

## O Modelo Experimental nas Infecções Causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

### Experimental Models of Infections Caused by *L. amazonensis* and *L. braziliensis*

Camila I. de Oliveira<sup>1</sup>, Manoel Barral-Netto<sup>1,2,3</sup>

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ; Faculdade de Medicina da Bahia, UFBA; Instituto de Investigação em Imunologia; Salvador, BA, Brasil

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos para o hospedeiro vertebrado por insetos flebotomíneos. Diferentes espécies de *Leishmania* podem causar distintas manifestações clínicas da doença e o curso da infecção também sofre influência da composição genética do hospedeiro. Muito do que sabemos sobre a resposta do indivíduo à infecção por *Leishmania* vem do estudo com camundongos. Algumas linhagens de camundongos são resistentes à infecção enquanto outras são extremamente suscetíveis, permitindo estudar os mecanismos imunes que regulam a resposta ao parasita. A seguir, serão revisados os modelos experimentais utilizados no estudo das leishmanioses causadas por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*.

**Palavras-chave:** *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major*, leishmanioses, BALB/c.

*Leishmaniasis are a group of diseases caused by parasitic protozoa of the genus Leishmania, which are transmitted to the vertebrate host by phlebotomine insects. Different Leishmania species may induce distinct clinical manifestations of the disease, and infection outcome is also influenced by the host's genetic background. Most of the knowledge on individual response comes from studies conducted in mice. Some mice strains are susceptible to infection, whereas others are extremely resistant, a fact that allows the study of the underlying mechanisms regulating the immune response to infection. In this review, we comment on the experimental models of infection currently used to study leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis and L. amazonensis.*

**Key words:** *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major*, leishmaniasis, BALB/c.

As leishmanioses são um conjunto de doenças cujo agente etiológico é a *Leishmania*, transmitido por insetos flebotomíneos. O espectro clínico desse conjunto de doenças inclui a leishmaniose tegumentar,

desde a leishmaniose cutâneo-localizada até a leishmaniose cutâneo-difusa, e a leishmaniose visceral, desde a forma subclínica até a doença fatal. Nas Américas, os parasitas que causam a leishmaniose tegumentar pertencem aos complexos *Leishmania braziliensis* (subgênero *Viannia*) e *Leishmania mexicana* (subgênero *Leishmania*), enquanto o agente etiológico da leishmaniose visceral é a *Leishmania chagasi* (subgênero *Leishmania*). Os modelos experimentais de infecção constituem uma importante ferramenta para o estudo das leishmanioses, tanto no que diz respeito à patogênese, quanto no que diz respeito ao desenvolvimento de vacinas.

Recebido em 22/02/2005

Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dr. Manoel Barral-Netto, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, BA, Brasil, 40296-710. Tel (+55) 71 3356 8782 r. 215, FAX (+55) 71 3356 8782 r. 261. Endereço eletrônico: mbarral@cpqgm.fiocruz.br

**Gazeta Médica da Bahia** 2005;75(1):Jan-Jun:35-45.

© 2005 Gazeta Médica da Bahia (ISSN 0016-545X).

Todos os direitos reservados.

### O Modelo Experimental Clássico: *L. major*

Com relação à leishmaniose tegumentar (LT), o modelo experimental mais bem estudado até hoje é o de infecção de camundongos com *Leishmania major*, uma das espécies responsáveis pela LT no Oriente Médio<sup>(27,43)</sup>. Nesse modelo de infecção dito convencional, altas doses do parasita ( $10^5$ - $10^7$ ), em fase estacionária, são inoculadas na pata do animal; a manifestação clínica subsequente está diretamente relacionada à linhagem do camundongo utilizada. Assim, camundongos das linhagens C3H/He, 129Sv/Ev, CBA e C57BL/6 são ditos resistentes à infecção, pois desenvolvem pequenas lesões que curam espontaneamente em 10-12 semanas. Após a cura espontânea, os animais também se tornam resistentes a uma nova inoculação de parasitas. Por outro lado, camundongos da linhagem BALB/c são altamente suscetíveis à infecção por *L. major*: eles desenvolvem extensas lesões na pele que se expandem e levam à morte do animal. A resistência ou susceptibilidade das diferentes linhagens de camundongos à infecção por *L. major* está fortemente associada ao padrão de resposta imune celular, mais especificamente ao perfil de citocinas Th1 ou Th2 produzido em resposta à infecção. Em camundongos suscetíveis, observa-se alta produção de IL-4. Esse padrão de resposta do tipo Th2 leva à desativação de macrófagos e à permanência do parasita. Em animais resistentes, observa-se um padrão de resposta do tipo Th1 com alta produção de IFN- $\gamma$ , ativação de macrófagos e, conseqüentemente, eliminação do parasita. Sabe-se também que a produção de reativos de oxigênio e de nitrogênio, por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ , é inibida na presença de citocinas como TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13 e IL-10, indicando que a diminuição na produção de citocinas do tipo Th2 pode ser importante para o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida<sup>(19)</sup>. Sendo assim, o desenvolvimento de susceptibilidade ou resistência à infecção por *L. major* depende de múltiplos fatores, e a utilização de linhagens de camundongos geneticamente diferentes permite o estudo do espectro clínico da LT.

### O Modelo Experimental de Infecção Subcutânea Aplicado à *L. braziliensis* e à *L. amazonensis*

No Brasil, as principais espécies causadoras da LT são *L. braziliensis* e *L. amazonensis*<sup>(17)</sup>. Modelos experimentais que envolvem a infecção subcutânea com esses dois parasitas já foram desenvolvidos. Com respeito à *L. braziliensis*, no entanto, os estudos são mais escassos, uma vez que esse parasita não é facilmente cultivável *in vitro* e a obtenção de promastigotas metacíclicos (o estágio infectivo do parasita), em condições de cultura, é ineficiente. Conseqüentemente, um grande número de parasitas ( $10^7$ ) deve ser utilizado nos inóculos a fim de que se obtenha infecção<sup>(34)</sup>. Contudo, Childs et al.<sup>(21)</sup> mostraram que a maioria das linhagens de camundongos é resistente à infecção: as linhagens C3H/HeJ, C57BL/6 e CBA/CaJ não mostraram qualquer evidência de infecção enquanto as linhagens AKR/J e CBA/J apresentaram apenas um pequeno e transiente edema quando os parasitas foram injetados no focinho dos animais. Por outro lado, as linhagens SWR/J, C57L/J, A/J, A/HeJ e DBA/1J desenvolveram pequenos nódulos após a infecção, que se curaram espontaneamente. Os camundongos BALB/c foram classificados como os mais suscetíveis à infecção, embora a *L. braziliensis* não cause, nessa linhagem, lesões severas ou de longa duração<sup>(21)</sup>. A análise da resposta imune de camundongos infectados com *L. braziliensis* mostrou uma forte produção de IFN- $\gamma$ , enquanto camundongos infectados com *L. braziliensis* e posteriormente tratados com anti-IFN- $\gamma$ , apresentam um aumento significativo no tamanho na lesão e não conseguem resolver a infecção<sup>(24)</sup>. Os autores sugerem, então, que um mecanismo dependente de IFN- $\gamma$  é responsável pela eliminação da *L. braziliensis* em camundongos BALB/c e, por outro lado, a pouca infectividade desse parasita está associada à sua inabilidade em induzir à produção longa e continuada de IL-4. No entanto, foi demonstrado que biópsias de pele de pacientes com LT causada por *L. braziliensis* apresentam IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ <sup>(37)</sup> e iNOS<sup>(20)</sup>. Por outro lado, nosso grupo mostrou que a adição de TGF- $\beta$  a culturas de macrófagos

murinos leva a um aumento na replicação de *L. braziliensis*, enquanto a adição de anticorpos anti-TGF- $\beta$  diminui os níveis de infecção<sup>(7)</sup>. A exacerbação da infecção por *L. braziliensis* foi associada a um aumento na expressão de IL-10 em linfonodos regionais. Esses resultados demonstram que o TGF- $\beta$  é capaz de alterar o curso da infecção por *L. braziliensis*. Assim, diversas moléculas desempenham um importante papel no controle da carga parasitária e, em paralelo, contribuem para o desenvolvimento de um processo inflamatório intenso no local de inoculação do parasita. Conclui-se que a infecção de camundongos ou mesmo do homem por *L. braziliensis* não é um processo silencioso, e que o balanço na produção de citocinas é crucial para que a infecção siga para o curso da cura espontânea.

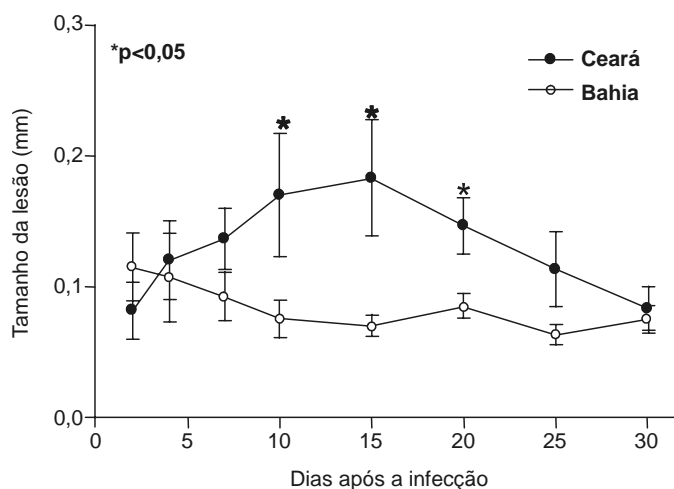
Em contraposição, foi mostrado que o parasita também desempenha um papel importante na dicotomia entre desenvolvimento da doença ou parasitismo assintomático. Isolados de *L. major*, obtidos no campo, apresentam diferenças na patogenicidade após a inoculação em camundongos BALB/c<sup>(31)</sup>. Estudos realizados com *L. mexicana* demonstraram a correlação entre características genotípicas de isolados e uma determinada manifestação clínica da doença<sup>(16)</sup>. Dessa maneira, a diversidade genética do parasita também é um fator importante no que diz respeito às características clínicas da leishmaniose.

A lesão cutânea de pacientes com LT do Ceará é acompanhada e, às vezes, é até precedida de uma linfadenopatia regional bastante pronunciada. Nesses casos, cunhou-se o termo leishmaniose bubônica para a descrição desse tipo de manifestação clínica<sup>(46)</sup>. A leishmaniose bubônica é restrita ao Ceará e às infecções com *L. braziliensis*. Entretanto, estudos prévios de nosso grupo demonstraram a ocorrência de linfadenopatia regional também em infecções por *L. braziliensis* na Bahia<sup>(6,8,46)</sup>. Utilizando o modelo experimental de infecção na pata, nosso grupo investigou se essas diferenças na manifestação clínica da LT estariam associadas a características intrínsecas dos parasitas. Para tal, utilizamos uma cepa de *L. braziliensis* do Ceará e outra da Bahia<sup>(28)</sup>. Em ensaios

de RAPD, a cepa de *L. braziliensis* da Bahia apresentou um padrão de amplificação distinto daquele apresentado pela cepa de *L. braziliensis* do Ceará. Em seguida, infectamos camundongos BALB/c na pata, com essas duas linhagens e observamos que os animais infectados com a cepa do Ceará desenvolvem lesões, enquanto os animais infectados com uma cepa proveniente da Bahia não o fazem (Figura 1). Ao examinarmos a resposta imune desenvolvida por esses dois grupos de animais, observamos que, inicialmente, os animais inoculados com a cepa da Bahia apresentam maior produção de IFN- $\gamma$ , o que foi correlacionado com a ausência de lesão; enquanto os animais inoculados com a cepa do Ceará apresentam maior produção de IL-4, o que foi correlacionado com a presença de lesão. Mais tarde, os animais inoculados com a cepa do Ceará também passam a produzir IFN- $\gamma$  e, assim, apresentam a cura espontânea da lesão desenvolvida.

Em seguida, nosso grupo investigou o padrão inflamatório desenvolvido por camundongos BALB/c infectados com essas mesmas duas cepas de *L. braziliensis* (Bahia x Ceará)<sup>(47)</sup>. Observamos que a cepa de *L. braziliensis* do Ceará induz a um maior recrutamento de células (neutrófilos e macrófagos) para o local da inoculação do parasita. Esse recrutamento celular pôde ser correlacionado com a expressão das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP1-a e CXCL1/KC. Por outro lado, a cepa de *L. braziliensis* da Bahia induz a uma maior expressão de CXCL10/IP10. Novamente, esses achados apresentam uma correlação *in vivo*: lesões de pacientes de LT apresentam um aumento na expressão de CCL2/MCP-1 e CCL3/MIP1-a<sup>(42)</sup>, e macrófagos humanos e murinos infectados com *Leishmania* também expressam CCL2/MCP-1 e CXCL1/KC<sup>(4,40)</sup>. A expressão dessas quimiocinas na pata de camundongos infectados com a cepa de *L. braziliensis* do Ceará pode explicar o maior recrutamento de macrófagos e monócitos para o local da inoculação do parasita. Esses achados mostram, então, que as quimiocinas, assim como seus receptores, são fatores que regulam a resposta inflamatória decorrente da infecção com uma ou outra cepa de *L. braziliensis*.

**Figura 1.** Curso do desenvolvimento da lesão de camundongos BALB/c inoculados com cepas de *L. braziliensis*. Os camundongos foram infectados, na pata, com  $10^6$  promastigotas de uma cepa do Ceará (●) ou de uma cepa da Bahia (○), e o tamanho da lesão foi medido por trinta dias. Os dados apresentados reportam a média  $\pm$  o erro padrão da média de três experimentos independentes, cada um com cinco animais. O asterisco indica diferença significativa entre os valores, como determinado pelo teste T de Student (\*  $p < 0,05$ ).



Conjuntamente, esses trabalhos mostram que cepas de *L. braziliensis* de duas regiões geográficas do Brasil apresentam um comportamento biológico distinto quando inoculadas na pata de camundongos BALB/c no que diz respeito à formação de uma lesão cutânea e ao desenvolvimento de uma resposta imune celular. Além disso, essas diferenças puderam ser correlacionadas com a “identidade genética” dos parasitas, como evidenciado por ensaios de RAPD.

Sendo assim, observa-se que a espécie do parasita desempenha um papel importante na determinação do padrão de resposta imune. Estudos realizados na Bahia vêm demonstrando essa importância. Camundongos CBA/J são resistentes à infecção por *L. major* e essa resistência é caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$ , pela ausência de IL-4 e pela presença de um infiltrado inflamatório composto por linfócitos, macrófagos e pela formação de granulomas<sup>(33)</sup>. Por outro lado, camundongos CBA/J infectados com *L. amazonensis* são altamente suscetíveis à infecção, pois produzem IL-4 e IL-10, mas não produzem IFN- $\gamma$ . A análise histopatológica das lesões desenvolvidas mostra a presença de um infiltrado mononuclear difuso, com

inúmeros macrófagos parasitados e raros linfócitos, semelhante ao observado em camundongos BALB/c infectados com *L. major*. A partir desses resultados, tornou-se interessante investigar os eventos iniciais da infecção com ambas as espécies de parasita. Observou-se que macrófagos de camundongos CBA/J tratados com IFN- $\gamma$  apresentam infecção reduzida por *L. major* quando comparados com macrófagos infectados com *L. amazonensis*; e essa redução na infecção por *L. major* foi associada à produção de TNF- $\alpha$ <sup>(26)</sup>. Em paralelo, ocorre inibição da produção de óxido nítrico induzida por LPS em macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*, o que foi correlacionado com uma diminuição na atividade de iNOS sintetase<sup>(5)</sup>. Assim, concluiu-se que a *L. amazonensis* é capaz de inativar e de resistir tanto aos mecanismos inatos de resposta quanto àqueles induzidos por IFN- $\gamma$ . Assim, a espécie do parasita e a sua interação com macrófagos determinam a polarização da resposta imune para susceptibilidade ou resistência. Na verdade, a infecção com *L. amazonensis* causa lesões cutâneas progressivas na maioria das linhagens isogênicas de camundongos.

Acredita-se que a ativação deficiente dos mecanismos imunes contribui para a patogênese da doença. Nesse sentido, observou-se que camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* apresentam uma demora significativa na expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- $\gamma$  e na expressão de quimiocinas e de seus receptores <sup>(29)</sup>. Esses achados foram correlacionados a uma resposta celular deficiente frente ao estímulo com parasita *in vivo* e *in vitro*. Assim, sugere-se que os mecanismos imunes atuantes nos eventos iniciais da infecção por *L. amazonensis* estão bloqueados.

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que a *L. amazonensis* é um agente importante da LT na Bahia e esta infecção produz um amplo espectro clínico de doenças: as manifestações clínicas variam desde a forma cutânea localizada até a forma visceral <sup>(9)</sup>. Empregando o modelo experimental murino, mostramos que um mesmo clone de *L. amazonensis* promove cursos diferentes de infecção <sup>(10)</sup>. Os níveis de anticorpos anti-leishmania foram mais altos em camundongos BALB/c, mas somente os camundongos C57BL/6 apresentaram um resultado positivo no teste de hipersensibilidade tardia, tanto no começo quanto no final de infecção. Assim, camundongos BALB/c são suscetíveis à infecção enquanto camundongos C57BL/6 são resistentes. De maneira complementar, avaliamos o curso da infecção causada no mesmo animal (BALB/c) por diferentes cepas de *L. amazonensis*, obtidas de pacientes com diferentes manifestações clínicas da doença <sup>(2)</sup>. Camundongos infectados na pata com cepas obtidas de pacientes com leishmaniose cutânea ou mucocutânea desenvolvem lesões ulceradas, com a presença de macrófagos parasitados e extensiva destruição tecidual. No entanto, camundongos infectados com cepas obtidas de pacientes com leishmaniose visceral apresentaram infecção controlada, com pequenas lesões e formação de granuloma. Esses estudos reforçam o papel do parasita e as possíveis variações intra-espécie no desenvolvimento da doença.

No intuito de investigar as características que poderiam explicar o curso diferente da infecção por *L. amazonensis*, analisamos aspectos da interação parasita-hospedeiro. Demonstramos que a *L. amazonensis* causa cursos diferentes de infecção em camundongos selecionados para alta ou baixa produção de anticorpos e camundongos selecionados para baixa ou alta resposta a mitógenos <sup>(25)</sup>. Camundongos com alta produção de anticorpos desenvolvem lesões grandes e capazes de se disseminar, enquanto camundongos com alta resposta a mitógenos apresentam fenótipo de resistência.

Em seguida, estudamos os mecanismos de destruição da *L. amazonensis* em camundongos BALB/c imunizados com antígeno solúvel de *Leishmania* <sup>(39)</sup>. Esta linhagem, normalmente suscetível à infecção, torna-se parcialmente resistente após a inoculação intravenosa do antígeno solúvel. Nos animais imunizados, foram observados também parasitas mortos pela lise de macrófagos infectados. Ainda nos camundongos BALB/c imunizados com antígeno solúvel de *L. amazonensis*, avaliamos os mecanismos de ativação de linfócitos T <sup>(38)</sup>.

Empregando o modelo experimental de infecção por *L. amazonensis*, estudamos a influência da infecção pelo vírus LP-BM5 (vírus da leucemia murina) sobre o desenvolvimento da leishmaniose. Camundongos C57BL/6 (naturalmente resistentes ao parasita) infectados com *L. amazonensis* e, posteriormente, infectados pelo vírus apresentam lesões maiores e com padrão histológico semelhante ao apresentado por camundongos BALB/c (naturalmente suscetíveis ao parasita) <sup>(11)</sup>. No entanto, quando os camundongos são primeiramente infectados pelo vírus e, em seguida, com *L. amazonensis*, a lesão não se desenvolve. Quando avaliamos o padrão histológico, observamos, nesses animais, macrófagos densamente parasitados e poucos linfócitos. Concluímos que a infecção pelo vírus influenciou o recrutamento celular para o local da infecção pelo parasita.

Utilizando o modelo experimental de *L. amazonensis*, demonstramos também o efeito

protetor *in vivo* de uma lectina obtida de *Canavalia braziliensis* em camundongos BALB/c<sup>(12)</sup>. Observamos que essa lectina foi capaz de reduzir as lesões derivadas da infecção pelo parasita e observamos também que este mecanismo não era mediado por IFN- $\gamma$ , uma vez que a neutralização com anticorpos anti-IFN- $\gamma$  não alterou a proteção conferida pela lectina.

### O Modelo Experimental de Infecção Intradérmica

A transmissão da *Leishmania* ocorre quando o inseto vetor (flebotomo) realiza o repasto sangüíneo no hospedeiro vertebrado e, nesse momento, injeta os parasitas (1-1.000 promastigotas) juntamente com sua saliva. Na tentativa de reproduzir a biologia da transmissão da *Leishmania*, Belkaid et al.<sup>(13)</sup> desenvolveram um modelo intradérmico de infecção com *L. major*. Nesse modelo, pequenas doses do parasita (1.000) são inoculadas na derme da orelha de camundongos, empregando-se uma seringa de insulina. O racional por trás da inoculação do parasita na derme do camundongo reside no fato de que esse é o local onde a infecção ocorre naturalmente. Além disso, a pele possui células e estruturas especializadas e mais bem adaptadas para responder aos ataques por microorganismos. Nesse modelo de infecção intradérmica, os padrões de susceptibilidade e resistência de camundongos BALB/c e C57BL/6, respectivamente, foram mantidos. No entanto, quando os parasitas são inoculados na presença da saliva do vetor, como acontece na natureza, ocorre uma exacerbação dramática da infecção. Assim, tanto os camundongos BALB/c quanto os C57BL/6 apresentaram lesões maiores quando inoculados com parasita mais saliva do vetor, se comparadas às lesões desenvolvidas pelos animais inoculados com parasitas somente. De fato, os camundongos C57BL/6 inoculados com parasita mais saliva não foram capazes de curar as lesões dérmicas, diferentemente do que aconteceu

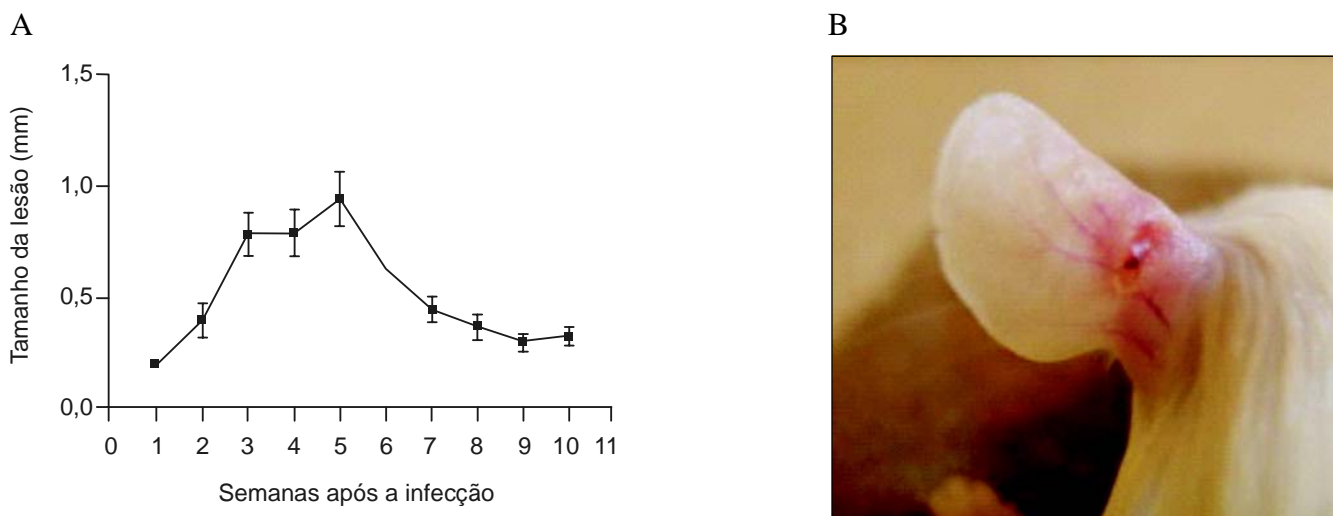
quando a mesma infecção foi feita na pata, pela via subcutânea<sup>(49)</sup>. Sendo assim, concluiu-se que a resposta imune decorrente da infecção com parasita mais saliva varia conforme a via de inoculação (intradérmica x subcutânea).

### O Modelo Experimental de Infecção Intradérmica Aplicado à *L. braziliensis* e à *L. amazonensis*

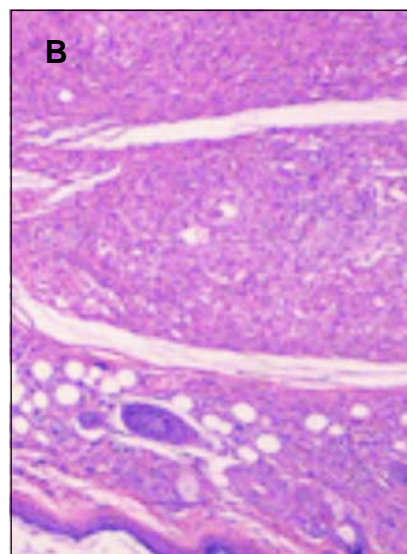
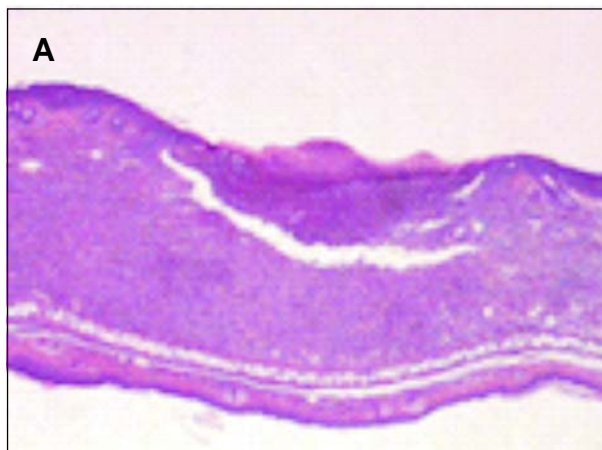
Diante dos achados descritos acima, nosso grupo interessou-se em desenvolver um modelo experimental semelhante, empregando *L. braziliensis*<sup>(23)</sup>. Nossos resultados mostraram que camundongos BALB/c infectados com  $10^5$  parasitas na derme da orelha desenvolvem uma lesão cutânea no local da inoculação (Figura 2), e essa lesão é semelhante àquela observada em pacientes com LT: localizada, ulcerada, com bordas elevadas e fundo necrótico<sup>(30,35)</sup>. Ao realizarmos a análise histopatológica da lesão, observamos que o infiltrado inflamatório consistia de células polimorfonucleares e de inúmeros macrófagos parasitados. Nove semanas após a infecção, momento em que se observa o início do processo de cicatrização, o infiltrado inflamatório consistia de escassos macrófagos parasitados, células epitelióides, poucos linfócitos e plasmócitos (Figura 3). Ao examinarmos a carga parasitária, observamos que, no sítio de inoculação, o aumento e a diminuição dessa carga ocorrem paralelamente ao aparecimento e à cura da lesão. Entretanto, no linfonodo drenante da lesão, a carga parasitária permanece constante, não havendo diminuição no número de parasitas, mesmo após a cura da lesão.

Como descrito anteriormente, camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, por via subcutânea ou por via intradérmica, apresentam cura espontânea da lesão. Essa cura está associada à potente resposta imune celular do tipo Th1 induzida. De fato, ao examinarmos as citocinas produzidas pelos animais infectados, observamos, por citometria de fluxo, uma forte produção de IFN- $\gamma$ , tanto por células T CD4+ quanto por células T CD8+. Utilizando o modelo de infecção subcutânea, foi demonstrado que células T

**Figura 2.** A inoculação de *L. braziliensis* na derme da orelha de camundongos BALB/c leva ao desenvolvimento de uma lesão ulcerada. (A) Camundongos BALB/c foram infectados com  $10^5$  promastigotas, e o curso do desenvolvimento da lesão foi monitorado por dez semanas. Os dados apresentados reportam a média  $\pm$  o erro padrão da média de três experimentos independentes, cada um com cinco animais. (B) Fotomicrografia da orelha de camundongo após cinco semanas de infecção, demonstrando a lesão ulcerada com bordas elevadas e fundo necrótico.



**Figura 3.** Aspectos histológicos das lesões da orelha em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* pela via intradérmica de *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c (cinco por grupo) foram infectados com  $10^5$  promastigotas. As orelhas foram removidas 5 (A) e 9 semanas (B) após a infecção e foram coradas com hematoxilina e eosina. (A) Lesão ulcerada mostrando necrose fibrinóide extensa e infiltrado inflamatório. Magnificação x 40. (B) A reconstituição da epiderme acompanha o processo de cicatrização. Presença de infiltrado inflamatório composto por poucos parasites, células epitelióides, plasmócitos e deposição de colágeno. Magnificação x 100.



CD8+, específicas para *Leishmania*, são encontradas em maior número em animais resistentes<sup>(50)</sup>. O papel das células T CD8+ foi recentemente reexaminado no contexto da infecção com *L. major* pela via intradérmica, e foi possível demonstrar seu acúmulo na pele e sua capacidade de produzir IFN- $\gamma$  em resposta ao estímulo com parasitas<sup>(15)</sup>. Em nosso trabalho com *L. braziliensis*, observamos que os parasitas permanecem no linfonodo drenante, apesar do desenvolvimento de uma resposta imune celular capaz de eliminar a lesão. Vale ressaltar que resultados similares foram encontrados nos ensaios de infecção com *L. braziliensis* pela via subcutânea (M.J. Teixeira, resultados não publicados). Esses achados sugerem que o parasita é capaz de “escapar” da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, ou este desenvolve imunossupressão e, conseqüentemente, assegura a permanência do parasita. Já foi demonstrado que tanto o homem quanto camundongos são capazes de manter parasitas no tecido linfóide após a cura espontânea ou após o tratamento<sup>(1,41,45)</sup>. No modelo de infecção com *L. major* pela via subcutânea, a persistência dos parasitas foi associada aos fibroblastos do linfonodo, que, comparados aos macrófagos, apresentam uma capacidade reduzida de eliminar a *Leishmania* intracelular. Os fibroblastos atuam como um “porto seguro”, albergando o parasita durante a infecção crônica<sup>(18)</sup>. Por outro lado, a participação de células T regulatórias também foi associada à persistência de *L. major* em camundongos resistentes<sup>(14,36)</sup>. As células T regulatórias suprimem a ação das células T efectoras por meio da produção de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$ <sup>(44)</sup>. Na infecção por *Leishmania*, a presença de células T regulatórias pode controlar a patogênese a partir da presença de citocinas antiinflamatórias e, ao mesmo tempo, pode assegurar a imunidade contra a reinfeção pela constante estimulação antigênica. Nesse sentido, observamos que camundongos infectados com *L. braziliensis* pela via intradérmica são resistentes a um desafio com o parasita. Nesse momento, estamos avaliando qual o papel das células T regulatórias nessa resistência.

Com relação à infecção de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* pela via intradérmica, sabe-se

que o tamanho do inóculo influencia o desenvolvimento de uma lesão e sua possível progressão até ulceração e necrose<sup>(22)</sup>. Além disso, camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* são incapazes de controlar uma reinfeção, ao contrário de camundongos BALB/c infectados com *L. major*. Essa incapacidade está associada ao desenvolvimento de uma resposta celular mista Th1/Th2.

### O Modelo Experimental de Primatas

Os primatas do Novo Mundo são suscetíveis à infecção por *L. braziliensis*<sup>(32)</sup>. A infecção do macaco Rhesus com *L. amazonensis*<sup>(3)</sup> resulta no desenvolvimento de doença semelhante à que ocorre no homem (lesão cutânea com cura espontânea e resistência à infecção homóloga). Mais recentemente, Teva et al.<sup>(48)</sup> desenvolveram um modelo de infecção de macacos Rhesus com *L. braziliensis* que facilita o estudo da leishmaniose mucosa. Nesse estudo, os animais foram injetados pela via intradérmica e desenvolveram lesões que variaram em severidade, desde lesão cutânea localizada até lesões que não curaram. Um dos animais infectados desenvolveu lesões dérmicas metastáticas persistentes e lesões mucosas. Observou-se a presença tanto de anticorpos anti-*Leishmania* quanto de uma resposta imune celular. Uma vez que a resposta granulomatosa inflamatória encontrada nos macacos infectados foi similar àquela encontrada em pacientes com leishmaniose cutânea, conclui-se que esse modelo pode ser bastante útil tanto no estudo da patogênese da leishmaniose quanto nos estudos relacionados ao desenvolvimento de vacinas.

Em conclusão, a utilização de camundongos e primatas como modelos experimentais de leishmaniose vem elucidando pontos importantes relacionados ao desenvolvimento da doença e da resposta imune subsequente. Esses modelos permitiram avaliar o papel dos diferentes componentes da resposta imune; e os achados resultantes de tais estudos têm permitido a



visualização de novas estratégias terapêuticas e de novos candidatos a vacinas. O modelo clássico de resistência e susceptibilidade, proposto a partir dos ensaios com *L. major*, permitiu-nos compreender a sintonia que existe entre resposta imune e patogênese. No entanto, resta o desafio de compreender como a *L. braziliensis* e a *L. amazonensis*, espécies que causam um espectro de doenças no homem, se comportam diante desse paradigma. A utilização dos modelos ditos “naturais” de transmissão (infecção intradérmica, presença da saliva do vetor) nos permitirá avançar nesses conhecimentos de maneira mais fiel à biologia da relação patógeno-hospedeiro.

## Referências Bibliográficas

- Aebischer T, Moody SF, Handman E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infect Immun* 61: 220-226, 1993.
- Almeida RP, Barral-Netto M, De Jesus AM, De Freitas LA, Carvalho EM, Barral A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *Am J Trop Med Hyg* 54: 178-184, 1996.
- Amaral VF, Ransatto VA, Conceicao-Silva F, Molinaro E, Ferreira V, Coutinho SG, McMahon-Pratt D, Grimaldi G, Jr. *Leishmania amazonensis*: the Asian rhesus macaques (*Macaca mulatta*) as an experimental model for study of cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 82: 34-44, 1996.
- Badolato R, Sacks DL, Savoia D, and Musso T. *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. *Exp Parasitol* 82: 21-26, 1996.
- Balestieri FM, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Netto M, Abrahamsohn I. de A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect* 4: 23-29, 2002.
- Barral A, Barral-Netto M, Almeida R, de Jesus AR, Grimaldi Junior G, Netto EM, Santos I, Bacellar O, Carvalho EM. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *Am J Trop Med Hyg* 47: 587-592, 1992.
- Barral A, Barral-Netto M, Yong EC, Brownell CE, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3442-3446, 1993.
- Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 53: 256-259, 1995.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44: 536-546, 1991.
- Barral-Netto M, Cardoso SA, Barral A. Different patterns of disease in two inbred mouse strains infected with a clone of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Acta Trop* 44: 5-11, 1987.
- Barral-Netto M, da Silva JS, Barral A, Reed S. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. *Am J Pathol* 146: 635-642, 1995.
- Barral-Netto M, Von Sothsen RL, Teixeira M, dos Santos WL, Pompeu ML, Moreira RA, Oliveira JT, Cavada BS, Falcoff E, Barral A. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop* 60: 237-250, 1996.
- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 188: 1941-1953, 1998.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420: 502-507, 2002.
- Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, Sacks D. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 168: 3992-4000, 2002.
- Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Romero SZ, Perez-Becker R, Saavedra-Lira E, Perez-Montfort R, Crippa-Rossi M, Velasco-Castrejon O, Becker I. *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. *Exp Parasitol* 95: 277-284, 2000.
- Bittencourt A, Barral-Netto M. Leishmaniasis. In: *Tropical Pathology* (2nd ed.), edited by Doerr W SG. Springer, Berlin, 1995, p. 597-651.
- Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med* 191: 2121-2130, 2000.

19. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12: 64-76, 2000.
20. Bogdan C, Rollinghoff M, and Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173: 17-26, 2000.
21. Childs GE, Lightner LK, McKinney L, Groves MG, Price EE, Hendricks LD. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiops*. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 25-34, 1984.
22. Couret N, Lang T, Milon G, Antoine JC. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 33: 1373-1383, 2003.
23. de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI. Towards a novel experimental model of infection to study American Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*, no prelo.
24. DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 66: 827-829, 1998.
25. Falcoff R, Barral-Netto M, Stiffel C, Bouthillier Y, Barral A, Freitas LA, Mevel JC, Mouton D. Variations in susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection in lines of mice selected for high or low immunoresponsiveness. *Parasite Immunol* 13: 639-647, 1991.
26. Gomes IN, Calabrich AF, Tavares RS, Wietzerbin J, de Freitas LA, Veras PS. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes Infect* 5: 251-260, 2003.
27. Gumy A, Louis JA, Launois P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol* 34: 433-444, 2004.
28. Indiani de Oliveira C, Teixeira MJ, Teixeira CR, Ramos de Jesus J, Bomura Rosato A, Santa da Silva J, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect* 6: 977-984, 2004.
29. Ji J, Sun J, and Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 71: 4278-4288, 2003.
30. Jones TC, Johnson WD, Jr., Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis* 156: 73-83, 1987.
31. Kebaier C, Louzir H, Chenik M, Ben Salah A, Dellagi K. Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response. *Infect Immun* 69: 4906-4915, 2001.
32. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana mexicana*, *L. (M.) amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. (B.) guyanensis* and *L. (B.) panamensis*. *J Trop Med Hyg* 80: 29-35, 1977.
33. Lemos de Souza V, Ascencao Souza J, Correia Silva TM, Sampaio Tavares Veras P, Rodrigues de-Freitas LA. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect* 2: 1807-1815, 2000.
34. Lima HC, Titus RG. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun* 64: 5442-5445, 1996.
35. Llanos Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, Marsden PD. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 845-846, 1984.
36. Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 200: 201-210, 2004.
37. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91: 1390-1395, 1993.
38. Pompeu M, Freitas AL, dosReis GA, Barral-Netto M. T-lymphocytes in experimental *Leishmania amazonensis* infection: comparison between immunized and naive BALB/c mice. *Parasitol Res* 78: 16-22, 1992.
39. Pompeu ML, Freitas LA, Santos ML, Barral A, Barral-Netto M. *Leishmania amazonensis* infection: a comparison of *in vivo* leishmanicidal mechanisms between immunized and naive infected BALB/c mice. *Exp Parasitol* 74: 169-176, 1992.
40. Racoosin EL, Beverley SM. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp Parasitol* 85: 283-295, 1997.
41. Ramirez JL, Guevara P. Persistent infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 333-338, 1997.
42. Ritter U, Moll H, Laskay T, Brocker E, Velazco O, Becker I, Gillitzer R. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis* 173: 699-709, 1996.
43. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2: 845-858, 2002.

44. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-562, 2004.
45. Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi G, Jr., Fernandes O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis* 178: 911-914, 1998.
46. Sousa AQ, Parise ME, Pompeu MM, Coehlo Filho JM, Vasconcelos IA, Lima JW, Oliveira EG, Vasconcelos AW, David JR, Maguire JH. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceara, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 53: 380-385, 1995.
47. Teixeira MJ, Fernandes JD, Teixeira CR, Andrade BB, Pompeu ML, Santana da Silva J, Brodskyn CI, Barral-Netto M, Barral A. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect Immun* 73: 1191-1195, 2005.
48. Teva A, Porrozzini R, Cupolillo E, Pirmez C, Oliveira-Neto MP, Grimaldi G, Jr. *Leishmania (Viannia) braziliensis*-induced chronic granulomatous cutaneous lesions affecting the nasal mucosa in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. *Parasitology* 127: 437-447, 2003.
49. Theodos CM, Ribeiro JM, Titus RG. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on leishmania infection in mice. *Infect Immun* 59: 1592-1598, 1991.
50. Titus RG, Milon G, Marchal G, Vassalli P, Cerottini JC, Louis JA. Involvement of specific Lyt-2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 17: 1429-1433, 1987.