

# Resposta imune na infecção por *Leishmania infantum* em modelo murino

Élia Cabrita<sup>1</sup>, Lenea Campino<sup>2</sup>, Carla Maia<sup>3</sup>

1. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, [ecabrita@ihmt.unl.pt](mailto:ecabrita@ihmt.unl.pt)

2. Unidade de Leishmanioses, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

3. Centro de Malária e outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

**RESUMO:** As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do género *Leishmania* que são parasitas intracelulares obrigatórios das células fagocíticas. O objectivo deste estudo foi caracterizar a infecção por *Leishmania infantum* em murganhos BALB/c inoculados por via intradérmica, analisando a evolução do parasitismo e as respostas imunitárias desenvolvidas. A carga parasitária foi determinada por PCR em tempo real. Foram detectados parasitas desde o 7º dia pós-infecção, verificando-se a disseminação visceral do parasita ao 56º dia pós-infecção. Os linfócitos dos animais do grupo infectado proliferaram em resposta à estimulação antigénica, enquanto que os macrófagos peritoneais produziram nitritos na presença do antigénio. Estes resultados demonstraram que os murganhos BALB/c inoculados por via intradérmica constituem um bom modelo experimental de leishmaniose visceral.

*Palavras-chave:* *Leishmania infantum*, resposta imune, modelo animal, óxido nítrico, proliferação linfocitária, PCR em tempo real

## Immune response in infection by *Leishmania infantum* based on animal model

**ABSTRACT:** Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* that are phagocytic cells-obligated intracellular parasites. The aim of this study was to characterize the infection by *Leishmania infantum* on intradermally inoculated BALB/c mice, analyzing the evolution of parasitism and the immune responses developed. Parasite load was determined by real time PCR. Since day 7 post-infection, parasites were detected and visceral dissemination was observed 56 days post-infection. Lymphocytes from the animals of the infected group proliferated in response to antigenic stimulation, while peritoneal macrophages produced nitric oxide in the presence of *Leishmania* antigen. These results demonstrated that BALB/c mice intradermally inoculated are a good experimental model of visceral leishmaniasis.

*Keywords:* *Leishmania infantum*, immune response, animal model, nitric oxide, lymphocyte proliferation, real time PCR

### Introdução

As Leishmanioses são doenças causadas por um protozoário intracelular obrigatório das células fagocíticas do género *Leishmania*<sup>1</sup>. A transmissão destes parasitas para o hospedeiro vertebrado faz-se através de um insecto-vector, a fêmea flebotomínea, dos géneros *Phlebotomus* (*P.*), no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo<sup>2</sup>. *Leishmania* (*L.*) *infantum* é o principal agente etiológico nos países da bacia mediterrânica, sendo *P. perniciosus* e *P. ariasi* os principais vectores<sup>3-4</sup> e o cão o principal reservatório<sup>5-6</sup>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as leishmanioses são endémicas em 88 países distribuídos por todos os

continentes, com excepção da Austrália e da Antárctida, estimando-se em 350 milhões o número de pessoas em risco de contrair a infecção. A prevalência mundial é de 12 milhões de casos, com milhão e meio a dois milhões de novos casos por ano: quinhentos mil casos de leishmaniose visceral (LV) e de um a um milhão e meio de leishmaniose cutânea (LC)<sup>7</sup>.

O largo espectro fenotípico das leishmanioses está dependente da espécie infectante, da resposta imunológica e das características genéticas do hospedeiro. O modelo murino tem contribuído para a compreensão dos mecanismos responsáveis pela patogénese e pela resposta imunitária

à infecção por *Leishmania*. A distribuição do parasita no organismo, a resposta imunitária, assim como o quadro clínico da doença são também influenciados pela via de inoculação e pelo número de parasitas inoculados<sup>8-9</sup>. Nas infecções experimentais de LV, as vias endovenosa e intraperitoneal (IP) são as mais utilizadas para inoculação dos parasitas<sup>10-13</sup>. Embora as vias subcutânea e intradérmica (ID) sejam as mais próximas do que ocorre na natureza com a picada do vector, existem poucos estudos com a sua utilização.

Estes protozoários possuem moléculas fortemente imunogénicas, com capacidade de induzir o sistema imunitário do hospedeiro a desenvolver uma resposta ineficaz<sup>14</sup>. Alguns estudos demonstraram que ocorre a inibição da síntese de óxido nítrico (NO) nos macrófagos<sup>15</sup> e que o parasita tem a habilidade de resistir ao pH ácido das células onde se desenvolve, multiplicando-se dentro do fagolisossoma<sup>16</sup>. Estes últimos, ao estarem infectados por *Leishmania*, são menos eficientes na produção de citocinas e/ou estimulação das outras células efectoras<sup>17-19</sup>. À medida que o parasita se diferencia, o macrófago perde a capacidade de ser uma célula apresentadora de antigénio<sup>20</sup>. A ausência de respostas linfoproliferativas ao antigénio específico foi já demonstrada na fase aguda de LV humana<sup>8-9</sup>, bem como em cães<sup>21</sup> e em hamsters<sup>22</sup> infectados por *L. infantum*.

O presente estudo teve como objectivo caracterizar a evolução do parasitismo e as respostas imunitárias desenvolvidas em murganhos BALB/c inoculados com *L. infantum* pela via ID.

## Metodologia

### 1. Murganhos e Infecção

Cinquenta e seis fêmeas BALB/c, entre seis a oito semanas de idade, foram adquiridas à *Harlan Interfauna Ibérica* (Barcelona, Espanha) e alojadas no biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Lisboa) em condições climáticas e de nutrição adequadas, de acordo com a norma comunitária (86/609/CEE) relativa ao bem-estar dos animais de experiência e transposta para a lei nacional (D.L. n.º 129/92 e Portaria n.º 1005/92, de 23 de Outubro, D.R., I série – B, n.º 245).

Para a infecção dos murganhos e *in vitro* dos macrófagos foi usada a estirpe de *Leishmania infantum* MON-1. Um grupo de 28 animais (Grupo W) foi inoculado pela via ID na orelha direita com  $10^7$  promastigotas de *L. infantum* em 5 µl de solução salina por cada animal. Os restantes animais constituíram o grupo controlo (Grupo C) e foram inoculados com 5 µl de solução salina. Antes de serem inoculados, os animais foram sedados com 150 mg de cetamina (Imalgene® 1000, Rhône Mérieux, Portugal) e 15 mg de xilazina a 2% (Rompun®, Bayer, Portugal) por kilo do animal, administrado por via IP. A experiência foi realizada uma vez.

### 2. Parasitas

Utilizaram-se formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* zimodemo MON-1 (MCAN/PT/05/IMT373) obtidas

em cultura a partir de aspirado ganglionar de um cão com leishmaniose. A metaciclogénese foi realizada segundo o método descrito por Howard<sup>23</sup>.

### 3. Recolha de amostras

Aos dias (D) 7, 14, 28, 42, 56, 84 e 112 pós-infecção (PI) foram sacrificados 4 animais de cada grupo por *overdose* da mistura anestésica descrita em 1. A cada animal foram retirados: o sangue, os macrófagos peritoneais, as orelhas, o gânglio linfático regional (cervical), o baço, o fígado e um fémur para colheita da medula óssea.

As amostras obtidas de cada animal foram colocadas individualmente em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Biochrom, Alemanha) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS) (Biochrom, Alemanha), com excepção do sangue periférico que foi recolhido para tubos contendo 2,0 mg de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA)/ml de sangue e do líquido peritoneal de todos os animais do mesmo grupo e que foi colocado em tubos de 50 ml sem aditivo; os macrófagos peritoneais de cada grupo foram utilizados em *pool* para análise da produção de NO.

### 4. Tratamento de Amostras

O baço e o fígado de cada animal foram macerados em 2 ml e 5 ml de meio RPMI, respectivamente, antes de serem utilizados nos diferentes procedimentos. Foram utilizados 200 µl de macerado esplénico para extracção de ácido desoxirribonucleico (DNA) e, com o restante, foi feito o *pool* dos vários animais, de acordo com o grupo a que pertenciam, para a realização do ensaio da proliferação linfocitária.

Os gânglios linfáticos e a pele de ambas as orelhas foram seccionados em pequenos fragmentos para extracção de DNA. A extracção da medula óssea do fémur foi realizada com uma agulha de 25G em seringa contendo 1ml de RPMI.

Procedeu-se à extracção do DNA das amostras utilizando kits comerciais: *PCR Template Preparation Kit*, (Roche Diagnostics GmbH) para o sangue e *EasySpin Genomic DNA Minipreps Tissue Kit* (Citomed) para as restantes amostras.

### 5. Carga Parasitária

A determinação e quantificação da carga parasitária foram realizadas através da reacção em cadeia da polimerase *TaqMan*® em tempo real (qPCR), como descrito por Rolão<sup>24</sup>. O número de parasitas nas amostras foi determinado a partir da curva padrão (declive = -3,273589; intercepção = 28,818321;  $R^2 = -0,998977$ ), construída a partir de uma cultura de massa de promastigotas de *L. infantum*. A concentração de parasitas na cultura foi determinada pelo valor médio de 10 contagens realizadas em hemacitometro ao microscópio óptico. As culturas foram então diluídas de 1:10, entre  $1 \times 10^6$  e 1 parasita. De seguida, procedeu-se à extracção de DNA dos parasitas de cada uma das diluições, utilizando o método referido no ponto anterior para as amostras de sangue.

As amostras de DNA foram analisadas usando os oligonucleótidos (Applied Biosystems) 5'GGTTAGCCGATGGTGGTCTT3' (*primer forward*), 5'GCTATATCATATGTCCAAGCACTACCT3'

**Tabela 1:** Carga parasitária detectada nos tecidos de BALB/c do grupo W ao 7º (a) e ao 56º (b) dia pós-inoculação com *Leishmania infantum*

| 1a               | Carga parasitária (parasitas/ µg DNA) |               |
|------------------|---------------------------------------|---------------|
|                  | Média                                 | Desvio padrão |
| Orelha direita   | 104,33                                | 183,55        |
| Orelha esquerda  | 7,71                                  | 10,69         |
| Gânglio regional | 0,77                                  | 1,54          |

| 1b     | Carga parasitária (parasitas/ µg DNA) |               |
|--------|---------------------------------------|---------------|
|        | Média                                 | Desvio padrão |
| Fígado | 1,05                                  | 2,10          |
| Baço   | 1,59                                  | 1,83          |
| Sangue | 0,00                                  | 0,00          |
| Medula | 4,50                                  | 5,43          |

(*primer reverse*) e a sonda TaqMan® 5'ACCACCTAAGGT CAACCC3', resultando um produto de ampliação de 90 pares de bases.

## 6. Produção de Óxido Nítrico

O método utilizado foi adaptado de Ding<sup>25</sup>. Resumidamente, colocou-se por poço de microplaca de ELISA, com fundo em U, 150 µl de macrófagos peritoneais (2x10<sup>6</sup> células/ml). Às células para estimulação foram adicionados, por poço, 10 µg/ml de antigénio (Ag) total de *Leishmania*. Às células não estimuladas adicionaram-se 50 µl de meio RPMI/FCS a 10%, perfazendo assim um total de 200 µl em cada poço da placa. Após incubação a +37° C e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) durante 48 horas, procedeu-se à quantificação de nitritos presentes no sobrenadante das culturas celulares, através da reacção colorimétrica de Griess. Paralelamente, foram utilizadas várias concentrações (padrões) de nitrito de sódio (1,56 a 100 µM). Todas as amostras foram testadas em duplicado. A densidade óptica foi lida a 550 nm em espectrofotómetro de microELISA. A concentração de nitritos nas amostras foi determinada a partir da curva padrão, construída com base nos valores de absorvância dos padrões ( $y = 0,0061x + 0,0721$ ;  $R^2 = 0,9997$ ).

## 7. Proliferação Linfocitária

Neste estudo, a técnica de proliferação linfocitária utilizada foi adaptada de Maluish e Strong<sup>26</sup>. Basicamente, as células mononucleadas, isoladas dos macerados esplênicos por gradiente de concentração, foram colocadas em microplaca de ELISA em fundo em U. Em cada poço colocaram-se 150 µl de células (2x10<sup>6</sup> células/ml). Às células para estimulação foram adicionados, por poço, 10 µg/ml de Ag total de *Leishmania* ou 5 µg/ml do mitogénio Concanavalina A (ConA) (Sigma, USA). Às células não estimuladas adicionaram-se 50 µl de meio RPMI/FCS a 10%, perfazendo assim um total de 200 µl em cada poço da placa. Após incubação a +37° C e 5% CO<sub>2</sub> durante 72 horas, adicionaram-se 25 µl de timidina tritiada (radioactiva) em todos os poços, tendo-se

**Tabela 2:** Produção de nitritos por macrófagos peritoneais de BALB/c, estimulados com antigénio parasitário

|      | Concentração de nitritos (µM) |         |
|------|-------------------------------|---------|
|      | Grupo W                       | Grupo C |
| D7   | 1,56                          | 0,21    |
| D14  | 4,38                          | 2,02    |
| D28  | 3,26                          | 0,96    |
| D42  | 0,00                          | 0,15    |
| D56  | 2,63                          | 0,77    |
| D84  | 0,05                          | 0,28    |
| D112 | 3,24                          | 1,12    |

medido a radioactividade emitida pelas células em divisão 14 a 16 horas após incubação com a timidina. Os resultados são expressos em número de cintilações por minuto (cpm), sendo o índice de estimulação (IE) determinado pela razão entre o valor médio de cpm dos triplicados das células estimuladas (ConA ou Ag) e o valor médio das células não estimuladas.

No presente estudo, tendo em conta os resultados de IE obtidos no Grupo C em resposta ao antigénio (IE máximo de 1,1) considerou-se positivo um resultado de IE  $\geq 1,5$ <sup>27</sup>.

## 8. Análise Estatística

A análise estatística foi efectuada no programa *Statistical Package for Social Sciences* 16.0 (SPSS Inc., USA). O teste não paramétrico de Friedman foi utilizado para comparar, ao longo do período de observação, a carga parasitária entre os diferentes órgãos, assim como para avaliar a proliferação linfocitária e a produção de NO nos dois grupos de murganhos em estudo. As diferenças foram consideradas significativas para um nível de significância de 5% ( $P \leq 0,05$ ).

## Resultados

### 1. Carga Parasitária

No D7 foram detectados parasitas em ambas as orelhas e nos gânglios linfáticos regionais (*cf.* Tabela 1a). Mas ao D56 apenas foram detectados no fígado, no baço e na medula óssea (*cf.* Tabela 1b).

No início das infecções, a orelha direita foi o local onde se detectou a maior carga parasitária (104,33 parasitas/ µg DNA) correspondendo ao local onde foi feita a inoculação. Já ao D56 verificou-se a carga parasitária mais elevada na medula óssea (4,50 parasitas/ µg DNA). Não se detectaram parasitas nos animais do grupo C durante o tempo de estudo.

### 2. Produção de Óxido Nítrico

A produção de nitritos pelos macrófagos dos animais dos dois grupos, cultivados na ausência de estímulo externo, não ultrapassou 2 µM. Apesar de no D14 se ter observado a produção máxima de nitritos (4,38 µM) em resposta ao Ag pelos macrófagos do grupo W, a activação das células também ocorreu nos D28, D56 e D112 (*cf.* Tabela 2). No grupo C não houve valores de NO iguais.

**Tabela 3:** Resposta proliferativa ao antígeno parasitário dos linfócitos extraídos do baço de BALB/c

|     | Índice de estimulação linfocitária |         |
|-----|------------------------------------|---------|
|     | Grupo W                            | Grupo C |
| D7  | 0,80                               | 1,00    |
| D14 | 1,40                               | 0,20    |
| D28 | 2,50                               | 0,50    |
| D42 | 0,90                               | 1,10    |
| D56 | 1,50                               | 0,80    |

### 3. Proliferação Linfocitária

Os linfócitos esplênicos dos animais dos grupos C e W responderam à estimulação na presença do mitogénio ConA. Os IE médios para os grupos estudados foram 5,3 no grupo C e 7,5 no grupo W.

Em resposta à estimulação antigénica, verificou-se que houve proliferação linfocitária das células do baço dos animais do grupo W nos D28 e D56. No grupo C não houve resposta proliferativa ao Ag parasitário ao longo de todo o período experimental (cf. Tabela 3).

### Discussão

A evolução da infecção experimental depende de vários factores, como a espécie do parasita e respectiva virulência, o inóculo (a concentração e a forma dos parasitas) e a via de inoculação<sup>28</sup>. A maioria das infecções experimentais de LV em murganhos são causadas pela inoculação de  $10^7$  parasitas por animal<sup>28-33</sup> e a via de inoculação mais comumente utilizada é a IP, por ser mais fácil de executar e por dar origem a uma maior homogeneidade das infecções<sup>8</sup>. Por outro lado, a via de inoculação ID é tida como a que mimetiza melhor a infecção natural; contudo, a doença desenvolve-se mais lentamente e os animais permanecem assintomáticos durante um longo período de tempo<sup>33-39</sup>.

O modelo experimental utilizado, BALB/c, é considerado susceptível, o que significa que desenvolve a doença e a espécie *L. infantum* é viscerotrópica, *i.e.*, dissemina-se a partir do local da infecção para os órgãos viscerais, como o baço e o fígado<sup>31-34,36</sup>, tal como aconteceu neste estudo.

No presente estudo, a inoculação ID de  $10^7$  promastigotas por animal resultou na visceralização da infecção. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Ahmed<sup>40</sup>, que observaram parasitas no fígado e no baço de murganhos uma semana após a inoculação ID de *L. infantum*. A escolha da concentração utilizada de promastigotas deveu-se ao facto da maioria das infecções experimentais, em modelo murino, com espécies viscerotrópicas de *Leishmania*, assim como no único estudo publicado que utilizou a via ID<sup>40</sup>, terem aplicado este número de parasitas. A utilização de uma concentração diferente impediria a comparação dos nossos resultados com os dos outros autores. No nosso estudo, passados 7 dias PI, foram detectados parasitas

na pele da orelha direita (local da inoculação), na pele da orelha esquerda e nos gânglios linfáticos regionais e, ao fim de 56 dias PI, no fígado, no baço e na medula óssea, o que significa que o parasita teve capacidade de se desenvolver e multiplicar *in vivo* no hospedeiro mamífero, o que prova que os promastigotas inoculados se encontravam na forma metacíclica ou virulenta.

Santos-Gomes<sup>41</sup>, num ensaio em que utilizou a via ID para inocular *L. infantum* em cães, observou que a transformação de promastigotas metacíclicas em amastigotas ocorre entre 30 minutos a 24 horas após a inoculação, pelo que podemos deduzir que ao D7 todos os promastigotas que não foram eliminados pelo sistema imunitário se transformaram em amastigotas. Ahmed<sup>40</sup>, utilizando a mesma via, também observou os parasitas na derme nos primeiros dias PI e, com o decorrer da experiência, verificou uma migração para os tecidos mais profundos. No nosso estudo não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na carga parasitária entre os diferentes órgãos analisados. Este resultado, assim como o obtido por Ahmed<sup>40</sup>, foi contrário aos obtidos por outros autores que sugerem o baço como o órgão mais susceptível à multiplicação dos parasitas de estirpes viscerotrópicas<sup>31,41-42</sup>. Foi também demonstrado que em infecções experimentais que utilizam a mesma espécie de *Leishmania*, o mesmo modelo animal e o mesmo tipo de inoculação, a evolução do parasitismo pode ser influenciada pela virulência da estirpe utilizada ou mesmo do isolado utilizado.

Moll<sup>42</sup> propõe que as células de Langerhans (células dendríticas) da pele são responsáveis pelo transporte dos parasitas até aos gânglios linfáticos, de modo a activarem as células efectoras, como as Natural Killer e os linfócitos T. Então, o desaparecimento dos parasitas da derme pode dever-se à sua eliminação através da resposta imune local, assim como à sua disseminação para os órgãos internos<sup>40</sup>.

Em resposta ao antígeno parasitário, no grupo W, verificou-se que os macrófagos peritoneais produziram nitritos nos dias D14, D28, D56 e D112 e os linfócitos esplênicos dos animais proliferaram nos dias D28 e D56. Isto poderá indicar que os macrófagos estavam activados e que talvez a produção de NO esteja relacionada com a eliminação dos parasitas. A seguir ao D7 verificámos uma elevada produção de nitritos em resposta ao antígeno parasitário, a qual foi diminuindo até ao D42. Talvez por isso, no D56 voltaram a ser detectados parasitas. No entanto, no dia 56 observou-se novamente a produção de NO, o que traduz a activação dos macrófagos que poderá estar na origem da não detecção de parasitas nos dias seguintes (D84 e D112).

O estudo da proliferação linfocitária demonstrou que não houve imunossupressão dos linfócitos esplênicos devido à infecção. A resposta celular manteve-se positiva de forma intermitente ao longo do estudo.

### Conclusão

A infecção experimental de murganhos BALB/c, inoculados por via ID com parasitas *Leishmania infantum*, mostrou ser um bom modelo para a LV. Verificou-se um tropismo dos



parasitas do local da inoculação (orelha direita), inicialmente para a outra orelha e gânglios linfáticos regionais e, posteriormente, para os órgãos mais profundos, como o baço, o fígado e a medula óssea, sugerindo que esta via de inoculação, ao causar uma evolução lenta da infecção, permite o estabelecimento de uma resposta celular imunológica protectora. Através de qPCR, foi possível detectar e quantificar os parasitas desde o D7, mostrando ser uma técnica sensível, de fácil execução e rápida na obtenção dos resultados.

### Referências Bibliográficas

- Lainson R, Shaw J. Evolution, classification and geographical distribution. In Peters W, Killick-Kendrick R (Eds.). *The Leishmaniasis in biology and medicine*. Vol. 1. London: Academic Press; 1987. p. 1-20.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol*. 1990;4(1):1-24.
- Killick-Kendrick R, Rioux J. Mark release recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia*. 2002;44(1-2):67-71.
- Aransay AM, Ready PD, Morillas-Marquez F. Population differentiation of *Phlebotomus perniciosus* in Spain following postglacial dispersal. *Heredity*. 2003;90(4):316-25.
- Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em sobral, Ceará. *Hospital*. 1955;47:75-87.
- Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(2):125-30.
- World Health Organization. *Leishmaniasis*. Geneva: WHO; 2008 [cited 2008 Sep]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
- Rolão N, Melo C, Campino L. Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. *Acta Trop*. 2004;90(1):123-6.
- Melby PC, Tryon W, Chandrasekar B, Freeman GL. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. 1998;66(5):2135-42.
- Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF, Finkelman FD, Murray HW. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. 1994;62(3):1058-63.
- Leclercq V, Lebastard M, Belkaid Y, Louis J, Milon G. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *J Immunol*. 1996;157(10):4537-45.
- Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxid synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*. 1995;25(3):745-50.
- Rolão N, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/ T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Exp Parasitol*. 2007;115(3):270-6.
- Reed SG, Scott P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr Opin Immunol*. 1993;5(4):524-31.
- Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxid synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*. 1995;25(3):745-50.
- Bogdan C, Röllinghoff M, Solbach W. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitol Today*. 1990;6(6):183-7.
- Reiner NE. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin 1 response by *Leishmania donovani*. *J Immunol*. 1987;138(6):1919-25.
- Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):293-305.
- Gregory DJ, Olivier M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology*. 2005;130 Suppl:S27-35.
- Courret N, Prina E, Mougneau E, Saraiva EM, Sacks DL, Glaichenhaus N, et al. Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. *Eur J Immunol*. 1999;29(3):762-73.
- Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Tolão N, et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001;79(3-4):273-84.
- Riça-Capela MJ, Cortes S, Leandro C, Peleteiro MC, Santos-Gomes GM, Campino L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol Res*. 2003;89(3):163-9.
- Howard MK, Sayers G, Miles MA. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation in vitro, lectin agglutination, complement resistance and infectivity. *Exp Parasitol*. 1987;64(2):147-56.
- Rolão N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction – enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol*. 2004;90(5):1150-4.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*. 1988;141(7):2407-12.
- Maluish AE, Strong DM. Lymphocyte proliferation. In Rose NR, Friedman H, Fahey JL, editors. *Manual of clinical laboratory immunology*. 3<sup>rd</sup> ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986. p. 274-81.
- Maia C. *Interação parasita-hospedeiro e susceptibilidade de Leishmania infantum a fármacos* [dissertation]. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa; 2003.
- Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol*. 1995;89 Suppl 1:55-73.

29. Olivier M, Proulx C, Tanner CE. Importance of lymphokines in the control of multiplication and dispersion of *Leishmania donovani* within liver macrophages of resistant and susceptible mice. *J Parasitol.* 1989;75(5):720-7.
30. Murray HW, Granger AM, Mohanty SK. Response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis: T-cell dependent but Interferon- $\gamma$  - and Interleukin-2-independent. *J Infect Dis.* 1991;163(3):622-4.
31. Wilson ME, Young BM, Davidson BL, Mente KA, McGowan SE. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 1998;161(11):6148-55.
32. Wilson ME, Recker TJ, Rodriguez NE, Young BM, Burnell KK, Streit JA, et al. The TGF-beta response to *Leishmania chagasi* in the absence of IL-12. *Eur J Immunol.* 2002;32(12):3556-65.
33. Paranhos-Silva M, Oliveira GG, Reis EA, de Menezes RM, Fernandes O, Sherlock I, et al. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Vet Parasitol.* 2003;114(2):97-111.
34. De Moura TR, Oliveira F, Novais FO, Miranda JC, Clarêncio J, Follador I, et al. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following preexposure to Sandfly Saliva. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007;1(2):e84.
35. Goto H, Lindoso JA. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(4):615-23.
36. Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(2):138-47.
37. Garin YJ, Sulahian A, Pralong F, Meneceur P, Gangneux JP, Prina E, et al. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infect Immun.* 2001;69(12):7365-73.
38. Gomes-Pereira S, Rodrigues OR, Rolão N, Almeida PD, Santos-Gomes GM. Hepatic cellular immune responses in mice with "cure" and "non-cure" phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8+ T cells and TGF-beta production. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004;41(1):59-68.
39. Rodrigues OR, Moura RA, Gomes-Pereira S, Santos-Gomes GM. H-2 complex influences cytokine gene expression in *Leishmania infantum*-infected macrophages. *Cell Immunol.* 2006;243(2):118-26.
40. Ahmed S, Colmenares M, Soong L, Goldsmith-Pestana K, Munstermann L, Molina R, et al. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun.* 2003;71(1):401-10.
41. Santos-Gomes GM, Campino L, Abranches P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(2):193-8.
42. Moll H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today.* 1993;14(8):383-7.

Artigo recebido em 25.02.2010 e aprovado em 08.07.2010.