerated in macrophages. In 24 h signs of binary division of the parasites were found in macrophages. This fact suggests that the parasites migrate from skin to the lymph node early in the infection within phagocytes and proliferate in lymph nodes before dissemination to the viscera. © 1998 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Visceral leishmaniasis; *Leishmania (Leishmania) chagasi*; Lymph nodes; Ultrastructure

Visceral leishmaniasis in Brazil is caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and is transmitted to man through a vector, the sandfly (*Lutzomia longipalpis*). Visceral leishmaniasis is characterised by hyperplasia and hypertrophy of cells of the mononuclear phagocytic system, mainly in the spleen, liver and bone marrow, where the parasites multiply rapidly [1].

Dissemination of parasites from the inoculation site to the viscera is poorly understood. Histo-

*Corresponding author. Faculdade de Medicina da USP, Depto. Patologia, Av. Dr. Arnaldo, 455-1º andar, sala 1217, 01246-903, Cerqueira César, São Paulo, S.P. Brazil. Tel.: +55 11 8817799; fax: +55 11 8817799; e-mail: ccorbett@usp.br

1383-5769/98/$ - see front matter © 1998 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.
PII S1383-5769(98)00024-5

pathological changes have been described in lymphoid organs including the lymph nodes, both in the hamster and in man where parasites phagocytized by macrophages are the most striking histopathological features in the active phase of the disease. In the lymph node the sequences of changes during the evolution of the disease are in part related to the increase of macrophages with phagocytised parasite and in part to lymphoid follicles reaction. This response is more evident after the first or second week. There is no description of early lymph node involvement [2–4].

Sequential histopathological changes at the inoculation site were already described with characterization of the dynamic of inflammatory cells [5]. Looking for further characterization of the dissemination process, we carried out an ultrastructural study detecting parasites in the popliteal draining lymph nodes. Sequential analysis in the first 3 days, after subcutaneous inoculation of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in the hind footpad of hamsters was carried out.

Fifteen hamsters (*Mesocricetus auratus*) of 45–60 days old were inoculated with 10^7 *Leishmania (Leishmania) chagasi* promastigotes from culture at the stationary phase of growth in the hind footpads and materials from the regional popliteal lymph nodes were collected and processed for electron microscopy using a fast method [6] at 2, 6, 24, 48 and 72 h of inoculation.

Parasites were detected in the popliteal lymph nodes 2 h after inoculation. The parasites were phagocytised by polymorphonuclear neutrophils (PMN) and mononuclear cells (MNC). After 6 h, the parasites were present only in the mononuclear cells. All parasites in the phagolysosomes of the PMN showed signs of degeneration (Fig. 1A); in contrast to this finding both intact and degenerated parasites were found in MNC (Fig. 1B). At 24 h, the amastigotes in the phagolysosomes showed signs of binary division (Fig. 1C), and intact amastigotes were found in the cytoplasm of MNC after 48 and 72 h.

Sequential histopathological study at the inoculation site of *Leishmania (Leishmania) chagasi* promastigotes in hamster's hind footpads showed preferential phagocytosis by PMN at 2, 6 and 12 h of inoculation in which most parasites were found degenerated inside these cells, as well as in the interstitium. A mild degree of phagocytosis by MNCs was also found with intact parasites detected in their cytoplasm. At 24, 48 and 72 h when the inflammatory infiltrate was predominant of MNCs, cellular and parasite debris together with intact parasites were found in these cells by an electron microscope [7].

Ultrastructural studies in the popliteal draining lymph node of the inoculation site showed parasites just 2 h after inoculation. The parasites were degenerated in the cytoplasm of PMN and either preserved or degenerated in the cytoplasm of MNCs. At 24 h after inoculation, amastigotes with signs of division were detected within the macrophage in the lymph nodes.

The association of the events occurred at the inoculation site with the ultrastructural finding of viable parasites in the regional lymph nodes 2 h after inoculation, suggests that the dissemination of the parasites from the inoculation site occurs in the early phase of infection. At the inoculation site the lysis of parasites by PMNs are the result of scarce parasitism. Signs of binary division within the cytoplasm of MNCs, the popliteal lymph node, was found at 24 h of inoculation. This fact suggests that there is a preliminary step of parasite persistence and replication in lymph nodes before disseminating to the organs rich in the mononuclear phagocytic system. In the organs, amastigotes can be observed from 45 days of infection simulating the typical lesions found in visceral leishmaniasis [5].

It was proposed that Langerhans cells have an important role in the early phase of cutaneous leishmaniasis [8]. These cells transport parasites from the infected skin to the draining lymph nodes for presentation to antigen-specific resting T cells in the paracortex. Recently, early transient lymphadenopathy has been reported in human cutaneous leishmaniasis [9]. In visceral leishmaniasis, these cells might have a similar role in carrying intact parasites to lymph nodes to support local amastigotes multiplication as well as development of the immune response before visceralisation of the infection.

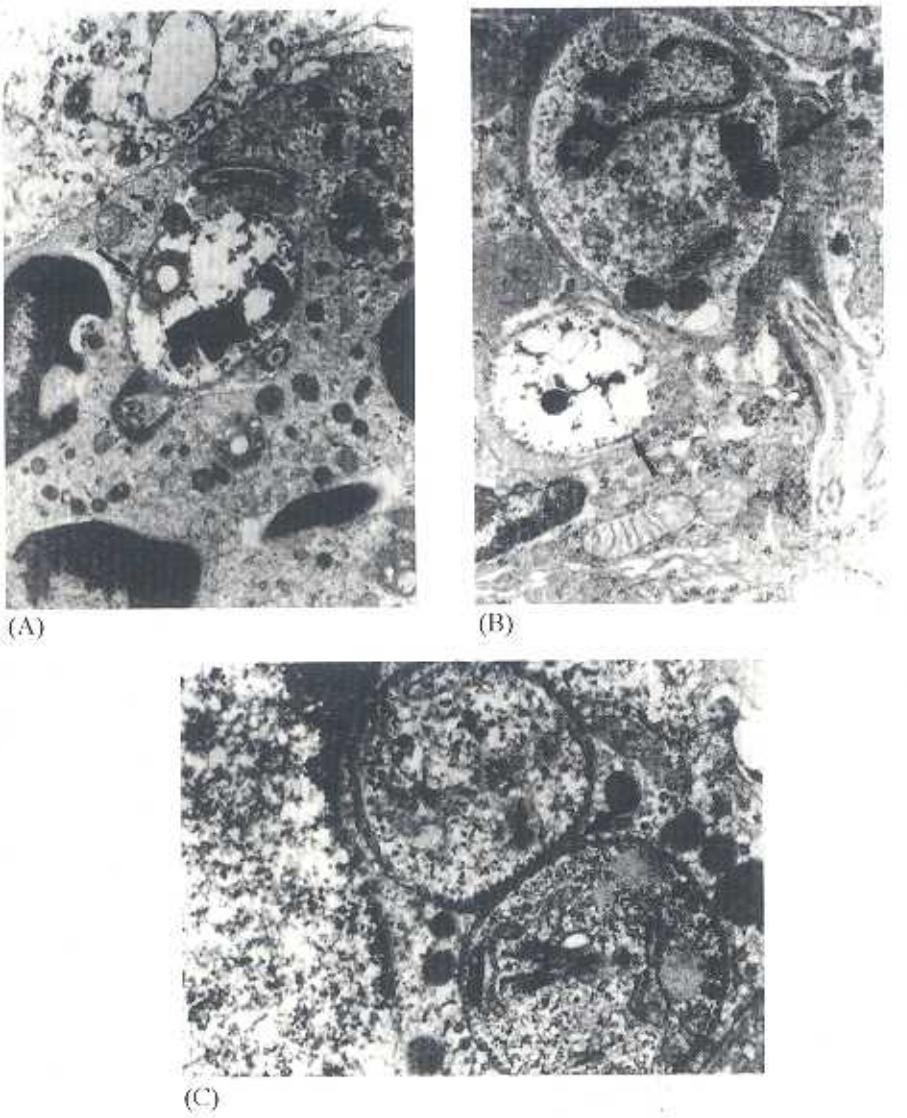


Fig. 1. Electron micrography of draining lymph nodes: **A** — 2 h of infection showing neutrophil cell with degenerated Leishmania (→). (O.M. 9000×); **B** — 2 h of infection showing intact (→) and degenerated (→) parasites together with subpellicular microtubules fragments in mononuclear cell cytoplasm (O.M. 9500×); **C** — 24 h of infection showing amastigote with signs of division (→) in mononuclear cells (O.M. 10000×).

Acknowledgements

This work was supported by FINEP, CNPq and LIM-50 HC/FMUSP.

References

[1] Andrade ZA, Andrade SG. Alguns novos aspectos da patologia do calazar. Rev Inst Med Trop São Paulo 1966;8:259–266.

[2] Corbett CEP, Pinto Paes RA, Laurenti MD, Andrade HF, Jr, Duarte MIS. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. Int J Exp Pathol 1992;73:417–433.

[3] Meleney HE. The histopathology of kala-azar in the hamster, monkey and man. Am J Pathol 1925;1:47–168.

[4] Veress B, Omer S, Satir AA, El-Hassan AM. Morpholog-

ical of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. Immunology 1977;33:605–610.

[5] Laurenti MD, Sotto MN, Corbett CEP, Matta VLR, Duarte MIS. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. Int J Exp Pathol 1990;71:791–797.

[6] Duarte MIS, Mariano ON, Takakura CFH, Uip DE, Corbett CEP. A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. Ultrastruct Pathol 1992;16:475–482.

[7] Laurenti MD, Corbett CEP, Sotto MN, Sinhorini IL, Goto H. The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Int J Exp Pathol 1996;77:15–24.

[8] Moll H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. Immunol Today 1993;14(8):383–386.

[9] Barral A, Guerreiro J, Bonfim G, Correia D, Barral-Neto M, Carvalho E. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. Am J Trop Med Hyg 1995;53(3):256–259.

ANEXO-6

The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis

Laurenti, M.D.; Gidilund, M.A.; Ura, D.M.; Sinhorini, I.L.; Corbett, C.E.P.; Goto, H.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research 1999; 32(3): 323-325

Brazilian Journal of Medical and Biological Research 1999; 32: 323-325
ISSN 0100-879X Short Communication

The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis

M.D. Laurenti[1], M. Gidlund[2,3], D.M. Ura[1], I.L. Sinhorini[4], C.E.P. Corbett[1] and H. Goto[1]

[1]Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas, Departamento de Patologia, Departamentos de [2]Patologia and [3]Medicina Preventiva, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (LIM/38), Faculdade de Medicina, and [4]Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil
[3]Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Abstract

In order to study the role of natural killer (NK) cells during the early period of *Leishmania* infection, BALB/c mice were selectively and permanently depleted of NK cells by injection with ^{90}Sr and subsequently infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (HSJD-1 strain). ^{90}Sr is known to selectively deplete NK cells, leaving an intact T- and B-cell compartment and preserving the ability to produce both interferon alpha and IL-2. This method of depletion has advantages when compared with depletion using anti-NK cell monoclonal antibodies because the effect is permanent and neither activates complement nor provokes massive cell death. In the present study, after one month of treatment with ^{90}Sr, the depletion of NK cells was shown by a more than ten-fold reduction in the cytotoxic activity of these cells: 2 x 10^6 spleen cells from NK-depleted animals were required to reach the same specific lysis of target cells effected by 0.15 x 10^6 spleen cells from normal control animals. The histopathology of the skin lesion at 7 days after *Leishmania* infection showed more parasites in the NK cell-depleted group. This observation further strengthens a direct role of NK cells during the early period of *Leishmania* infection.

Correspondence
H. Goto
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
Av. Dr. Enéas C. Aguiar, 470
05403-000 São Paulo, SP
Brasil
Fax: +55-11-852-3622
E-mail: hgoto@usp.br

Presented at the XIII Annual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, Brasil, August 26-29, 1998.

Research supported by CAPES (No. 0025/95-20), FAPESP (No. 96/11004-0), and LIM/38 (HC-FMUSP).

Received April 14, 1998
Accepted December 1, 1998

Key words
- Cutaneous leishmaniasis
- NK cells
- Strontium 90
- *Leishmania (leishmania) amazonensis*

Both innate and specific elements of the immune system contribute to the control or the progression of leishmaniasis. At the beginning of the infection, innate elements have been shown to have an important role in influencing the outcome of the disease. Among them, complement has been shown to contribute to the evasion of the parasite and for visceral dissemination in hamsters infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* (1). It has also been shown that nonimmune natural killer (NK) cells are important in *Leishmania* infection as a source of IFNγ with the potential to trigger the Th-1 type of immune response in cutaneous leishmaniasis (2,3). In addition, using the mutant beige mice with low NK activity, the direct importance of NK cells in the development of visceral leishmaniasis has been shown (4). Recently, in mice with an intermittent suppression or depletion of NK cells by anti-asialo GM1 or anti-NK1.1 monoclonal antibodies resulted in an increased susceptibility of mice to *Leishmania major* (5).

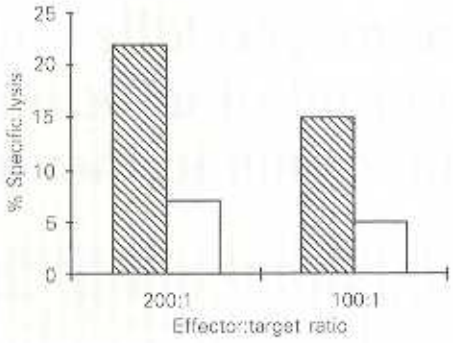


Figure 1 - *In vitro* spleen cell NK activity from normal (striped column) or NK-depleted (open column) mice. Spleen cells from control or ^{90}Sr-treated mice (0.6 µCi/g body weight intraperitoneal injection) were tested in a 4 h [^{51}Cr]-release microcytotoxicity assay at the indicated effector to target ratio using YAC-1 as described in Ref. 8. Specific lysis = (release (cpm) with effector cells - release in medium alone)/(release in distilled water - release in medium alone)) x 100. Data are from two separate experiments yielding similar results. Data represent the mean of 5 animals in each group and the SD was less than 5% of the mean.

In the present study we have used ^{90}Sr to deplete NK cells. This treatment is well established and provides an intense local irradiation of the bone marrow leading to severe bone marrow aplasia with concomitant extramedullar myelopoiesis in the spleen (6,7). The treatment has been shown to lead to a severe and permanent depletion of NK cell activity in the spleen, in the lymph nodes and in the periphery without any noticeable alteration in the T- or B-cell compartment or in the capacity to rapidly produce IL-2 or interferon alpha upon stimulation (6). Here we studied the effect of NK cell depletion by ^{90}Sr on the course of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection.

Ten newly weaned BALB/c mice were depleted of NK cells by intraperitoneal injection of ^{90}Sr (0.6 µCi/g body weight) as previously described (6). After 30 days (i.e., after elimination of free ^{90}Sr) they were infected subcutaneously in the hind footpad with 5 x 10^7 stationary phase promastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* (HSJD-1 strain) characterized by Prof. J.J. Shaw (Instituto Evandro Chagas, Brazil) according to the reactivity to monoclonal antibodies specific for *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis* and for the subgenus *Viannia*, and also by Dr. S.R. Uliana (Department of Parasitology, ICB, University of São Paulo, Brazil) according to the reactivity to subunit ribosomal DNA probes for *L. amazonensis* and the subgenus *Viannia* (8). Samples were taken to evaluate NK activity of spleen cells at the time of inoculation by a ^{51}Cr release cytotoxic assay of YAC-1 target cells. The level of parasite growth was verified by histopathological analysis of the skin lesion at seven days of infection.

The severe depletion of NK activity was confirmed by the lytic activity against YAC-1 cells in ^{90}Sr-treated animals (Figure 1). The calculated number of cells required in control animals to obtain the same level of lysis of target cells as found in NK-depleted animals (i.e., 7% specific lysis) was shown to be 0.15 x 10^6 cells versus 2 x 10^6 spleen cells in NK-depleted animals. This demonstrated that the NK cell activity of ^{90}Sr-

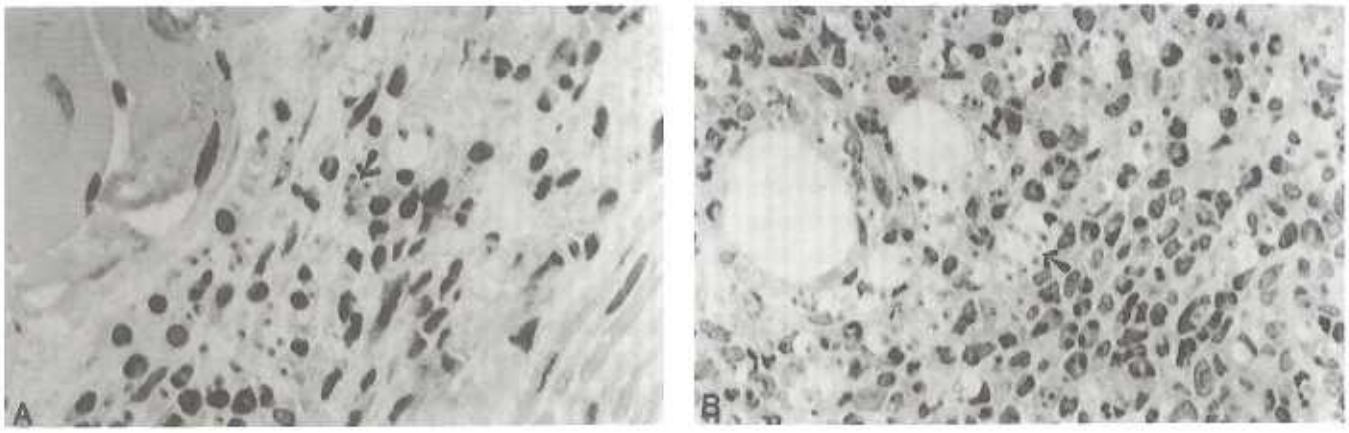


Figure 2 - Histopathology of skin lesions from control or NK-depleted mice infected with *Leishmania (L.) amazonensis*. Hematoxylin and eosin. Magnification, 40X. *A*, Mixed inflammatory infiltrate with few parasites is shown in control BALB/c mice. *B*, Mixed inflammatory infiltrate with more parasites is shown in NK-depleted BALB/c mice.

treated mice was reduced more than ten times. As shown in Figure 2A and B, seven days after infection more parasites were observed in the skin lesion in ^{90}Sr-treated mice. The inflammatory infiltrate characterized mainly by mononuclear cells with few polymorphonuclear neutrophils was similar in both groups.

Previous studies have similarly indicated a role for NK cells in leishmaniasis; however, our study clarified several important points. Several color mutants, including the beige mutant, have been shown to have reduced NK cells compared with their wild type counterpart (9). These mice also have severe alterations in the lysosomal compartment which affect macrophage and neutrophil functions. Therefore, there is uncertainty about the data obtained in beige mice and how the defects in phagocytes could interfere with the susceptibility of these mutant mice to *Leishmania* infection. The use of anti-asialo GM1 or NK1.1 antibodies leads to an intermittent and short-lived depletion of NK cells (5,10) and furthermore, as is the case for any antibody used to deplete cell components *in vivo*, to a rapid activation of the complement that is known to be important in the initial phase of infection (1). Finally, it is highly likely that the rapid elimination of a sizable portion of the lymphocyte pool by the antibody can cause secondary effects due to complement activity and massive cell death. The ^{90}Sr-treated mice have an advantage since they do not present any apparent change in monocyte function, as shown by the ability to mount a normal T- and macrophage-dependent response to Con A detected by IL-2 production (6).

In a system with a selective depletion of NK cells along with an intact T- and B-cell compartment and with preserved ability to produce both interferon alpha and IL-2, we have shown increased *Leishmania* growth in the skin lesion. We conclude that the present data further support a direct role of NK cells in the early period of *Leishmania* infection.

Acknowledgments

We thank the Instituto de Pesquisas Energéticas da Universidade de São Paulo and Patrick Spencer for technical support during ^{90}Sr treatment.

References

1. Laurenti MD, Corbett CEP, Sotto MN, Sinhorini IL & Goto H (1996). The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *International Journal of Experimental Pathology*, 77: 15-24.
2. Scharton TM & 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. *Journal of Experimental Medicine*, 178: 567-577.
3. Scott P (1991). IFN-γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Immunology*, 147: 3149-3155.
4. Kirkpatrick CE, Farrell JP, Warner JF & Dennert G (1985). Participation of natural killer cells in the recovery of mice from visceral leishmaniasis. *Cellular Immunology*, 92: 163-171.
5. Laskay T, Rollinghoff M & Solbach W (1993). Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *European Journal of Immunology*, 23: 2237-2241.
6. Gidlund M, Berke P, Örn A, Axberg I, Ramstedt U & Wigzell H (1990). Impact of ^{90}Sr on mouse natural killer cells and their regulation by alpha-interferon and interleukin-2. *Scandinavian Journal of Immunology*, 31: 575-582.
7. Haller O & Wigzell H (1977). Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: effector cells are marrow dependent. *Journal of Immunology*, 118: 1503-1508.
8. Uliana SR, Nelson K, Beverly SM, Camargo EP & Floeter-Winter LM (1994). Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41: 324-330.
9. Örn A, Gidlund M, Ramstedt U, Axberg I & Wigzell H (1982). Four different pigment mutations in the mouse which also affect lysosomal function and all lead to suppressed NK cell activity. *Scandinavian Journal of Immunology*, 15: 305-310.
10. Stein-Streilein J & Guffee J (1986). In vivo treatment of mice and hamsters with antibodies to asialo GM1 increases morbidity and mortality to pulmonary influenza infection. *Journal of Immunology*, 136: 1435-1441.

Rio de Janeiro Cell Bank

Human and Animal Cell Biotechnology Services

- *Deposit and Distribution of Cell Lines*
- *Cell Cryopreservation*
- *Development and Distribution of Human and Animal Primary Cell Cultures*
- *Development of New Monoclonal Antibody Secreting Hybridomas*
- *Monoclonal Antibodies, in Cell Culture Supernatants or Purified*
- *Identification of Microbiological Contaminants*
- *Decontamination of Cell Lines*
- *Cytotoxicity Tests*
- *Characterization of Cell Lines*
- *Training in "in vitro" Culture of Human and Animal Cells*
- *Consultation Assistance in Cell Culture*

Contact us for specific services not listed above

Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ
Programa Avançado de Biologia Celular aplicado à Medicina - PABCAM
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - HUCFF
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ
Sala 4A9, Caixa Postal 68021
CEP 21941-970 Rio de Janeiro, RJ
Tel: (021)564-2010 Ramal 249
Tel/Fax: (021)590-8736

ANEXO-7

Cytokine detection at the site of Leishmania (Leishmania) amazonensis subcutaneous inoculation in mice depleted of Natural Killer cells.

Laurenti, M.D.; Örn, A.; Sinhorini, I.L.; Corbett, C.E.P.

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science 2005; 42 (2): 105-112.

Cytokine detection at the site of *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* subcutaneous inoculation in mice depleted of Natural Killer cells

Márcia Dalastra LAURENTI[1]
Andres ÖRN[2]
Idércio Luiz SINHORINI[3]
Carlos Eduardo Pereira CORBETT[1]

1- Laboratório de Patologia e Doenças Infecciosas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo - SP
2- Microbiology and Tumorbiology Center, Karolinska Institute, Stockholm, SWEDEN
3- Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo - SP

Correspondence to:
MÁRCIA DALASTRA LAURENTI
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina da USP
Av. Dr. Arnaldo, 455 - 1º andar - sl 1209
Cerqueira César
01246-903 - São Paulo – SP
mdlauren@usp.br

Received: 11/02/2003
Accepted: 23/08/2005

Abstract

BALB/c mice depleted and non-depleted of Natural Killer (NK) cells were infected subcutaneously with 10^7 stationary phase promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and samples were taken at 24 hours and 7 days after infection. In NK cell-depleted mice, the NK cytotoxic activity of spleen cells decreased at 7 days after infection and more parasites were found in the lesion. The NK cell populations were analyzed by immunohistochemistry in spleen cryosections. An increase of NK1.1$^+$ expression and a decrease of NK5E6$^+$ antigen expression was observed in NK cell-depleted mice compared to non-depleted mice. When the presence of IFN-g, IL-12 and IL-4 at the site of parasite inoculation was analyzed by immunohistochemistry, a large amount of cytokines was detected in NK cell-depleted mice at 24 hours and 7 days after infection. In non-depleted mice, there was a small amount of IL-12 at 24 hours and of IL-4 at 7 days after infection. These data cells suggest that NK cell depletion by ^{90}Sr results in increased parasitism in the lesion. The increase of NK1.1$^+$ expression, which mainly produces IL-4, may take part in the progression of the infection.

Key-words:
Natural Killer cells.
Cytokines.
Cutaneous Leishmaniasis.
Leishmania (Leishmania) amazonensis.
Immunopathology.
^{90}Strontium.

Introduction

Leishmaniasis is an infectious disease of chronic evolution caused by the *Leishmania* protozoan, whose transmission involves vector arthroprods from the phlebotomine family. The disease develops when the *Leishmania* parasites survive the attack of the non-specific innate immune response involving cellular and humoral elements, after inoculation. These parasites migrate to target organs and proliferate, evading the specific immune mechanisms[1].

Both innate and specific elements of the immune system contribute to the control or the progression of the disease. At the beginning of the infection, the innate elements have an important role in the outcome of the disease. The direct importance of Natural Killer (NK) cells in the development of visceral leishmaniasis has been shown in mutant beige mice which have low NK cell activity[2]. Concerning cutaneous leishmaniasis, mice with an intermittent suppression or depletion of NK cells by anti-asialo GM-1 or anti-NK1.1 monoclonal antibodies became more susceptible to *Leishmania major* infection[3]. Laurenti et al.[4] showed increased numbers of parasites in the cutaneous lesion of BALB/c mice submitted to NK cell depletion by ^{90}Sr treatment and infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. It has also been found that non-immune NK cells

are important in *Leishmania* infection as a source of IFN-g with the potential to trigger the Th-1 type of immune response in the early phase of cutaneous leishmaniasis[5].

In view of the importance of NK cells at the beginning of *Leishmania* infection in controlling the number of parasites in the lesion and as a source of IFN-g production, the main objective of the present study was to assess cytokine production at the site of subcutaneous inoculation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in BALB/c mice submitted to NK cell depletion by ^{90}Sr treatment in the early period of the infection in order to examine some mechanisms involved in the increase of parasitism in this model.

Materials and Methods

Animals: Balb/c mice from the General Colony of the São Paulo University Medical School were maintained in our laboratory during the experiments.

Parasite: Promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, HSJD-1 strain, were used throughout the experiments. Promastigotes in the stationary phase from the 3rd culture passage in supplemented RPMI 1640 medium (10% fetal calf serum, 5 mM HEPES, 50 mg/ml gentamicin and 100 U/ml penicillin) were harvested and washed 3 times in sterile saline (3000 rpm/ 10 minutes). The parasite concentration was adjusted to 2 x 10^8 promastigotes/ml and 50 ml was subcutaneously injected into the hind footpads of mice.

NK cell depletion: One dose of 0.6 mCi/g body weight of ^{90}Strontium - ^{90}Sr (AMERSHAM - USA) was injected by the intraperitoneal route in newly weaned mice one month before the parasite infection in order to deplete the mice of NK cells[6].

In vitro spleen NK cell activity from normal (NK+) and NK-depleted (NK-) mice was tested in a 4 hour ^{51}Cr-release microcytotoxicity assay at effector to target ratios of 200:1, 100:1, 50:1 and 25:1 using YAC-1 cells. The specific lysis = [(release (cpm) with effector cells – release in medium alone)/(release in distilled water – release in medium alone)] x 100.

Frozen spleen section from NK+ and NK- mice were submitted to immunohistochemistry using anti-NK cells (5E6) and anti-NK1.1 (PK136) (PharMingen-USA) purified monoclonal antibodies. To evaluate the reaction, semi-quantitative analysis was performed considering negative (-) results for no labeling and positive results according to the following scores: discrete (+) for 1 cell labeled per 10 microscope fields using a 40X objective, moderate (++) for 2-5 cells/field, and intense (+++) for more than 5 cells/ field.

Infection: Three groups of 40 mice, 20 NK- and 20 NK+, were inoculated with 10^7 *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. One group of 10 mice, not depleted and not infected, was used as control. Fragments from hind footpads were taken at 24 hours and 7 days after inoculation for histopathological study and cytokine detection.

Histopathological study: The lesion and the parasitism at the inoculation site were evaluated by light microscopy on the 7th day of infection in paraffin-embedded sections stained with Hematoxylin & Eosin. The images were obtained using digital photografic system (Leica MPS60) conected to optical microscope (Leica DMR).

In situ cytokine detection: Frozen sections from the site of parasite inoculation were submitted to immunohistochemical reaction for cytokine detection by the method of Sunnemark et al.[7]. Anti-IFN-g (XMG1.2) (ImmonoKontact-DE), anti-IL-12 (C15.6), and anti-IL-4 (BVD4-1D11) purified monoclonal antibodies (PharMingen-USA) were used as primary antibodies for the immunolabeling reaction. To evaluate the reaction, semi-quantitative analysis was performed considering results to be negative (-) in the absence of labeling and positive according to the following scores: discrete (+) for 1-10 cells labeled per microscope

field using a 40X objective, moderate (++) for 10-20 cells/field and intense (+++) for more than 20 cells/field.

Statistical analysis: The One Way Anova multiple range test was applied using the SigmaStat Statistical Software version 1.0. The difference was considered significant when $p<0.05$.

Results

Cytotoxic activity of spleen cells

Samples were taken to evaluate the NK activity of spleen cells before parasite inoculation in a ^{51}Cr release cytotoxic assay of YAC-1 target cells. Severe depletion of NK cytotoxic activity was observed by the lytic activity against YAC-1 when spleen cells from ^{90}Sr-treated animals were used at effector:target cell ratios of 200:1, 100:1 and 50:1 ($p<0.05$) (Figure 1).

Analysis of NK cell populations in spleen tissue

The semi-quantitative analysis of frozen spleen sections from NK- and NK+ BALB/c mice performed by immunohistochemistry using purified anti-NK (5E6) and anti-NK1.1 (PK136) monoclonal antibodies showed discrete expression of both antigens in NK+ mice. On the other hand, NK- mice showed an increase in $NK1.1^+$ expression and absence of $NK5E6^+$ cell antigen expression (Table 1 and Figure 2).

Histopathological analysis and parasitism of the skin lesion

Histopathological analysis of the skin lesion of NK- and NK+ BALB/c mice infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* did not show significant differences between the two groups concerning inflammation. At the beginning of the infection, the inflammatory infiltrate was characterized by predominance of polymorphonuclear cells, which were gradually replaced by mononuclear cells. The number of parasites in the skin lesion was discrete in NK+ mice at 7 days after infection,

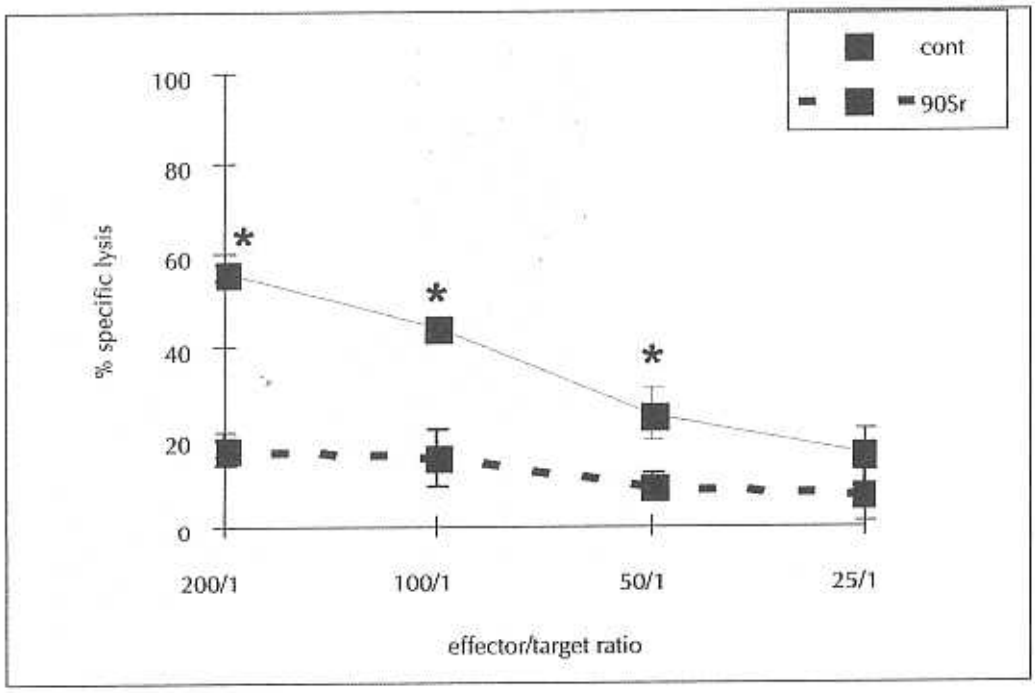


Figure 1 - *In vitro* NK cytotoxic activity of spleen cells from NK- and NK+ BALB/c mice. Data are representative of three separate experiments and show the mean and the standard deviation for 5 animals in each group (* $p<0.05$)

Table 1 - Semi-quantitative analysis of NK cells in spleen tissue from NK- and NK+ BALB/c mice by immunohistochemistry, scored as follows: - negative, + discrete, + + moderate and + + + intense. Data are representative of three separate experiments. São Paulo, 1998

Experimental Animals	Monoclonal Antibody	NK1.1/PK136	NK/5E6
BALB/c	NK-	+ +	-
	NK+	+	+

whereas NK- mice showed an increase of parasitism compared to the contrôl NK+ mice (Figure 3).

Cytokine detection at the inoculation site

The semi-quantitative immunohistochemical analysis of IFN-g in frozen sections from the site of subcutaneous parasite inoculation in BALB/c mice revealed the presence of moderate amounts of IFN-g in NK- mice and its absence in NK+ mice at 24 hours and 7 days after infection. (Table 2 and Figure 4). IL-12 was found to be moderately present in NK- mice at 24 hours and 7 days after infection, although in NK+ mice it was discrete at 24 hours and absent at 7 days of infection (Figure 5). The presence of IL-4 was intense at 24 hours and 7 days after infection in NK- mice, but the cytokine was not detected at 24 hours and was present only in slight amounts at 7 days after infection in NK+ mice (Figure 6).

Discussion

Some pathogenetic aspects during the early period of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection were studied in BALB/c mice submitted to NK cell depletion by intraperitoneal treatment with ^{90}Strontium (^{90}Sr).

Treatment with ^{90}Sr results in a severe and permanent depletion of NK cell activity without any apparent change in monocyte function or complement activation[6]. Here, a severe depletion of NK cell activity was confirmed by the lytic activity against YAC-1 cells in ^{90}Sr-treated animals.

The importance of NK cells in the resistance to *Leishmania* infection has been described by many authors. Kirkpatrick and Farrel[8] demonstrated the importance of NK cells in the elimination of splenic amastigotes in mice infected with *Leishmania donovani*. Further studies using ^{137}Cs-irradiated mice for NK cells depletion confirmed the role of these cells in the control of visceral leishmaniasis[2]. Later, Laskay, Rollinghoff and Solbach[3] showed an active participation of NK cells in the control of skin parasitism in the early phase of cutaneous leishmaniasis using mice depleted of NK cells by the use of monoclonal antibodies. Laurenti et al.[4] observed increased numbers of *Leishmania* in the skin lesion after ^{90}Sr treatment. The

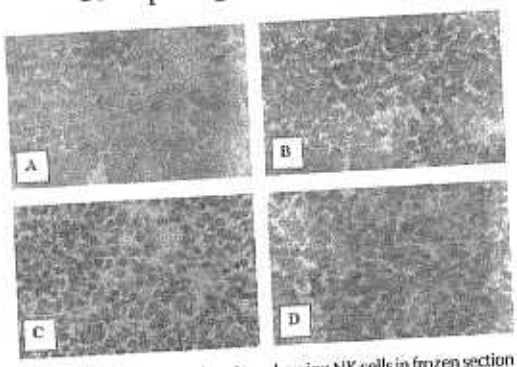


Figure 2 – Immunohistochemistry showing NK cells in frozen section of spleen of BALB/c mice NK- (A, B) and NK+ (C, D). Reaction with anti-NK1.1 (PK136) (A, C) and with anti-NK (5E6) (B, D) monoclonal antibody (ABC - 350x)

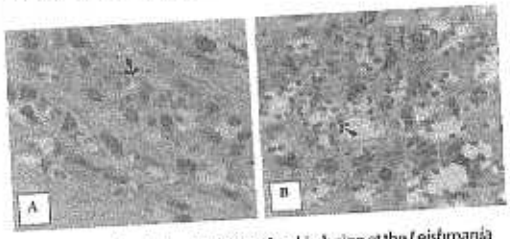


Figure 3 - Histological section from the skin lesion at the Leishmania subcutaneous inoculation site of NK+ (A) and NK- (B) BALB/c mice on the 7th day of infection showing predominance of mononuclear cells in the inflammatory infiltrate and tissue parasitism (arrow) (H&E – 675x)

Table 2 - Semi-quantitative cytokine analysis in frozen sections from the site of subcutaneous *Leishmania* inoculation at 24 hours and 7 days of infection by immunohistochemistry, scored as follows: - negative, + discrete, + + moderate, + + + severe. Data are representative of three separate experiments. São Paulo, 1998

Time of infection		24 hours			7 days		
Experimental Animals	Cytokines	IFN-γ	IL-12	IL-4	IFN-γ	IL-12	IL-4
BALB/c	NK -	+ +	+ +	+ + +	+ +	+ +	+ + +
	NK+	-	+	-	-	-	+

present study, which shows increased parasitism in the skin lesion of mice submitted to NK cell depletion with ^{90}Sr and infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, reinforces the importance of NK cells in the early period of cutaneous leishmaniasis.

The mechanisms involved in the control of lesion parasitism by NK cells are still partially unknown. However, the importance of NK cells as a source of IFN-g at the beginning of infection is already known[9,10].

Surprisingly, the analysis of IFN-g participation at the site of subcutaneous parasite inoculation showed an increase of IFN-g in NK- animals at 24 hours and 7 days after infection compared to NK+ animals. There are reports showing that IFN-g production is largely dependent on IL-12, whose production is induced at 24 hours after infection[10,11,12]; by the other side, Nylen et al.[13] reported that live *Leishmania* promastigotes can directly induce human peripheral blood NK cells from healthy donors to IFN-g secretion in the absence of IL-12 and the professional antigen presenting cells. Data from the present study show the concomitant and increased presence of IL-12 and IFN-g in the lesion of NK- BALB/c mice at 24 hours and 7 days after infection.

Although a marked decrease in NK cytotoxic activity was observed in the spleen, immunolabeling revealed an *in situ* increase in the expression of NK 1.1$^+$ cells and a decrease in the expression of NK5E6$^+$ cells after ^{90}Sr treatment. NK cells were described as non-T and non-B cells[14]. However, subsets of T lymphocytes have been reported as NK1.1$^+$ cells, therefore being processed in the thymus[15]. In this way, it is reasonable to propose that they are saved during the process of depletion by ^{90}Sr injection and are present in the spleen. Once NK5E6$^+$ cells are reduced, it may be

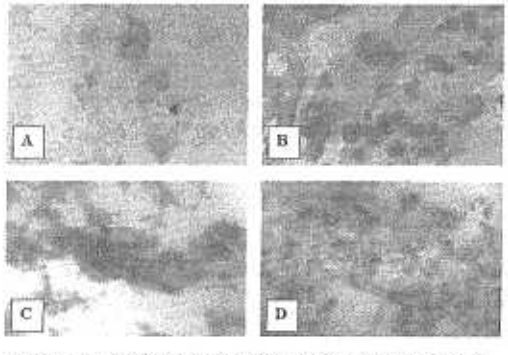


Figure 4 – Immunohistochemistry showing the presence of IFN-g in the subcutaneous inoculation site of parasites in BALB/c mice skin. (A) NK- and (B) NK+, 24 hours of infection (ABC – 675x); (C) NK- and (D) NK+, 7 days of infection (ABC – 350x)

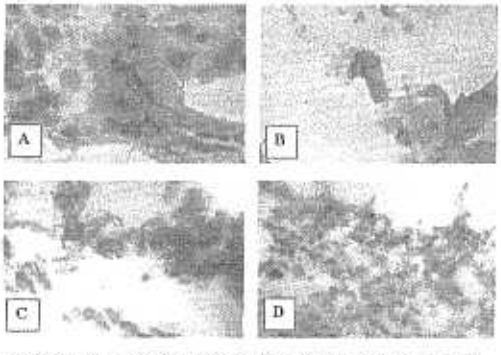


Figure 5 – Immunohistochemistry showing the presence of IL-12 in the subcutaneous inoculation site of parasites in BALB/c mice skin. (A) NK- and (B) NK+, 24 hours of infection (ABC – 675x); (C) NK- and (D) NK+, 7 days of infection (ABC – 675x and 350x, respectively)

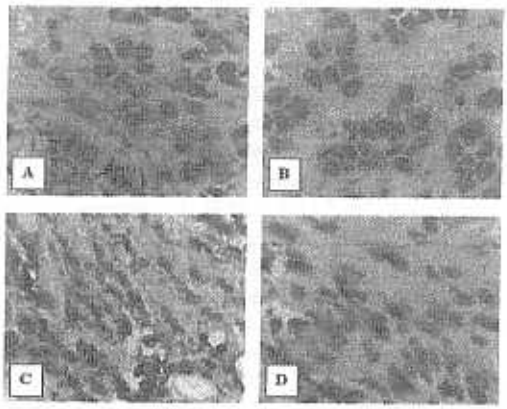


Figure 6 – Immunohistochemistry showing the presence of IL-4 in the subcutaneous inoculation site of parasites in BALB/c mice skin. (A) NK- and (B) NK+, 24 hours of infection; (C) NK- and (D) NK+, 7 days of infection (ABC – 675x)

speculated that control of one population over the other may be occurring in NK- animals. So, a decrease in NK5E6$^+$ cells should leading to a higher expression of NK1.1$^+$.

The resistance to *Leishmania* infection is traditionally attributed to the production of IFN-g, which activates the microbicidal mechanisms of macrophages, enabling them to control parasite replication[16,17]. The present data, however, show that in animals treated with ^{90}Sr there is a higher presence of IFN-g and a larger increase of parasitism in the lesion. Recent data have correlated IFN-g to the development of lesions instead of control in leishmaniasis[18,19]. On the other hand, the cytokines which have been traditionally related to susceptibility to infection in cutaneous leishmaniasis are IL-4 and IL-10[17]. Akuffo et al.[20] demonstrated that in innate response to *Leishmania* antigen envolving NK cells, a critical level of IL-12 is required to induce IFN-g secretion below which, IL-10 is released in amounts which apparently inhibit IFN-g secretion and cellular proliferation showing the contribution of NK cells in cross regulation of these two very import immunoregulatory cytokines. Regarding the production of IL-4, it is known that NK 1.1$^+$ cells, along with IFN-g production, result in *in vitro* production of this cytokine[21,22]. Other authors also reported a high production of IL-4 by NK1.1$^+$ cells when mice are stimulated *in vivo*[23]. The present experiments showed a large amount of IL-4 detected by immunohistochemistry at the subcutaneous parasite inoculation site in BALB/c mice depleted of NK cells by ^{90}Sr treatment, probably produced by. NK1.1$^+$ cells, which were increased in NK-depleted mice.

These experiments showed that NK cells are highly important in the initial control of *Leishmania* infection. Data suggest that the regulatory mechanism of different NK cell populations may result in the production of different cytokines at the site of infection, determining the evolution of the disease.

Acknowlegments

To Dr. Dan Sunnemark for the initial steps on standartization of immunohistochemistry reaction for cytokine detection in mouse tissue. This work was supported by LIM-50 HC-FMUSP, CNPq, FAPESP and CAPES - PDEE 0025/95-20.

Detecção de citocinas no sítio de inoculação subcutânea de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos depletados de células Natural Killer

Resumo

Camundongos BALB/c depletados e não depletados em células *Natural Killer* (NK) foram infectados subcutaneamente com 10^7 promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em fase estacionária de crescimento e amostras foram colhidas às 24 horas e 7 dias de infecção. Nos camundongos depletados em células NK, a atividade citotóxica NK de células esplênicas estava diminuída aos 7

Palavras-chave:
Células Natural Killer.
Citocinas.
Leishmaniose cutânea.
Leishmania (Leishmania) amazonensis.
Imunopatologia.
^{90}Estrôncio.

dias de infecção e mais parasitos foram encontrados na lesão. Populações de células NK foram analisadas por imuno-histoquímica em cortes congelados de baço. Foi observado aumento na expressão de células NK1.1$^+$ e diminuição na expressão do antígeno NK5E6$^+$ nos animais depletados em células NK comparados aos camundongos não depletados. A presença de IFN-g, IL-12 e IL-4, analisada por imuno-histoquímica no sítio de inoculação dos parasitos, mostrou que maior quantidade de citocinas foram detectadas nos camundongos depletados em células NK às 24 horas e 7 dias depois da infecção. Nos camundongos não depletados, havia pequenas quantidades de IL-12 às 24 horas e de IL-4 aos 7 dias de infecção. Estes dados sugerem que a depleção de células NK por ^{90}Sr resulta em aumento de parasitismo na lesão. O aumento na expressão de células NK1.1$^+$, as quais produzem principalmente IL-4, pode representar um dos mecanismos que colaborariam para a progressão da infecção.

References

1 BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Evasion strategies of Leishmania parasites. **Parasitology Today**, v. 14, p. 171-183, 1990.

2 KIRKPATRICK, C. E. et al. Participation of Natural Killer cells in the recovery of mice from visceral leishmaniasis. **Cellular Immunology**, v. 92, p. 163-171, 1985.

3 LASKAY, T.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Natural Killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* in mice. **European Journal of Immunology**, v. 23, p. 2237-2241, 1993.

4 LAURENTI, M. D. et al. The role of Natural Killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 323-325, 1999.

5 SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural Killer cells are a source of Interferon g that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces resistance to *Leishmania major* in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 567-577, 1993.

6 GIDLUND, M. et al. Impact of ^{90}Sr on mouse Natural Killer cells and their regulation by alpha-interferon and interleukin-2. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 31, p. 575-582, 1990.

7 SUNNEMARK, D. et al. Cytokine production in hearts of *Trypanosoma cruzi*-infected mice: Do cytokine patterns in chronic stage reflect the establishment of myocardial pathology? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 44, p. 421-429, 1996.

8 KIRKPATRICK, C. E.; FARREL, J. P. Mechanisms of depression of splenic Natural Killer cell function in C57BL/6 mice infected with *Leishmania donovani*. **Cellular Immunology**, v. 87, p. 601-612, 1984.

9 SCOTT, P. IFN-g modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 147, p. 3149-3155, 1991.

10 SOLBACK, W.; LASKAY, T. *Leishmania major* infection: the overture. **Parasitology Today**, v. 11, p. 394-397, 1995.

11 CHARTON-KERSTEN, T.; SCOTT, P. The role of the immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 57, p. 515-522, 1995.

12 SYPEK, J. P. et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: Interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 1797-1802, 1993.

13 NYLÉN, S. et al. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human Natural Killer cells to produce Interferon-gamma. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 131, p. 457-467, 2003.

14 KIESSLING, R. et al. Killer cells: a functional comparison between natural, immune T-cell and antibody-dependent *in vitro* systems. **Journal of Experimental Medicine**, v. 143, p. 772-780, 1976.

15 VICARI, A. P.; ZLOTNIK, A. Mouse NK1.1 T cells, a new family of T cells. **Immunology Today**, v. 17, p. 71-76, 1996.

16 LOCKSLEY, R. M. et al. Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 336-342, 1988.

17 REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 151-177, 1995.

18 GUEVARA-MENDOZA, O. et al. Experimental infection of Balb/c mice with *Leishmania panamensis* and *Leishmania mexicana*: induction of early IFN-g but

not IL-4 is associated with the development of cutaneous lesions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 46, p. 35-40, 1997.

19 SOONG, L. et al. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of Immunology**, v. 158, p. 5374-5383, 1997.

20 AKUFFO, H. et al. Natural Killer cells in cross regulation of IL-12 by IL-10 in Leishmania antigen-stimulated blood donor cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 117, p. 529-534, 1999.

21 ZLOTNIK, A. et al. Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells, ab-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. **Journal of Immunology**, v. 149, p. 1211-1215, 1992.

22 ARASE, H. et al. NK1.1+CD4+CD8- thymocytes with specific lymphokine secretion. **European Journal of Immunology**, v. 23, p. 307-310, 1993.

23 BROWN, R. D. et al. Beta 2-microglobulin-dependent NK1.1+T cells are not essential for T helper cell 2 immune response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 1295-1304, 1996.