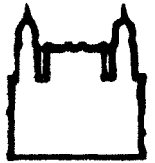




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**FAGÓCITOS MONONUCLEARES INFLAMATÓRIOS
POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE
DE LEISHMANIA EM HOSPEDEIROS VERTEBRADOS**

MICELY D'EL-REI HERMIDA

Salvador - Bahia - Brasil

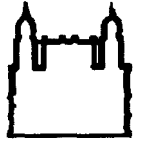
2007





UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**FAGÓCITOS MONONUCLEARES INFLAMATÓRIOS
POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE DE
LEISHMANIA EM HOSPEDEIROS VERTEBRADOS**

MICELY D' EL-REI HERMIDA

**Salvador – Bahia – Brasil
2007**

CPqGM
Biblioteca

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

MICELY D' EL-REI HERMIDA

**FAGÓCITOS MONONUCLEARES INFLAMATÓRIOS
POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE DE
LEISHMANIA EM HOSPEDEIROS VERTEBRADOS**

Orientador: WASHINGTON LUIS CONRADO DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental

**Salvador – Bahia – Brasil
2007**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Hermida, Micely d' El-Rei
H554f Fagócitos mononucleares inflamatórios potencialmente envolvidos no
transporte de *Leishmania* em hospedeiros vertebrados [manuscrito]/Micely d'
El-Rei Hermida. - 2007
92 f.:il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Fundação Oswaldo
Cruz, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, Laboratório de
Patologia e Bio-Intervenção.

1. *Leishmania*. 2. Fagócitos. 3. Migração celular. 4. Leucócitos
Mononucleares. 5. Linfócitos. I.Título.

CDU 6.993.161:611.018.53

L. H. D. R.

FAGÓCITOS MONONUCLEARES INFLAMATÓRIOS POTENCIALMENTE
ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE DE *Leishmania* EM HOSPEDEIROS
VERTEBRADOS

MICELY D' EL-REI HERMIDA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Alda Maria da Cruz

Cláudia Brodsyn

Washington L. C. dos Santos
Pesquisador Titular
CPqGM - Fiocruz

A meus pais e meus irmãos pelo imenso amor e
atenção que têm sido cruciais para o meu
desenvolvimento pessoal e intelectual

À Eduardo, meu marido e amigo que, com tanto
amor, me dá suporte, estímulo, carinho e
equilíbrio juntamente com toda a sua família.

AGRADECIMENTOS

Dr. Washington Luís Conrado dos Santos, meu agradecimento pela atenção e grande paciência com que me orientou iniciada na iniciação científica, pela dedicação, preocupação e incentivo constante.

Dr. José Mengel, pela paciência e colaboração nos experimentos de citometria de fluxo, além das sugestões enriquecedoras ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho e Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira, pelo apoio e revisão crítica deste e de outros trabalhos.

Lara Utsch, Mariana Petattia e Nathanael Pinheiro, grandes amigos que participaram de momentos memoráveis em minha vida e que colaboraram muitos nos intermináveis experimentos para conclusão desse trabalho.

Joselli, Ingrid, Paula, Leina, Rafaela e Maíra, amigas e companheiras do laboratório que me ajudaram nos grandes multirões, principalmente Rafaela e Maíra que contribuíram muito com os ensaios de cinética e rastreamento celular e pela oportunidade de co-orientá-las em sua IC.

Cláudia Santana e Lenita Ramires pela amizade e por compartilhar as angústias e alegrias envolvidas nesta conquista.

Elivani dos Santos (Lívia), técnica competente e dedicada, que possibilita, anonimamente e com satisfação visível, todos os trabalhos em andamento no laboratório.

CAPES, pela bolsa de mestrado.

FAPESB, pelo financiamento desse projeto.

À Fiocruz e ao CPqGM, pela infra-estrutura física e pessoal que possibilitaram a execução dos experimentos desta dissertação, e pelo ambiente de trabalho ameno e positivo que encontramos neste centro.

Ana Fiscina Sampaio e todo o pessoal da biblioteca do CPqGM pela presteza no atendimento.

À turma do Mestrado em Patologia Experimental de 2005 pelo companheirismo e amizade.

Todos os laboratórios e funcionários do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DAS TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1.1 A LEISHMANIOSE	14
1.1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, ETIOLÓGICO E CLÍNICOS.	14
1.1.3 DETERMINANTES DAS FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE	18
1.2 FAGÓCITOS PROFISSIONAIS E A INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i>	19
1.2.1 NEUTRÓFILOS	20
1.2.2 NEUTRÓFILOS E <i>LEISHMANIA</i>	20
1.2.3 MONÓCITOS/MACRÓFAGOS	21
1.2.4 MONÓCITOS/MACRÓFAGOS E <i>LEISHMANIA</i>	23
1.2.5 CÉLULAS DENDRÍTICAS	25
1.2.6 CÉLULAS DENDRÍTICAS E <i>LEISHMANIA</i>	26
1.3 DISSEMINAÇÃO DA <i>LEISHMANIA</i> A PARTIR DO SÍTIO DE INFECÇÃO	27
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 GERAL:	34
3.2 ESPECÍFICOS:	34
4 DESENHO EXPERIMENTAL	35
5 MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1 ANIMAIS:	36
5.2 CINÉTICA DO INFLUXO E DA MIGRAÇÃO PARA O LINFONODO DRENANTE DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES PERITONEAIS APÓS O ESTÍMULO COM TIOGLICOLATO:	36
5.3 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO:	37
5.4 MARCAÇÃO DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES OU <i>LEISHMANIA</i> COM PKH26:	38
5.5 INJEÇÃO E RASTREAMENTO DE CÉLULAS MARCADAS:	38
5.6 CÉLULAS DO EXSUDATO PERITONEAL DE CAMUNDONGO:	40
5.7 PARASITOS:	40
5.8 INFECÇÃO DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES COM <i>LEISHMANIA</i> :	40
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA:	41

6 RESULTADOS	42
6.1 CINÉTICA PÓS-INJEÇÃO DE TIOGLICOLATO	42
6.1.1 POPULAÇÕES CELULARES:	43
6.2 MIGRAÇÃO CELULAR	47
6.2.1 CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS PERITONEAIS PARA O LINFONODO DRENANTE: -	47
6.2.2 INJEÇÃO E RASTREAMENTO DE CÉLULAS MARCADAS: -----	52
6.2.3 INJEÇÃO E RASTREAMENTO DE CÉLULAS MARCADAS APÓS INCUBAÇÃO: -----	54
6.3 POPULAÇÕES CELULARES DO EXSUDATO PERITONEAL QUATRO DIAS APÓS ESTÍMULO INFLAMATÓRIO COM TIOGLICOLATO	56
6.3.1 POPULAÇÃO CELULAR TOTAL APÓS INCUBAÇÃO DE DEZOITO-VINTE E QUATRO HORAS:	57
6.3.2 SUB-POPULAÇÕES CELULARES POR REGIÕES DE ANÁLISE EM CITOMETRIA DE FLUXO:	59
6.3.3 POPULAÇÕES CELULARES APÓS A INCUBAÇÃO COM <i>L. AMAZONENSIS</i> POR DEZOITO-VINTE E QUATRO HORAS: SUSCEPTIBILIDADE DIFERENCIAL NA INFECCÃO. -----	63
6.3.4 DISTRIBUIÇÃO DAS SUB-POPULAÇÕES NAS REGIÕES DEFINIDAS POR TAMANHO E GRANULOSIDADE APÓS INCUBAÇÃO POR POR DEZOITO-VINTE E QUATRO HORAS COM <i>L. AMAZONENSIS</i> -----	65
6.4 COMPARAÇÕES ENTRE A EXPOSIÇÃO DE MARCADORES POR CÉLULAS RECÉM ISOLADAS OU INCUBADAS EM TUBOS NÃO ADERENTES	69
7 DISCUSSÃO	71
8 CONCLUSÃO	80
9 PERSPECTIVAS	81
10 REFERÊNCIAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação das diferentes formas da leishmaniose e seus aspectos histológicos. -----	17
Figura 2.	Desenho esquemático sobre o aparecimento de fagócitos infectados no linfonodo regional. -----	28
Figura 3.	Relação dos fagócitos infectados com <i>Leishmania</i> entre componentes matriciais e celulares do tecido. -----	29
Figura 4.	Desenho esquemático sobre metodologia da injeção e rastreamento de células marcadas. -----	39
Figura 5.	Cinética do recrutamento de células para o peritônio após injeção de tioglicolato. -----	42
Figura 6.	Percentual das diferentes populações celulares observadas entre as células do exsudato peritoneal em diferentes períodos após a injeção de tioglicolato. -----	44
Figura 7.	Percentual das diferentes populações celulares observadas entre as células do exsudato peritoneal induzido por tioglicolato em diferentes pontos de tempo analisados utilizando-se citometria de fluxo. -----	46
Figura 8.	Morfologia das células da cavidade peritoneal antes e após estímulo inflamatório. -----	47
Figura 9.	Linfonodo para-tímico 4 dias após a injeção de salina. -----	48
Figura 10.	Linfonodo para-tímico 8 horas após a injeção de tioglicolato. ----	49
Figura 11.	Linfonodo para-tímico 12 horas e 4 dias após a injeção de tioglicolato. -----	50
Figura 12.	Linfonodo para-tímico 10 dias e 40 dias após a injeção de tioglicolato. -----	51
Figura 13.	Migração de fagócitos mononucleares inflamatórios para o linfonodo regional 18-24 após a injeção intra-peritoneal das células coradas com PKH26. -----	53
Figura 14.	Migração de fagócitos mononucleares inflamatórios para o linfonodo regional após 18-24 horas de incubação. -----	55
Figura 15.	Distribuição das populações de células do exsudato peritoneal quatro dias após a indução de peritonite estéril com tioglicolato. -----	57

Figura 16.	Distribuição de fagócitos mononucleares inflamatórios peritoneais. -----	58
Figura 17.	Análise por citometria de fluxo das células peritoneais obtidas de camundongos da linhagem BALB/c após 4 dias de estímulo inflamatório com tioglicolato.-----	59
Figura 18.	Distribuição de fagócitos mononucleares inflamatórios peritoneais nas diferentes sub-populações.-----	61
Figura 19.	Distribuição da população de células CD11c⁺MHC-II⁺ entre os fagócitos peritoneais inflamatórios nas diferentes sub-populações. -----	62
Figura 20.	População de células CD11c⁺/MHC-II^{high} entre os fagócitos peritoneais inflamatórios infectados por <i>L. amazonensis</i> por 18-24 horas. -----	64
Figura 21.	Distribuição das células CD11c⁺CD11b⁺ após infecção com <i>Leishmania</i> nas diferentes sub-populações e respectiva taxa de infecção. -----	66
Figura 22.	Distribuição da população de células CD11c⁺MHC-II⁺ entre os fagócitos peritoneais inflamatórios infectados por <i>L. amazonensis</i> por 18-24 horas nas diferentes sub-populações.-----	67
Figura 23.	População de células CD11c⁺ MHC-II^{high} entre as células CD11c⁺ infectadas dentro da região 4. -----	68
Figura 24.	Percentual dos fagócitos peritoneais positivos para moléculas CD11b, antígeno F4/80, MHC-II, CD11c após os diferentes tratamentos adotados.. -----	69
Figura 25.	Intensidade da expressão de diferentes moléculas nos fagócitos peritoneais infectados ou não com <i>Leishmania</i>. -----	70

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1.	Número dos linfonodos em que a migração foi verificada. -----	50
Tabela 2.	Distribuição das sub-populações de células nas diferentes regiões (R1-R4) definidas por granulidade e tamanho do total de células do exsudato peritoneal de camundongos da linhagem BALB/c após 4 dias de estímulo inflamatório com tioglicolato. -----	60
Tabela 3.	Distribuição das populações celulares e células infectadas em cada população após 18-24 horas de incubação do PEC¹ com <i>L. amazonensis</i>. -----	63
Tabela 4.	Taxa de infecção das células do exsudato peritoneal de camundongo incubadas com <i>Leishmania</i> por 18-24 horas e marcadas contra CD11b e CD11c. -----	64
Tabela 5.	Distribuição das sub-populações celulares no exsudato peritoneal nas regiões definidas por tamanho e granulidade 4 dias após o estímulo inflamatório com tioglicolato e incubação <i>in vitro</i> com ou sem <i>Leishmania</i> por 18-24 horas. -----	65

RESUMO

FAGÓCITOS MONONUCLEARES INFLAMATÓRIOS POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE DE LEISHMANIA EM HOSPEDEIROS VERTEBRADOS. **MICELY D' EL-REI HERMIDA.** A infecção por protozoários do gênero *Leishmania* modula a função de integrinas em fagócitos inflamatórios. Essa alteração pode interferir na migração celular e apresentação de antígenos ao sistema imune. O objetivo deste estudo é identificar populações de fagócitos mononucleares inflamatórios potencialmente envolvidos no transporte de *Leishmania* em hospedeiros vertebrados. Inicialmente, definimos um modelo que permite o estudo do processo de migração em um grande número de fagócitos mononucleares inflamatórios. Para isso, foi induzida peritonite em camundongos da linhagem BALB/c com a injeção de Tioglicolato e foram examinadas a cinética de migração celular para o linfonodo regional e as populações de fagócitos mononucleares que compõem o exsudato e sua susceptibilidade à infecção com *Leishmania*. O influxo celular para o peritônio foi crescente, atingindo o pico de peritonite por volta do quarto dia. A partir de então, o número de células diminuiu, atingindo um platô por volta dos quarenta dias, permanecendo estável até o centésimo dia. Inicialmente, entre 4 horas e o primeiro dia, houve aumento de polimorfonucleares ($9 \pm 4\%$, - $12 \pm 8\%$ das células), seguindo um predomínio de fagócitos mononucleares (primeiro ao quarto dia) e posterior aparecimento de linfócitos (quadragésimo ao centésimo dia). A migração de fagócitos mononucleares para os linfonodos regionais foi observada 8 horas após o estímulo inflamatório, tornando-se máxima a partir do quarto dia. A migração das células foi confirmada em ensaios de injeção e rastreamento de células marcadas, observando-se a substancial migração dessas células para o linfonodo em um período de doze-vinte e quatro horas. O fenótipo dos fagócitos mononucleares presentes no exsudato peritoneal no quarto dia de inflamação foi: CD11b ($78 \pm 6\%$), F4/80 ($65 \pm 9\%$) e CD11c ($28 \pm 15\%$). A taxa de infecção foi mais alta em células CD11b⁺ que em células CD11b⁻: CD11b⁺/CD11c⁺ (77%), CD11b⁺/CD11c⁻ (68%) em comparação com CD11b⁻/CD11c⁺ (33%) e CD11b⁻/CD11c⁻ (30%). Ambos os fenótipos de células macrofágicas (CD11b⁺ e F4/80⁺) e dendríticas mielóides (CD11b⁺CD11c⁺) tiveram alta infecção. Dentre as células CD11c⁺ infectadas, 28% expressaram MHC-II, contudo, apenas 6% destas tinham alta expressão de MHC-II. A infecção por *Leishmania* causou uma redução no número de células positivas para CD11b ($78 \pm 6\%$ vs $64 \pm 13\%$, $p=0.0085$), F4/80 ($65 \pm 9\%$ vs $39 \pm 11\%$, $p=0.0007$), CD11c ($33 \pm 6\%$ vs $22 \pm 13\%$, $p=0.0581$) e MHC-II ($27 \pm 3\%$ vs $21 \pm 3\%$) quando comparada ao grupo não infectado. Este modelo permite o estudo de uma grande quantidade de células do processo de migração de fagócitos mononucleares inflamatórios para o linfonodo drenante e potenciais alterações nesse processo induzidas pela infecção com *Leishmania*.

PALAVRAS CHAVE: *Leishmania*, Fagócitos, Migração Celular, Leucócitos Mononucleares.

ABSTRACT

INFLAMMATORY MONONUCLEAR PHAGOCYTES POTENTIALLY INVOLVED ON THE TRANSPORT OF *LEISHMANIA* IN VERTEBRATE HOSTS. **MICELY D' EL-REI HERMIDA**. Infection by protozoan of the species *Leishmania* modulates the integrin function in inflammatory phagocytes. This alteration can interfere on the cellular migration and presentation of antigens to the immune system. The objective of this study is to identify populations of inflammatory mononuclear phagocytes potentially involved on the transport of *Leishmania* in vertebrate hosts. Initially, we defined a model that allows the study of the migration process in a great number of inflammatory mononuclear phagocytes. In order for that, peritonitis was induced in BALB/c mice, through injection of Tioglicolato, and to examine the kinetics of cellular migration for the draining lymph node, the populations of mononuclear phagocytes that compose the exudato and its susceptibility to the infection with *Leishmania*. The cellular influx was increased to the peritoneum, reaching the peak of peritonitis around the fourth day. From this moment on, the number of cells decreased, reaching a plateau around the 40th day, remaining stable until the 100th day. Initially, between 4 hours and the 1st day there was an increase of polymorphonuclear ($9 \pm 4\%$, - $12 \pm 8\%$ of the cells), following a predominance of mononuclear phagocytes (1st to 4th day), and posterior emergence of lymphocytes (40th to 100th day). The migration of mononuclear phagocytes to the regional lymph nodes was observed 8 hours after the inflammatory stimulus, becoming maximum from the 4th day. The migration of the cells was confirmed in injection and cellular tracking assays of marked cells, being observed the substantial migration of those cells for the lymph nodes in a period of 12-24 hours. The phenotype of the mononuclear phagocytes present on the peritoneal exudates on the 4th day of inflammation was CD11b ($78 \pm 6\%$), F4/80 ($65 \pm 9\%$) and CD11c ($28 \pm 15\%$). The infection rate was higher in cells CD11b⁺ than in cells CD11b⁻: CD11b⁺/CD11c⁺ (77%), CD11b⁺/CD11c⁻ (68%) in comparison with CD11b⁻/CD11c⁺ (33%) and CD11b⁻/CD11c⁻ (30%). Both phenotypes of macrophagic cells (CD11b⁺ and F4/80⁺) and dendritic myeloid (CD11b⁺CD11c⁺) had high infection. Among cells CD11c⁺ infected, 28% expressed MHC-II, however, only 6% of these had high expression of MHC-II. Infection by *Leishmania* caused a reduction on the number of cells positive for CD11b ($78 \pm 6\%$ vs $64 \pm 13\%$, $p=0.0085$), F4/80 ($65 \pm 9\%$ vs $39 \pm 11\%$, $p=0.0007$), CD11c ($33 \pm 6\%$ vs $22 \pm 13\%$, $p=0.0581$) and MHC-II ($27 \pm 3\%$ vs $21 \pm 3\%$) when compared to the non-infected group. This model allows the study of a great amount of the process of migration of inflammatory mononuclear phagocytes for the draining lymph node and potentials alterations in this process induced by the infection with *Leishmania*.

Key-words: *Leishmania*, Phagocytes, Cellular migration, Mononuclear Leucocyte . Lymph node.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A LEISHMANIOSE

1.1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, ETIOLÓGICO E CLÍNICOS.

A leishmaniose humana é uma doença grave, por vezes fatal e considerada um problema importante de saúde pública. Esta ocorre em países com climas tropical e subtropical (ASHFORD *et al.*, 2000a) e atualmente ameaça trezentos e cinquenta milhões de pessoas no mundo. Está presente em oitenta e oito países dos quais setenta e dois estão em desenvolvimento. A cada ano estima-se um aumento de dois milhões de novos casos de infecção distribuídos em um milhão e meio de casos de leishmaniose cutânea (LC) e quinhentos mil casos de leishmaniose visceral (LV). Estima-se que apenas seiscentos mil desses dois milhões de casos são oficialmente registrados (WHO, 2006).

Na América Latina a leishmaniose está presente em doze países. No Brasil, que é responsável por 90% das ocorrências, a enfermidade está em expansão. Durante os surtos ocorridos entre 1980 e 2005, o número de casos de leishmaniose visceral atingiu picos de dois mil quatrocentos e oitenta e nove casos em 1985, três mil oitocentos e oitenta e cinco casos em 1994 e quatro mil oitocentos e cinquenta e oito casos em 2000 (BRASIL, 2007). No mesmo período, o número de casos de leishmaniose tegumentar foi treze mil seiscentos e cinquenta e quatro, trinta e cinco mil cento e três e vinte e oito mil setecentos e doze respectivamente (BRASIL, 2007).

A leishmaniose era considerada uma doença de zona rural porém, com a migração da população rural para a zona urbana, vem aumentando o número de casos, principalmente de LV tanto no Brasil como em outros países da América do Sul (WHO, 2006).

O agente etiológico da doença é um protozoário do gênero *Leishmania* que é transmitido através da picada de um inseto vetor. Calcula-se que existam aproximadamente vinte e uma espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem, transmitidas através de trinta espécies de flebotomíneos vetores (DESJEUX, 1996; ASHFORD, 1997; HERWALDT, 1999).

O parasito apresenta duas fases principais no ciclo de vida: amastigota e promastigota. A forma amastigota é intracelular obrigatória e está presente no hospedeiro vertebrado. A forma promastigota apresenta um flagelo e é encontrada no inseto vetor (ASHFORD, 2000a). A transmissão pode ocorrer de um hospedeiro vertebrado não humano para o homem (zoonótica) ou de homem para homem (antropozoonótica), quase sempre intermediada por um inseto vetor (DESJEUX *et al.*, 1991).

A infecção é iniciada quando flebotomíneos fêmeas, ao picarem o hospedeiro mamífero, ingerem juntamente com o sangue, fagócitos infectados (GUARGA *et al.*, 2000). As amastigotas são liberadas no tubo digestivo do inseto e diferenciam-se na forma promastigota metacíclica que serão regurgitadas na derme do hospedeiro durante novo repasto (BITTENCOURT, 1995). Após serem liberadas na derme do hospedeiro mamífero, as promastigotas são englobadas por fagócitos mononucleares e, no interior destes, o parasito se transforma em amastigotas. As amastigotas proliferam e são liberadas no meio extracelular infectando células vizinhas (BITTENCOURT, 1995; DESCOTEAUX, 1999; ASHFORD, 2000b; a).

Em todas as formas da doença são encontrados fagócitos mononucleares albergando formas amastigotas do parasito. Esses fagócitos podem ser encontrados no sítio de inoculação ou em tecidos distantes. Nas formas tegumentares da doença, macrófagos infectados se alojam na pele e nas mucosas, enquanto na forma visceral se estabelecem em órgãos internos, como baço, fígado e medula óssea (BITTENCOURT, 1995; FREITAS *et al.*, 2006).

As formas tegumentares da leishmaniose podem ser manifestas como leishmaniose cutânea (LC) ou mucocutânea (LMC) em indivíduos capazes de montar uma resposta celular efetora mediada por linfócitos T (polo responsivo). Na LC as lesões podem demorar a aparecer por períodos de algumas semanas, iniciando-se na área da picada do inseto com pequenas pápulas evoluindo para úlceras com bordas elevadas com fundo granuloso e úmido, geralmente localizadas em áreas expostas (face e membros) (BITTENCOURT, 1995; HERWALDT, 1999; FREITAS *et al.*, 2006).

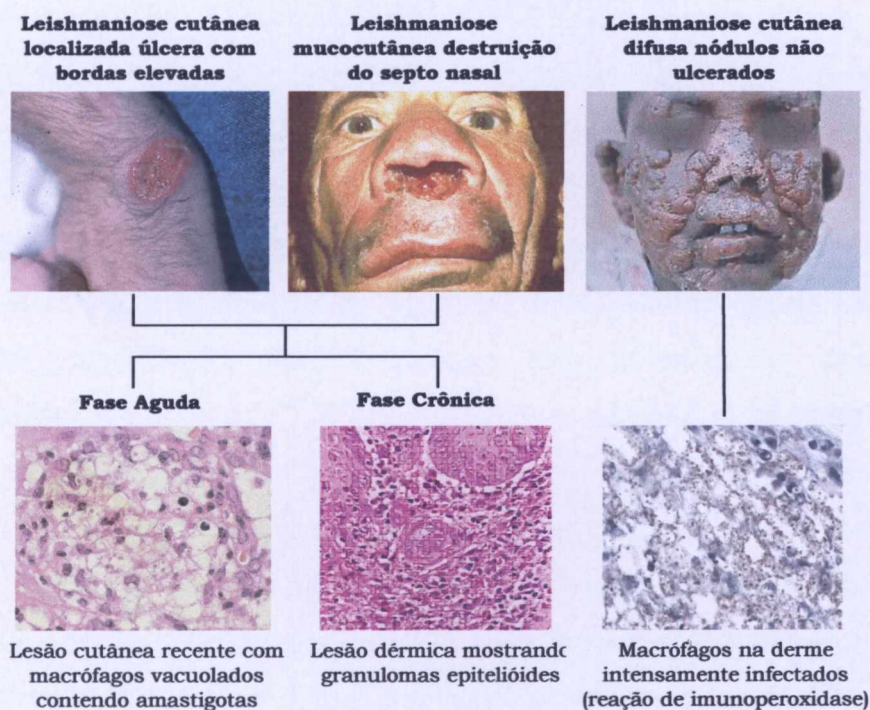
As lesões da LMC são graves e desfigurantes, surgem na mucosa nasal ou bucal e geralmente evoluem de forma ulcerativa destrutiva (BITTENCOURT, 1995; ASHFORD, 2000a; FREITAS *et al.*, 2006). As formas LC e LMC apresentam padrão histológico similar na fase inicial, e exibem um infiltrado inflamatório pleomórfico com grande número de macrófagos, frequentemente infectados e distribuídos por todas as camadas da pele. Na fase crônica observa-se uma redução do número de células infectadas e o surgimento de granulomas com células epitelióides e gigantes multinucleadas (FREITAS *et al.*, 2006).

Pacientes de leishmaniose tegumentar incapazes de montar uma resposta imune celular efetora, geralmente apresentam um infiltrado inflamatório mononuclear monomórfico constituído por macrófagos intensamente infectados por amastigotas de *Leishmania*, resultando num quadro conhecido como leishmaniose cutânea difusa (LCD) (FREITAS, 2006). As lesões são principalmente observadas na face, exibindo pápulas e nódulos usualmente não ulcerados como demonstrado na figura 1 (BITTENCOURT, 1995; FREITAS *et al.*, 2006).

A forma visceral da leishmaniose agride órgãos internos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea, levando a um quadro de febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia e aumento de susceptibilidade a infecções bacterianas (BITTENCOURT, 1995; DESJEUX, 1996). Quando estabelecida a enfermidade, se não for tratada, esta evoluirá a óbito.

Após a recuperação, alguns pacientes, principalmente infectados com a forma antroponótica da leishmaniose visceral, podem desenvolver uma forma cutânea crônica conhecida como leishmaniose dérmica pós-calazar, representada por lesões nodulares, papulares ou maculares. Essas lesões podem servir como reservatórios do parasito, principalmente nos períodos interepidêmicos da LV (BITTENCOURT, 1995).

Formas Tegumentares



Forma Visceral

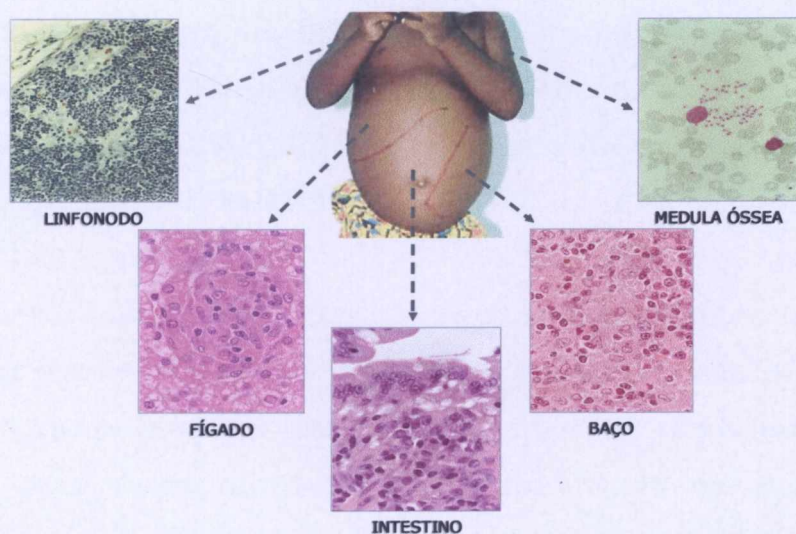


Figura 1. Representação das diferentes formas clínicas da leishmaniose e seus aspectos histológicos.

1.1.3 Determinantes das formas clínicas da leishmaniose

Os mecanismos envolvidos na disseminação, tropismo e permanência de células parasitárias nos diferentes tecidos são pouco conhecidos. As diferentes formas de leishmaniose estão intimamente associadas à espécie do parasito que causa a infecção. No Brasil, por exemplo, a leishmaniose cutânea está associada principalmente à infecção com *L. braziliensis*, *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*. A leishmaniose mucosa ocorre preferencialmente nos indivíduos infectados por *L. brasiliensis*. A leishmaniose visceral está associada à infecção com *L. chagasi* (GRIMALDI *et al.*, 1989; COLMENARES *et al.*, 2002). Apenas raramente, espécies causadoras de formas tegumentares têm sido isoladas de pacientes com acometimento visceral (BARRAL *et al.*, 1991), assim como espécies mais comumente causadoras de LV podem ser isoladas de pacientes com acometimento tegumentar (NOYES *et al.*, 1997; BELLI *et al.*, 1999; CAMPOS-PONCE *et al.*, 2005).

Entre as hipóteses levantadas para explicar a distribuição das diferentes espécies de *Leishmania* nos tecidos, estão a idade e o estado da resposta imune por parte do hospedeiro e, por parte do parasito, estão a sensibilidade à temperatura pelas diferentes espécies (CALLAHAN *et al.*, 1996) e fatores não completamente identificados ligados à patogenicidade, refletidos em características manifestadas por padrões enzimáticos específicos entre diferentes zimodemos (JIMENEZ *et al.*, 1995) e no comportamento biológico destes parasitos (COLMENARES *et al.*, 2002).

Independente dessas proposições, o fato de amastigotas de *Leishmania* viverem e disseminarem-se no interior de fagócitos mononucleares indica que a mensagem para que o parasito permaneça em determinado tecido ou se desloque para outro sítio, deve estar codificada na superfície desses fagócitos.

1.2 FAGÓCITOS PROFISSIONAIS E A INFECCÃO POR *LEISHMANIA*

No hospedeiro, a picada do inseto resulta em lesão tecidual e vascular com extravasamento de sangue e uma reação inflamatória com o recrutamento de leucócitos. Antes de interagirem com as células inflamatórias, as promastigotas inoculadas na pele possivelmente entram em contato com o sistema complemento, presente no plasma do hospedeiro. Estima-se que aproximadamente 90% dos parasitos são eliminados neste contato (SACKS, 1984). As formas metacíclicas (infectantes) da *Leishmania* têm a capacidade de sobreviver ao complexo de ataque à membrana (MAC) devido a algumas características peculiares da sua membrana (PUENTES *et al.*, 1990). Por exemplo, a resistência ao complemento está relacionada à presença de moléculas de lipofosfoglicano (LPG), duas vezes mais longas que as presentes em promastigotas procíclicas (estágio não infectante), que atuam como uma barreira à inserção do MAC na membrana do parasito (MCCONVILLE *et al.*, 1992). As promastigotas de *Leishmania* que escapam do sistema complemento usam componentes desse sistema para invadir as células do hospedeiro. A proteinase gp63, uma glicoproteína freqüente na membrana de promastigotas de *Leishmania*, é capaz de clivar C3b para a forma inativa iC3b, a qual se liga ao receptor de completo CR3 e CR1 na membrana de fagócitos mononucleares (MOSSER, 1985).

A *Leishmania* pode infectar fagócitos profissionais como neutrófilos, uma variedade de fagócitos mononucleares, incluindo macrófagos (BEIL *et al.*, 1992) e células dendríticas (DC) (BLANCK *et al.*, 1993), além de células não fagocíticas como fibroblastos (SCHWARTZMAN, 1985). As células dendríticas são consideradas apresentadoras de antígenos profissionais, assim como são também capazes de transportar microorganismos do sítio inflamatório para os linfonodos regionais (PAUL, 2003).

1.2.1 NEUTRÓFILOS

Dentre os fagócitos profissionais, os neutrófilos têm uma importante função na resposta imune inata, devido à sua capacidade de fagocitar e matar patógenos extracelulares (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000). Estas são as primeiras células a serem recrutadas na inflamação aguda e dominam o influxo inicial de leucócitos (ISSEKUTZ, 1980). Após estímulo inflamatório na cavidade peritoneal de camundongos, os neutrófilos se acumulam em poucas horas e gradualmente são substituídos por macrófagos (LAGASSE, 1996; COOK *et al.*, 2003). Os neutrófilos também apresentam capacidade migratória para o linfonodo drenante, observada após estímulo com lipopolisacarídeo (LPS) (MIYAZAKI *et al.*, 2004).

Os neutrófilos são caracterizados na citometria de fluxo por sua alta granulosidade e podem também ser diferenciados de macrófagos/monócitos pela alta expressão da molécula de superfície celular Gr-1 juntamente com Mac-1 (Gr-1^{hi}/Mac-1^{lo-hi}). Esse fenótipo foi observado em neutrófilos do sangue periférico, no baço e na cavidade peritoneal de camundongos após estímulo inflamatório (LAGASSE, 1996).

1.2.2 NEUTRÓFILOS E *Leishmania*

Os primeiros fagócitos a serem recrutados após a inoculação da *Leishmania* são os neutrófilos (BELKAID *et al.*, 2000), capazes de conferir certa resistência a animais susceptíveis, no estágio precoce da infecção (CHEN *et al.*, 2005). Essas células são mais eficientes em degradar amastigotas de *Leishmania* do que os monócitos, devido a mais baixa atividade microbicida destes (CHANG, 1981).

Quando o parasito é inoculado pelo inseto vetor no hospedeiro vertebrado, libera certa quantidade de saliva, a qual confere algumas habilidades inflamatórias, como induzir a vasodilatação (SACKS *et al.*, 2001) e

quimiotaxia para polimorfonucleares e macrófagos (ZER *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Na realidade, a injeção de saliva de *Lutzomyia longipalpis* na orelha (intradermicamente) de camundongos induziu um intenso e difuso infiltrado inflamatório composto por polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e macrófago, tão cedo quanto 2 horas após a sua injeção (SILVA *et al.*, 2005). Além disso, após a administração de glândulas salivares juntamente com *L. chagasi* em camundongos susceptíveis foi observado um intenso recrutamento de neutrófilos e macrófagos (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Os macrófagos são capazes de induzir a apoptose de neutrófilos inflamatórios devida a presença de TNF em sua membrana (ALLENBACH *et al.*, 2006). Estudos mostram que esta interação, em animais susceptíveis, causa uma exacerbação no crescimento do parasito no macrófago infectado. O mesmo não acontece nos animais resistentes, os quais diminuem a carga parasitária (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004)

1.2.3 MONÓCITOS/MACRÓFAGOS

Os monócitos constituem cerca de 5-10% dos leucócitos sanguíneos em camundongos e em humanos. Estes têm um período curto de vida, de aproximadamente um dia em camundongos (VAN FURTH, 1968) e três dias em humanos (WHITELAW, 1972). Além disso, eles mantêm a homeostasia de macrófagos e células dendríticas, e interferem na resposta inata e adaptativa durante a inflamação (ZIEGLER-HEITBROCK, 2000).

Nos camundongos, os monócitos podem ser caracterizados pela citometria de fluxo por sua baixa granulosidade e sua expressão de moléculas como receptor de M-CSF (CD115), Mac-1 (CD11b) e do antígeno reconhecido pelo anticorpo F4/80 (GEISSMANN *et al.*, 2003; QU *et al.*, 2004). Atualmente, os monócitos podem ser divididos em dois subtipos de acordo com a expressão de CCR2, CD62L (L-selectina) e do receptor 1 da quimiocina CX₃C (CX₃CR1).

Os monócitos residentes são caracterizados pela alta expressão de CX₃CR1 e ausência de CD62L e CCR2 (GORDON, 2005). Os monócitos inflamatórios são caracterizados pela baixa expressão de CX₃CR1 e positividade para CD62L e CCR2. Esses monócitos inflamatórios respondem a quimiocinas CCL2 (MCP-1) (GU *et al.*, 1998; PALFRAMAN *et al.*, 2001) e assim migram para sítios inflamatórios (KURIHARA *et al.*, 1997; KUZIEL *et al.*, 1997; GU *et al.*, 1998; LU *et al.*, 1998). Esses monócitos inflamatórios correspondem também aos monócitos clássicos humanos (CD14^{high}/CD16⁻) e, a depender do estímulo *in vitro*, podem se diferenciar em macrófagos (KIM *et al.*, 2004) ou em células dendríticas (GEISSMANN *et al.*, 2003) capazes de migrar para o linfonodo drenante, como demonstrado em experimentos *in vivo* (RANDOLPH *et al.*, 1999).

O macrófago é a segunda população celular a chegar ao sítio inflamatório. Este apresenta uma grande variação fenotípica durante sua diferenciação e distribuição pelos diferentes tecidos nos quais se estabelecem (GORDON, 2003). Quando maduros, os macrófagos têm uma vida longa com alta capacidade fagocítica, são capazes de apresentar antígenos e de agir como células efetoras matando patógenos intracelulares. As moléculas antigênicas como F4/80, macrosialinas (CD68) e sialoadesinas são identificados em diferentes populações. O antígeno F4/80 tanto encontra-se na maioria da população ativada, como também em algumas populações residentes (GORDON, 2003).

Os macrófagos peritoneais residentes em camundongos têm sido caracterizados pela alta expressão do antígeno F4/80 e CD11b (NIBBERING *et al.*, 1987; COOK *et al.*, 2003) e pela não expressão de GR-1 e B220 (LAGASSE, 1996). Os macrófagos peritoneais inflamatórios têm sido muito utilizados nos estudos relacionados com a resposta inflamatória (COOK *et al.*, 2003; CAILHIER *et al.*, 2005) relacionada a doenças auto-imunes (POTTER *et al.*, 2003), estudos de migração celular (BELLINGAN *et al.*, 1996).

Um dos recursos mais comumente utilizados para obtenção dessas células é a indução de peritonite estéril por meio da injeção de tioglicolato. Esse meio de cultura é normalmente utilizado para o crescimento de bactéria (MCCLUNG, 1940) e é rico em nutrientes contendo proteínas e carboidratos (LI *et al.*, 1997). Para causar a peritonite é necessário que o meio seja autoclavado após seu preparo e envelhecido (em média 30 dias) para maior indução do recrutamento de fagócitos mononucleares para o peritônio (LI *et al.*, 1997). A capacidade de atrair fagócitos tem sido atribuída à formação de produtos de glicação avançados (AGE) (LI *et al.*, 1997) ou até mesmo ao agar (substância utilizada na constituição do meio para a cultura de microrganismos) presente no meio (EICHNER, 1983). Contudo, os polimorfonucleares ou macrófagos atraídos com o estímulo do tioglicolato não estão ativados, mas são capazes de fagocitar e matar os microorganismos ingeridos (BARON, 1982; LEIJH *et al.*, 1984). Esse método tem como vantagem obter fagócitos mononucleares inflamatórios em um ambiente estéril tendo a possibilidade do cultivo e posterior manipulação das células isoladas (CARVALHAL *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2006).

1.2.4 MONÓCITOS/MACRÓFAGOS E *Leishmania*

A infecção de macrófagos pela *Leishmania* é feita de forma silenciosa via CR3, levando à não ativação celular (WRIGHT, 1983). Dessa forma, o parasito pode se replicar no interior da célula infectada destruindo-a e liberando mais parasitos que infectam outras células. Após a infecção, a *Leishmania* é capaz de inibir uma série de mecanismos funcionais nos macrófagos, como a produção de IL-12, a qual é necessária para o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 (CARRERA *et al.*, 1996; BELKAID *et al.*, 1998), a atividade das enzimas proteolíticas (DESCOTEAUX, 1999) e a produção do óxido nítrico (WEI *et al.*, 1995; DESCOTEAUX, 1999) prolongando assim sua sobrevivência no hospedeiro.

Na pele, após a infecção com *Leishmania*, observa-se um grande número de macrófagos (CD11b⁺) infectados em animais susceptíveis (MURAILLE *et al.*, 2003). Essas células aparecem tardiamente no linfonodo drenante se comparadas com as DC (MOLL *et al.*, 1993), porém, em ambas as células, encontram-se parasitos viáveis no linfonodo (MOLL *et al.*, 1995).

Há evidências de que a infecção com *Leishmania* interfere na capacidade dos macrófagos de estimularem linfócitos T. Essa alteração da função do fagócito pode estar relacionada com defeito na apresentação de antígenos exógenos pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de (MHC) classe II (FRUTH *et al.*, 1993; PRINA *et al.*, 2004) ou com a baixa expressão de moléculas co-estimulatórias, sinal necessário para completar a apresentação de antígeno junto ao MHC-II (KAYE *et al.*, 1994; SAHA *et al.*, 1995). Interações entre moléculas co-estimulatórias são importantes para que ocorra ativação celular. Por exemplo, a interação entre CD40-DC40L (macrófagos-linfócitos) é necessária para que ocorra a ativação da capacidade leishmanicida de macrófagos após infecção por *Leishmania* (KAMANAKA *et al.*, 1996).

Os macrófagos peritoneais, como população geral, possuem uma alta capacidade fagocítica, contudo não induzem uma boa resposta proliferativa para os linfócitos T naive (COOK *et al.*, 2003; CAILHIER *et al.*, 2005) ou pré-sensibilizados com antígenos de *Leishmania* (INABA *et al.*, 1990). Essas células talvez caracterizem uma população de fagócitos mononucleares mais apta a transportar patógenos que estimular uma resposta imune protetora (MURAILLE *et al.*, 2003), entretanto, podem sofrer alterações na expressão de receptores de quimiocinas envolvidos na adesão celular após a infecção com *Leishmania*. Essas alterações incluem a diminuição da expressão de receptores de quimiocinas como CCR5 ou CCR4 e alterações na regulação da afinidade de integrinas (PINHEIRO *et al.*, 2006) ou até mesmo diminuição na expressão de moléculas de adesão como CD11b e CD54 em estudos com monócitos humanos, embora esta redução não tenha sido observada em macrófagos derivados de monócitos (DE ALMEIDA *et al.*, 2003). Esses dados

mostram como os parasitos podem interferir no transporte e apresentação de antígenos aos linfócitos T.

1.2.5 CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas são capazes de iniciar a resposta imune e eficientemente estimular a geração de memória imunológica. As DCs estão constitutivamente distribuídas por muitos tecidos do corpo, porém em pequeno número, localizando-se particularmente na pele e superfícies de mucosas. No tecido periférico as DCs estão na forma imatura, capazes de captar antígenos. Após sua ativação pelos estímulos patogênicos ou produção de citocinas, amadurecem aumentando sua expressão de MHC e moléculas co-estimulatórias tornando-se competentes APC (CAVANAGH, 2002; LIPSCOMB, 2002; SHORTMAN, 2002; GORDON, 2003).

Um grande número de DCs murinas tem sido descrito em órgãos linfóides e não linfóides. Essas células têm sido classificadas em duas linhagens principais: DCs mielóides (STEINMAN, 1974) ou linfóides (SUSS, 1996). As DCs de origem mielóide são consideradas a população clássica de APC do sistema imune (HART, 1997) e apresentam similaridades funcionais, fenotípicas e morfológicas com macrófagos (VAN FURTH, 1968). Estudos, principalmente *in vitro*, têm demonstrado que precursores mielóides, após estímulo com fator estimulador de colônia granulócito/macrófago (GM-CSF), diferenciam-se em granulócitos, monócitos e DCs mielóides (INABA *et al.*, 1992; SCHEICHER *et al.*, 1992).

O subtipo DC linfóide é identificado pela expressão de CD8 α . Anteriormente pensava-se que essas células se originavam de um precursor da linhagem linfóide (SUSS, 1996), contudo, foi demonstrado que DC CD8 α^+ ou CD8 α^- podem ser originadas de um progenitor mielóide (TRAVER *et al.*, 2000; DEL HOYO *et al.*, 2002). As DC mielóide e linfóide diferem em sua localização nos tecidos, fenótipo e função, porém ambas expressam altos níveis de CD11c,

MHC classe II e moléculas co-estimulatórias CD86 e CD40. Basicamente, as DC linfóides são CD8 α^+ e as DC mielóides são CD8 α^- , representando populações com funções distintas (MARASKOVSKY *et al.*, 1996; WU *et al.*, 1996; PULENDRAN *et al.*, 1997; VREMEC, 1997).

A principal dicotomia entre os subtipos de DC pode ser vista na indução de uma resposta do tipo Th2 produzida pelas DC CD8 α^- , enquanto que as DCs CD8 α^+ produzem interleucina (IL)-12, induzindo uma resposta do tipo Th1 (PULENDRAN *et al.*, 1999; DEN HAAN *et al.*, 2000; MOSER, 2000; IYODA *et al.*, 2002). Na epiderme são encontradas células dendríticas residentes conhecidas como células de Langerhans. Essas células são consideradas APC, capazes de fagocitar parasitos e migrar para o interior da região para-cortical no linfonodo, apresentando assim antígenos para os linfócitos T (MOLL, 1995). Atualmente o grupo de Leon (2007) descreveu que as células dendríticas podem ser recrutadas para o sítio inflamatório ou até mesmo serem diferenciadas de monócitos dermais. Estas células são capazes de migrar para o linfonodo drenante e apresentar antígeno para os linfócitos T sendo responsáveis por uma resposta protetora no animal (LEON *et al.*, 2007).

1.2.6 CÉLULAS DENDRÍTICAS E *Leishmania*

Alguns estudos que utilizam o modelo murino de leishmaniose tegumentar têm demonstrado que, logo após a inoculação do parasito na pele, as células de Langerhans, e não os macrófagos, são capazes de transportar a *Leishmania* da pele para o linfonodo (BLANK *et al.*, 1993; MOLL *et al.*, 1993) e assim apresentar o antígeno aos linfócitos T virgens, iniciando uma resposta imuno-específica (MOLL *et al.*, 1993).

Em camundongos resistentes, a presença de células dendríticas e macrófagos infectados contendo parasitos viáveis no linfonodo foram equivalentes, porém apenas as células dendríticas foram capazes de induzir

a resposta imune por células T (MOLL *et al.*, 1995). Estas células exibem parasitismo ativo por longos períodos no linfonodo dos animais infectados sendo capazes de manter sempre presente uma população de células T específica para *Leishmania* e assim proteger o animal contra reinfecção. Isto sugere que, além da resposta imune primária, é provável que as células dendríticas estejam também envolvidas no processo de manutenção da resposta em células T de memória (MOLL *et al.*, 1995).

Logo após a internalização do parasito, as células de Langerhans têm a expressão de moléculas de MHC classe I e II e co-estimulatórias aumentada no período de quarenta e oito horas (VON STEBUT *et al.*, 1998), mostrando características de maturação. Interessantemente, essa maturação só ocorre com a internalização do parasito, em qualquer dos estágios do ciclo de vida, opsonizado por anticorpo (PRINA *et al.*, 1993). A ausência de maturação dessas células, que ocorre após a infecção com o parasito, beneficia o seu estabelecimento e multiplicação dentro das células do hospedeiro (PRINA *et al.*, 1993).

A capacidade de migração da DC derivada de monócitos da pele para o linfonodo drenante está associada a receptores de quimiocinas, como CCR7 e CCR8 (FORSTER *et al.*, 1999; QU *et al.*, 2004). Contudo, após a infecção por *Leishmania*, essas células podem sofrer alterações na expressão de alguns receptores de quimiocinas capazes de interferir com a sua migração para órgãos como linfonodo drenante e o baço (SATO *et al.*, 2000; ATO *et al.*, 2002).

1.3 DISSEMINAÇÃO DA *Leishmania* A PARTIR DO SÍTIO DE INFECÇÃO

Como revisto acima, amastigotas de *Leishmania* vivem nos tecidos no interior de fagócitos mononucleares. Esses fagócitos podem permanecer no sítio de infecção ou se deslocar, estabelecendo lesões em outros tecidos como pele, mucosas e órgãos internos. Tem-se mesmo sugerido a eficiência de um

tropismo das diferentes espécies de *Leishmania* para determinados tecidos. Frequentemente, fagócitos infectados podem ser observados na região subcapsular do linfonodo que drena a área de inoculação do parasito. Fagócitos mononucleares infectados são também observados atravessando os cordões medulares como mostra o desenho esquemático abaixo (figura 2), assim como também já foram identificados na corrente sanguínea (FIORINI *et al.*, 2002).

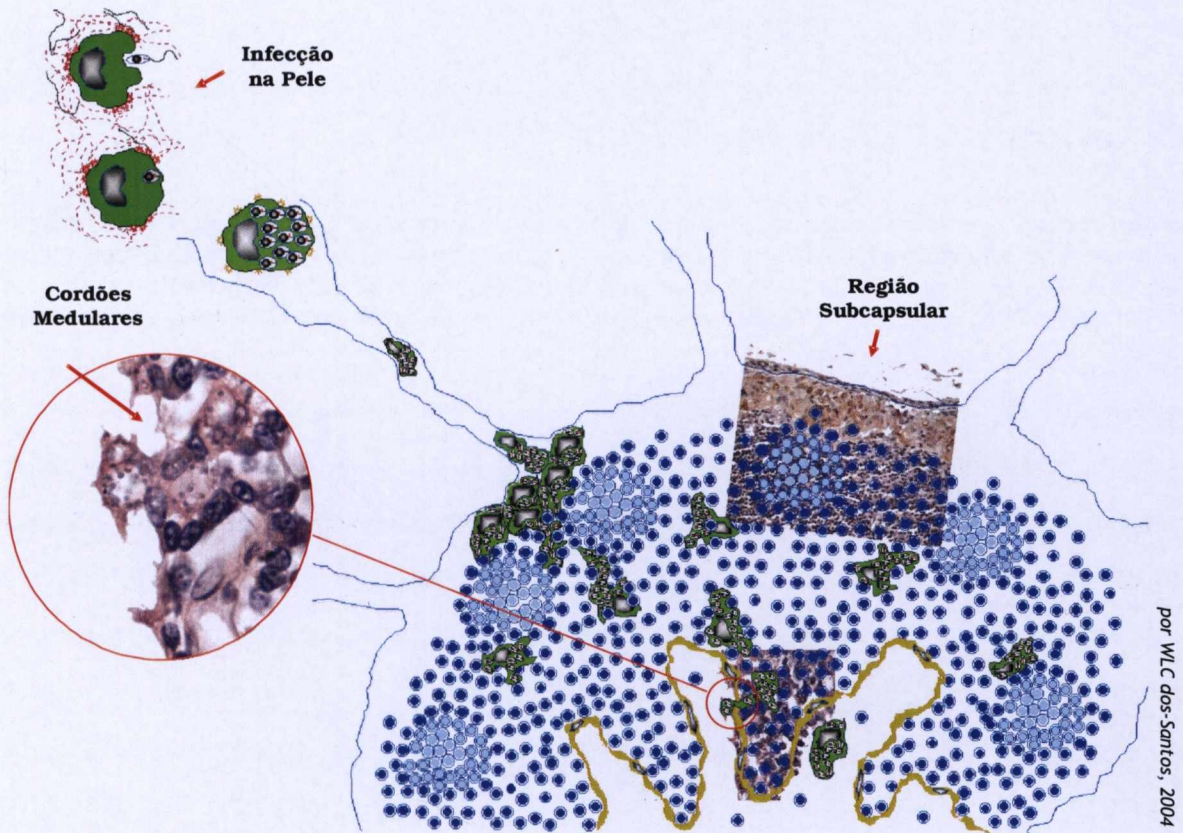


Figura 2. Desenho esquemático sobre o aparecimento de fagócitos infectados no linfonodo regional.

Os sinais para permanência ou deslocamento dos parasitos para os diferentes tecidos devem estar codificados na superfície dos fagócitos infectados, desde que a superfície dessas células constituem a real interface entre o parasito e os tecidos do hospedeiro. Na realidade, como pode ser visto na figura 3, uma íntima relação é observada entre fagócitos mononucleares infectados com *Leishmania* e componentes matriciais e celulares do tecido conjuntivo.

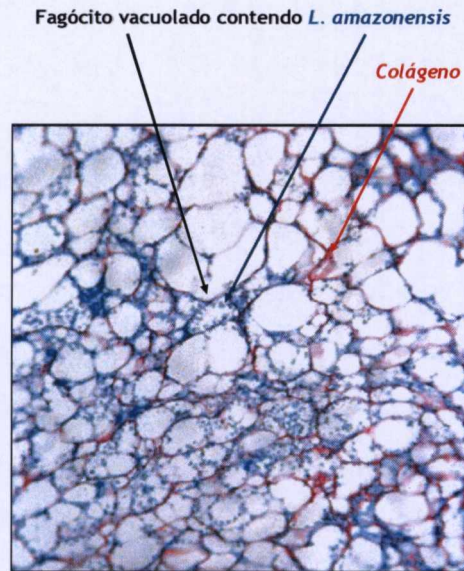


Figura 3. Relação dos fagócitos infectados com *Leishmania* entre componentes matriciais e celulares do tecido. Secção de lesão tegumentar de camundongo infectado com *L. amazonensis* e corada com vermelho sírius. Em vermelho, fibras de colágeno; em verde, outras proteínas em células vacuoladas e *Leishmania*.

Nosso grupo desenvolveu um ensaio de adesão para estudar as interações entre células macrofágicas e o tecido conjuntivo (CARVALHAL *et al.*, 2004). Através desse ensaio demonstramos que macrófagos e monócitos aderem preferencialmente ao tecido conjuntivo inflamado. Essa adesão é dependente de cátions divalentes, capaz de aumentar após a ativação dos fagócitos com lipopolissacarídeo e ser inibida por uma mistura de anticorpos contra integrinas contendo cadeias $\alpha 4$ ou $\beta 2$ (inibição de 49.5% a 77.4%) ou por uma mistura dos peptídios CS-1 (fragmento da fibronectina) e RGD (inibição de $58.2 \pm 2\%$).

Demonstramos que a infecção de fagócitos mononucleares com *Leishmania* causa uma inibição na adesão dessas células ao tecido conjuntivo inflamado logo nas primeiras vinte e quatro horas de infecção. Contudo, a fagocitose de partículas de látex de 3 μm (tamanho aproximado de uma amastigota de *Leishmania*) ou a infecção com *Mycobacterium fortuitum* não produziram o mesmo efeito. Essa redução da aderência, decorrente da infecção com *Leishmania*, foi observada utilizando-se células macrofágicas da linhagem J774, fagócitos peritoneais inflamatórios de camundongo induzidos por

tioglicolato e com monócitos do sangue periférico humano (CARVALHAL *et al.*, 2004).

Foi possível reverter parcialmente a perda na adesão dos fagócitos infectados através da adição de manganês, levando a entender que mecanismos que regulam a afinidade/avidez das integrinas pelos seus receptores, estão envolvidos (CARVALHAL *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2006). Demonstramos por meio de experimentos de cinética do aparecimento da redução da adesão celular que essas alterações têm início tão cedo quanto duas horas após a infecção, que o fenômeno está relacionado à alteração na função de integrinas da família beta-1 e potencialmente é relacionado a alterações na expressão de receptores de quimiocinas (PINHEIRO *et al.*, 2006).

A identidade das células que carregam o parasito do sítio de inoculação para o linfonodo (BLANK *et al.*, 1993; MURAILLE *et al.*, 2003; QU *et al.*, 2004) que são capazes de estimular a resposta imune eficaz tem sido motivo de controvérsias na literatura (BLANK *et al.*, 1993; SAHA *et al.*, 1995; SHANKAR, 1997; RITTER *et al.*, 2004). Moll e colaboradores (1993) identificaram células dendríticas derivadas de células de Langerhans como potenciais carreadoras do parasito. Muraille e colaboradores (2003), entretanto, apresentaram evidências de que células dendríticas derivadas de monócitos seriam as principais responsáveis pelo transporte do parasito do sítio de infecção para o linfonodo. Essa possibilidade também tem o suporte de estudos com partículas de látex transportadas dos sítios de injeção para linfonodos braquiais do pulmão (RANDOLPH *et al.*, 1999).

Iezzi e colaboradores (2006) demonstraram que células dendríticas residentes do linfonodo são capazes de adquirir antígenos solúveis de *Leishmania*, provavelmente drenados pelos vasos linfáticos até o linfonodo ou levado por monócitos inflamatórios, logo nas primeiras vinte e quatro horas após a infecção. Estes consideram que poucas células dendríticas derivadas da pele (Células de Langerhans ou DC dérmicas) migram para o linfonodo exibindo pequena função na ativação precoce de células T. Dessa

forma é possível que o trânsito de moléculas vistas pelo sistema imune como antígenos seria distinto do trânsito de parasitos do sítio de agressão para os linfonodos regionais.

Esses estudos ressaltam as controvérsias expostas sobre o fenótipo e a importância de cada população celular no transporte de *Leishmania* para diferentes tecidos. Buscamos desenvolver um modelo experimental capaz de permitir o estudo de uma grande quantidade de fagócitos inflamatórios com possível capacidade migratória. Utilizamos este modelo para explorar as populações de fagócitos mononucleares capazes de se infectar com *Leishmania* e capazes de transportar o parasito do sítio inflamatório para o linfonodo regional, além dos mecanismos envolvidos no processo.

2 JUSTIFICATIVA

Há controvérsias a respeito das populações de fagócitos mononucleares responsáveis pelo transporte de *Leishmania* do sítio de infecção para o linfonodo drenante e sobre os mecanismos envolvidos nesse processo (MOLL *et al.*, 1993; MURAILLE *et al.*, 2003).

Nosso grupo desenvolveu um modelo de interação celular ao tecido conjuntivo inflamado, com o qual observamos que fagócitos inflamatórios peritoneais de camundongo, monócitos humanos e células de linhagem macrofágica, J774, têm sua aderência ao tecido conjuntivo inflamado reduzida após a infecção com *Leishmania* (CARVALHAL *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2006).

Não sabemos o significado dessas alterações da adesão celular induzida por *Leishmania*. A desadesão pode constituir, porém, o estágio inicial da migração leucocitária, pode ainda limitar a saída dessas células do sítio inflamatório e a capacidade dessas células em estimular a resposta imune.

Um dos problemas que encontramos ao tentar acessar essas questões é a pequena quantidade de fagócitos mononucleares oriundos dos sítios infectados por *Leishmania* e potenciais artefatos originados no processo de isolamento dessas células. Bellingan e colaboradores (1996) demonstraram a migração de fagócitos mononucleares do peritônio para linfonodos regionais. Desde que essas células são susceptíveis à infecção com *Leishmania* e têm sua aderência ao tecido conjuntivo modulada pela infecção, nós adaptamos esse modelo para a utilização em nossos estudos. A utilização do modelo com as adaptações descritas aqui permitirão a confirmação de hipóteses geradas em estudos *in vitro* sobre adesão e migração celular. Permitiram ainda dispor de um grande número de células, o que possibilita a execução de estudos para a confirmação dos mecanismos envolvidos no processo de migração de fagócitos mononucleares.

Pretendemos utilizar agora este sistema para a identificação da capacidade de transporte de *Leishmania* por diferentes populações de fagócitos mononucleares inflamatórios e para o estudo dos mecanismos celulares envolvidos no processo, possibilitando o teste de hipóteses originadas no estudo das lesões.

Além da importância para o estudo da leishmaniose, pretendemos com este trabalho contribuir para o avanço na compreensão de mecanismos de outros patógenos intracelulares, cujo mecanismo patogênico compartilha aspectos com a leishmaniose.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL:

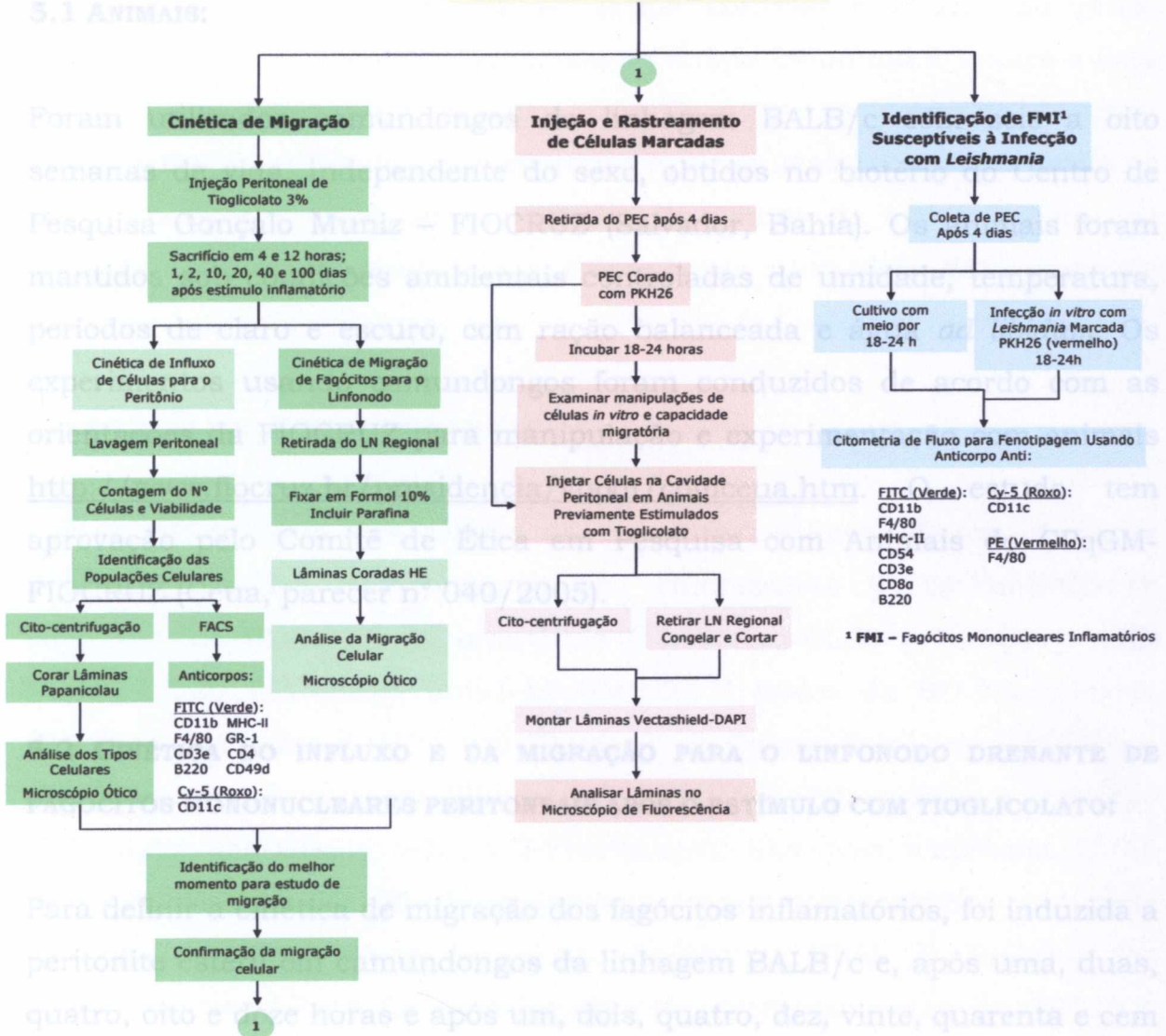
Estabelecer um sistema que permita identificar o potencial migratório *in vivo* de populações de fagócitos mononucleares inflamatórios susceptíveis à infecção por *Leishmania*.

3.2 ESPECÍFICOS:

- 3.2.1 Definir a cinética de influxo e fenótipo das populações de fagócitos mononucleares atraídas para o peritônio após um estímulo inflamatório com tioglicolato;
- 3.2.2 Definir a cinética de migração de fagócitos mononucleares inflamatórios do peritônio para o linfonodo regional;
- 3.2.3 Identificar as populações celulares que compõem o exsudato inflamatório no ponto em que a migração de fagócitos para o linfonodo regional é mais evidente;
- 3.2.4 Examinar o efeito do cultivo *in vitro* dos fagócitos na sua migração para os linfonodos;
- 3.2.5 Identificar as populações dos fagócitos peritoneais inflamatórios murinos susceptíveis à infecção com *Leishmania*.

4 DESENHO EXPERIMENTAL

Camundongo da Linhagem BALB/c



5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS:

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c com seis a oito semanas de vida, independente do sexo, obtidos no biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz – FIOCRUZ (Salvador, Bahia). Os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas de umidade, temperatura, períodos de claro e escuro, com ração balanceada e água *ad libidum*. Os experimentos usando camundongos foram conduzidos de acordo com as orientações da FIOCRUZ para manipulação e experimentação com animais <http://www.fiocruz.br/presidencia/vppdt/comceua.htm>. O estudo tem aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do CPqGM-FIOCRUZ (Ceua, parecer n° 040/2005).

5.2 CINÉTICA DO INFLUXO E DA MIGRAÇÃO PARA O LINFONODO DRENANTE DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES PERITONEAIS APÓS O ESTÍMULO COM TIOGLICOLATO:

Para definir a cinética de migração dos fagócitos inflamatórios, foi induzida a peritonite estéril em camundongos da linhagem BALB/c e, após uma, duas, quatro, oito e doze horas e após um, dois, quatro, dez, vinte, quarenta e cem dias, os fagócitos peritoneais inflamatórios e o linfonodo regional (paratímico) foram retirados para análise. As células peritoneais de cada animal foram cito-centrifugadas, fixadas em lâminas e coradas pelo método de Papanicolau para análise diferencial das populações celulares por microscópio óptico. Um pool das células dos animais foi analisado por citometria de fluxo, conforme descrito no tópico abaixo (5.3). Dentre os anticorpos utilizados nesta etapa não incluímos anti-CD8 α (Ly-2) e anti-CD54 (3E2) (todos da BD-Pharmingen; San Jose, Califórnia, EUA e adicionamos anti-GR-1 (RB6-8C5) (Caltag; San Diego, California, EUA) ligado a FITC. Os linfonodos foram incluídos em líquido de Bouin, incluídos em

parafina, cortados e corados com HE e, em seguida, a migração foi analisada ao microscópio óptico (Olympus, modelo CX41; Philippines). Para a análise morfológica os dados foram extraídos de dois experimentos. No primeiro foram utilizados dois animais no grupo controle e quatro no grupo estimulado com tioglicolato. Os pontos de tempo foram duas, quatro e doze horas e um, dois, quatro, dez, vinte, e quarenta dias. No segundo experimento, foi utilizado um número maior de animais, com dez animais no grupo controle e cinco no estimulado. Os pontos de tempo revistos no segundo experimento foram quatro e doze horas e um, dois, dez e quarenta dias.

5.3 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO:

Para a fenotipagem das células do exsudato peritoneal foram utilizados anticorpos ligados a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC): anti-CD11b (M1/70), anti-CD8 α (Ly-2), anti-CD54 (3E2), anti-CD3e (145-2C11), anti-CD45R/B220 (RA3-6B2), anti-I-A^d (AMS-32.1) (todos da BD-Pharmingen; San Jose, Califórnia, EUA) e anti-F4/80 (R1-2; Caltag; San Diego, California, EUA); ligados a Ficoeritrina (PE): anti-F4/80 (R1-2; Caltag, EUA) e anticorpo biotilado: anti-CD11c (HL3; BD-Pharmingen; San Jose, Califórnia, EUA). Para detectar os anticorpos biotilados utilizamos streptoavidina conjugada a Cy-5 (BD-Pharmingen; San Jose, Califórnia, EUA). O fenótipo dos monócitos/macrófagos foi determinado pela expressão única de CD11b e F4/80 ou ambas; os polimorfonucleares pela combinação da alta granulosidade e a alta expressão de GR-1; os linfócitos pela soma das células CD3⁺ e B220⁺ e as células dendríticas maduras pela expressão de CD11c⁺ e MHC-II^{high}. Todos os anticorpos foram previamente titulados para determinação da concentração ideal de uso. As células infectadas ou não com *Leishmania* foram ressuspensas na concentração de 2x10⁷/ml em tampão de FACS (PBS, contendo 2mM de azida, 5% de SFB). As reações não específicas foram bloqueadas com 5% de soro de camundongo. As células foram distribuídas 100 μ l da suspensão/poço em placa de noventa e seis poços com fundo em "U" (Microplate, Reino Unido) e incubadas com os

anticorpos contra as moléculas em estudo ou sem anticorpos, usados como controle. Após vinte minutos, as células foram lavadas por três vezes com tampão de FACS e ressuspensas em (PBS) a 0,15M com pH 7,2 contendo 2mM de azida. A aquisição foi realizada por um citômetro de fluxo FACScan usando o programa CellQuest (Becton–Dickinson, Canadá, EUA). Para análise dos dados utilizamos FlowJo (Tree Star Inc, Califórnia, EUA) (PINHEIRO *et al.*, 2006).

5.4 MARCAÇÃO DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES OU *LEISHMANIA* COM PKH26:

Os fagócitos mononucleares ou promastigotas de *Leishmania* na fase estacionária foram tratadas com PKH26 (Sigma, USA), que é um marcador fluorescente estável com longas cadeias alifática, a qual se liga entre a bicamada lipídica da membrana celular, conferindo as células fluorescência vermelha (protocolo proposto pelo fabricante). Em resumo, as células e os parasitos foram lavados duas vezes com HBSS e ressuspensos na concentração de 2×10^7 fagócitos ou de 2×10^8 promastigotas por ml do diluente C. Em outro tubo, 4×10^{-6} M do corante PKH26 foi diluído em 1ml do diluente C e adicionado à célula. Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi bloqueada com a adição de igual volume de SFB e incubação por um minuto também à temperatura ambiente. As células foram centrifugadas (400 x g) por dez minutos a 25°C e lavadas três vezes com HBSS. Foram então ressuspensas e usadas nos experimentos.

5.5 INJEÇÃO E RASTREAMENTO DE CÉLULAS MARCADAS:

No terceiro dia da indução de peritonite estéril pela injeção de tioglicolato, as células do exsudato peritoneal foram isoladas e marcadas com o corante fluorescente vermelho PKH26, conforme descrito acima. Após ressuspensas na concentração de 10^6 - 10^7 /ml em salina, 1ml da suspensão das células foi injetada no peritônio de camundongos da linhagem BALB/c previamente

estimulados por três dias com tioglicolato. Após doze a vinte e quatro horas da injeção das células marcadas, foi feita a lavagem peritoneal com coleta de células e a extração do linfonodo paratímico de animais recipientes (Ver esquema na figura 4). As células foram cito-centrifugadas, os linfonodos foram congelados com tissue-teck (Sakura, USA) e cortados em criostato e as lâminas foram montadas com Vectashield contendo DAPI (Vector, USA). Em seguida o material foi examinado ao microscópio de fluorescência e imagens do mesmo campo foram capturadas, para o DAPI com excitação de 360 nm, emissão máxima de 460 nm quando ligado ao DNA e filtro azul produzindo uma fluorescência azul. O PKH26 tem excitação de 551 nm, emissão 567 nm e filtro verde produzindo uma fluorescência vermelha.

5.7 PARASITOS:

As células do exsudato peritoneal de *L. amazonensis* (MHOM/1973/Br/125) foram isoladas em placa de cultura (B/c) e cultivadas *in vitro* em meio de Schneiders (Sigma) suplementado com 10% Soro Feto de Calf (FCS) em 22°C. Os parasitos na fase estacionária foram lavados três vezes com solução de lavagem a 1.250 vezes em minutos em HBSS e ressuspenso em RPMI completo.

5.8 INFECÇÃO DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES COM LEISHMANIA:

Os fagócitos mononucleares de camundongos *B6* e *129* foram cultivados por vinte e quatro horas em cultura primária (não aderentes) em RPMI completo, na presença ou não de células dendríticas de *Leishmania* a 37°C e 5% de CO₂. A infecção foi feita na proporção de 10 parasitos:1 fagócito. Os parasitos foram ressuspenso em RPMI completo a uma concentração de 2x10⁷/ml e incubados com as células na concentração de 2x10⁶/ml, por um período de dezoito a

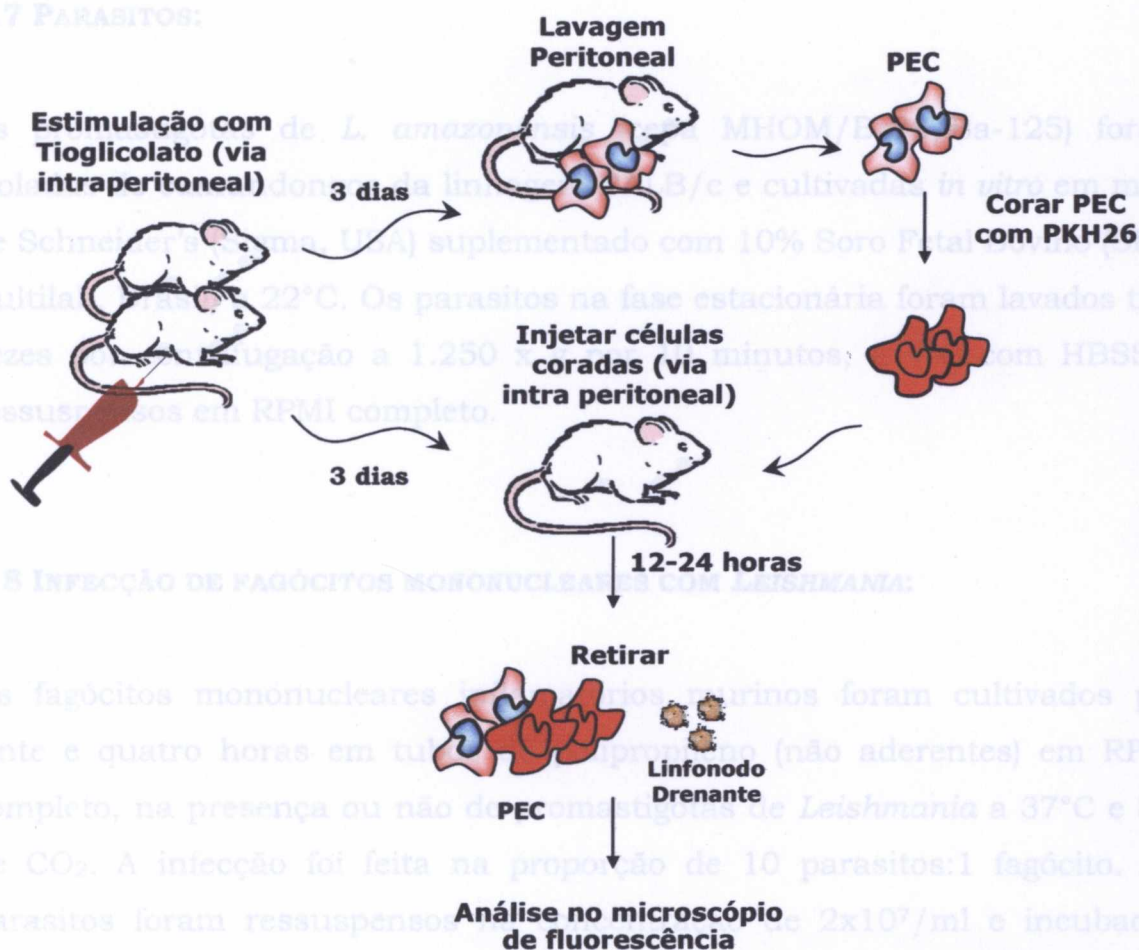


Figura 4. Desenho esquemático sobre metodologia da injeção e rastreamento de células marcadas. PEC – células do exsudato peritoneal; PKH26 – corante fluorescente vermelho.

5.6 CÉLULAS DO EXSUDATO PERITONEAL DE CAMUNDONGO:

As células do exsudato peritoneal foram obtidas de camundongo da linhagem BALB/c pela injeção de 3 ml de uma solução de tioglicolato (Sigma, USA) a 3% estéril e envelhecido por um mês ao abrigo da luz. Quatro dias após a injeção de tioglicolato, as células do exsudato peritoneal (PECs) foram coletadas através da lavagem da cavidade peritoneal com Solução Salina Tamponada de Hank modificado (HBSS; Sigma, USA) a 4 °C, contendo 20 IU/ml heparina. As células foram contadas e utilizadas nos diferentes experimentos.

5.7 PARASITOS:

As promastigotas de *L. amazonensis* (cepa MHOM/Br88/Ba-125) foram isoladas de camundongos da linhagem BALB/c e cultivadas *in vitro* em meio de Schneider's (Sigma, USA) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB; Cultilab, Brasil) a 22°C. Os parasitos na fase estacionária foram lavados três vezes por centrifugação a 1.250 x g por 10 minutos, a 4°C com HBSS e ressuspensos em RPMI completo.

5.8 INFECÇÃO DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES COM *LEISHMANIA*:

Os fagócitos mononucleares inflamatórios murinos foram cultivados por vinte e quatro horas em tubos de polipropileno (não aderentes) em RPMI completo, na presença ou não de promastigotas de *Leishmania* a 37°C e 5% de CO₂. A infecção foi feita na proporção de 10 parasitos:1 fagócito. Os parasitos foram ressuspensos na concentração de 2x10⁷/ml e incubados com as células na concentração de 2x10⁶/ml, por um período de dezoito a vinte e quatro horas.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os gráficos dos experimentos de cinética representam médias \pm desvios padrões entre os diferentes experimentos. A tabela 1 apresenta o percentual dos linfonodos para os quais houve migração celular em relação ao número de linfonodos totais examinados. Os dados exibidos pela análise por citometria de fluxo representam média percentual do número de células positivas para cada marcador analisado \pm desvio padrão entre os diferentes experimentos. A significância estatística entre os diferentes grupos foi medida usando o teste *t*, com nível crítico de significância de $p \leq 0,05$. Os dados foram analisados através de programa Prisma 4.00 para Windows, Software GraphPad (San Diego, Califórnia, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 CINÉTICA PÓS-INJEÇÃO DE TIOGLICOLATO

Observou-se um significativo aumento no número de células na cavidade peritoneal dos animais injetados com tioglicolato ($1,8 \pm 0,6 \times 10^7$ células) em relação aos animais injetados com salina ($2 \pm 2 \times 10^6$ células), desde o primeiro dia após estímulo inflamatório. O número de células permaneceu aproximadamente inalterado até o quarto dia após o estímulo. Após esse período, o número de células diminuiu progressivamente atingindo um platô ($8 \pm 4 \times 10^6$) que se manteve estável até o centésimo dia. O número de células do grupo estimulado com tioglicolato foi sempre maior do que o grupo controle, mesmo cem dias após o estímulo inflamatório (figura 5).

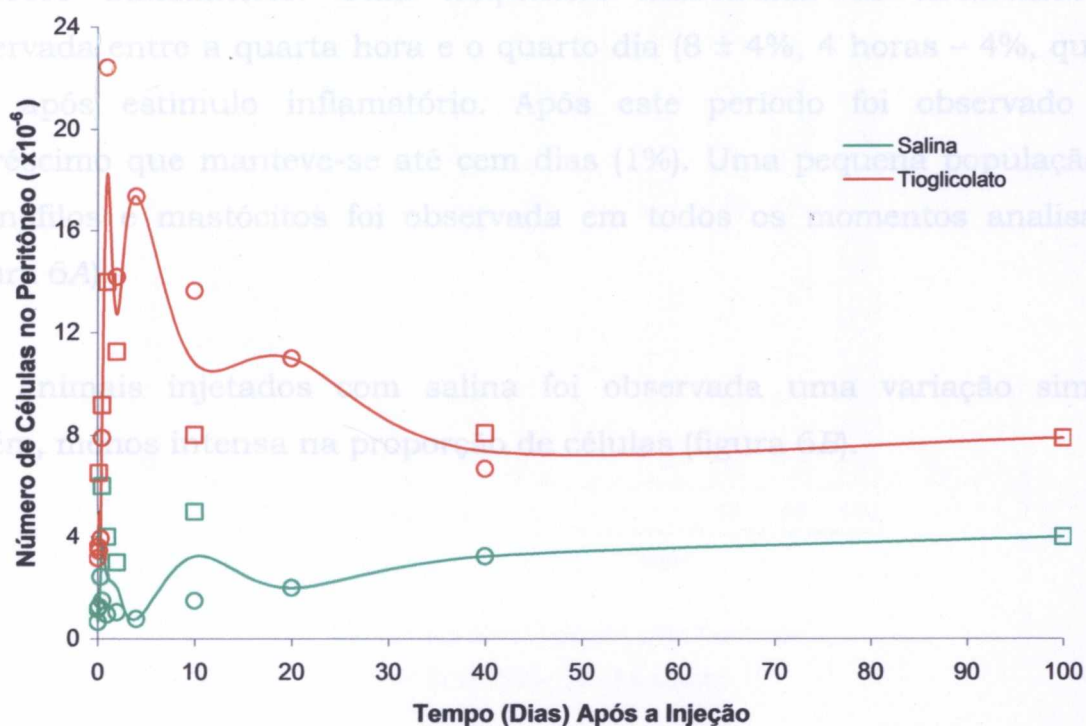


Figura 5. Cinética do recrutamento de células para o peritônio após injeção de tioglicolato. Os camundongos da linhagem BALB/c foram estimulados com tioglicolato e sacrificados nos períodos de duas, quatro e doze horas e um, dois, quatro, dez, vinte, quarenta e cem dias. Em seguida, foi feita a lavagem peritoneal. Cada círculo e quadrado no gráfico representam o número de células obtidas em cada experimento. As linhas representam a média do número de células retiradas de cada animal. Os dados são representativos de dois experimentos representados pelo círculo e quadrado.

6.1.1 POPULAÇÕES CELULARES:

6.1.1.1 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓPTICA:

O percentual de fagócitos mononucleares do exsudato peritoneal recrutados pelo estímulo inflamatório com tioglicolato variou de acordo com o tempo de estímulo. Nas doze primeiras horas houve um decréscimo ($48 \pm 17\%$, 2h; $28 \pm 10\%$, 4h; $19 \pm 1\%$, 12h) no percentual de fagócitos mononucleares com um aumento entre o primeiro ($59 \pm 25\%$) e o quarto dia ($84 \pm 11\%$) quando tornou-se a célula predominante. O percentual de fagócitos mononucleares declinou entre o décimo ($52 \pm 40\%$) e o quadragésimo dia ($23 \pm 16\%$). Os linfócitos foram as células mais freqüentes nas etapas iniciais ($56 \pm 19\%$, 2h; 63 ± 5 , 4h e 67 ± 1 , 12 horas) e finais ($75 \pm 15\%$, 40 e $89 \pm 3\%$ 100 dias) do processo inflamatório. Uma freqüência aumentada de neutrófilos foi observada entre a quarta hora e o quarto dia ($8 \pm 4\%$, 4 horas – 4%, quarto dia) após estímulo inflamatório. Após este período foi observado um decréscimo que manteve-se até cem dias (1%). Uma pequena população de eosinófilos e mastócitos foi observada em todos os momentos analisados (figura 6A).

Nos animais injetados com salina foi observada uma variação similar, porém, menos intensa na proporção de células (figura 6B).

6.1.1.2 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO:

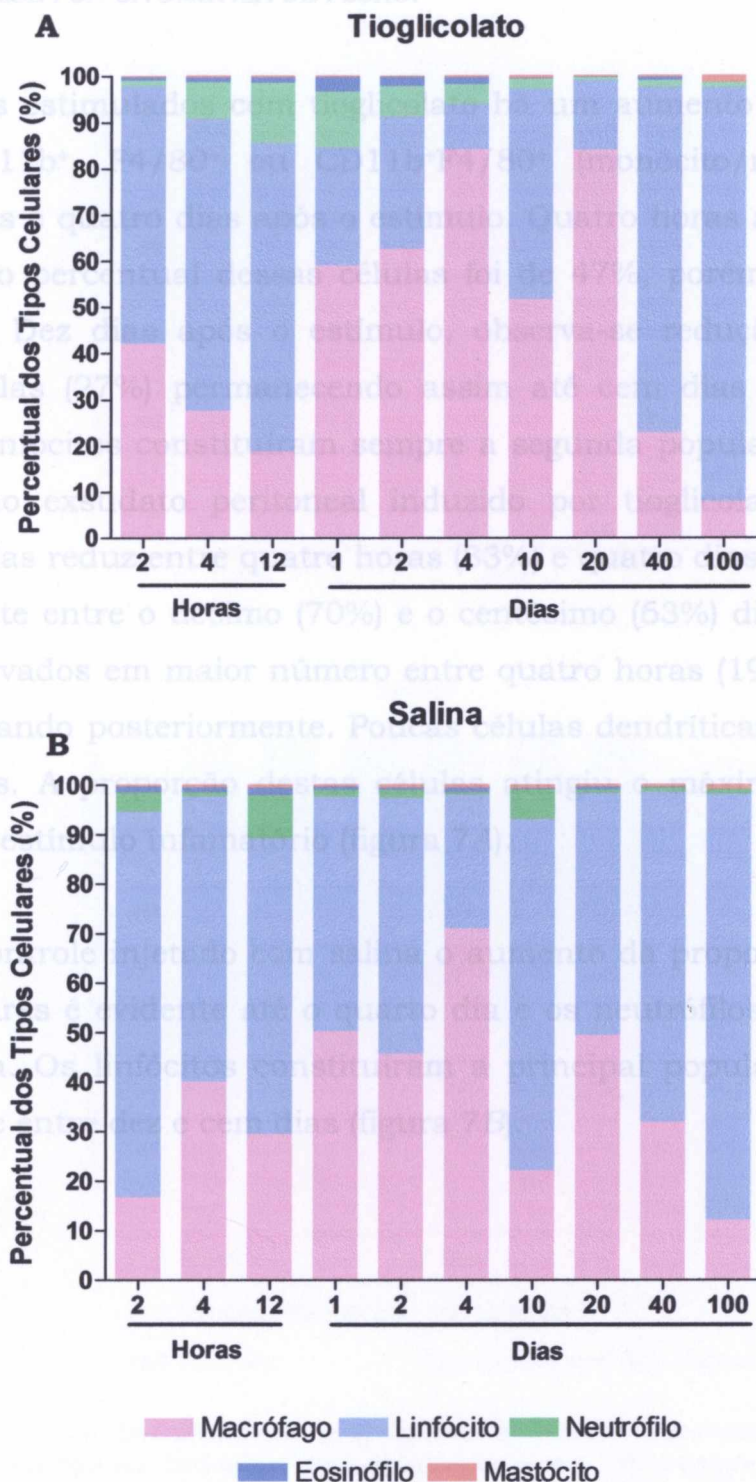


Figura 6. Percentual das diferentes populações celulares observadas entre as células do exsudato peritoneal em diferentes períodos após a injeção de tioglicolato. A, animais injetados com tioglicolato; B, animais injetados com salina. Os camundongos da linhagem BALB/c foram injetados com salina ou estimulados com tioglicolato e sacrificados nos períodos de duas, quatro e doze horas e um, dois, quatro, dez, vinte, quarenta e cem dias. As cores diferentes nas barras do gráfico representam os percentuais de células contadas em cada animal nos diferentes pontos do experimento. Dados originados de dois experimentos.

6.1.1.2 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO:

Nos animais estimulados com tioglicolato há um aumento da proporção de células CD11b⁺, F4/80⁺ ou CD11b⁺F4/80⁺ (monócito/macrófago) entre quatro horas e quatro dias após o estímulo. Quatro horas após a injeção de tioglicolato o percentual dessas células foi de 47%, porém, atinge 84% no quarto dia. Dez dias após o estímulo, observa-se redução da população dessas células (27%) permanecendo assim até cem dias após o estímulo (35%). Os linfócitos constituíram sempre a segunda população celular mais frequente no exsudato peritoneal induzido por tioglicolato. A proporção dessas células reduz entre quatro horas (33%) e quatro dias (14%), elevando-se novamente entre o décimo (70%) e o centésimo (63%) dia. Os neutrófilos foram observados em maior número entre quatro horas (19%) e quatro dias (1%), declinando posteriormente. Poucas células dendríticas maduras foram identificadas. A proporção destas células atingiu o máximo com dez dias (2%) após o estímulo infamatório (figura 7A).

No grupo controle injetado com salina o aumento da proporção de fagócitos mononucleares é evidente até o quarto dia e os neutrófilos predominam no primeiro dia. Os linfócitos constituíram a principal população celular com doze horas e entre dez e cem dias (figura 7B).

6.2 MIGRAÇÃO CELULAR

6.2.1 CINÉTICA DE CÉLULAS PERITONEAIS PARA O LINFONODO DRENANTE:

A morfologia dos macrófagos e linfócitos presentes no exsudato peritoneal após estímulo injetado com tioglicolato é diferente da observada em animais injetados com salina. As células peritoneais por tioglicolato são grandes e apresentam características morfológicas de células fagocitadas do meio líquido. Os aspectos morfológicos característicos das células obtidas dos animais injetados com salina ou com tioglicolato são apresentados na figura 8.

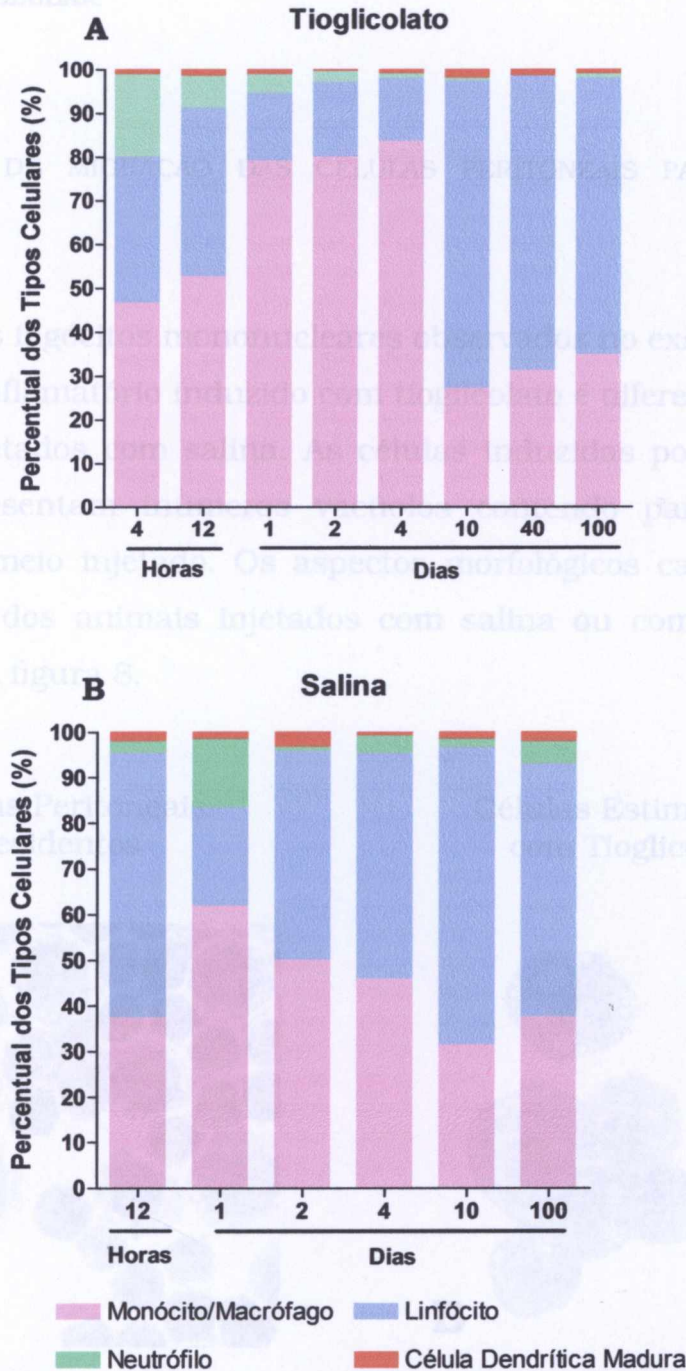


Figura 7. Percentual das diferentes populações celulares observadas entre as células do exsudato peritoneal induzido por tioglicolato em diferentes pontos de tempo analisados utilizando-se citometria de fluxo. A, animais estimulados com tioglicolato; B, animais injetados com salina. Os camundongos da linhagem BALB/c foram injetados com salina ou estimulados com tioglicolato e sacrificados nos períodos de quatro e doze horas e um, dois, dez, quarenta e cem dias. As células do exsudato peritoneal foram retiradas e marcadas com anticorpos contra GR-1, B220, CD3 e duplamente marcadas com CD11b e F4/80 e CD11c e MHC-II. O fenótipo dos monócitos/macrófagos foram determinados pela expressão única de CD11b e F4/80 ou ambas; os polimorfonucleares pela combinação da alta granulosidade e a expressão de GR-1; os linfócitos pela soma das células CD3⁺ e B220⁺ e as células dendríticas maduras pela expressão de CD11c⁺ e MHC-II^{high}. As cores diferentes nas barras representam o percentual das células contadas em cada animal nos diferentes pontos. Dados originados de um experimento.

6.2 MIGRAÇÃO CELULAR

6.2.1 CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS PERITONEAIS PARA O LINFONODO DRENANTE:

A morfologia dos fagócitos mononucleares observados no exsudato peritoneal após estímulo inflamatório induzido com tioglicolato é diferente da observada em animais injetados com salina. As células induzidas por tioglicolato são grandes e apresentam inúmeros vacúolos contendo partículas de agar fagocitadas do meio injetado. Os aspectos morfológicos característicos das células obtidas dos animais injetados com salina ou com tioglicolato são apresentados na figura 8.

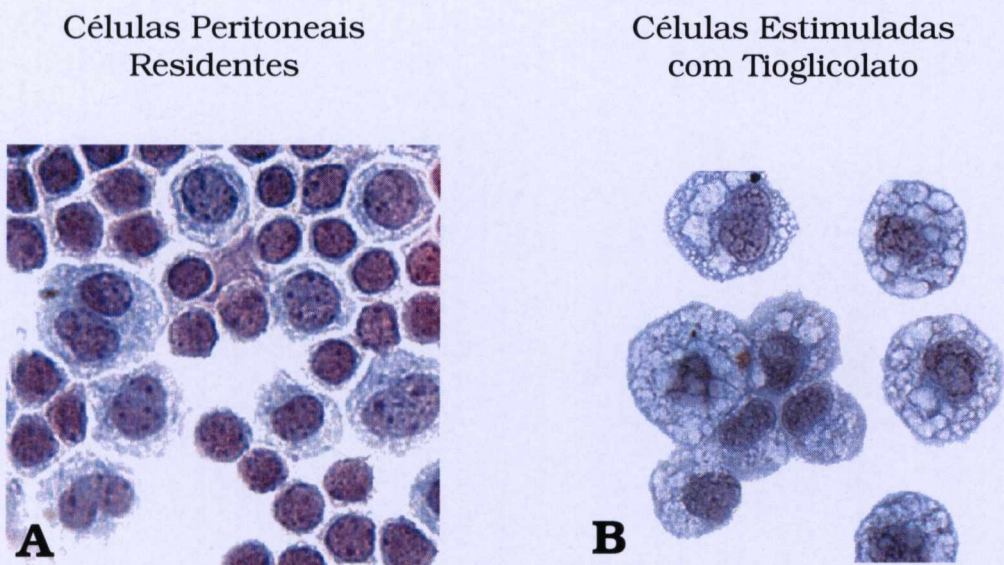


Figura 8. Morfologia das células da cavidade peritoneal antes e após estímulo inflamatório. Células da cavidade peritoneal foram retiradas de camundongos da linhagem BALB/c após 4 dias da injeção de salina (A) ou tioglicolato (B) e coradas com a técnica Papanicolau (1000X).

Os linfonodos dos animais que foram injetados com salina demonstraram um padrão similar em todos os períodos da observação. Nestes animais é comum a presença de mastócitos no seio subcapsular e células de aspecto macrofágico como mostra a figura 9.

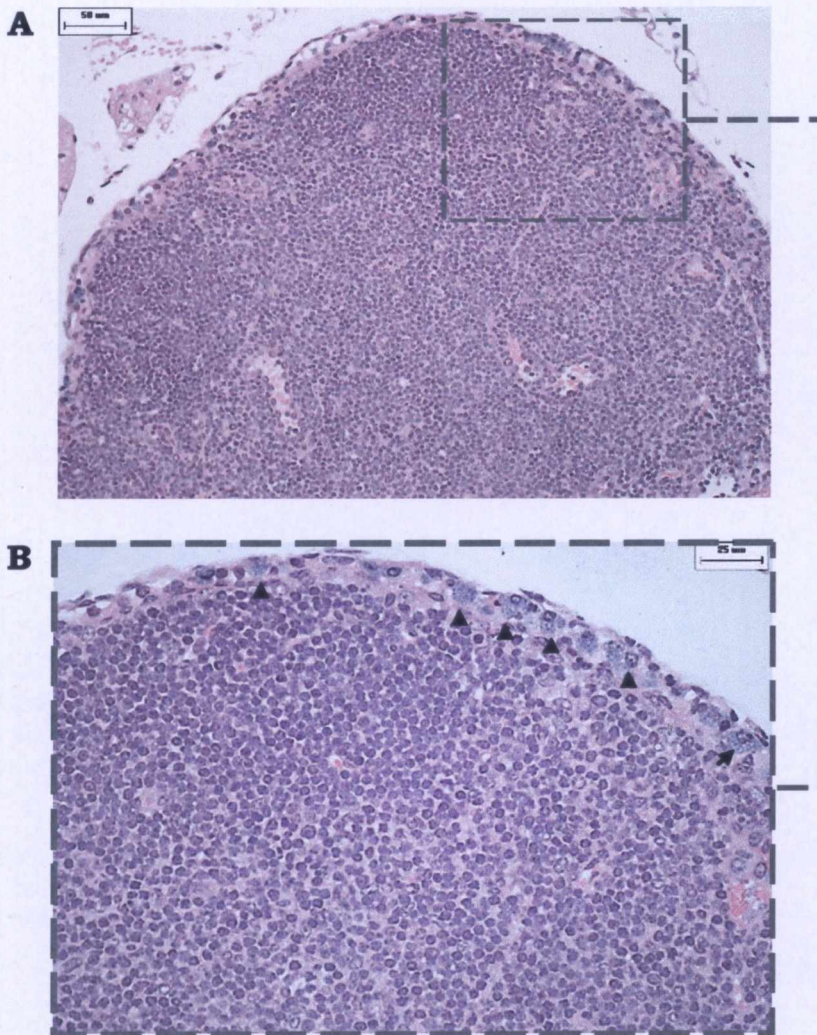


Figura 9. Linfonodo para-tímico 4 dias após a injeção de salina. A. Camundongos da linhagem BALB/c foram injetados com salina e depois de 4 dias foram sacrificados, o linfonodo para-tímico retirado e em seguida levado para processamento histológico. B. O linfonodo no aumento de 20x observa-se a presença de mastócitos (cabeça de seta) na região sub-capsular.

O aparecimento de células vacuoladas nos seios periféricos dos linfonodos drenantes da cavidade peritoneal foi observado 8 horas após a injeção de tioglicolato (figura 10). Neste momento, as poucas células observadas no linfonodo para-tímico encontram-se no seio subcapsular. Dentre os cinco linfonodos examinados, apenas dois apresentaram essas células (tabela 1).

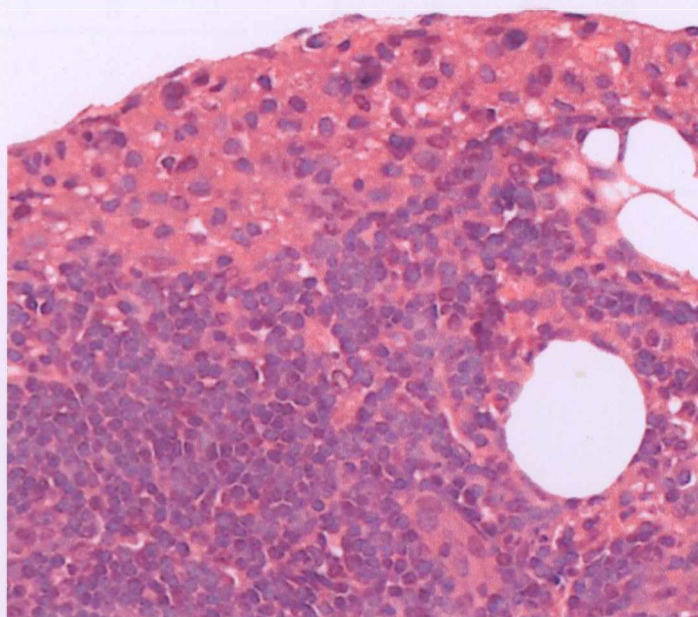


Figura 10. Linfonodo para-tímico 8 horas após a injeção de tioglicolato. Camundongos da linhagem BALB/c foram estimulados com tioglicolato e depois de 8 horas foram sacrificados, o linfonodo para-tímico retirado e levado para processamento histológico. Imagem em aumento de 40x.

Com doze horas, as células vacuoladas foram encontradas no seio subcapsular em maior proporção. Em um dos linfonodos, essas células puderam ser observadas em grande quantidade na transição córtico-medular. Nesta região, observam-se também mastócitos e células polimorfonucleadas (figura 11). A partir de doze horas, verifica-se um aumento progressivo da quantidade dessas células no peritônio pelo menos até o quarto dia após o estímulo inflamatório, permanecendo assim até o centésimo dia (figura 5). Há, porém, diferenças na intensidade de migração dessas células para o linfonodo. No quarto dia, células vacuoladas estavam presentes na maioria dos linfonodos observados (tabela 1). Na maioria dos casos foi observada a substituição de quase todo o parênquima do linfonodo por células vacuoladas de morfologia macrofágica, tanto na região

paracortical quanto nos cordões medulares (figura 11). Neste ponto, dos quinze linfonodos observados, quatorze apresentaram migração.

Tabela 1. Percentual dos linfonodos para-tímicos que apresentaram migração dos fagócitos mononucleares inflamatórios peritoneais.

	Horas			Dias						
	4	8	12	1	2	4	10	20	40	100
Número de animais	14	2	7	9	11	6	9	6	14	5
Percentual dos linfonodos com migração (%)	0	40	56	43	47	93	63	61	45	13

Dados obtidos de dois experimentos independentes.

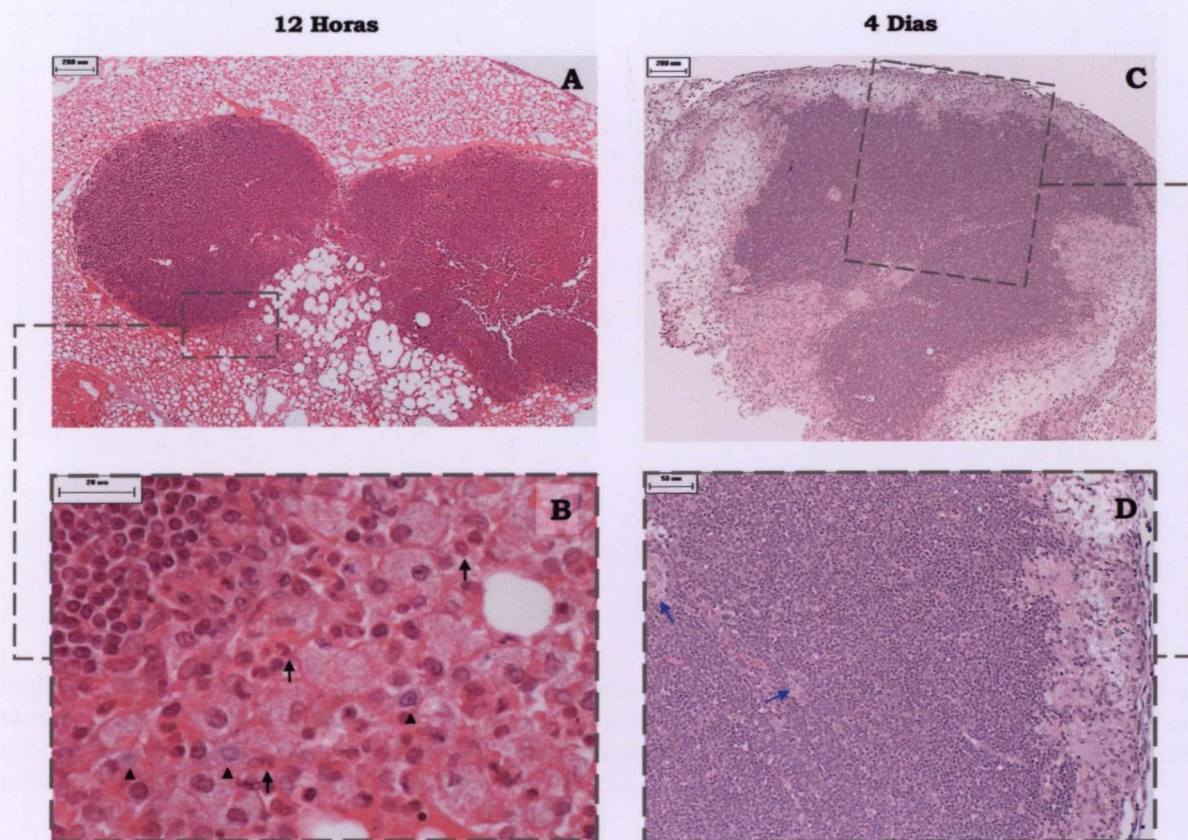


Figura 11. Linfonodo para-tímico doze horas e 4 dias após a injeção de tioglicolato. Camundongos da linhagem BALB/c foram estimulados com tioglicolato e depois de doze horas (A-B) e 4 dias (C-D) foram sacrificados, o linfonodo para-tímico retirado e levado para processamento histológico. B. Após doze horas observa-se também a presença de polimorfonucleares (seta preta) e mastócitos (cabeça de seta) na região de transição entre a região sub-capsular e medular. D. Quatro dias após o estímulo observa-se um grande infiltrado de células vacuoladas no seio subcapsular, cordões medulares e região paracortical (seta azul).

A partir do décimo dia observa-se uma diminuição progressiva do número de linfonodos que apresentaram agregados de células vacuoladas (tabela 1). Contudo, pode-se encontrar ainda um grande número dessas células na região cortical e nos cordões medulares dos linfonodos. Um quadro similar é observado nos poucos linfonodos que apresentaram essas células com quarenta (figura 12) e cem dias após estímulo com tioglicolato.

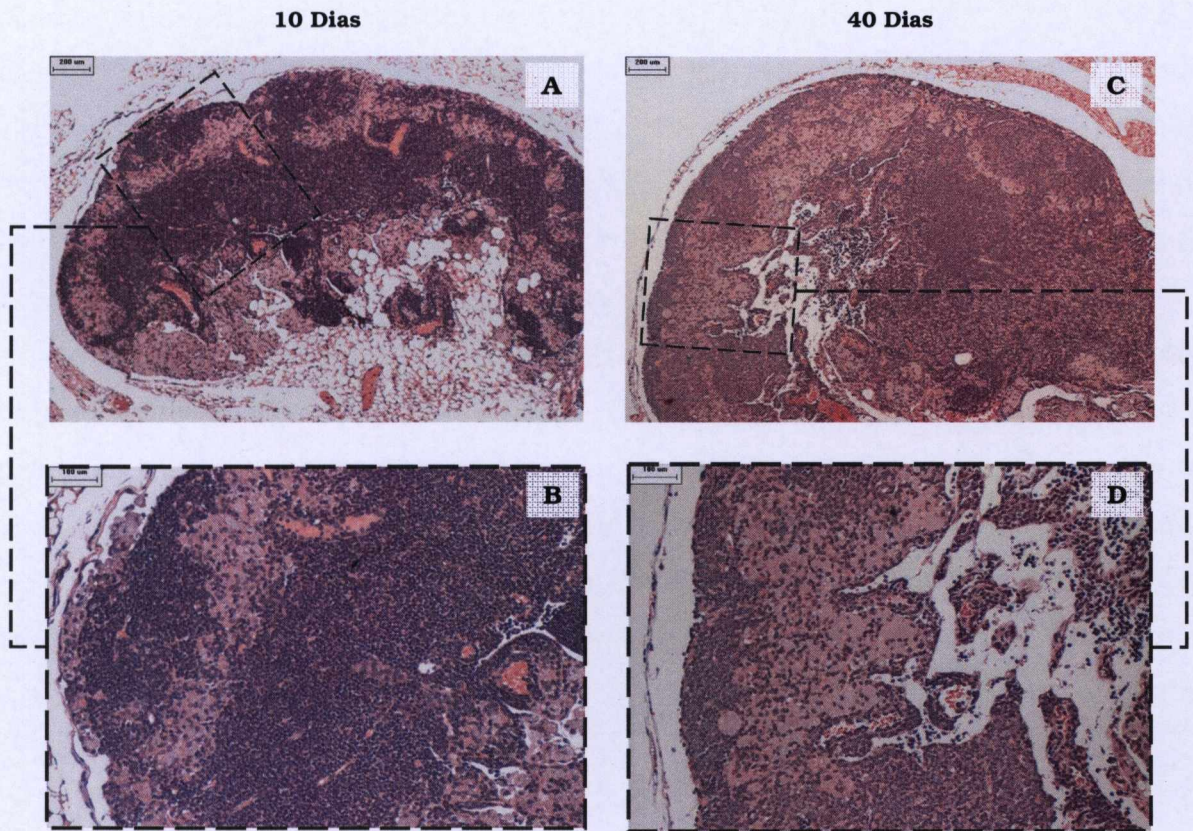


Figura 12. Linfonodo para-tímico dez dias e quarenta dias após a injeção de tioglicolato. Camundongos da linhagem BALB/c foram estimulados com tioglicolato, sacrificados, depois de dez dias (A-B) e quarenta dias (C-D), o linfonodo para-tímico retirado e levado para processamento histológico.

6.2.2 INJEÇÃO E RASTREAMENTO DE CÉLULAS MARCADAS:

Nos experimentos objetivando identificar a cinética de migração de fagócitos mononucleares para o linfonodo, verificou-se que o quarto dia de estímulo inflamatório foi o momento com maior influxo de fagócitos mononucleares no peritônio, assim como o ponto de maior número de linfonodos que apresentaram essas células em grande quantidade. Com base nestes dados, realizamos os experimentos de injeção e rastreamento com células marcadas, para afastar a possibilidade de que no lugar da migração dessas células do peritônio para o linfonodo, estivesse apenas migrando partículas de agar do sítio de injeção para o seio marginal. Após vinte e quatro horas da injeção intraperitoneal de células marcadas, encontrou-se um grande número de células fluorescentes no lavado peritoneal (figura 13) e no linfonodo drenante (figura 13). No linfonodo, as células foram observadas principalmente no seio subcapsular (figura 13), mas também espalhadas pela região medular (dado não mostrado). Analisando o mesmo linfonodo no HE, encontramos um número maior de células vacuoladas do que observado na fluorescência. Provavelmente, isso decorre do fato de que os animais que receberam as células fluorescentes estavam previamente estimulados com tioglicolato, havendo migração de células próprias e de células injetadas (Figura 13).

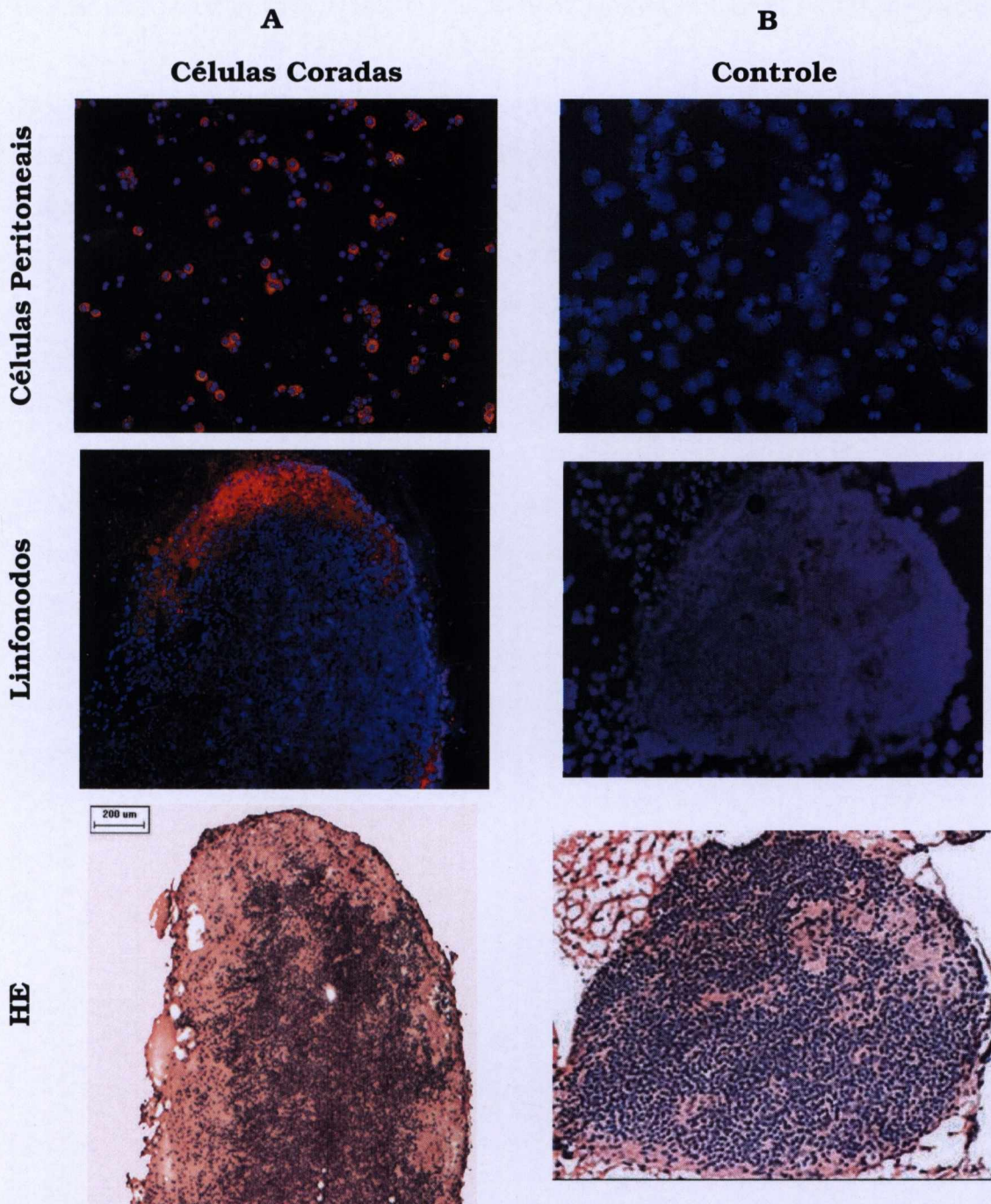


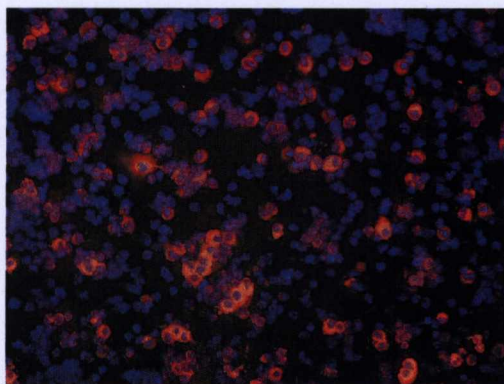
Figura 13. Migração de fagócitos mononucleares inflamatórios para o linfonodo regional dezoito-vinte e quatro horas após a injeção intra-peritoneal das células coradas com PKH26. Células do exsudato peritoneal foram retiradas de camundongos da linhagem BALB/c após 3 dias de estímulo com tioglicolato; em seguida foram coradas ou não com marcador fluorescente vermelho (PKH26) e injetadas no peritônio de camundongos previamente estimulados. Após vinte e quatro horas, as células do exsudato peritoneal (PEC) e o linfonodo regional foram retirados e levados para análise no microscópio óptico de fluorescência. As lâminas foram montadas com DAPI marcando em azul. Os dados são representativos de sete experimentos. Células do exsudato peritoneal; B - linfonodo de um animal injetado com tioglicolato sem injeção de células marcadas do mesmo período. A - Exsudato peritoneal e linfonodo de um animal também com tioglicolato e injetado com células marcadas.

6.2.3 INJEÇÃO E RASTREAMENTO DE CÉLULAS MARCADAS APÓS INCUBAÇÃO:

No modelo de infecção das células peritoneais utilizado no laboratório, as células são incubadas com o parasito por dezoito-vinte e quatro horas, na estufa de CO₂ em tubos não aderentes. Como o objetivo deste estudo é definir condições para identificação de populações celulares em ensaios de migração *in vivo*, realizamos alguns experimentos para ver se o cultivo nas condições descritas alteram a migração dessas células. Como demonstrado na figura 14, a incubação das células por dezoito-vinte e quatro horas não altera a capacidade de migrar para o linfonodo drenante. Foram observadas células fluorescentes no lavado peritoneal assim como no linfonodo drenante. No linfonodo, foi possível observar células migrantes espalhadas nas regiões cortical e medular, como foi visto quando as células não foram incubadas. Na coloração com HE, foi observada a presença de células vacuoladas nas mesmas regiões que as observadas pela fluorescência ou às vezes um pouco mais, devido ao estímulo prévio com tioglicolato (figura 14).

Células Coradas e Incubadas

Células Peritoneais



Linfonodo

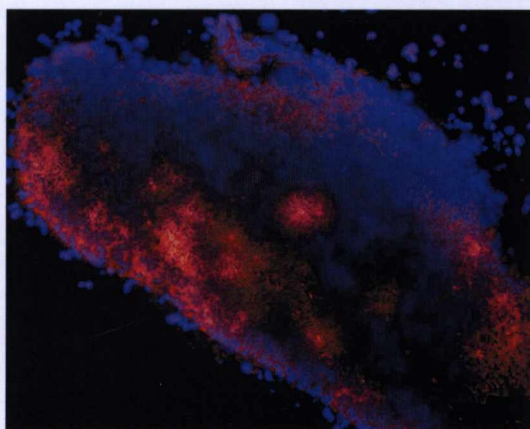


Figura 14. Migração de fagócitos mononucleares inflamatórios para o linfonodo regional após dezoito-vinte e quatro horas de incubação. Células do exsudato peritoneal foram retiradas de camundongos da linhagem BALB/c após 3 dias de estímulo com tioglicolato e, em seguida foram coradas ou não com marcador fluorescente vermelho (PKH26). Depois foram incubadas por dezoito-vinte e quatro horas em tubos não aderentes na estufa de CO₂ e injetadas no peritônio de camundongos previamente estimulados. Após aproximadamente vinte e 4 horas, as células do exsudato peritoneal (PEC) e o linfonodo para-tímico foram retirados e levados para análise no microscópio óptico de fluorescência. As lâminas foram montadas com DAPI marcando em azul. Os dados são representativos de sete experimentos.

6.3 POPULAÇÕES CELULARES DO EXSUDATO PERITONEAL QUATRO DIAS APÓS ESTÍMULO INFLAMATÓRIO COM TIOLICOLATO

Tendo definido o quarto dia após o estímulo inflamatório como o mais adequado para os estudos de migração celular, procuramos, nesta etapa, identificar as populações celulares presentes no exsudato peritoneal e a susceptibilidade dessas células à infecção com *Leishmania*. Por essa razão, a análise das células foi sempre procedida por dezoito-vinte e quatro horas de incubação em tubos não aderentes (condições dos nossos ensaios de infecção e adesão celular; CARVALHAL *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2006). Desde que seja possível refinar a análise dessas células adicionando parâmetros de granulidade e tamanho à análise, fizemos em seguida uma avaliação da distribuição das células utilizando esse parâmetro. Nossa expectativa é identificar regiões com populações celulares mais uniformes para uso em futuros experimentos.

6.3.1 POPULAÇÃO CELULAR TOTAL APÓS INCUBAÇÃO DE DEZOITO-VINTE E QUATRO HORAS:

A peritonite estéril induzida pela injeção de tioglicolato aumenta o número de células na cavidade peritoneal, após quatro dias, em vinte vezes, de 1×10^6 para $2,0 \pm 1,3 \times 10^7$, o número de células normalmente encontradas na cavidade. O fenótipo dessas células e sua frequência no exsudato está apresentada na figura 15. Como podemos observar, $78 \pm 6\%$ das células eram CD11b⁺, $65 \pm 9\%$ F4/80⁺, $28 \pm 15\%$ CD11c⁺, $27 \pm 3\%$ MHC-II⁺, $47 \pm 25\%$ CD54⁺, $0,6 \pm 1\%$ CD8a⁺, $1,01 \pm 1\%$ CD3⁺, $1,18\%$ CD4⁺ e 4% B220⁺.

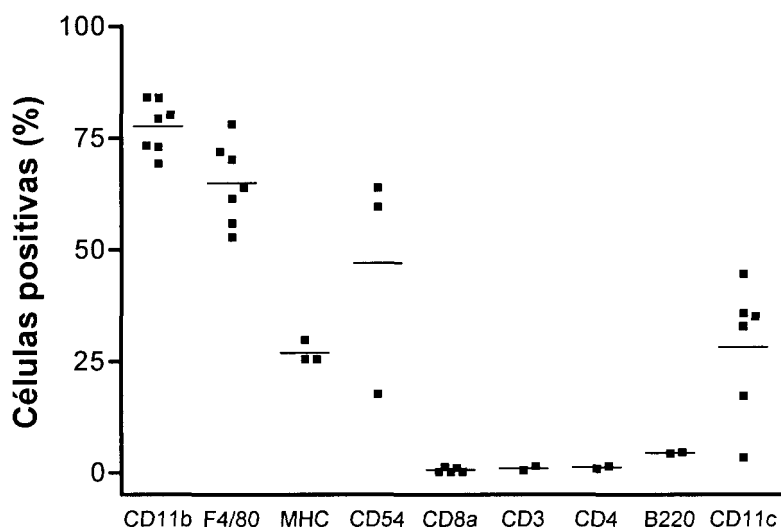


Figura 15. Distribuição das populações de células do exsudato peritoneal quatro dias após a indução de peritonite estéril com tioglicolato. Cada ponto do gráfico representa percentual de células observado em experimentos independentes. As barras horizontais representam a média dos valores obtidos nos diferentes experimentos.

Pode-se notar que as células $CD11b^+$ e $F4/80^+$ são as mais freqüentes nesse exsudato peritoneal. Como observado na figura 16, 64% dessas células são $CD11b^+F4/80^+$ (figura 16A), $9 \pm 5\%$ são $CD11b^+CD11c^+$ (figura 16B), 20% são $CD11c^+MHC-II^+$ dentre as quais 3% são células $CD11c^+MHC-II^{high}$ (figura 16C). Não foram encontradas células $CD11c^+CD8\alpha^+$ (figura 16D).

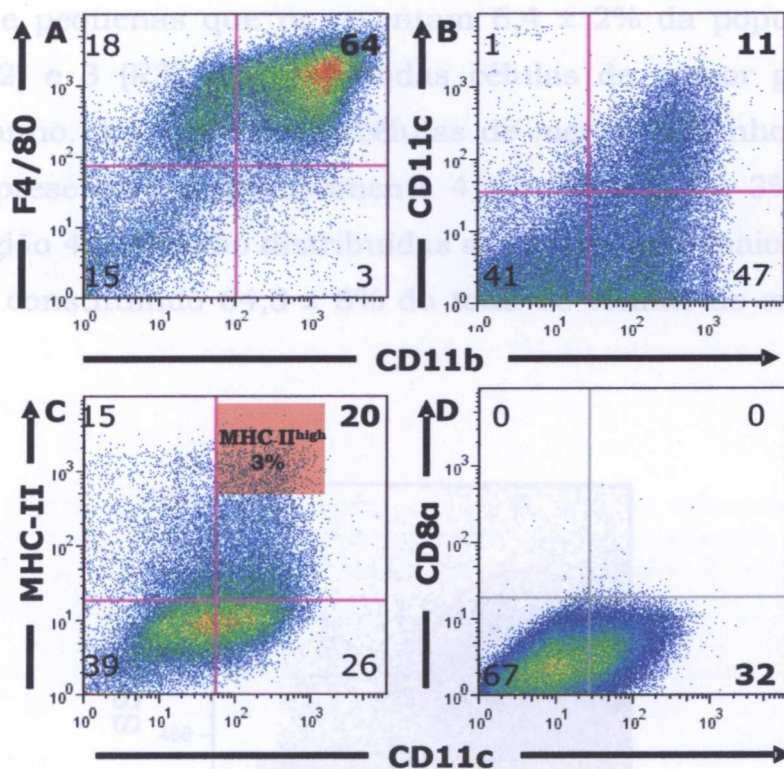


Figura 16. Distribuição de fagócitos mononucleares inflamatórios peritoneais incubados com meio de cultura após 18-24 horas. BALB/c foram estimulados com tioglicolato e após 4 dias de estímulo PEC foram retiradas, duplamente marcadas com anticorpos contra CD11b e F4/80 (A); CD11b e CD11c (B); CD11c e MHC-II (C); CD11c e CD8α (D) e analisadas utilizando-se citometria de fluxo. Os dados são representativos de cinco experimentos independentes. O quadro vermelho representa população de células $CD11c^+/MHC-II^{high}$.

6.3.2 SUB-POPULAÇÕES CELULARES POR REGIÕES DE ANÁLISE EM CITOMETRIA DE FLUXO:

Observando a distribuição das células do exsudato peritoneal, podemos distinguir quatro regiões em relação ao seu tamanho e granulosidade (*forward/side scatter*) (figura 17). Na região 1 (R1) observou-se células pouco granulosas e pequenas que representam $6,4 \pm 2\%$ da população total. Na região 2 (R2) e 3 (R3) são observadas células de menor granulosidade e menor tamanho. A R2 possui as células de menor tamanho. As células da R2 e R3 representam respectivamente $4,1 \pm 2\%$ e $8,3 \pm 3\%$ da população total. Na região 4 (R4) estão distribuídas as células com maior granulosidade e tamanho, constituindo $64,3 \pm 8\%$ do total de células do exsudato (Figura 17).

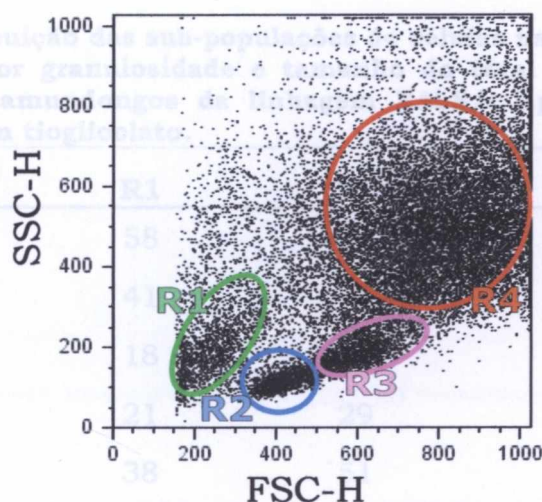


Figura 17. Análise por citometria de fluxo das células peritoneais obtidas de camundongos da linhagem BALB/c após 4 dias de estímulo inflamatório com tioglicolato. Foram definidas quatro regiões distintas (R1-R4) baseadas nas características de granulosidade, tamanho e concentração celular. Os dados apresentados são representativos de sete experimentos independentes.

Análise estatística entre as regiões: * R4>R1>R3>R2 (P<0.0001); † R4>R1>R3>R2 (P<0.0001); ‡ R4>R1>R3>R2 (P= 0.0006); § R3>R1>R2>R4 (P<0.0001); ¶ R2>R4>R3>R1 (P=0.0010); †† R2>R4>R3>R1 (P=0.0238); ††† R3>R2>R1>R4 (P=0.0008).

As caracterizações fenotípicas das sub-populações nas regiões definidas acima revelaram a composição apresentada na tabela 1. Na R1 observou-se que a maioria das células expressava CD11b ($58,18 \pm 7\%$) e F4/80 ($41,32 \pm 13\%$). Níveis intermediários de expressão MHC-II também são identificados em $21,11 \pm 6\%$ das células. R2 é a única região na qual foram encontradas células CD3+ ($24,89 \pm 8\%$) e CD4+ ($11,70 \pm 4\%$), mostrando também quantidades moderadas de células MHC-II+ ($29,47 \pm 12\%$) e B220+ ($42,45 \pm 5\%$). O antígeno reconhecido pelo anticorpo F4/80 e CD11b não é expresso nas células dessa região. Na R3 predominam células MHC-II+ ($84,30 \pm 9\%$), B220+ ($75,07 \pm 2\%$) e há baixa expressão de CD11b e F4/80. Pode-se observar também na R3 uma população bem definida positiva para CD11c, não encontrada em nenhuma outra região. Em R4 a maioria das células são CD11b+ ($88,72 \pm 21\%$), F4/80+ ($80,95 \pm 11\%$) e possuem baixa expressão de MHC-II (tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das sub-populações de células nas diferentes regiões (R1-R4) definidas por granulidade e tamanho do total de células do exsudato peritoneal de camundongos da linhagem BALB/c após 4 dias de estímulo inflamatório com tioglicolato.

	R1	R2	R3	R4
CD11b^a	58	10	27	89
F4/80^b	41	1	9	81
CD11c^c	18	3	12	32
MHC II^d	21	29	84	12
CD54	38	51	65	59
CD8a^e	1	5	1	1
CD3^f	5	25	3	0
CD4	4	12	2	1
B220^g	10	42	75	1

Dados representam média de sete experimentos.

Análise estatística entre as regiões: ^a R4>R1>R3>R2 (P<0.0001); ^b R4>R1>R3=R2 (P<0.0001); ^c R4>R1>R3=R2 (P= 0.0006); ^d R3>R1=R2=R4 (P<0.0001); ^e R2>R4=R3=R1 (P=0.0010); ^f R2>R4=R3=R1 (P=0.0238); ^g R3>R2>R1=R4 (P=0.0008).

As células CD11b⁺/CD11c⁺ são mais freqüentes nas regiões R1 (12 ± 5 , figura 18A) e R4 (24 ± 14 , figura 18B), porém foi observada um pequeno percentual dessas células na região R3 (7 ± 1 , figura 18B). Entretanto as células duplo positivas para CD11b e F4/80 estavam na sua maioria presentes na região R4 (77%, figura 18F), com apenas 21% e 13% nas regiões R1 (figura 18D) e R3 (figura 18E) respectivamente.

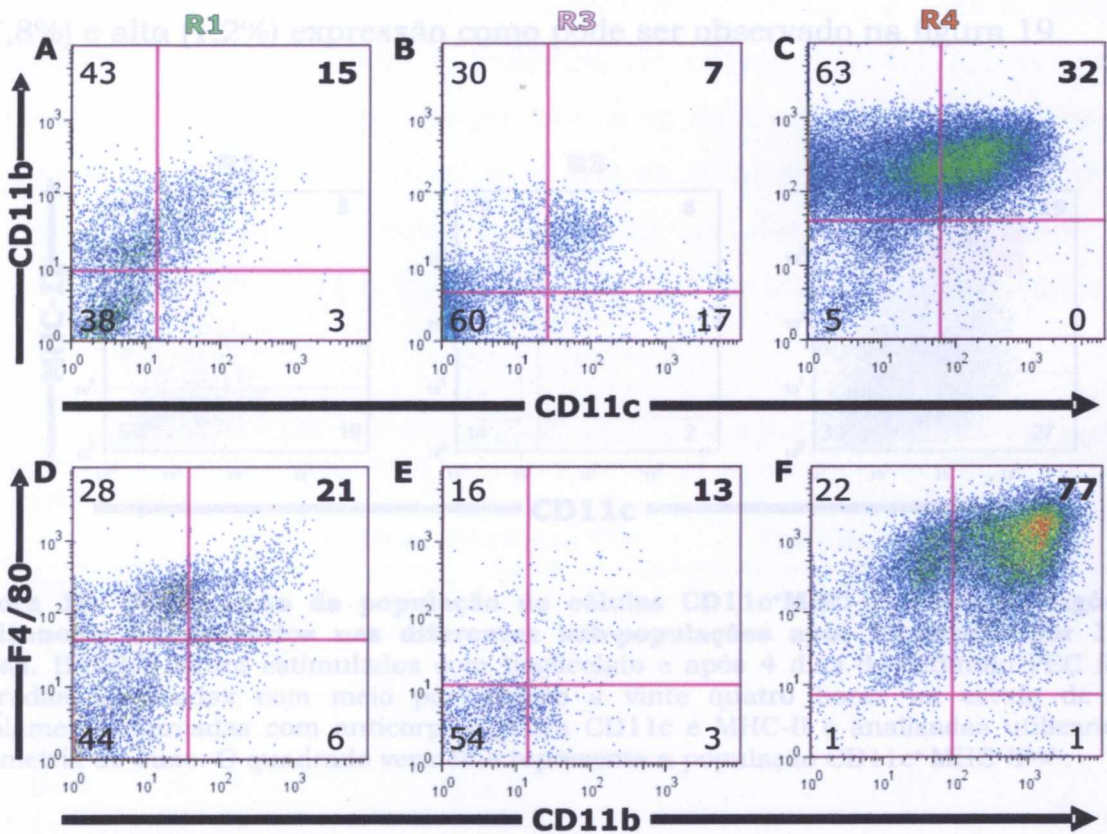


Figura 18. Distribuição de fagócitos mononucleares inflamatórios peritoneais nas diferentes sub-populações. BALB/c foram estimulados com tioglicolato e após 4 dias de estímulo PEC foram retiradas duplamente marcadas com anticorpos contra CD11c e CD11b (A-C); CD11b e F4/80 (D-F) e analisadas utilizando-se de citometria de fluxo.

A população de CD11c⁺MHC-II⁺, no grupo o qual as células foram apenas incubadas com meio por dezoito a vinte quatro horas, foi observada apenas nas regiões 1, 3 e 4, sendo que as células presentes na região 3 estavam bem dispersas, representando apenas 6% do total. Na região 1, apenas 8% dessas células com expressão do MHC-II foi relativamente baixa. Diferente disso, na região 4 essas células representavam 19% da população total, constituída de duas populações que diferiam na expressão da molécula MHC-II com baixa (17,8%) e alta (1,2%) expressão como pode ser observado na figura 19.

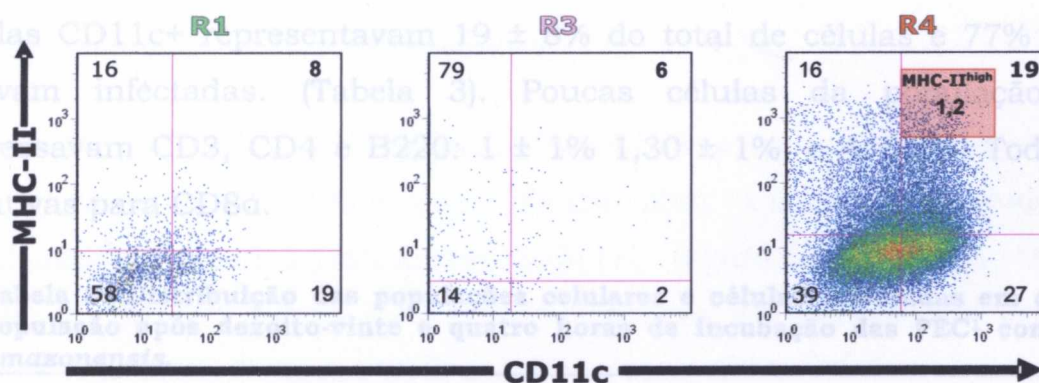


Figura 19. Distribuição da população de células CD11c⁺MHC-II⁺ entre os fagócitos peritoneais inflamatórios nas diferentes sub-populações após incubação por 18-24 horas. BALB/c foram estimulados com tioglicolato e após 4 dias de estímulo PEC foram retiradas, incubadas com meio por dezoito a vinte quatro horas na estufa de CO₂, duplamente marcadas com anticorpos contra CD11c e MHC-II e analisadas utilizando-se citometria de fluxo. O quadrado vermelho representa a população CD11c⁺ MHC-II^{high}.

Dados representam média dos experimentos.

¹ PEC, Células do Exsudato Peritoneal de camundongos da linhagem BALB/c

6.3.3 POPULAÇÕES CELULARES APÓS A INCUBAÇÃO COM *L. AMAZONENSIS* POR DEZOITO-VINTE E QUATRO HORAS: SUSCEPTIBILIDADE DIFERENCIAL NA INFECÇÃO.

Após incubar os fagócitos mononucleares por dezoito a vinte e quatro horas com *L. amazonensis*, $63 \pm 14\%$ da população total eram células CD11b⁺ e 65% dessas estavam infectadas. As células F4/80⁺ representavam $39 \pm 11\%$ da população total, sendo que 77% destas estavam infectadas. A expressão de MHC-II foi observada em $21 \pm 6\%$ do total de células. A taxa de infecção nessas células foi de 44%. A molécula de adesão ICAM-1 (CD54) estava expressa em $26 \pm 2\%$ da população total com 83% das células infectadas. As células CD11c⁺ representavam $19 \pm 8\%$ do total de células e 77% destas estavam infectadas. (Tabela 3). Poucas células da população total expressavam CD3, CD4 e B220: $1 \pm 1\%$, $1,30 \pm 1\%$, e $4 \pm 2\%$. Todas são negativas para CD8 α .

Tabela 3. Distribuição das populações celulares e células infectadas em cada população após dezoito-vinte e quatro horas de incubação das PEC¹ com *L. amazonensis*.

	Células Positivas (%)	Taxa de Infecção (%)
CD11b	63 ± 14	65
F4/80	39 ± 11	77
CD11c	19 ± 8	77
MHC II	21 ± 6	44
CD54	26 ± 2	83

Dados representam média dos experimentos.

¹ PEC, Células do Exsudato Peritoneal de camundongos da linhagem BALB/c

As células CD11b⁺CD11c⁺ apresentavam taxa de infecção de $77 \pm 22\%$ e as células CD11b⁻CD11c⁺ $33 \pm 13\%$ de infecção, como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4. Taxa de infecção das células do exsudato peritoneal de camundongo incubadas com *Leishmania* por dezoito-vinte e quatro horas e marcadas contra CD11b e CD11c.

	Taxa de Infecção (%)
CD11b ⁺ CD11c ⁺	77 ± 22
CD11b ⁺ CD11c ⁻	68 ± 31
CD11b ⁻ CD11c ⁺	33 ± 13
CD11b ⁻ CD11c ⁻	30 ± 19

Dados representam média dos experimentos.

Apenas 1% de células CD11c⁺MHC-II^{high} foi observada na população total após a infecção por *Leishmania* (figura 20A). Contudo, tomando-se a população de células infectadas CD11c⁺ (figura 20B), 28% também expressam MHC-II (figura 20C) e dessas células apenas 6% têm uma alta expressão de MHC-II (figura 20C, quadrado vermelho).

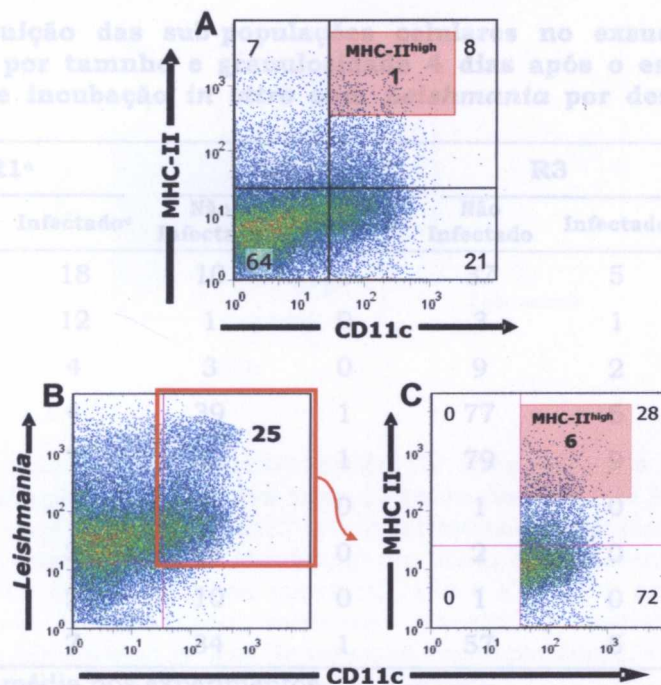


Figura 20. População de células CD11c⁺/MHC-II^{high} entre os fagócitos peritoneais inflamatórios infectados por *L. amazonensis* por dezoito-vinte e quatro horas. PEC foram infectadas com parasita corado com marcador que exibe fluorescência vermelha e anticorpo contra CD11c e MHC-II. (A) Ambos os marcadores foram analisados com base na população total peritoneal. (B) A região representando a população de células CD11c infectadas foi analisada em relação à expressão de MHC-II (C). O quadrado vermelho representa a população CD11c⁺/MHC-II^{high}.

6.3.4 DISTRIBUIÇÃO DAS SUB-POPULAÇÕES NAS REGIÕES DEFINIDAS POR TAMANHO E GRANULOSIDADE APÓS INCUBAÇÃO POR DEZOITO-VINTE E QUATRO HORAS COM *L. AMAZONENSIS*

A distribuição das sub-populações celulares nas regiões definidas por tamanho e granulidade vinte e quatro horas após a infecção *in vitro* com *Leishmania* está apresentada na tabela 5. Pode-se observar que as células predominantes na região 1 expressam CD11b e F4/80 ($50 \pm 14\%$ e $26 \pm 15\%$, respectivamente). A região 2 está composta basicamente por células que expressam CD54 ($63 \pm 32\%$), MHC-II ($40 \pm 15\%$) e B220 ($35 \pm 4\%$), considerando que apenas nesta região foi observada maior frequência de células CD3⁺ ($24 \pm 10\%$), CD4⁺ ($10 \pm 3\%$) e CD8a⁺ ($5 \pm 1\%$). Na região 3 foi observado que a maioria das células expressa CD54 ($88 \pm 9\%$), MHC-II ($83 \pm 13\%$), B220 ($62 \pm 13\%$) e CD11b ($41 \pm 8\%$). Na região 4 foi onde se concentrou o maior número de células CD11b⁺ ($82 \pm 9\%$), F4/80⁺ ($47 \pm 16\%$) e CD11c⁺ ($22 \pm 11\%$).

Tabela 5. Distribuição das sub-populações celulares no exsudato peritoneal nas regiões definidas por tamanho e granulidade 4 dias após o estímulo inflamatório com tioglicolato e incubação *in vitro* com *Leishmania* por dezoito-vinte e quatro horas.

	R1 ^a		R2		R3		R4	
	Não ^b Infectado	Infectado ^c	Não Infectado	Infectado	Não Infectado	Infectado	Não Infectado	Infectado
CD11b	32	18	10	1	37	5	25	57
F4/80	15	12	1	0	3	1	10	38
CD11c	8	4	3	0	9	2	4	19
MHC II	11	4	39	1	77	6	3	10
CD54	6	7	61	1	79	9	2	26
CD8a	0	1	5	0	1	0	0	0
CD3	1	2	23	0	2	0	0	0
CD4	1	2	10	0	1	0	0	0
B220	2	7	34	1	57	5	0	0

Dados representam média dos experimentos.

^a As regiões foram definidas de acordo com granulidade e tamanho do total de células;

^b Se refere as células que não se infectaram após a incubação com *L. amazonensis*;

^c Se refere as células que se infectaram após a incubação com *L. amazonensis*.

Como pode ser observado, as regiões R1, R3 e R4 concentram as maiores proporções de células $CD11b^+CD11c^+$. Em R1 e R3 apenas $5 \pm 3\%$ e $6 \pm 3\%$ das células são duplo positivas respectivamente. Com relação à taxa de infecção, encontramos $46 \pm 7\%$ na R1 e $36 \pm 25\%$ na R3. Na região 4 foi observado um número maior de células $CD11b^+CD11c^+$ representando $9 \pm 3\%$. Destas células $66 \pm 23\%$ estão infectadas como mostra a figura 21.

alta (0,5%) expressão de MHC-II.

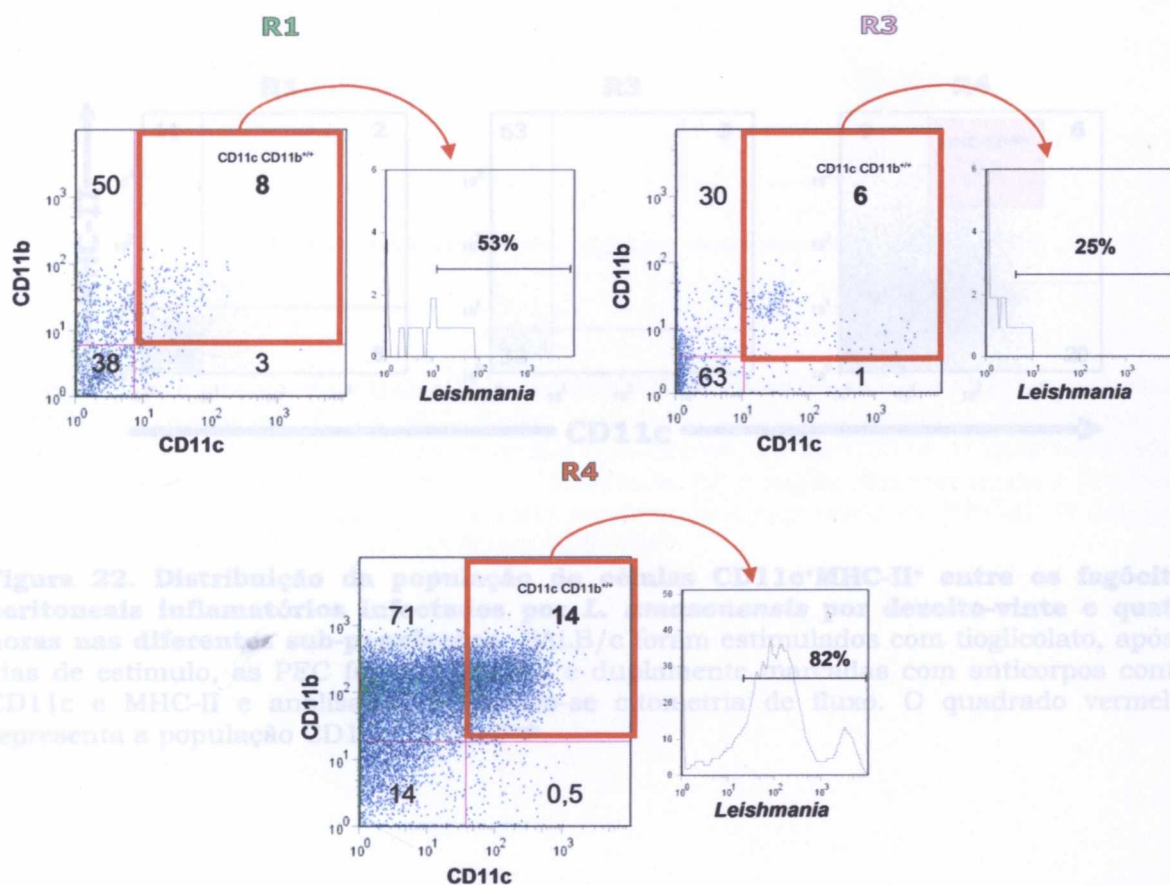


Figura 21. Distribuição das células $CD11c^+CD11b^+$ após infecção com *Leishmania* nas diferentes sub-populações e respectiva taxa de infecção. BALB/c foram estimulados com tioglicolato e após 4 dias de estímulo PEC foram retiradas e infectadas com *L. amazonensis*. Após dezoito-vinte e quatro horas de incubação em tubos não aderentes, os fagócitos foram duplamente marcados com anticorpos contra CD11c e CD11b e analisados utilizando-se citometria de fluxo. O quadrado vermelho ressalta a população duplo positiva ($CD11c^+CD11b^+$) e o histograma a taxa de infecção correspondente. Os dados apresentados são representativos de cinco experimentos independentes.

Foi observada a presença de uma população de células $CD11c^+MHC-II^+$ bem definida apenas nas regiões 1 e 4; na região 3 as células encontravam-se dispersas e representavam apenas 3% da sub-população, como pode ser observado na figura 22. Em R1 as células $CD11c^+MHC-II^+$ eram 2,3% da população e exibiam uma baixa expressão de MHC-II. Na região R4 (6%) duas populações puderam ser definidas: uma com baixa (5,5%) e outra com alta (0,5%) expressão de MHC-II.

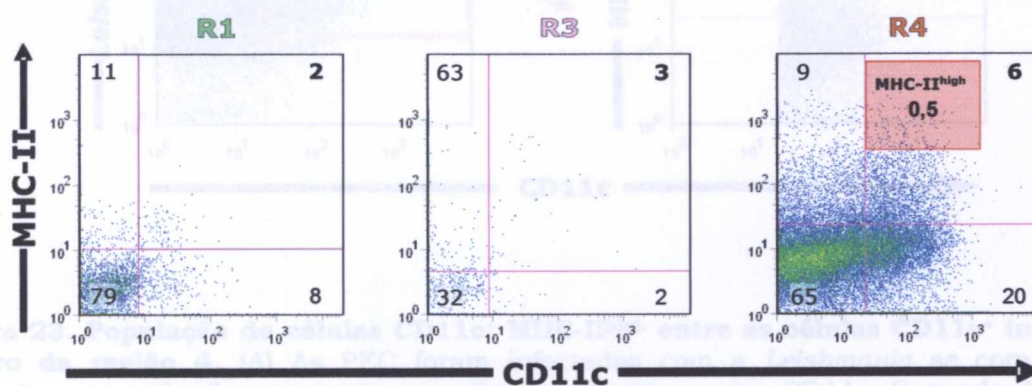


Figura 22. Distribuição da população de células $CD11c^+MHC-II^+$ entre os fagócitos peritoneais inflamatórios infectados por *L. amazonensis* por dezoito-vinte e quatro horas nas diferentes sub-populações. BALB/c foram estimulados com tioglicolato, após 4 dias de estímulo, as PEC foram retiradas e duplamente marcadas com anticorpos contra CD11c e MHC-II e analisadas utilizando-se citometria de fluxo. O quadrado vermelho representa a população $CD11c^+MHC-II^{high}$.

Analisando a população de células que expressaram CD11c dentro da região R4 e que estavam infectadas (23% de células), observou-se que apenas 5% dessas células eram CD11c⁺MHC-II^{high} e 16% CD11c⁺MHC-II^{low} (Figura 23).

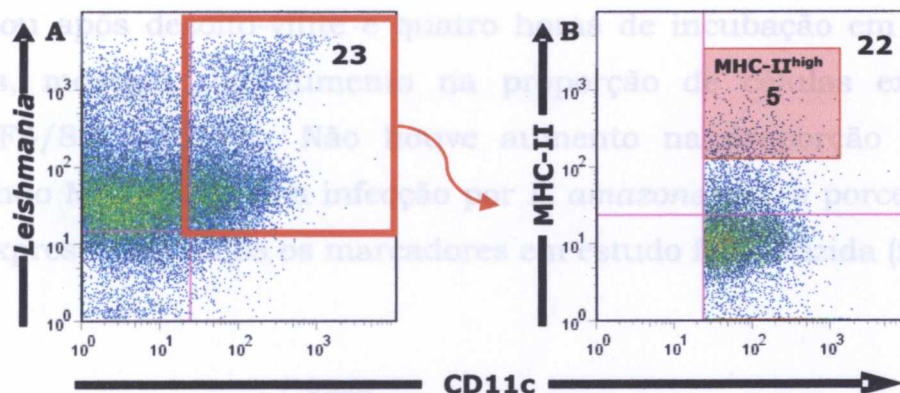


Figura 23. População de células CD11c⁺ MHC-II^{high} entre as células CD11c⁺ infectadas dentro da região 4. (A) As PEC foram infectadas com a *Leishmania* se coradas com marcador que exibe fluorescência vermelha e anticorpo contra CD11c. O quadrado vazado vermelho representa a população CD11c⁺ infectada. (B) A região representando a população de células CD11c infectadas foi analisada em relação à expressão de MHC-II. O quadrado vermelho representa a população CD11c⁺ MHC-II^{high}.

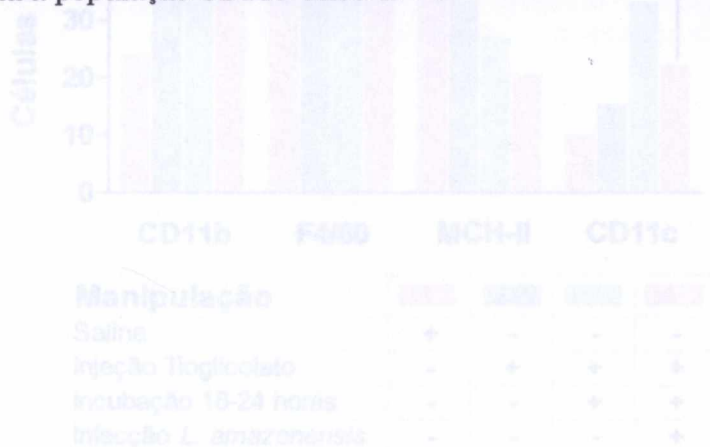


Figura 24. Percentual dos fagócitos peritoneais positivos para moléculas CD11b, antigênio F4/80, MHC-II, CD11c após os diferentes tratamentos adotados. Camundongos da linhagem BALB/c foram diferentemente manipulados: injetados apenas com salina ou estimulados com tioglicolato no peritônio. Após quatro dias as células peritoneais foram diretamente analisadas pelo FACS ou apenas incubadas ou incubadas e infectadas por dezoito-vinte e quatro horas em tubos não aderentes para posterior análise no FACS. Os valores com significância estatística entre os diferentes resultados estão indicados no topo da linha horizontal unidos entre as colunas referentes ao dado.

6.4 COMPARAÇÕES ENTRE A EXPOSIÇÃO DE MARCADORES POR CÉLULAS RECÉM ISOLADAS OU INCUBADAS EM TUBOS NÃO ADERENTES

A análise do conjunto das células do exsudato peritoneal após 4 dias de indução do estímulo por tioglicolato ou apenas injeção de salina, recém-isoladas ou após dezoito-vinte e quatro horas de incubação em tubos não aderentes, mostrou um aumento na proporção de células expressando CD11b, F4/80 e CD11c. Não houve aumento na proporção de células expressando MHC-II. Após a infecção por *L. amazonensis*, a porcentagem de células expressando todos os marcadores em estudo foi reduzida (figura 24).

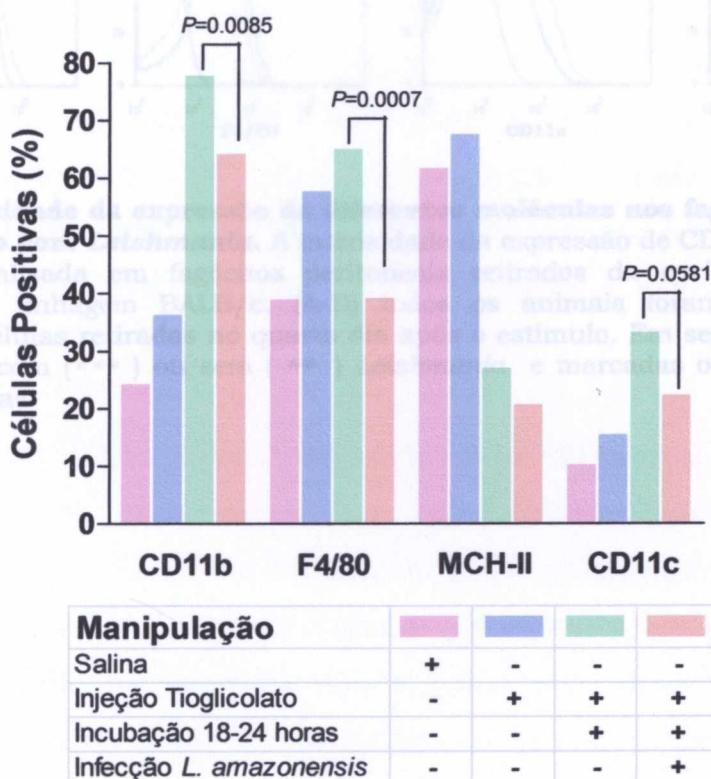


Figura 24. Percentual dos fagócitos peritoneais positivos para moléculas CD11b, antígeno F4/80, MHC-II, CD11c após os diferentes tratamentos adotados. Camundongos da linhagem BALB/c foram diferentemente manipulados: injetados apenas com salina ou estimulados com tioglicolato no peritônio. Após quatro dias as células peritoneais foram diretamente analisadas pelo FACS ou apenas incubadas ou incubadas e infectadas por dezoito-vinte e quatro horas em tubos não aderentes para posterior análise no FACS. Os valores com significância estatística entre os diferentes resultados estão indicados no topo da linha horizontal unidos entre as colunas referentes ao dado.

A intensidade de expressão das moléculas analisadas como CD11b, F4/80, CD11c e MHC-II não foi alterada após a infecção com *Leishmania*. Como demonstrado nos histogramas de A-D (figura 25), em células incubadas, infectadas ou não com *L. amazonensis*, todas obtidas de animais que foram estimulados com tioglicolato por 4 dias.

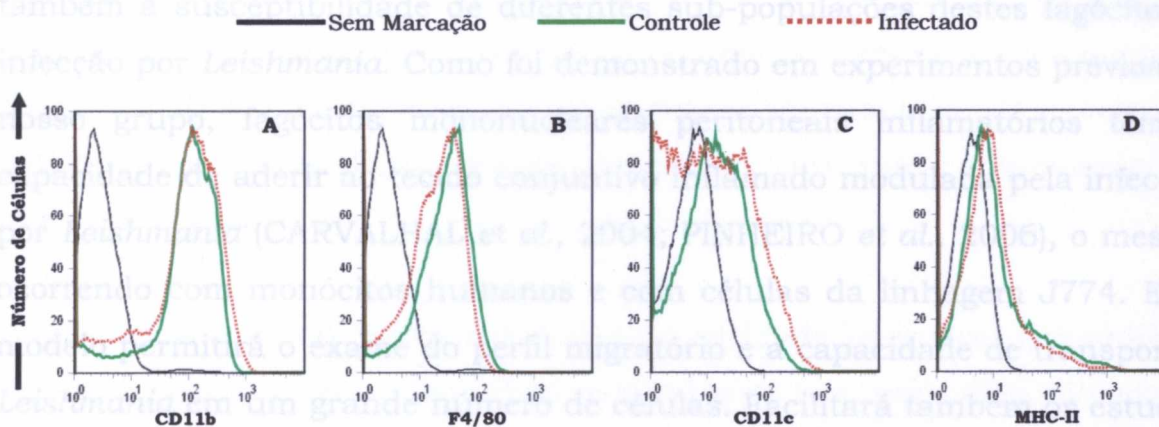


Figura 25. Intensidade da expressão de diferentes moléculas nos fagócitos peritoneais infectados ou não com *Leishmania*. A intensidade da expressão de CD11b, F4/80, CD11c e MHC-II foi analisada em fagócitos peritoneais retirados da cavidade peritoneal de camundongos da linhagem BALB/c. (A-D) todos os animais foram estimulados com tioglicolato e as células retiradas no quarto dia após o estímulo. Em seguida, essas células foram incubadas com (■ ■ ■) ou sem (—) *Leishmania* e marcadas ou não (—) contra diferentes moléculas.

Após o estímulo inflamatório, induzido pela injeção de tioglicolato na cavidade peritoneal, observamos um recrutamento leucocitário que em linhas gerais é semelhante ao observado após o estímulo inflamatório em outros sítios: um influxo de neutrófilos e macrófagos, exibindo um declínio inicial de neutrófilo no segundo dia, seguido pelo predomínio de células mononucleares. dados esses que estão de acordo com outros já descritos na literatura (BELLINGAN *et al.*, 1996; COOK *et al.*, 2003; HENDERSON *et al.*, 2003; POTTER *et al.*, 2003), utilizando o mesmo modelo. Como nos processos em que o estímulo inflamatório persiste, há uma tendência à cronicidade, sendo ainda evidente o aumento de celularidade na cavidade peritoneal no centésimo dia do experimento. Nossos dados confirmam muitos dos achados descritos por Bellingan e colaboradores (1996), como o pico no número de fagócitos mononucleares por volta do quarto dia, declínio progressivo da celularidade peritoneal, significativa população de neutrófilos,

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho definimos as condições para uso de um modelo *in vivo* de fagócitos mononucleares inflamatórios, para o estudo dos mecanismos de migração do sítio de infecção para o linfonodo drenante e disseminação da *Leishmania* e, potencialmente, outros parasitos intracelulares. Examinamos também a susceptibilidade de diferentes sub-populações destes fagócitos à infecção por *Leishmania*. Como foi demonstrado em experimentos prévios do nosso grupo, fagócitos mononucleares peritoneais inflamatórios têm a capacidade de aderir ao tecido conjuntivo inflamado modulada pela infecção por *Leishmania* (CARVALHAL *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2006), o mesmo ocorrendo com monócitos humanos e com células da linhagem J774. Este modelo permitirá o exame do perfil migratório e a capacidade de transportar *Leishmania* em um grande número de células. Facilitará também os estudos sobre os mecanismos envolvidos na migração dessas células para o linfonodo drenante e sua modulação pela infecção com *Leishmania* e outros patógenos ou estímulos, para os quais um grande número de células é necessário.

Após o estímulo inflamatório, induzido pela injeção de tioglicolato na cavidade peritoneal, observamos um recrutamento leucocitário que em linhas gerais é semelhante ao observado após o estímulo inflamatório em outros sítios: um influxo de neutrófilos e macrófagos, exibindo um declínio inicial de neutrófilo no segundo dia, seguido pelo predomínio de células mononucleares, dados esses que estão de acordo com outros já descritos na literatura (BELLINGAN *et al.*, 1996; COOK *et al.*, 2003; HENDERSON *et al.*, 2003; POTTER *et al.*, 2003), utilizando o mesmo modelo. Como nos processos em que o estímulo inflamatório persiste, há uma tendência à cronicidade, sendo ainda evidente o aumento de celularidade na cavidade peritoneal no centésimo dia do experimento. Nossos dados confirmam muitos dos achados descritos por Bellingan e colaboradores (1996), como o pico no número de fagócitos mononucleares por volta do quarto dia, declínio progressivo da celularidade peritoneal, significativa população de linfócitos,

migração de células do próprio animal ou de células injetadas (coradas com PKH26) para o linfonodo para-tímico. Além disso, verificamos em nossos estudos que após o vigésimo dia a celularidade peritoneal atinge um platô que persiste até o centésimo dia, porém, sempre com maior número de células do que o observado no grupo controle (animais injetados com salina). Estabelecemos ainda o período de tempo adequado para o rastreamento nos linfonodos drenantes de células injetadas no peritônio e demonstramos que o cultivo dessas células em tubos não aderentes por dezoito a vinte e quatro horas não afeta a capacidade migratória dessas células. Isso nos oferece um período para manipulação dessas células *in vitro* antes dos ensaios de migração *in vivo*.

Os fagócitos mononucleares recolhidos da cavidade peritoneal dos animais injetados com tioglicolato fagocitam partículas de agar presentes do meio de cultura o que lhes confere um aspecto de vacuolização citoplasmática (BELLINGAN *et al.*, 1996; COOK *et al.*, 2003). Essa característica permite que essas células sejam facilmente identificadas no linfonodo (BELLINGAN *et al.*, 1996) drenante da cavidade peritoneal. Utilizando histologia convencional, demonstramos no presente trabalho que a migração dessas células para o linfonodo já é observada oito horas após o estímulo com tioglicolato, tornando-se mais intensa a partir do quarto dia. A confirmação de que células migram da cavidade peritoneal para o linfonodo e de que a presença de fagócitos mononucleares, nas regiões sub-capsulares desses órgãos, não representam apenas a fagocitose de agar por células presentes ou recrutadas do sangue para o linfonodo foi feita através de experimentos de injeção e rastreamento de células marcadas com PKH26. Como também observado por Bellingan e colaboradores (1996), não há evidências de fagocitose celular que justifique a intensa localização de células marcadas no linfonodo. Ainda que estímulos quantitativos, com ênfase em estudos de população celular sejam necessários, a manipulação dessas células *in vitro* antes da sua re-injeção e rastreamento não parece interferir na migração celular. Dessa forma, esse modelo facilitará a execução de experimentos nos

quais será necessário isolar sub-populações celulares e infectar com mediadores da migração celular *in vitro* antes da injeção nos animais.

A definição das populações celulares presentes no exsudato peritoneal foi feita por citometria de fluxo e pelo exame citológico em preparados de cito-centrifugados. De maneira geral, as duas técnicas são concordantes, mas existem algumas diferenças na proporção de células de cada categoria. Por exemplo, na análise do grupo estimulado com tioglicolato pela microscopia óptica, a proporção de linfócitos foi maior na maioria dos tempos do que o demonstrado na análise utilizando-se citometria de fluxo. Observamos pela citometria de fluxo que, em lugar do grande número de linfócitos, encontramos mais monócitos/macrófagos distribuídos nos diferentes tempos. Contudo, mesmo com algumas diferenças nos percentuais entre as duas técnicas, os dados mostram uma tendência à concordância entre elas. Essa diferença observada nos resultados provavelmente ocorreu devido à maior sensibilidade da citometria de fluxo na identificação das populações celulares reconhecidas pelos anticorpos utilizados contra moléculas específicas. Por exemplo, CD11b e antígeno F4/80 observados em macrófagos, populações de células com alta granulosidade expressando GR-1 que podem ser consideradas neutrófilos, CD11b e CD11c que expressam fenótipo de células dendríticas mielóides, CD3 caracterizando linfócitos T e B220 que define populações de linfócitos B (NIBBERING *et al.*, 1987; LAGASSE, 1996; WU *et al.*, 1996; VREMEC, 1997; PULENDRAN *et al.*, 1999; COOK *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2004). Por outro lado, células como eosinófilos, para os quais anticorpos específicos não foram utilizados, só puderam ser identificados pela microscopia óptica.

Examinando o *pool* das células do exsudato peritoneal colhidas após quatro dias ao estímulo com tioglicolato, observamos que 41% das células totais apresentam fenótipo de macrófago (CD11b⁺F4/80⁺) compondo a maioria da população neste período. Apenas 8% das células tinham o fenótipo de linfócitos T (CD3⁺) e B (B220⁺) e um pequeno percentual de neutrófilos (1%). A população de células CD11c⁺MHC-II⁺ foi de 36% porém destas, apenas 5%

eram células com fenótipo de células dendríticas maduras (CD11c⁺MHC-II^{high}). Esses achados concordam parcialmente com os dados publicados por Cook e colaboradores (2003) os quais não foram capazes de identificar células CD11c⁺ em seus experimentos.

Após a incubação por dezoito a vinte e quatro horas em tubos não aderentes, demonstramos que a maioria da população celular é constituída de fagócitos mononucleares que correspondem a $73 \pm 10\%$ do total das células do exsudato peritoneal neste estágio. Dentre estas, $65 \pm 9\%$ têm fenótipo de macrófago F4/80⁺, 20% de célula dendrítica (CD11c⁺MHC-II⁺), podendo 3% representar a população de células dendríticas maduras (CD11c⁺MHC-II^{high}) e uma predominância de células CD11b⁺ ($78 \pm 6\%$). Mostramos que a expressão de alguns marcadores celulares pode ser alterada nos fagócitos peritoneais se observados em diferentes condições. O estímulo de quatro dias com tioglicolato induz o aumento no número de células expressando CD11b, antígeno F4/80 e MHC-II se comparado aos animais injetados apenas com salina, como também mostrado por Cook e colaboradores (2003). Contudo, após a incubação por dezoito-vinte e quatro horas, observamos um aumento ainda maior, principalmente na expressão da molécula CD11b. Estudos têm mostrado que as células peritoneais, quatro dias após estímulo com tioglicolato, apresentam alta capacidade fagocítica, mesmo que não seja hábil na estimulação de células T (COOK *et al.*, 2003).

Como descrito inicialmente por Steinman e colaboradores (1974), as células dendríticas mielóides expressam marcadores como CD11b. As DC linfóides descritas por Suss e colaboradores (1996) expressam CD8 α . Mostramos aqui que células dendríticas linfóides não fazem parte da população das células peritoneais, porém, $9 \pm 5\%$ expressam marcadores de células dendríticas mielóides (CD11b⁺CD11c⁺).

As células peritoneais inflamatórias podem ser caracterizadas pelo tamanho e pela granulosidade. Da mesma maneira que Cook e colaboradores (2003), definimos quatro regiões gráficas de distribuição das células do infiltrado

peritoneal, induzido por tioglicolato, utilizando os critérios de tamanho e granulosidade. Em uma região com células de menor tamanho e granulosidade (R2) definidas como linfócitos T e B não são encontradas células infectadas após a incubação por dezoito-vinte e quatro horas com *L. amazonensis*.

Na região 3 observamos uma população de células um pouco maior e mais granulosa que os linfócitos, das quais 75% exibem B220 e apenas 27% CD11b (MAC-1). Células B-1 podem ser caracterizadas pela alta expressão de B220 e baixa expressão de CD11b (FAGARASAN *et al.*, 2000). Algumas publicações sugerem que essas células são capazes de se diferenciar em macrófagos (KIPPS, 1989). Como demonstrado por Cook e colaboradores (2003) esta região está representada em sua maioria por uma população de células B220⁺Mac-1^{low} que era predominantemente CD19⁺IgK⁺cFms⁻F4/80⁻, ou seja, apresentavam marcadores de células B, mas não de macrófagos.

Identificamos células expressando marcadores compatíveis com o fenótipo de células dendríticas mielóides (CD11c⁺CD11b⁺) com diferentes tamanhos e granulosidades. Na região 4, 32% das células expressavam esse fenótipo. Entre as células dessa região, 19% eram CD11c⁺MHC-II⁺, porém destas, apenas 1,2% eram MHC-II^{high}. Em menor proporção as células dendríticas mielóides também foram observadas nas regiões 1 (menor tamanho e granulosidade) e 3 (tamanho intermediário e granulosidade baixa).

Como descrito anteriormente, a maioria da população do exsudato peritoneal é de macrófagos (CD11b⁺F4/80⁺), predominantemente localizados na região 4 que contêm o maior número de células da população total. Estas células exibem maior tamanho e granulosidade e baixa expressão de MHC-II. Células com características semelhantes, exibindo menor tamanho e granulosidade com alta expressão de MHC-II, podem ser observadas em menor número na região 3.

As populações de fagócitos peritoneais inflamatórios têm susceptibilidades diferenciadas à infecção com *Leishmania*. Como demonstrado neste estudo, macrófagos expressando o antígeno F4/80, células CD11c⁺ e as células expressando marcadores compatíveis com o fenótipo de células dendríticas mielóide apresentaram alta taxa de infecção, chegando a 77%. É provável que as células expressando fenótipo de células dendríticas após a infecção migrem para o linfonodo drenante para posterior apresentação de antígeno. Como demonstrado por Muraille e colaboradores (2003), esse tipo celular está altamente infectado no linfonodo.

Células dendríticas apresentam características variáveis de acordo com os seus estágios de maturação. Ainda quando imaturas, DCs possuem alta capacidade fagocítica (BANCHEREAU *et al.*, 2000), baixa expressão de MHC-II e de moléculas co-estimulatórias (PAUL, 2003). Logo após ativação estas têm sua capacidade fagocítica reduzida e em paralelo ocorre o aumento dos níveis de MHC-II na superfície celular, juntamente com moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86 e CD40 (MELLMAN, 2001). As DCs teriam também sua capacidade migratória aumentada em decorrência da maior expressão de moléculas de adesão como CD44 (WEISS *et al.*, 1997) e integrina $\alpha_6\beta_1$ (PRICE *et al.*, 1997).

Considerando o fenótipo de célula dendrítica madura a expressão de CD11c⁺MHC-II^{high}, (CAVANAGH, 2002; LIPSCOMB, 2002; SHORTMAN, 2002; GORDON, 2003), encontramos nos animais controle 3% destas células na população total dos fagócitos peritoneais. Essa sub-população celular foi ainda menor (1%) quando as células foram infectadas por *L. amazonensis*. Observamos também que entre a população de células CD11c⁺ infectadas, 28% são MHC-II⁺, contudo, apenas 6% são MHC-II^{high}. Entre as possíveis explicações para esta redução na população de células CD11c⁺MHC-II^{high}, teríamos a possibilidade da interferência do parasito no processo de maturação das células dendríticas.

Experimentos com monócitos e macrófagos humanos têm demonstrado que após infecção por *Leishmania* monócitos humanos, mas não macrófagos, reduzem a expressão para CD11b (BUATES, 2001; DE ALMEIDA *et al.*, 2003). A infecção também é capaz de reduzir a expressão de MHC-II em macrófagos humanos, porém, o mesmo não ocorre após a fagocitose de partícula de látex em ambas as células (DE ALMEIDA *et al.*, 2003). Em um artigo publicado anteriormente por nosso grupo, demonstramos que a expressão de moléculas de adesão não é alterada após a infecção por *L. amazonensis* (PINHEIRO *et al.*, 2006). Aqui demonstramos que podem ocorrer outras alterações moleculares, como uma redução significativa no número de células capazes de expressar moléculas como CD11b⁺, F4/80⁺, CD11c⁺ e MHC-II⁺, embora não haja alteração na intensidade de expressão dessas moléculas. As inibições de moléculas de adesão ou até mesmo moléculas responsáveis pela apresentação de antígenos podem estar relacionadas a algum mecanismo de escape do parasito com relação ao sistema imune.

Outra possibilidade é que a infecção por *Leishmania* interfira na exposição de grupos de moléculas pelos fagócitos. Na realidade, em um estudo anterior (PINHEIRO *et al.*, 2006) demonstramos que a infecção com *Leishmania* inibe a expressão dos receptores de quimiocinas CCR4 e CCR5 por células do exsudato peritoneal de camundongo da linhagem BALB/c. De Almeida e colaboradores (2003), estudando monócitos humanos, observaram redução na expressão de moléculas como CD11b e CD54 após a infecção com *Leishmania*, a qual não foi observada em macrófagos derivados de monócitos humanos, que reduziram a expressão de MHC-II (DE ALMEIDA *et al.*, 2003). A redução de B7 também foi descrita após a infecção de macrófagos derivados de monócitos caninos e essa alteração interfere na resposta proliferativa dos linfócitos T a antígenos de *Leishmania* (PINELLI *et al.*, 1999). Saha e colaboradores (1995) também demonstraram que após infecção com *L. donovani*, macrófagos derivados de camundongos susceptíveis reduzem a expressão de moléculas co-estimulatórias como B7-1 e aumentam moléculas de adesão como ICAM-1 (SAHA *et al.*, 1995). Na

realidade neste estudo observamos a redução no número de células capazes de expressar uma série de moléculas como CD11b, F4/80, CD11c e MHC-II.

Finalmente, não podemos excluir a possibilidade de que esta redução na população de células CD11c⁺MHC-II^{high} resulte da migração dessas células da cavidade peritoneal para o linfonodo drenante, já que este tipo celular está relacionado com a apresentação e estimulação direta aos linfócitos no tecido linfóide (SCHULER, 1985). É importante observar que todas essas possibilidades não são excludentes e podem decorrer de alterações provocadas pela infecção com *Leishmania* em uma única via metabólica afetando mecanismos de expressão e regulação de funções moleculares pelos fagócitos.

Não encontramos grandes diferenças na distribuição dos tipos celulares nas diferentes regiões definidas por tamanho e granulosidade celular quando células infectadas e não infectadas foram comparadas. Contudo, observamos que o maior número de células infectadas se encontrava na região 4, com maior tamanho e granulosidade, CD11b⁺.

Em resumo, padronizamos um modelo de estudo de migração celular para uso em estudos sobre a disseminação da *Leishmania* e de outros patógenos intracelulares. Demonstramos que fagócitos mononucleares inflamatórios e células dendríticas mielóides (CD11c⁺CD11b⁺) apresentam alta susceptibilidade à infecção por *Leishmania*. Demonstramos também que há uma redução no número de células capazes de expressar moléculas que caracterizam células macrofágicas ou células dendríticas, incluindo algumas moléculas de adesão leucocitárias. Em nosso estudo anterior (PINHEIRO *et al.*, 2006) observamos que a infecção com *Leishmania* não altera a intensidade de expressão de algumas moléculas de adesão. Neste estudo, mostramos que mesmo que não existam alterações na intensidade da expressão de moléculas de adesão, há diminuição das populações de células expressando essas moléculas. Isso é interessante porque vislumbramos perspectivas para o estudo dos mecanismos envolvidos na disseminação do

parasito nos tecidos do hospedeiro. No momento estamos utilizando o sistema aqui descrito para identificar os tipos celulares capazes de carrear amastigotas de *Leishmania* do sítio de inoculação para o linfonodo.

8 CONCLUSÃO¹

- 1) **O estímulo inflamatório com tioglicolato reproduz etapas de um processo inflamatório crônico usual** *[nossos dados de cinéticas de recrutamento celular e outros por Bellingan et al., (1996) e Cook e colaboradores (2003); Henderson e colaboradores (2003), concordam com o aumento no número de neutrófilos e macrófagos em um período inicial, demonstrando um declínio inicial de neutrófilos e persistindo um aumento no número de células peritoneais até cem dias após o estímulo inflamatório];*

- 2) **A migração dos fagócitos mononucleares inflamatórios para o linfonodo pode ser observada tão cedo quanto oito horas após o estímulo com tioglicolato, aumentando até por volta do quarto-quinto dias** *[nossos achados e os descrito por Bellingan e colaboradores (1996) demonstraram que fagócitos peritoneais característicos da estimulação com tioglicolato ou fluorescentes, injetados na cavidade peritoneal, têm o potencial de migrar para o linfonodo para-tímico];*

- 3) **Uma grande população dos fagócitos inflamatórios mononucleares do exsudato peritoneal expressam fenótipo de células dendríticas mielóide (CD11b⁺CD11c⁺) que são susceptíveis à infecção por *Leishmania*.** *[nossos dados de fenotipagem e outros da literatura (MURAILLE E. et al., 2003; LEON, B. et al., 2007) demonstram que as células dendríticas mielóides são altamente susceptíveis à infecção por *Leishmania* e que provavelmente são capazes de migrar para o linfonodo];*

- 4) **Há uma redução na proporção de fagócitos mononucleares que expressam moléculas de adesão após a infecção com *Leishmania*, apesar de não haver alterações na intensidade de expressão dessas moléculas** *[nossos dados de fenotipagem de células infectadas e observações por Favali e colaboradores (2007) demonstram que a infecção com *Leishmania* levam a uma redução nas populações de células expressando moléculas como CD11b, F4/80, CD11c e MHC-II como demonstrado em nosso trabalho e moléculas como CD1a e CD80 como demonstrado por Favali e colaboradores (2007)].*

¹ As conclusões serão apresentadas seguidas de um comentário indicativo dos dados do nosso trabalho e da literatura, que sustentam, ao nosso ver, essas conclusões. Optamos por esse modelo para contribuir com o julgamento do leitor em relação à consistência das afirmações apresentadas.

9 PERSPECTIVAS

- 1) Identificar os tipos celulares que têm sua adesão ao tecido conjuntivo e capacidade migratória modulada pela infecção por *Leishmania*** *[através de injeção e rastreamento de células marcadas e infectadas com *Leishmania* corada];*

- 2) Comparação desses resultados com o estudo dos fagócitos mononucleares infectados com *Leishmania* no sitio de infecção e no linfonodo em camundongos** *[através da inoculação de *L. amazonensis* na orelha de camundongos BALB/c e retirada do linfonodo drenante para posterior identificação dos fagócitos pelo método de Imuno-histoquímica].*

10 REFERÊNCIAS

- ALLENBACH, C.; ZUFFEREY, C. *et al.* Macrophages induce neutrophil apoptosis through membrane TNF, a process amplified by *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 176, n. 11, p. 6656-6664, jun. 2006.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as model zoonoses. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 91, n. 7, p. 693-701, out. 1997.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 12-13, p.1269-1281, nov. 2000a.
- ASHFORD, R. W. Parasites as indicators of human biology and evolution. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, n. 9, p. 771-772, sep. 2000b.
- ATO, M.; STAGER, S. *et al.* Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 12, p. 1185-1191, dec. 2002.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, E R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, mar. 1998.
- BARON, E. J.; PROCTOR, R. A. Elicitation of peritoneal polymorphonuclear neutrophils from mice. **J. Immunol. Methods**, v. 49, n. 3, p. 305-313, mar. 1982.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D. *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 5, p. 536-546, may. 1991.
- BEIL, W. J.; MEINARDUS-HAGER, G. *et al.* Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 52, n. 2, p.135-142, aug. 1992.
- BELKAID, Y.; BUTCHER B., *et al.* Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 4, p. 1389-1400, apr. 1998.
- BELKAID, Y.; MENDEZ, S. *et al.* A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J. Immunol.**, v.165, n.2, p. 969-977, jul. 2000.

BELLI, A.; GARCIA, D. *et al.* Widespread atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) chagasi* in Nicaragua. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 3, p. 380-385, sep. 1999.

BELLINGAN, G. J.; CALDWELL, H. *et al.* In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. **J. Immunol.**, v. 157, n. 6, p. 2577-2585, sep. 1996.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: W. DOERR, E.; SEIFERT, G. (Ed.). **Tropical Pathology**. Berlin: Springer, 1995. v. 8, cap. 14. p. 597-651.

BITTENCOURT, A. L.; DE FREITAS, L. A. *et al.* Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 53-59, jan-mar. 1990.

BLANK, C.; FUCHS, H., *et al.* Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. **J. Infect. Dis.**, v. 167, n. 2, p. 418-425, feb. 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Gráfico de evolução da leishmaniose visceral de 1980 a 2005**. Serie_2006. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Evolução de casos de LTA de 1980 a 2005**. Brasília, 2007.

BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. **J. Immunol.**, v. 166, n. 5, p. 3416-322, mar. 2001.

CAILHIER, J. F.; PARTOLINA, M. *et al.* Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. **J. Immunol.**, v. 174, n. 4, p. 2336-2342, feb. 2005.

CALLAHAN, H. L.; PORTAL, I. F. *et al.* *Leishmania* spp: temperature sensitivity of promastigotes *in vitro* as a model for tropism *in vivo*. **Exp. Parasitol.**, v. 84, n. 3, p. 400-409, dec. 1996.

CAMPOS-PONCE, M.; PONCE, C. *et al.* *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. **Exp. Parasitol.**, v. 109, n. 4, p. 209-219, apr. 2005.

CARRERA, L.; GAZZINELLI, R. T. *et al.* *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 2, p. 515-526, feb. 1996.

- CARVALHAL, D. G.; BARBOSA JUNIOR, A. *et al.* The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. **Exp. Parasitol.**, v. 107, n. 3-4, p. 189-199, jul-aug. 2004.
- CAVANAGH, L. L.; VON ANDRIAN, U. H. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. **Immunol. Cell Biol.**, v. 80, n. 5, p. 448-462, oct. 2002.
- CHANG, K. P. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 30, n. 2, p. 322-333, mar. 1981.
- CHEN, L.; ZHANG Z. H., *et al.* The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. **Parasitol. Int.**, v. 54, n. 2, p.109-118, jun. 2005.
- COLMENARES, M.; KAR, S. *et al.* Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, Suppl 1, p. S3-7, apr. 2002.
- COOK, A. D.; BRAINE, E. L. *et al.* The phenotype of inflammatory macrophages is stimulus dependent: implications for the nature of the inflammatory response. **J. Immunol.**, v. 171, n. 9, p. 4816-4823, nov. 2003.
- DE ALMEIDA, M. C.; CARDOSO, S. A. *et al.* *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, n. 2, p.153-162, feb. 2003.
- DEL HOYO, G. M.; MARTIN, P. *et al.* Characterization of a common precursor population for dendritic cells. **Nature**, v. 415, n. 6875, p.1043-1047, feb. 2002.
- DEN HAAN, J. M.; LEHAR, S. M. *et al.* CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells *in vivo*. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 12, p. 1685-1696, dec. 2000.
- DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J.. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1455, n. 2-3, p. 341-352, oct. 1999.
- DESJEUX, P. Information on the epidemiology and control of the leishmaniases by country or territory. Geneva; **World Health Organization**, p. 1-47, feb. 1991.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v. 14, n. 5, p. 417-423, sep-oct. 1996.

- EICHNER, R. D.; SMEATON, T. C. Agar accumulates in rat peritoneal macrophages elicited with thioglycollate broth. **Scand. J. Immunol.**, v. 18, n. 3, p. 259-263, sep. 1983.
- FAGARASAN, S.; WATANABE N., *et al.* Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. **Immunol. Rev.**, v. 176, p. 205-215, aug. 2000.
- FIORINI, M.; MESSINA, M. F. *et al.* Peripheral intramonoctytic and intraneutrophil *Leishmanias* observed in a chronic myelomonocytic leukemia (CMMoL) patient. **Haematologica**, v. 87, n. 8, p. EIM21, aug. 2002.
- FORSTER, R.; SCHUBEL, A. *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. **Cell**, v. 99, n. 1, p. 23-33, oct. 1999.
- FREITAS, L. A. R. D.; DOS-SANTOS, W. L. C. *Leishmanioses*. (Ed.). **Patologia**. 7^a ed. Rio de Janeiro: G. Koogan, 2006. p.1359-1367.
- FRUTH, U.; SOLIOZ, N. *et al.* *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. **J. Immunol.**, v. 150, n. 5, p. 1857-1864, mar.1993.
- GEISSMANN, F.; JUNG, S. *et al.* Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71-82, jul. 2003.
- GORDON, S. Macrophages and the immune response. In: PAUL, W. E. (Ed.). **Fundamental Immunology**. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2003. v.1, cap. 16, p. 481-498.
- GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, n. 12, p. 953-964, dec. 2005.
- GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R. B. *et al.* A review of the geographic distribution and epidemiology of *Leishmaniasis* in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 41, n. 6, p. 687-725, dec. 1989.
- GU, L.; OKADA, Y. *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. **Mol. Cell**, v. 2, n. 2, p. 275-281, aug. 1998.
- GUARGA, J. L.; LUCIENTES, J. *et al.* Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. **Acta Trop.**, v. 77, n. 2, p. 203-207, nov. 2000.
- HART, D. N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. **Blood**, v. 90, n. 9, p. 3245-3287, nov. 1997.

HENDERSON, R. B.; HOBBS, J. A. *et al.* Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. **Blood**, v. 102, n. 1, p. 328-335, jul. 2003.

HERWALDT, B. L. *Leishmaniasis*. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, oct. 1999.

INABA, K.; INABA, M. *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J. Exp. Med.**, v. 176, n. 6, p. 1693-1702, dec. 1992.

INABA, K.; METLAY, J. P. *et al.* Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. **J. Exp. Med.**, v. 172, n. 2, p. 631-640, aug. 1990.

ISSEKUTZ, A. C.; MOVAT, H. Z. The in vivo quantitation and kinetics of rabbit neutrophil leukocyte accumulation in the skin in response to chemotactic agents and *Escherichia coli*. **Lab. Invest.**, v. 42, n. 3, p. 310-317, mar. 1980.

IYODA, T.; SHIMOYAMA, S. *et al.* The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 195, n. 10, p. 1289-1302, may. 2002.

JIMENEZ, M.; FERRER-DUFOL, M. *et al.* Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 131, n. 2, p. 197-204, sep. 1995.

KAMANAKA, M.; YU, P. *et al.* Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. **Immunity**, v. 4, n. 3, p. 275-281, mar. 1996.

KAYE, P. M.; ROGERS N. J., *et al.* Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n. 11, p. 2850-2854, nov. 1994.

KIM, J. M.; KIM, H. *et al.* Intracellular glutathione status regulates mouse bone marrow monocyte-derived macrophage differentiation and phagocytic activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 325, n. 1, p. 101-108, dec. 2004.

KIPPS, T. J. The CD5 B cell. **Adv. Immunol.**, v. 47, p. 117-185, 1989.

KURIHARA, T.; WARR, G. *et al.* Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 10, p. 1757-1762, nov. 1997.

KUZIEL, W. A.; MORGAN, S. J. *et al.* Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 22, p. 12053-12058, oct. 1997.

LAGASSE, E.; WEISSMAN, I. L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. **J. Immunol. Methods**, v. 197, n. 1-2, p. 139-150, oct. 1996.

LEIJH, P. C.; VAN ZWET, T. L. *et al.* Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. **Infect. Immun.**, v. 46, n. 2, p. 448-452, nov. 1984.

LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M. *et al.* Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. **Immunity**, v. 26, p. 519-531, abril 2007

LI, Y. M.; BAVIELLO, G. *et al.* Glycation products in aged thioglycollate medium enhance the elicitation of peritoneal macrophages. **J. Immunol. Methods**, v. 201, n. 2, p. 183-188, feb. 1997.

LIPSCOMB, M. F.; MASTEN, B. J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 1, p. 97-130, jan. 2002.

LU, B.; RUTLEDGE, B. J. *et al.* Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. **J. Exp. Med.**, v. 187, n. 4, p. 601-608, feb. 1998.

MARASKOVSKY, E.; BRASEL, K. *et al.* Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 5, p. 1953-1962, nov. 1996.

MCCLUNG, L. S. The Use of Dehydrated Thioglycollate Medium in the Enrichment of Spore-Forming Anaerobic Bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 40, n. 5, p. 645-648, nov. 1940.

MCCONVILLE, M. J.; TURCO, S. J. *et al.* Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **Embo J.**, v. 11, n. 10, p. 3593-3600, oct. 1992.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 255-258, aug. 2001.

MIYAZAKI, S.; ISHIKAWA, F. *et al.* Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide induces dynamic migration of Gr-1 high polymorphonuclear neutrophils in the murine abdominal cavity. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 11, n. 3, p. 452-457, may. 2004.

- MOLL, H.; FUCHS, H. *et al.* Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 7, p. 1595-1601, jul. 1993.
- MOLL, H. **The immune functions of epidermal Langerhans cells.** Canada: Springer, 1995. v.1., 191 p.
- MOLL, H.; FLOHE, S. *et al.* Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 3, p. 693-699, mar. 1995.
- MOSER, M.; MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. **Nat. Immunol.**, v. 1, n. 3, p. 199-205, sep. 2000.
- MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **J. Immunol.**, v. 135, n. 4, p. 2785-2789, oct. 1985.
- MURAILLE, E.; DE TREZ, C. *et al.* Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 5, p. 2704-2715, may. 2003.
- NIBBERING, P. H.; LEIJH, P. C. *et al.* Quantitative immunocytochemical characterization of mononuclear phagocytes. I. Monoblasts, promonocytes, monocytes, and peritoneal and alveolar macrophages. **Cell. Immunol.**, v. 105, n. 2, p. 374-385, apr. 1987.
- NOYES, H.; CHANCE, M. *Et al.* *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. **Exp. Parasitol.**, v. 85, n. 3, p. 264-273, mar. 1997.
- PALFRAMAN, R. T.; JUNG, S. *et al.* Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 9, p. 1361-1373, nov. 2001.
- PAUL, W. E. Organization and Evolution of the Immune System. In: WILKINS, L. W. A. (Ed.). **Fundamental Immunology.** Philadelphia: Organization and Evolution of the Immune System, 2003. p.4 19-570.
- PINELLI, E.; RUTTEN, V. P. *et al.* Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 1, p. 237-243, jan. 1999.
- PINHEIRO JUNIOR, N. F.; HERMIDA, M. D. *et al.* *Leishmania* infection impairs beta 1-integrin function and chemokine receptor expression in

mononuclear phagocytes. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 7, p.3912-3921, jul. 2006.

POTTER, P. K.; CORTES-HERNANDEZ, J. *et al.* Lupus-prone mice have an abnormal response to thioglycolate and an impaired clearance of apoptotic cells. **J. Immunol.**, v. 170, n. 6, p. 3223-3232, mar. 2003.

PRICE, A. A.; CUMBERBATCH, M. *et al.* Alpha 6 integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 10, p. 1725-1735, nov. 1997.

PRINA, E.; ABDI, S. Z. *et al.* Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. **J. Cell Sci.**, v. 117, n. Pt 2, p. 315-325, jan. 2004.

PRINA, E.; JOUANNE, C. *Et al.* Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. **J. Immunol.**, v. 151, n. 4, p. 2050-2061, aug. 1993.

PUENTES, S. M.; DA SILVA, R. P. *et al.* Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **J. Immunol.**, v. 145, n. 12, p. 4311-4316, dec. 1990.

PULENDRAN, B.; LINGAPPA, J. *et al.* Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. **J. Immunol.**, v. 159, n. 5, p. 2222-2231, sep. 1997.

PULENDRAN, B.; SMITH, J. L. *et al.* Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 3, p. 1036-1041, feb. 1999.

QU, C.; EDWARDS, W. *et al.* Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. **J. Exp. Med.**, v. 200, n. 10, p. 1231-1241, nov. 2004.

RANDOLPH, G. J.; INABA, K. *et al.* Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells *in vivo*. **Immunity**, v. 11, n. 6, p. 753-761, dec. 1999.

REZZANI, R.; RODELLA, L. *et al.* Mouse peritoneal cells as a reservoir of late dendritic cell progenitors. **Br. J. Haematol.**, v. 104, n. 1, p. 111-118, jan. 1999.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C. *et al.* Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v. 172, n. 7, p. 4454-4462, apr. 2004.

RITTER, U.; MEISSNER, A. *et al.* CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in *Leishmaniasis*. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, n. 6, p. 1542-1550, jun. 2004.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417-1419, mar. 1984.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol.**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SAHA, B.; DAS, G. *et al.* Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 9, p. 2492-2498, sep. 1995.

SATO, N.; AHUJA, S. K. *et al.* CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, B cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 2, p. 205-218, jul. 2000.

SCHEICHER, C.; MEHLIG, M. *et al.* Dendritic cells from mouse bone marrow: *in vitro* differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **J. Immunol. Methods**, v. 154, n. 2, p. 253-264, oct. 1992.

SCHULER, G.; STEINMAN, R. M. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells *in vitro*. **J. Exp. Med.**, v. 161, n. 3, p. 526-546, mar. 1985.

SCHWARTZMAN, J. D.; PEARSON, R. D. The interaction of *Leishmania donovani* promastigotes and human fibroblasts *in vitro*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, n. 5, p. 850-855, sep. 1985.

SHANKAR, A. H.; TITUS, R. G. The influence of antigen-presenting cell type and interferon-gamma on priming and cytokine secretion of *Leishmania major*-specific T cells. **J. Infect. Dis.**, v. 175, n. 1, p. 151-157, jan. 1997.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.89, n. 3, p. 471-478, jul-sep. 1994.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 3, p. 151-161, mar. 2002.

- SILVA, F.; GOMES, R. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 71, n. 1, p. 94-98, jan. 2005.
- STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties *in vitro*. **J. Exp. Med.**, v. 139, n. 2, p. 380-397, feb. 1974.
- STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D. *et al.* Tolerogenic dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 685-711, 2003.
- SUSS, G.; SHORTMAN, K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 4, p. 1789-1796, apr. 1996.
- TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, C. R. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **J Immunol.**, v. 175, n. 12, p. 8346-8353, dec. 2005
- TRAVER, D.; AKASHI, K. *ET al.* Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. **Science**, v. 290, n. 5499, p. 2152-2154, dec. 2000.
- VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **J. Exp. Med.**, v. 128, n. 3, p. 415-435, sep. 1968.
- VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M. *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J. Immunol.**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, dec. 2004.
- VON STEBUT, E.; BELKAID, Y. *et al.* Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 8, p. 1547-1552, oct. 1998.
- VREMEC, D.; SHORTMAN, K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. **J. Immunol.**, v. 159, n. 2, p. 565-573, jul. 1997.
- WEI, X. Q.; CHARLES, I. G. *et al.* Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 408-411, jun. 1995.
- WEISS, J. M.; SLEEMAN, J. *et al.* An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function. **J. Cell Biol.**, v. 137, n. 5, p. 1137-1147, jun. 1997.

WHITELAW, D. M. Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. **Cell Tissue Kinet**, v. 5, n. 4, p. 311-317, jul. 1972.

WHO. Disponível em

<<http://www.who.int/emc/diseases/Leishmania/leishdis1.html>> Acesso em: out. 2006.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P. *et al.* Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab. Invest.**, v. 80, n. 5, p. 617-653, may. 2000.

WRIGHT, S. D.; SILVERSTEIN, S. C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **J. Exp. Med.**, v. 158, n. 6, p. 2016-2023, dec. 1983.

WU, L.; LI, C. L. *et al.* Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 3, p. 903-911, sep. 1996.

WU, Q.; FENG, Y. *et al.* Kinetics of the phenotype and function of murine peritoneal macrophages following acute inflammation. **Cell Mol. Immunol.**, v. 1, n. 1, p. 57-62, feb. 2004.

ZER, R.; YAROSLAVSKI, I. Effect of sand fly saliva on Leishmania uptake by murine macrophages. **Int J Parasitol.**, v. 31, n. 8, p. 810-814, jun. 2001.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Definition of human blood monocytes. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, n. 5, may. p. 603-606, 2000.