

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**



**TESE DE DOUTORADO**

**Transporte de *Leishmania* do sítio inflamatório para o  
linfonodo drenante: potenciais fagócitos envolvidos  
e cinética de disseminação**

**MICELY D' EL-REI HERMIDA**

**Orientador:  
Washington Luis Conrado dos-Santos**

**SALVADOR-BAHIA-BRASIL  
2013**

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

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**Transporte de *Leishmania* do sítio inflamatório para o  
linfonodo drenante: potenciais fagócitos envolvidos  
e cinética de disseminação**

**MICELY D'EL-REI HERMIDA**

**Orientador:  
WASHINGTON LUIS CONRADO DOS SANTOS**

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

**SALVADOR-BAHIA-BRASIL  
2013**

“TRANSPORTE DE *LEISHMANIA* DO SÍTIO INFLAMATÓRIO PARA O LINFONDO DRENANTE:  
POTENCIAIS FAGÓCITOS ENVOLVIDOS E CINÉTICA DE DISSEMINAÇÃO.”

MICELY D' EL-REI HERMIDA

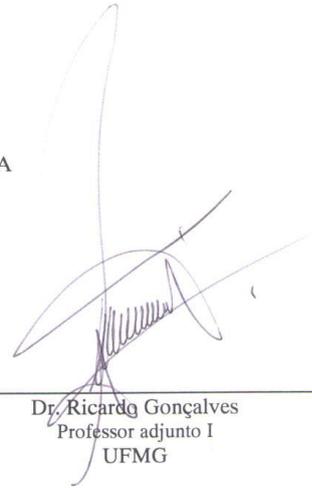
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dr. Roque Pacheco de Almeida  
Professor Associado  
UFS



---

Dr. Ricardo Gonçalves  
Professor adjunto I  
UFMG



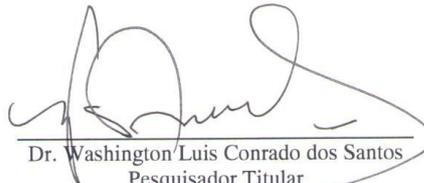
---

Dr. Lucas Pedreira de Carvalho  
Professor adjunto  
UFBA



---

Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo  
Professor Associado  
UFBA



---

Dr. Washington Luis Conrado dos Santos  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

The true sign of intelligence is not  
knowledge but imagination

Albert Einstein

## **AGRADECIMENTOS**

---

### **Ao Dr. Washington Luís Conrado dos Santos**

Pela sua orientação segura, atenciosa, e pelo crescimento intelectual e visão crítica adquiridos através da convivência, discussão de metodologias e inúmeras correções.

### **À José Mengel**

Pela colaboração nos experimentos de citometria de fluxo, além das sugestões enriquecedoras ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos estudantes de iniciação científica: **Angela Taguchi, Priscila Doria, Marcos Cavalcanti e Fernanda Orpinelli** que participaram intensamente para o desenvolvimento desse trabalho.

### **À Joselli Santos Silva**

Companheira eterna para todos os momentos e assuntos indispensável tornando o trabalho mais fácil e divertido.

### **Aos amigos do Laboratório de Patologia e Biointervenção Sala 1 e Sala 2**

Pelo companheirismo e agradável convívio durante todo o período em que estive no laboratório.

### **À Elivani dos Santos (Lívia)**

Técnica competente e dedicada, que possibilita, anonimamente e com satisfação visível, todos os trabalhos em andamento no laboratório.

### **Ao CNPq e à FAPESB**

Pela bolsa de doutorado e pelo financiamento do projeto que deu origem a essa tese de doutorado.

### **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.

### **Aos demais funcionários do CPqGM**

Que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho em especial a Liliane Cunha e Jorge Clarêncio, Dona Lia, à turma da esterilização e o biotério

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELA.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1 A LEISHMANIOSE.....	17
2.2 INTERFERÊNCIAS DOS FAGÓCITOS PROFISIONAIS NA INFECCÃO POR LEISHMANIA .....	26
2.3 DISSEMINAÇÃO DA LEISHMANIA A PARTIR DO SÍTIO DE INFECCÃO .....	38
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>44</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	46
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
<b>5. DESENHO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>47</b>
<b>6. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
7.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DO PERITÔNIO PARA O LINFONODO DRENANTE.....	55
7.2 ALTERAÇÕES NAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS PERITONIAIS E DO LINFONODO DRENANTE APÓS A INJEÇÃO COM DIFERENTES ESTÍMULOS .....	65
7.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FAGÓCITOS CAPAZES DE MIGRAR PARA O LINFONODO DRENANTE APÓS UM ESTÍMULO INFLAMATÓRIO CRÔNICO INFECCIOSO .....	73
<b>8. DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>9. CONCLUSÃO .....</b>	<b>99</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>101</b>
<b>11. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>
<b>12. ANEXO.....</b>	<b>116</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação das diferentes formas clínicas da leishmaniose e seus aspectos histológicos..... 20
- Figura 2.** Ilustração representativa do lago sanguíneo formado após a picada do inseto vetor..... 23
- Figura 3.** Desenho esquemático representando a disseminação de fagócitos infectados a partir do sítio de infecção (A) passando pelo linfonodo drenante (B) e disseminando para os diferentes tecidos (C). 40
- Figura 4.** Desenho esquemático sobre metodologia da injeção e rastreamento de células marcadas..... 52
- Figura 5.** Percentual dos linfonodos contendo células migrantes do peritônio 24h após a injeção de diferentes concentrações de células na cavidade peritoneal..... 56
- Figura 6.** Intensidade fluorescência relativa ao número de fagócitos PKH26<sup>+</sup> presentes no linfonodo paratímico 24 h após a injeção na cavidade peritoneal..... 58
- Figura 7.** Relação entre o número de fagócitos injetadas no peritônio e o número de fagócitos vacuolizadas presentes no linfonodo drenante. 59
- Figura 8.** Percentual de fagócitos PKH26<sup>+</sup> presentes no peritônio e no linfonodo drenante após 24 a sua injeção..... 60
- Figura 9.** Ensaio de transferência de células coradas com fluorescente vermelho comparando migração entre células infectadas ou não por *L. amazonensis*..... 61
- Figura 10.** Análise fenotípica das células Ly 5.1<sup>+</sup> capazes de migrar do peritônio para o linfonodo drenante *in vivo* após infecção por *L. amazonensis*..... 63
- Figura 11.** Análise fenotípica *in vivo* dos fagócitos infectados ou não por *L. amazonensis* transferidos entre camundongos com MHC diferentes.. ..... 64
- Figura 12.** Caracterização dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal quatro dias após da injeção de salina, tioglicolato e *Leishmania*..... 67
- Figura 13.** Caracterização das células dendríticas presentes na cavidade peritoneal quatro dias após da injeção de salina, tioglicolato e *Leishmania*..... 68

<b>Figura 14. Alteração na expressão de receptores de quimiocinas nas células do exsudato peritoneal após injeção de salina, tioglicolato e <i>L. amazonensis</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 15. Caracterização das populações leucocitárias presentes no linfonodo drenante quatro dias após estímulos com tioglicolato ou <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 16. Caracterização das células dendríticas presentes no linfonodo drenante quatro dias após da injeção de salina, tioglicolato ou <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 17. Intensidade fluorescência no linfonodo paratímico relativa ao número de <i>L. amazonensis</i> PKH26<sup>+</sup> após 24h da injetadas no peritônio.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 18. Caracterização dos fagócitos capazes de migrar do sítio inflamatório para o linfonodo drenante em condições de inflamação crônica.....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 19. Caracterização dos fagócitos infectados capazes de migrar para o linfonodo drenante. ....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 20. Caracterização dos fagócitos recrutados através de diferentes estímulos inflamatórios capazes de migrar para o linfonodo drenante. ....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 21. Identificação do parasita em culturas de PEC e de células do linfonodo coletados de camundongos da linhagem BALB/c após 1, 2, 4 ou 6 horas da infecção por <i>L. amazonensis</i>.. ....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 22. Tempo transcorrido até positividade das culturas das células peritoneais e do linfonodo de camundongos da linhagem BALB/c que ficaram infectados por <i>L. amazonensis</i> por 15 ou 30 minutos.....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 23. Tempo transcorrido até positividade das culturas de células coletadas do timo, pulmão e baço colhidos de camundongos infectados por <i>L. amazonensis</i> após 15, 30 minutos ou uma hora. ....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 24. Caracterização morfológica e taxa de infecção dos fagócitos peritoneais durante a cinética de disseminação do parasito <i>L. amazonensis</i>.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 25. Identificação de fagócitos infectados e parasitos de <i>L. amazonensis</i> entre as células do linfonodo drenante.....</b>	<b>88</b>

## **LISTA DE TABELA**

***Tabela 1.* Percentual dos linfonodos paratímicos que apresentaram migração de células infectadas ou contendo parasitos mortos após injeção de *L. amazonensis* PKH26<sup>+</sup> na cavidade peritoneal..... 74**

***Tabela 2.* Número de poços com culturas positivas para *L. amazonensis* nos diferentes órgãos de acordo com o tempo de inoculação do parasito.....86**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AGE</b>	Produtos de glicação avançados (do inglês <i>advanced glycation endproducts</i> )
<b>APC</b>	Células apresentadoras de antígeno (do inglês <i>antigen presenting cells</i> )
<b>CD</b>	Nomenclatura sistematizada de moléculas (do inglês <i>cluster differentiation</i> )
<b>CX<sub>3</sub>CR</b>	Receptores de quimiocina contendo 3 aminoácidos entre dois resíduos-chave de cisteína
<b>CCR</b>	Receptor de quimiocinas contendo 2 resíduos de cisteína juntos
<b>CCL</b>	Ligantes de quimiocinas contendo 2 resíduos de cisteína juntos
<b>CRs</b>	Receptores de complemento (do inglês <i>complement receptors</i> )
<b>DAPI</b>	Marcador fluorescente que cora de azul o núcleo das células
<b>DC</b>	Células dendríticas (do inglês <i>dendritic cell</i> )
<b>FACS</b>	Separador de células de fluorescência ativada (do inglês <i>fluorescence-activated cell sorter</i> )
<b>FITC</b>	Isotiocianeto de fluoresceína (do inglês <i>fluoresceina isotiocianate</i> )
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (do inglês <i>granulocyte/macrophage colony-stimulating factors</i> )
<b>Hi</b>	Alta expressão da molécula referida na célula marcada.
<b>HBSS</b>	Solução salina tamponada de Hank (do inglês <i>Hank's balanced salts</i> )
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LC</b>	Leishmaniose <b>cutânea</b>
<b>LCD</b>	Leishmaniose <b>cutânea difusa</b>
<b>LCL</b>	Leishmaniose <b>cutânea localizada</b>
<b>LMC</b>	Leishmaniose <b>muco</b> cutânea
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano (do inglês <i>lipophosphoglycan</i> )
<b>LV</b>	Leishmaniose <b>visceral</b>
<b>LPS</b>	Lipopolisacarídeo (do inglês <i>lipopolysaccharide</i> )
<b>MAC</b>	Complexo de ataque a membrana (do inglês <i>membrane attack complex</i> )
<b>MDR</b>	Transportador de membrana (do inglês <i>multi-drug resistance</i> )
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês <i>major histocompatibility complex</i> )
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatrativa de monócitos-1 (do inglês <i>monocyte chemotactic protein-1</i> )
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato (do inglês <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PE</b>	Ficoeritrina (do inglês <i>phicoeritrin</i> )
<b>PEC</b>	Células do exsudato peritoneal (do inglês <i>peritoneal esudate cells</i> )
<b>RGD</b>	Péptido contendo seqüência RGD (seqüência comum entre muitos componentes da matriz conjuntiva)
<b>RPMI</b>	Instituto Memorial Parque Roswell (do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
<b>RPMI Completo</b>	RPMI contendo 10% de SFB, 60µg/ml de gentamicina e 2mM de Glutamina
<b>SFB</b>	Soro <b>Fetal Bovino</b>
<b>Th1</b>	Linfócitos T auxiliares tipo 1 (do inglês <i>T helper-1</i> )

## RESUMO

TRANSPORTE DE *LEISHMANIA* DO SÍTIO INFLAMATÓRIO PARA O LINFONODO DRENANTE: POTENCIAIS FAGÓCITOS ENVOLVIDOS E CINÉTICA DE DISSEMINAÇÃO. **MICELY D' EL-REI HERMIDA**. A infecção por *Leishmania* modula a função de integrinas em fagócitos inflamatórios, afetando a migração celular e disseminação do parasito. O conhecimento sobre as populações de fagócitos capazes de transportar *Leishmania* ou fragmentos de parasitos mortos, e os mecanismos de disseminação da *Leishmania* do sítio de infecção para os diferentes tecidos ainda está incompleto. Nesse trabalho, nós adaptamos um modelo de migração de células *in vivo* para estudar o efeito da infecção parasitária na capacidade das diferentes populações de fagócitos mononucleares de migrar do sítio inflamatório para o linfonodo drenante e para estudar a cinética de disseminação da *Leishmania* através do sistema linfático. Inicialmente, nós usamos um modelo de peritonite crônica induzida por tioglicolato para identificar populações de fagócitos inflamatórios susceptíveis a infecção por *Leishmania* e suas possíveis alterações na migração após a infecção. Células peritoneais estimuladas por tioglicolato coletadas de animais Ly5.1<sup>+</sup>, não infectadas ou infectadas por *Leishmania*, foram injetadas na cavidade peritoneal de animais Ly5.1<sup>-</sup> e as diferentes populações de fagócitos foram rastreadas no linfonodo drenante. Células migrantes corresponderam no linfonodo 1% dos leucócitos injetados. Em animais injetados com células peritoneais cultivadas somente com meio, 28-90% das células migrantes eram células dendríticas mielóides e 30-74% eram macrófagos. No grupo de animais injetados com células do exsudato peritoneal co-cultivadas com *Leishmania*, 9-65% das células migrantes eram células dendríticas mielóides e 20-69% eram macrófagos. Somente a migração da célula dendríticas foi consistentemente diminuída após a co-incubação *Leishmania*. Em seguida, nós determinamos a cinética de disseminação do parasito do sítio inflamatório para o linfonodo drenante e sistemicamente. Promastigotas de *L. amazonensis* foram injetadas na cavidade peritoneal de camundongos e depois de 15min e 30min; 1h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24h amostras de fagócitos peritoneais, linfonodo, baço e pulmão foram cultivados para isolamento de *Leishmania*. Culturas de fagócitos peritoneais e células do linfonodo ficaram positivas após 15min a 6h da infecção. Parasitos foram detectados em culturas de células esplênicas de 15min a 1h após a infecção. Cultura de células do pulmão foram positivas 1h após a infecção ou, menos consistentemente, 15min e 30min após a inoculação. Parasitos na forma promastigota foram identificados no linfonodo drenante. Nossos dados mostraram que: (1) Uma variedade de fagócitos são capazes de migrar do sítio inflamatório para o linfonodo drenante. (2) Populações de células dendríticas infectadas por *Leishmania* parecem estar retidas no sítio inflamatório. (3) Os mecanismos de disseminação da *Leishmania* da cavidade peritoneal para o linfonodo ocorre em menos de 15 minutos após a injeção. (4) O trânsito para a corrente sanguínea ocorre nas primeiras horas após a infecção. Nossos dados também sugerem que mesmo antes do tempo requerido para alterações nas populações de células inflamatórias ocorra no sítio inflamatório, parasitos de *Leishmania* e seus antígenos podem chegar ao linfonodo drenante.

**PALAVRAS CHAVE:** *Leishmania*; fagócito mononuclear; célula dendrítica mielóide; disseminação do parasito

## ABSTRACT

TRANSPORT OF *LEISHMANIA* FROM THE INFLAMMATORY SITE TO THE DRAINING LYMPH NODE: PHAGOCYTES AND KINETICS OF PARASITE DISSEMINATION. **MICELY D' EL-REI HERMIDA.** *Leishmania* infection modulates integrin function in inflammatory phagocytes, affecting cell migration and parasite dissemination. The knowledge on the phagocyte populations capable of transporting *Leishmania* or fragments of dead parasites, and the mechanisms of *Leishmania* dissemination from the infection site to the different tissues is still incomplete. In this work, we adapted a model of cell migration in vivo to study the effect of parasite infection upon the ability of different mononuclear phagocyte populations to migrate from the inflammatory site to the draining lymph node and to study the kinetics of *Leishmania* dissemination through the lymphatic system. First, we used a model of chronic peritonitis induced by thioglycollate to identify inflammatory phagocytes populations susceptible to *Leishmania* infection and the potential changes in their migratory patterns after infection. Uninfected and *Leishmania*-infected, thioglycollate-elicited peritoneal exudate cells from Ly5.1<sup>+</sup> mice were injected into the peritoneal cavity of Ly5.1<sup>-</sup> mice, and the different phagocyte populations were tracked to the draining lymph node. Migrating cells corresponded 1% of the injected leukocytes. In the animals injected with peritoneal cells cultivated with medium alone, 28-90% of the migrating cells were myeloid dendritic cells and 30-74% were macrophages. In the group of animals injected with peritoneal exudate cells co-cultivated with *Leishmania*, 9-65% of the migrating cells were myeloid dendritic cells and 20-69% were macrophages. Only dendritic cell migration was consistently decreased after co-incubation with *Leishmania*. Afterwards, we determined the kinetic of parasite dissemination from the inflammatory site to the draining lymph node and systemically. *L. amazonensis* promastigotes were injected into BALB/c mice peritoneal cavity and after 15min and 30min; 1h, 2h, 4h, 6h, 12h and 24h samples of peritoneal phagocytes, lymph nodes, spleen and lungs were cultivated for *Leishmania* isolation. Peritoneal phagocytes and lymph nodes were positive after 15min to 6h of infection. Parasites were detected in splenic cells cultures 15min to 1h after infection. Lungs cultures were positive after 1h of infection or, less consistently, 15min and 30min after inoculation. Labeled parasites were identified in the draining lymph nodes. Our data show that: (1) A variety of phagocytes are able to migrate from the inflammatory site to the draining lymph node. (2) Populations of *Leishmania*-infected dendritic cells appear to be retained in the inflammatory site. (3) The mechanisms of *Leishmania* dissemination from peritoneal cavity to the lymph node occur in less than 15 minutes after injection. (4) The transit to bloodstream occurs in the first hour of infection. Our data also suggest that even before the time required for deep changes in inflammatory cell population takes place in the inflammatory site, *Leishmania* parasites and their antigens can reach the draining lymph node.

**Keywords:** *Leishmania*; mononuclear phagocytes; myeloid dendritic cell; parasite dissemination

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção por *Leishmania* tem início quando formas promastigotas do parasito são injetadas na derme por um flebotomíneo fêmea que pica a pele para obter sangue. Um capilar é lesado, e fagócitos que saem do vaso – fagócitos residentes da pele ou que são recrutados pelo processo inflamatório que se estabelece no local – são infectados por *Leishmania* (DE ALMEIDA et al., 2003; PETERS; SACKS, 2009). Da pele, células infectadas disseminam-se para o linfonodo regional e para outros tecidos, estabelecendo lesões (MOLL et al., 1993; MURAILLE et al., 2003; RITTER et al., 2004). No homem e em outros vertebrados, as lesões da leishmaniose estão associadas à presença de fagócitos mononucleares contendo amastigotas (BEIL et al., 1992; MURAILLE et al., 2003). Estas células estão em íntima relação com componentes da matriz extracelular e com outras células do tecido conjuntivo (CARVALHAL et al., 2004). Nós demonstramos 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; HERMIDA, 2007; PINHEIRO et al., 2006), por um mecanismo dependente da regulação da afinidade de integrinas. Não sabemos o significado dessas alterações da adesão celular induzida por *Leishmania*. A desadesão pode constituir, porém, o estágio inicial da migração leucocitária. Na realidade, uma série de estudos por outros autores tem demonstrado que células fagocíticas, ao englobarem *Leishmania* (MOLL et al., 1993; MURAILLE et al., 2003; RITTER et al., 2004) ou outras partículas (RANDOLPH et al., 1999), adquirem a capacidade de migrar para linfonodos regionais. Há controvérsias, porém, a respeito do tipo de célula responsável pelo transporte de *Leishmania* do sítio primário de infecção ao linfonodo drenante, e sobre a capacidade de disseminação do parasito ou fragmentos de parasitos mortos (IEZZI et al., 2006; MOLL et al., 1993; MOLL; FLOHÉ; RÖLLINGHOFF, 1995; MURAILLE et al., 2003; RANDOLPH et al., 1999).

Neste trabalho, apresentamos uma contribuição ao conhecimento nessa área. Nossa hipótese é a de que fagócitos mononucleares inflamatórios com diferentes fenótipos têm capacidade migratória e contribuem para a disseminação da *Leishmania* do sítio de infecção podendo influenciar, a partir desses diferentes fenótipos, diversamente, a resposta imuno-inflamatória ao parasito. Os elementos que suportam esta hipótese são: (1) O local de inoculação de *Leishmania* pelo flebótomo constitui um sítio inflamatório decorrente da lesão tecidual e da injeção de uma variedade de substâncias exógenas incluindo o parasito; (2) Uma variedade de fagócitos mononucleares tem capacidade migratória em resposta ao estímulo inflamatório; e (3) uma variedade de células com características fenotípicas diferentes tem sido apresentada em diferentes estudos como candidatas a transportadoras de amastigotas. Recentemente, adaptamos, em nosso laboratório, um sistema descrito por Bellingan e colaboradores (1996) que permite o rastreamento de fagócitos mononucleares da cavidade peritoneal para o linfonodo de drenagem em camundongos com peritonite induzida por tioglicolato (BELLINGAN et al., 1996). Inicialmente, determinamos o tempo de estímulo que permitisse coletar o maior número de células com características diversas, o qual foi definido no quarto dia após o estímulo inflamatório. Nesse período, o infiltrado é constituído por uma variedade de fagócitos mononucleares susceptíveis à infecção com *Leishmania*. Pelo menos parte desses fagócitos tem sua aderência ao tecido conjuntivo diminuída após a infecção com o parasito. Esse sistema de migração celular permite a manipulação *in vitro* dos fagócitos, seguida da análise *in vivo* da migração dessas células do sítio inflamatório para o linfonodo drenante. Com base nisto, demonstramos que os diferentes tipos de fagócitos comportam-se de forma distinta em relação à disseminação do parasito. Neste estudo, pretendemos (1) identificar, dentre as populações de fagócitos mononucleares, as que têm capacidade de migrar do sítio inflamatório para o linfonodo drenante; (2) definir se há alteração da intensidade de migração dessas células pela infecção com *Leishmania*; (3) identificar quais dentre essas populações celulares são capazes de transportar a *Leishmania* do sítio inflamatório para o linfonodo. A identificação das populações celulares que

apresentam sua capacidade migratória alterada pela infecção com *Leishmania* contribuirá para um melhor entendimento dos mecanismos relacionados à disseminação da *Leishmania* e outros patógenos intracelulares. Pode, ainda, abrir perspectivas para a identificação de alvos moleculares a serem utilizados na concepção de novas abordagens terapêuticas de doenças associadas ao endereçamento inadequado de células fagocíticas mononucleares.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A LEISHMANIOSE**

#### **2.1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS.**

Leishmaniose constitui um conjunto de doenças tegumentares e de órgãos internos, causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, resultando em ulcerações de caráter desfigurante (formas cutâneas e cutâneo-mucosa) ou distúrbios funcionais de órgãos internos evoluindo com anemia, sangramentos e susceptibilidade aumentada a infecções bacterianas (forma visceral) (ANDRADE; CARVALHO; ROCHA, 1990; BITTENCOURT; BARRALNETTO; DOERR, 1995). Atualmente, a leishmaniose acomete quatro continentes, sendo endêmica em oitenta e oito países, dentre os quais, setenta e dois são países em desenvolvimento (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012).

Na América Latina, a leishmaniose está presente em doze países. No Brasil, que é responsável por 90% das ocorrências da leishmaniose visceral, a enfermidade está em expansão. Durante os surtos ocorridos entre 1990 e 2009, o número de casos de leishmaniose visceral atingiu, nos picos, 3.885 em 1995, 4.858 em 2000 e 3.852 casos em 2008 (DA SAÚDE DO BRASIL SSM, 2010b). No mesmo período, o número de casos de leishmaniose tegumentar foi de 35.748, 33.720 e 19.992, respectivamente (DA SAÚDE DO BRASIL SSM, 2010a). O desenvolvimento de diferentes formas da leishmaniose está associado à espécie do parasito infectante e a condições inerentes ao hospedeiro, como idade, co-infecções e resposta imune do hospedeiro ao parasito (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012). Além disso, a leishmaniose deixou de ser uma doença especificamente de zona rural, alcançando a zona urbana (HERWALDT, 1999).

A leishmaniose humana é causada por algumas espécies de *Leishmania*, as quais levam a diferentes doenças (BARRAL et al., 1991). Há três formas clássicas mais conhecidas, entre as doenças causadas na leishmaniose: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV). 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) a maioria dos casos de LC é curada espontaneamente. Contudo, nos casos em que as úlceras se tornam lesões crônicas, há uma maior dificuldade no tratamento, sendo a lesão mais duradoura, destrutiva e desfigurante (BITTENCOURT; BARRAL-NETTO; DOERR, 1995; HERWALDT, 1999; RODRIGUES DE-FREITAS; DOS-SANTOS, 2006).

As lesões da LMC são graves e desfigurantes, surgem na mucosa nasal ou bucal e geralmente evoluem de forma ulcerativa destrutiva (ASHFORD, 2000b; BITTENCOURT; BARRAL-NETTO; DOERR, 1995; RODRIGUES DE-FREITAS; DOS-SANTOS, 2006). As formas LC e LMC apresentam alguns padrões 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 (RODRIGUES DE-FREITAS; DOS-SANTOS, 2006).

Pacientes com 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) (RODRIGUES DE-FREITAS; DOS-SANTOS, 2006). As lesões são principalmente observadas na face, exibindo pápulas e nódulos usualmente não ulcerados, como

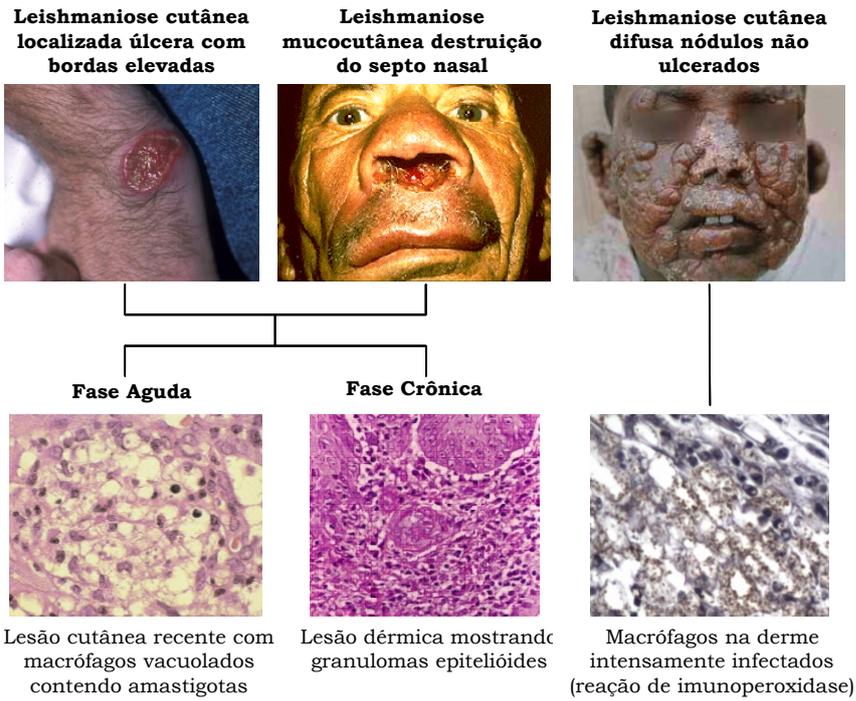
demonstrado na figura 1 (BITTENCOURT; BARRAL-NETTO; DOERR, 1995; RODRIGUES DE-FREITAS; DOS-SANTOS, 2006).

A forma visceral da leishmaniose, a qual representa a maior parte das setenta mil mortes por ano relacionadas com a leishmaniose em âmbito mundial, agride órgãos internos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea. Leva a um quadro de febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia e aumento de susceptibilidade a infecções bacterianas (BITTENCOURT; BARRAL-NETTO; DOERR, 1995; DESJEUX, 1996). Quando estabelecida a enfermidade, se não for tratada, esta evoluirá a óbito.

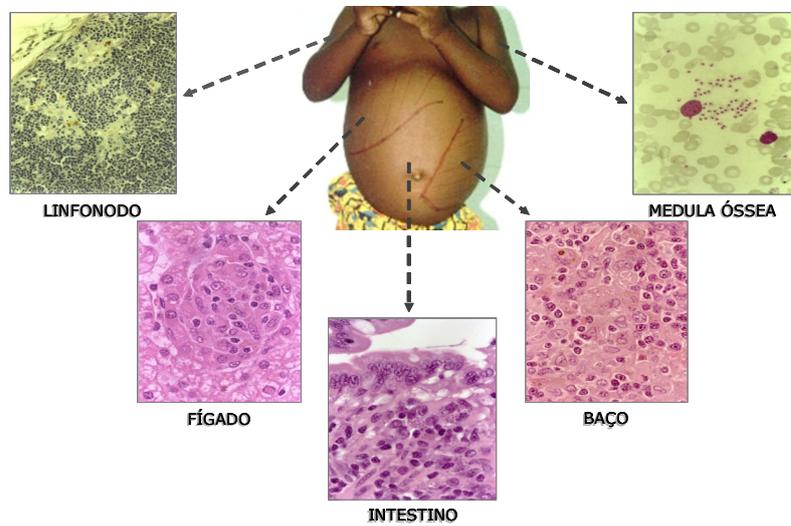
Após a recuperação, alguns pacientes, principalmente infectados com a forma antroponótica da leishmaniose visceral, podem desenvolver uma forma cutânea crônica conhecida como leishmaniose dérmica pós-calazar, representada por lesões nodulares, papulares ou maculares. Estas lesões podem servir como reservatórios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

Interessante notar que 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; BARRAL-NETTO; DOERR, 1995; RODRIGUES DE-FREITAS; DOS-SANTOS, 2006) (Figura 1).

### Formas Tegumentares



### Forma Visceral



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

### **2.1.2 AGENTE ETIOLÓGICO E ETAPA INICIAL DA INFECÇÃO.**

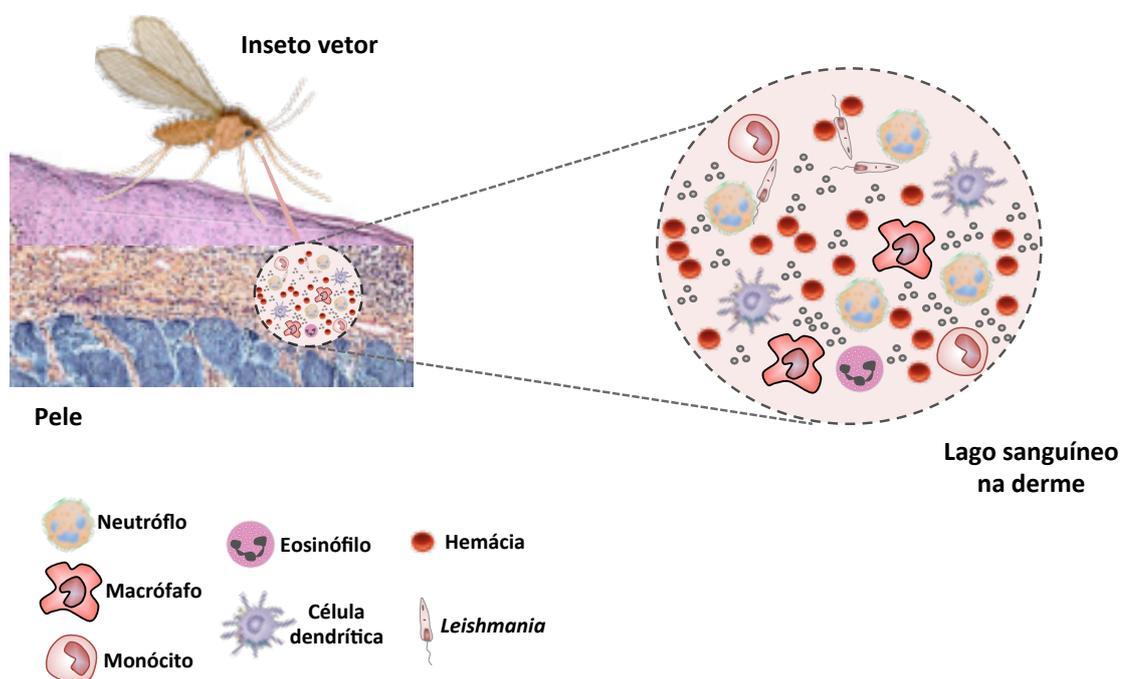
O agente etiológico da doença é um protozoário do gênero *Leishmania* que é transmitido através da picada de um inseto vetor. Calcula-se que existam aproximadamente vinte e uma espécies de *Leishmania* patogênicas para o homem, transmitidas através de trinta espécies de flebotomíneos vetores (ASHFORD, 1997; DESJEUX, 1996; 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, 2000b). 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, 1991).

A infecção no flebotomíneo fêmea é iniciada no momento do repasto sanguíneo quando, ao picar o hospedeiro mamífero, ingere juntamente com o sangue, fagócitos infectados (GUARGA et al., 2000). As amastigotas são liberadas no tubo digestivo do inseto, diferenciam-se na forma promastigota metacíclica, e serão regurgitadas na derme do hospedeiro durante novo repasto (BITTENCOURT; BARRAL-NETTO; DOERR, 1995).

No sítio da inoculação, devido à picada do inseto vetor, forma-se um lago sanguíneo onde serão liberados os parasitos juntamente com a saliva do flebotomíneo (DE ALMEIDA et al., 2003; PETERS; SACKS, 2009) (Figura 2). Inicialmente, o parasito interage com as células residentes como as células dendríticas dermais (MOLL et al., 1993; NG et al., 2008). Essas células têm a habilidade de diferenciar a fagocitose entre o parasito e partículas inertes, dando preferência ao parasito (NG et al., 2008). Como são células que apresentam longas extensões dos seus pseudópodes, fagocitam os parasitos logo nas primeiras horas após a infecção (LOCKSLEY et al., 1988; NG et al., 2008). Após vinte quatro horas da infecção, os macrófagos dermais se

tornam a população de células predominantemente infectadas (LOCKSLEY et al., 1988; PETERS et al., 2008). Na área do dano tecidual, estabelece-se um processo inflamatório causado não somente pela inserção da proboscide do inseto vetor, mas também devido a enzimas da saliva, as quais têm atividade vasodilatadora (DE ALMEIDA et al., 2003; GILLESPIE; MBOW; TITUS, 2000; KAMHAWI et al., 2000; RIBEIRO, 1987; RIBEIRO; ROSSIGNOL; SPIELMAN, 1984; TEIXEIRA et al., 2005). Desta forma, facilita-se o recrutamento ou extravasamento de células fagocíticas do sangue iniciado pela presença dos neutrófilos (PETERS et al., 2008), além do recrutamento de macrófagos e células dendríticas (DE ALMEIDA et al., 2003; LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007). As amastigotas proliferam e são liberadas no meio extracelular infectando os fagócitos vizinhos (ASHFORD, 2000a; 2000b; BITTENCOURT; BARRAL-NETTO; DOERR, 1995; DESCOTEAUX; TURCO, 1999) ou até mesmo neutrófilos infectados são facilmente fagocitados por macrófagos induzindo uma infecção silenciosa na célula hospedeira (KAYE; SCOTT, 2011; PETERS et al., 2008).



**Figura 2.** Ilustração representativa do lago sanguíneo formado após a picada do inseto vetor. Em destaque, pode-se observar a presença do parasito e os diferentes tipos de leucócitos atraídos ao sítio de inoculação devido ao estímulo inflamatório induzido no local. Imagem baseada no artigo de DE ALMEIDA et al., 2003.

Apenas uma fração das promastigotas injetadas é resistente ao complemento. Desta forma, este e outros mecanismos de morte atuam na destruição de parte dos parasitos inoculados (NIEVES; PIMENTA, 2000; SACKS; PERKINS, 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 (infectantes), 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 deste sistema para invadir as células do hospedeiro. A proteinase gp63, uma glicoproteína frequente na membrana de promastigotas de *Leishmania*, é capaz de clivar C3b para a forma inativa iC3b, a qual se liga ao receptor de complemento CR3 e CR1 na membrana de fagócitos mononucleares (MOSSER; EDELSON, 1985).

Parasitas vivos e produtos de degradação de parasitos mortos são fagocitados por leucócitos. Estes leucócitos podem permanecer no sítio inflamatório ou migrar para o linfonodo drenante e, deste para outras partes do corpo (FIORINI; MESSINA; BARRACCHIA, 2002; LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007; MOLL et al., 1993; MURAILLE et al., 2003; RANDOLPH et al., 1999), causando lesões em outros sítios da pele, mucosa oral e nasal, e em órgãos internos. Porém, ainda não está claro qual o fenótipo das células capazes de transportar o parasito do sitio de inoculação para o linfonodo drenante e apresentar antígeno produzindo ou regulando a resposta imune contra o parasito.

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 LC está associada, principalmente, à infecção com *L. braziliensis*, *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*. A leishmaniose mucosa ocorre preferencialmente nos indivíduos infectados por *L. braziliensis*. A LV está associada à infecção com *L. infantum* (COLMENARES et al., 2002; GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989). 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 (BELLI et al., 1999; CAMPOS-PONCE et al., 2005; NOYES et al., 1997).

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, está à 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 (JIMÉNEZ et al., 1995) e no comportamento biológico destes parasitos (COLMENARES et al., 2002).

Independente dessas proposições, nessa etapa inicial da infecção, as alterações causadas pelo parasito sobre os fagócitos envolvidos na sua disseminação pelo hospedeiro podem influenciar a resposta imuno-inflamatória contra o parasito.

## 2.2 INTERFERÊNCIAS DOS FAGÓCITOS PROFISSIONAIS NA INFECÇÃO POR LEISHMANIA

A *Leishmania* pode infectar fagócitos profissionais como os neutrófilos polimorfonucleares, além de uma variedade de fagócitos mononucleares, incluindo macrófagos (BEIL et al., 1992; PETERS et al., 2008) e células dendríticas (DC) (BLANK et al., 1993), além de células não fagocíticas como fibroblastos (SCHWARTZMAN; PEARSON, 1985). As células dendríticas são consideradas apresentadoras de antígenos profissionais, assim como são também capazes de transportar microrganismos do sítio inflamatório para os linfonodos regionais (BANCHEREAU et al., 2000; REIS E SOUSA, 2004).

### 2.2.1 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 e reparar o dano tecidual (KENNEDY; DELEO, 2009; WITKO-SARSAT et al., 2000). Estas são as primeiras células a serem recrutadas na inflamação aguda e dominam o influxo inicial de leucócitos (ISSEKUTZ; MOVAT, 1980). Sua função adicional em modular a resposta adaptativa está relacionada com sua capacidade de liberar quimiocinas, citocinas e peptídeos antimicrobicidas (SCAPINI et al., 2000; YANG et al., 2000). Recentemente, tem-se sugerido que neutrófilos ativados podem fornecer sinais de ativação e antígenos microbianos para as células dendríticas (BLOMGRAN; ERNST, 2011; MEGIOVANNI et al., 2006), podendo, assim, beneficiar uma rápida resposta imune adaptativa contra o patógeno.

Após estímulo inflamatório induzido com tioglicolato na cavidade peritoneal de camundongos, os neutrófilos se acumulam em poucas horas e gradualmente são substituídos por macrófagos (COOK; BRAINE; HAMILTON,

2003; LAGASSE; WEISSMAN, 1996). Os neutrófilos também apresentam capacidade migratória para o linfonodo drenante, observada após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) (MIYAZAKI et al., 2004).

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

### **2.2.2 NEUTRÓFILOS NA INTERAÇÃO COM *Leishmania***

Durante a inoculação do parasito pelo inseto vetor no hospedeiro vertebrado, certa quantidade de saliva do flebotomíneo é liberada, a qual possui algumas ações inflamatórias, como indução de vasodilatação (SACKS; KAMHAWI, 2001) e quimiotaxia para polimorfonucleares e macrófagos (TEIXEIRA et al., 2005; ZER et al., 2001). 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, logo duas 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).

Atualmente, os neutrófilos foram definidos como fagócitos essenciais para o parasito *Leishmania* estabelecer e promover doença (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; PETERS et al., 2008). São predominantes e persistentes logo após as primeiras horas da infecção por *L. major* (independente da via inoculação, com agulha ou picada do inseto vetor) (BELKAID et al., 2000; PETERS et al., 2008) no hospedeiro susceptível, induzindo uma certa resistência nesses animais (CHEN et al., 2005), mas

são fagocitados no sítio de inoculação em hospedeiros resistentes (BEIL et al., 1992). Esse rápido infiltrado de neutrófilos na pele ocorre com diferentes espécies de *Leishmania spp*, que causam doenças cutâneas (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; PETERS et al., 2008), ou viscerais (THALHOFER et al., 2011).

Interessante notar que os parasitos, ao serem fagocitados pelos neutrófilos, continuam viáveis em seu interior. Logo após a fagocitose do parasito, os neutrófilos adquirem um fenótipo apoptótico, mas permanecem intactos (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Esse efeito foi caracterizado como o modelo do “Cavalo de Tróia” no qual neutrófilos infectados induzem sua fagocitose por macrófagos. Desta forma, há uma infecção silenciosa dos macrófagos pelos parasitos, impedindo uma indução mais exacerbada da defesa antimicrobiana inata (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; PETERS et al., 2008). As células dendríticas também fagocitam neutrófilos infectados por *L. major*. Esse contato com as células dendríticas via neutrófilo infectado inibe a resposta inicial anti-*Leishmania* e vias de apresentação de antígeno para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (RIBEIRO-GOMES et al., 2012).

### **2.2.3 MONÓCITOS E MACRÓFAGOS**

Os monócitos representam células imunes efetoras, as quais exibem receptores de quimiocinas e moléculas de adesão capazes de induzir sua migração da corrente sanguínea para o tecido durante um processo infeccioso (SERBINA et al., 2008). Constituem cerca de 5-10% dos leucócitos sanguíneos em camundongos e em humanos. Esses monócitos têm um período curto de vida, de aproximadamente um dia, em camundongos (VAN FURTH, 1968) e três dias em humanos (WHITELAW, 1972). São capazes de capturar células e moléculas tóxicas. Além disso, eles podem se diferenciar em células dendríticas inflamatórias ou macrófagos em condições normais e

com mais eficiência durante a resposta inflamatória (SERBINA et al., 2008; ZIEGLER-HEITBROCK, 2000).

Nos camundongos, os monócitos podem ser caracterizados pela citometria de fluxo por sua baixa granulosidade e sua expressão de moléculas como receptores de M-CSF (CD115), Mac-1 (CD11b) e do antígeno reconhecido pelo anticorpo F4/80 (AUSTYN; GORDON, 1981). Atualmente, os monócitos podem ser divididos em dois subtipos, de acordo com a expressão de CCR2, CD62L (L-selectina) e do receptor um da quimiocina CX<sub>3</sub>C (CX<sub>3</sub>CR1). Os monócitos residentes são caracterizados pela alta expressão de CX<sub>3</sub>CR1 e ausência de CD62L e CCR2 (GORDON; TAYLOR, 2005). Os monócitos inflamatórios são caracterizados pela baixa expressão de CX<sub>3</sub>CR1 e positividade para CD62L e CCR2. Estes monócitos inflamatórios respondem a quimiocinas CCL2 (MCP-1) (GU et al., 1998; PALFRAMAN et al., 2001) e, assim, migram para sítios inflamatórios (GU et al., 1998; KURIHARA et al., 1997; KUZIEL et al., 1997; LU et al., 1998). Esses monócitos inflamatórios correspondem também aos monócitos clássicos humanos (CD14<sup>hi</sup>/CD16<sup>-</sup>) e, a depender do estímulo *in vitro*, podem se diferenciar em macrófagos (KIM et al., 2004) ou em células dendríticas (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 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. Ele apresenta uma grande variação fenotípica durante sua diferenciação e distribuição pelos diferentes tecidos nos quais se estabelece (AUSTYN; GORDON, 1981; DIJKSTRA et al., 1985; G KRAAL, 1986; GORDON; TAYLOR, 2005). Quando maduros, os macrófagos têm uma vida longa com alta capacidade fagocítica, são capazes de apresentar antígenos e de agir como células efectoras matando patógenos intracelulares. As moléculas antigênicas como F4/80, macrosialinas (CD68) e sialoadesinas são identificadas em diferentes populações macrofágicas. O antígeno F4/80 encontra-se na maioria da população ativada, como também em algumas populações residentes (GORDON; TAYLOR, 2005).

Os macrófagos peritoneais residentes em camundongos têm sido caracterizados pela alta expressão do antígeno F4/80 e CD11b (COOK; BRAINE; HAMILTON, 2003; GHOSN et al., 2010; NIBBERING, P. H. et al., 1987) e pela não expressão de GR-1 e B220 (LAGASSE; WEISSMAN, 1996). Os macrófagos peritoneais inflamatórios têm sido muito utilizados nos estudos relacionados com a resposta inflamatória (CAILHIER et al., 2005; COOK; BRAINE; HAMILTON, 2003b; RIBEIRO-GOMES et al., 2004) relacionada a doenças autoimunes (POTTER et al., 2003) e estudos de migração celular (BELLINGAN et al., 1996; SOUZA et al., 1988; WIEGE et al., 2012).

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 presente no meio (EICHNER; SMEATON, 1983). Contudo, os polimorfonucleares ou macrófagos atraídos pelo estímulo com tioglicolato têm a capacidade de fagocitar e matar os microrganismos ingeridos (BARON; PROCTOR, 1982; LEIJH et al., 1984). Esse método tem como vantagem obter fagócitos mononucleares inflamatórios em um ambiente estéril, sendo possível o cultivo e manipulação das células isoladas (CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006).

#### **2.2.4 MONÓCITOS E MACRÓFAGOS NA INTERAÇÃO COM *Leishmania***

A infecção de macrófagos pela *Leishmania* normalmente ocorre de forma silenciosa devido ao reconhecimento de alguns receptores da *Leishmania* em comum com as células do hospedeiro. São receptores tais como o receptor de complemento três (CR3), receptor de complemento um (CR1), receptor de manose (MR), Receptores Fc gama (FcγRs, em particular FcγRII-B2) e receptores de Fibronectina (FnRs) (BLACKWELL et al., 1985; DA SILVA et al., 1989; GUY; BELOSEVIC, 1993; MOSSER; EDELSON, 1985; WRIGHT; SILVERSTEIN, 1983; WYLER; SYPEK; MCDONALD, 1985). 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 e fraca sinalização via CD40, mecanismos necessários para o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 (BELKAID; BUTCHER; SACKS, 1998; CARRERA et al., 1996; RUB et al., 2009), a atividade das enzimas proteolíticas (DESCOTEAUX; TURCO, 1999) e a produção do óxido nítrico (DESCOTEAUX, 1999; WEI et al., 1995), prolongando, assim, sua sobrevivência no hospedeiro.

Na pele de animais susceptíveis, após a infecção com *Leishmania*, observa-se um grande número de macrófagos (CD11b<sup>+</sup>) infectados (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; FLOHÉ; RÖLLINGHOFF, 1995). Recentemente trabalhos *in vivo* utilizando microscopia de imagem com 2-fotons possibilitaram a demonstração visual de como os macrófagos dermais se tornam a população mais infectada da pele 24 horas após a infecção por *L. major* (PETERS et al., 2008).

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; SOLIOZ; LOUIS, 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* (CAILHIER et al., 2005; COOK; BRAINE; HAMILTON, 2003) ou pré-sensibilizados com antígenos de *Leishmania* (LYTTON; MOZES; JAFFE, 1993; MEIER; SVENSSON; KAYE, 2003). Um estudo recente, desenvolvido por Ghosn e colaboradores, descreveu que, na cavidade peritoneal, há duas populações de macrófagos: em uma, eles são maiores, têm alta expressão de marcadores como CD11b e antígeno F4/80 e têm baixa expressão de MHC-II. Na segunda população de macrófagos peritoneais, eles são menores, têm menor expressão dos marcadores CD11b e antígeno F4/80, contudo expressão mais alta de MHC-II. Essa última população é predominante no peritônio quatro dias após estímulo com tioglicolato. São células derivadas de monócitos migrantes da corrente sanguínea após o estímulo inflamatório. Ambos apresentam mesma capacidade fagocítica e intensa produção de óxido nítrico (NO) *in vivo* (GHOSN et al., 2010).

Os macrófagos peritoneais 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 (monócitos

humanos), embora a redução na expressão dessas moléculas 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.

### **2.2.5 CÉLULAS DENDRÍTICAS**

As células dendríticas são capazes de iniciar a resposta imune e eficientemente estimular a geração de memória imunológica. Acredita-se que tenham como principal função reconhecer e processar antígenos externos e, subsequentemente, apresentá-los aos linfócitos T naive (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). 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-II e moléculas co-estimulatórias, tornando-se competentes APC (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; CAVANAGH; ANDRIAN, 2002; GORDON; TAYLOR, 2005; LIPSCOMB; MASTEN, 2002; SHORTMAN; LIU, 2002).

Um grande número de DCs murinas tem sido descrita em órgãos linfoides e não linfoides. Essas células têm sido classificadas em duas linhagens principais: DCs mielóides (STEINMAN; COHN, 1974) ou linfoides (SÜSS; SHORTMAN, 1996). As DCs de origem mielóides são consideradas a população clássica de APC do sistema imune (HART, 1997) e apresentam similaridades funcionais, fenotípicas e morfológicas com macrófagos (VAN FURTH; COHN, 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 da DC linfóide é identificado pela expressão de CD8 $\alpha$ . Anteriormente, pensava-se que essas células se originavam de um precursor da linhagem linfóide (SÜSS; SHORTMAN, 1996), contudo, foi demonstrado que DC CD8 $\alpha^+$  ou CD8 $\alpha^-$  podem ser originadas de um progenitor mielóide (DEL HOYO et al., 2002; TRAVER et al., 2000). As DCs mielóides e linfóides diferem em sua localização nos tecidos, fenótipo e função, porém ambas expressam altos níveis de CD11c, MHC-II e moléculas co-estimulatórias CD86 e CD40. Basicamente, as DCs linfóides são CD8 $\alpha^+$  e as DCs mielóides são CD8 $\alpha^-$ , representando populações com funções distintas (MARASKOVSKY et al., 1996; PULENDRAN et al., 1997; VREMEC; SHORTMAN, 1997; WU, 2001; WU; LI; SHORTMAN, 1996).

A principal dicotomia entre os subtipos de DCs pode ser vista na indução de uma resposta do tipo Th2 produzida pelas DCs CD8 $\alpha^-$ , enquanto que as DCs CD8 $\alpha^+$  produzem interleucina (IL)-12, induzindo uma resposta do tipo Th1 (HAAN; LEHAR; BEVAN, 2000; IYODA et al., 2002; MOSSER; EDWARDS, 2008; PULENDRAN et al., 1999). 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; FLOHÉ; RÖLLINGHOFF, 1995). Na derme encontra-se DCs as quais apresentam uma habilidade em fagocitar patógenos e migrar mais eficientemente que as células de Langerhans (NG et al., 2008). O grupo de Leon (2007) descreveu que as células dendríticas podem ser recrutadas para o sítio inflamatório ou até mesmo ser diferenciadas de monócitos dermais (monócitos que migram para a derme). Estas células são capazes de migrar para o linfonodo drenante e apresentar antígeno para os linfócitos T, sendo responsáveis por uma resposta protetora contra *Leishmania* (LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007).

### 2.2.6 CÉLULAS DENDRÍTICAS NA INTERAÇÃO COM *Leishmania*

Alguns estudos antigos que utilizam o modelo murino de leishmaniose tegumentar demonstraram que, logo após a inoculação do parasito na pele, as células de Langerhans infectadas, e não os macrófagos, são capazes de transportar a *Leishmania* da pele para o linfonodo drenante (BLANK et al., 1993; MOLL et al., 1993) e, assim, apresentar o antígeno aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens, iniciando uma resposta imuno-específica (MOLL et al., 1993). Contudo, estudos recentes vêm questionando esses achados, demonstrando que as células dendríticas presentes no linfonodo drenante não expressam a molécula langerina utilizado para identificar células de Langerhans (RITTER et al., 2004). Estudos *in vivo* demonstraram que esse tipo de células são mais sensíveis que as células dendríticas dermais (NG et al., 2008). Estas células dendríticas dermais também tem sido investigadas, e foram descritas como células capazes de transportar a *Leishmania* até o linfonodo drenante (MISSLITZ et al., 2004; RITTER et al., 2004). Células dendríticas com outros fenótipos também têm sido incluídas nesse grupo de células transportadoras de *Leishmania*, como monócitos que, atraídos ao sitio inflamatório nas fases mais tardias da doença, transformam-se em células dendríticas capazes de se infectar e migrar eficientemente para o linfonodo drenante e induzir a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (LEON; ARDAVIN, 2007).

Em camundongos resistentes a leishmaniose, a presença de células dendríticas e macrófagos infectados viáveis no linfonodo foram equivalentes, porém apenas as células dendríticas foram capazes de induzir a resposta imune por células T (MOLL; FLOHÉ; RÖLLINGHOFF, 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 específicas contra *Leishmania* e, assim, proteger o animal contra reinfecção (MOLL; FLOHÉ; RÖLLINGHOFF, 1995). 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 contra o parasito (MOLL; FLOHÉ; RÖLLINGHOFF, 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 (STEBUT et al., 1998), mostrando características de maturação. Interessante é que essa maturação em células dendríticas infectadas só ocorre quando o parasito internalizado foi previamente opsonizado por anticorpos *Leishmania* específicos (PRINA, 2004). 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, 2004).

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 (FÖRSTER 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 (ATO et al., 2002; SATO et al., 2000).

Além disso, Muraille e colaboradores (2003), apresentaram evidências de que células dendríticas derivadas de monócitos seriam as principais responsáveis pelo carreamento do parasito do sítio de infecção para o linfonodo (MURAILLE et al., 2003). Essa possibilidade também tem suporte em estudos com partículas de látex transportadas dos sítios de injeção para linfonodos braquiais do pulmão (RANDOLPH *et al.*, 1999). De acordo com esses dados, o grupo de Leon (LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007) demonstrou que monócitos são atraídos à pele e se transformam em células dendríticas capazes de migrar para o linfonodo drenante, ativando os linfócitos T induzindo uma resposta protetora contra a infecção por *Leishmania* (LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007).

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 levados por monócitos inflamatórios, logo nas primeiras vinte e quatro horas após a infecção. Estes pesquisadores consideram que poucas células dendríticas derivadas da pele (células de Langerhans ou DC dérmicas) migram para o linfonodo, exibindo pequenas funções na ativação precoce de células T. Dessa forma, é possível que o trânsito de moléculas vistas pelo sistema imune como antígenos seja distinto do trânsito de parasitos do sítio de agressão para os linfonodos regionais (IEZZI et al., 2006).

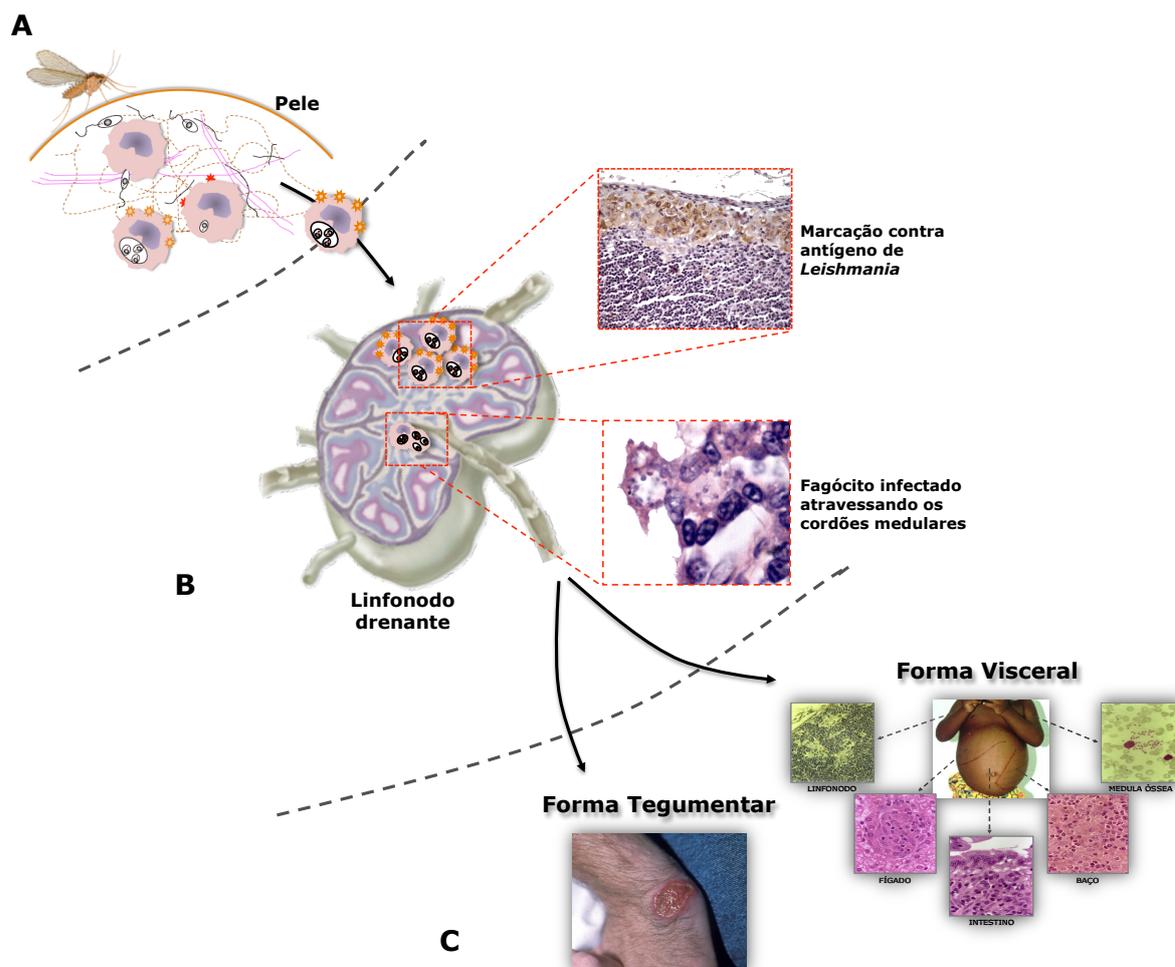
### 2.3 DISSEMINAÇÃO DA LEISHMANIA A PARTIR DO SÍTIO DE INFECÇÃO

Uma vez dentro do hospedeiro mamífero, o parasito *Leishmania sp.* se prolifera, aumentando suas chances de contaminar outros insetos vetores ou até mesmo de disseminar no hospedeiro, estabelecendo-se e causando lesões nos diferentes tecidos. Os mecanismos pelos quais a disseminação ocorre não são completamente entendidos, contudo, o estabelecimento nos diferentes tecidos depende da espécie do parasito bem como o tipo de resposta imune montada pelo hospedeiro (YURDAKUL, 2005).

A luta do parasito pela sobrevivência no hospedeiro vertebrado ocorre através da disseminação e recirculação de fagócitos infectados pelos tecidos do hospedeiro. Isso se torna evidente a partir do momento em que, nas áreas de lesões, sempre se observa a presença de fagócitos contendo parasitos no seu interior. Em algumas formas da doença tegumentar, as lesões permanecem restritas à área focal da pele, por vezes com evidente linfadenopatia regional, em outros há disseminação do parasito para múltiplos focos da pele ou para mucosa (BITTENCOURT; BARRAL-NETTO; DOERR, 1995). O quadro de disseminação da *Leishmania* nos casos de leishmaniose visceral parece ainda mais complexo. Durante o processo inflamatório, esses fagócitos mononucleares são estimulados a migrar do sangue para o sítio inflamatório ou deste até o linfonodo drenante (MOLL et al., 1993; RANDOLPH et al., 1999). Esse processo é seguido pelo estabelecimento de células parasitadas em diferentes tecidos, como demonstrado em camundongos (MOLL et al., 1993; MURAILLE et al., 2003; RITTER et al., 2004; RITTIG; BOGDAN, 2000) e sugerido em estudos com cães naturalmente infectados (DOS-SANTOS et al., 2004; REIS et al., 2006; 2009). Como observado em outras células, o estabelecimento e sobrevivência de fagócitos infectados nos tecidos são fenômenos dependentes de interações de moléculas de adesão expressa, na sua superfície, aos componentes do tecido conjuntivo nos tecidos alvo de lesão (LEON; ARDAVIN, 2008;

PALFRAMAN, 1985), além do estado de atividade funcional dessas moléculas (SPRINGER, 1995). Adicionalmente, pares moleculares envolvidos no processo de adesão e migração leucocitária atuam também na formação de sinapses imunológicas, possibilitando a geração de autoimunidade (SIMS; DUSTIN, 2002).

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 (Figura 3 A), estabelecendo lesões em outros tecidos como pele, mucosas e órgãos internos (Figura 3 C). Tem-se sugerido a existência de um tropismo das diferentes espécies de *Leishmania* por determinados tecidos. Frequentemente, fagócitos infectados podem ser observados na região subcapsular do linfonodo que drena a área de inoculação do parasito (MOLL et al., 1993; MURAILLE et al., 2003; NG et al., 2008; PETERS et al., 2008; RITTER et al., 2004). Fagócitos mononucleares infectados são também observados atravessando os cordões medulares como mostra o desenho esquemático abaixo (Figura 3 B), assim como também já foram identificados na corrente sanguínea (FIORINI *et al.*, 2002).



**Figura 3.** Desenho esquemático representando a disseminação de fagócitos infectados a partir do sítio de infecção (A) passando pelo linfonodo drenante (B) e disseminando para os diferentes tecidos (C).

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  $58.2 \pm 2\%$ ) (CARVALHAL *et al.*, 2004).

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  $\mu\text{m}$  (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 substituição de cálcio e magnésio, na superfície celular, por manganês, sugerindo 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 logo 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).

Alguns mecanismos pelos quais esses fagócitos migram para o linfonodo drenante via linfa tem sido estudados em modelos experimentais *in vivo* (BELLINGAN et al., 1996; GUNN et al., 1999; RANDOLPH et al., 1999; ROBBIANI et al., 2000). Tais estudos demonstram que fagócitos aumentam sua habilidade de migração através dos vasos linfáticos quando administrado um estímulo como, por exemplo, à fagocitose de partícula de látex (RANDOLPH et al., 1999). Essa migração é dependente de quimiocinas, as quais são capazes de guiar as células do sítio inflamatório para o linfonodo drenante ou até mesmo o seu estabelecimento nos compartimentos do linfonodo (ATO et al., 2006; BAGGIOLINI, 1998; GUNN et al., 1999; SPRINGER, 1995). A infecção por *Leishmania* também induz algumas

alterações no processo migratório das células. Alguns leucócitos, como neutrófilos e células dendríticas, após a infecção por *Leishmania*, são rapidamente recrutados para a área de lesão. Contudo, após fagocitose do parasita, têm sua capacidade migratória reduzida (JEBBARI et al., 2002; PETERS et al., 2008). Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão bem definidos em estudo *in vivo*. Moléculas de adesão ou padrões de receptores de quimiocinas (VICARI et al., 2004) podem estar envolvidos nessa inibição. Contudo, estudo *in vivo* sobre quais mecanismos celulares estão envolvidos na disseminação do parasito necessitam ser elaborados para um maior esclarecimento dos fatos.

Neste trabalho, utilizamos um modelo experimental *in vivo* capaz de permitir o estudo de uma grande quantidade de fagócitos inflamatórios com habilidade de migrar para o linfonodo drenante desenvolvido por Bellingan e colaboradores (BELLINGAN et al., 1996). Neste modelo experimental, utilizamos injeção intraperitoneal de tioglicolato em camundongos, resultando em um grande afluxo de fagócitos. Essas células, recolhidas da cavidade peritoneal dos animais injetados com tioglicolato, fagocitam partículas de agar, existentes no tioglicolato, o que lhes confere um aspecto de vacuolização citoplasmática ( BELLINGAN et al., 1996; COOK; BRAINE; HAMILTON, 2003). Esta característica permite que essas células sejam facilmente identificadas no linfonodo drenante (BELLINGAN et al., 1996). Em um trabalho anterior do nosso grupo, verificamos que o afluxo de macrófagos para a cavidade peritoneal aumenta progressivamente até o quarto dia após o estímulo inflamatório com tioglicolato. Após o quarto dia do estímulo inflamatório, há também uma importante taxa de migração desses fagócitos contendo tioglicolato para o linfonodo para-tímico. A comprovação de que estas células realmente migram do peritônio para o linfonodo, e não representam apenas a fagocitose de agar por células já presentes no linfonodo ou recrutadas do sangue foi feita através de experimentos de injeção e rastreamento de células marcadas com PKH26. Nesses experimentos, não foi observada fagocitose celular que justifique a intensa quantidade de células marcadas no linfonodo (HERMIDA, 2007).

Assim, utilizamos este modelo nesse trabalho para avaliar a influência de estímulos inflamatórios na atração de células ao sítio inicial da inoculação e migração de células infectadas ou carreando moléculas do parasito para o linfonodo drenante. Além disso, exploramos as populações de fagócitos mononucleares capazes de se infectar com *Leishmania* e capazes de transportar o parasito ou moléculas do parasito do sítio inflamatório para o linfonodo regional responsáveis pela disseminação do parasito no hospedeiro mamífero. Com base nessas informações, nossa hipótese é a de que fagócitos mononucleares inflamatórios com diferentes fenótipos têm capacidade migratória alterada o que, de certa forma, pode contribuir para a disseminação da *Leishmania* do sítio de infecção para o linfonodo drenante e interferir na resposta imuno-inflamatória contra o parasito.

### 3 JUSTIFICATIVA

Uma série de estudos por outros autores tem demonstrado que células fagocíticas ao englobarem *Leishmania* (MOLL et al., 1993) ou outras partículas (RANDOLPH et al., 1999), adquirem a capacidade de migrar para linfonodos regionais. Há controvérsias, porém, a respeito do tipo de célula responsável pelo transporte de *Leishmania* do sítio primário de infecção ao linfonodo drenante e sobre a capacidade desses fagócitos de iniciar uma resposta imune adaptativa adequada contra o parasito (FIORINI; MESSINA; BARRACCHIA, 2002; LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007; MOLL et al., 1993; MURAILLE et al., 2003; RANDOLPH et al., 1999).

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.

Recentemente, adaptamos em nosso laboratório um sistema que permite o rastreamento de fagócitos mononucleares da cavidade peritoneal para o linfonodo de drenagem em camundongos com peritonite induzida por tioglicolato. Os fagócitos mononucleares da peritonite induzida por tioglicolato são susceptíveis à infecção com *Leishmania* e têm sua aderência ao tecido conjuntivo diminuída após a infecção com o parasito (CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006). Em um estudo preliminar, examinamos o fenótipo dos fagócitos mononucleares presentes nesse exsudato e a

susceptibilidade de cada uma dessas populações celulares à infecção com *Leishmania*. Observamos que 78% expressam CD11b; 65% expressam o antígeno F4/80, e 28% expressam CD11c. A taxa de infecção foi mais alta em células CD11b<sup>+</sup> que em células CD11b<sup>-</sup>: CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> (77%), CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> (68%), em comparação com CD11b<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> (33%) e CD11b<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> (30%). Ambos os fenótipos de células macrofágicas (CD11b<sup>+</sup> e F4/80<sup>+</sup>) e dendríticas mielóides (CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) tiveram alta infecção (HERMIDA, 2007).

A identificação das populações celulares que apresentam sua capacidade migratória alterada pela infecção com *Leishmania* contribuirá para um melhor entendimento dos mecanismos relacionados à disseminação da *Leishmania* e outros patógenos intracelulares. Pode, ainda, abrir perspectivas para a identificação de alvos moleculares a serem utilizados na concepção de novas abordagens terapêuticas de doenças associadas ao endereçamento inadequado de células fagocíticas mononucleares.

Desde que essas células sejam susceptíveis à infecção com *Leishmania* e tenham sua aderência ao tecido conjuntivo modulada pela infecção, a utilização do modelo com as adaptações descritas aqui permitirá a confirmação de hipóteses geradas em estudos *in vitro* sobre adesão e migração celular. Permitirá 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 *in vivo* e até mesmo na identificação do fagócito responsável pela disseminação do parasito.

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.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

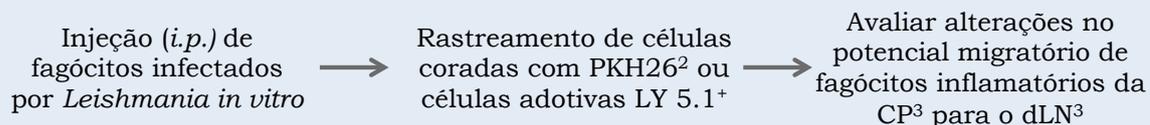
Identificar potenciais vias de transporte de *Leishmania* do sítio inflamatório para o linfonodo e sua modulação pelo parasito

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

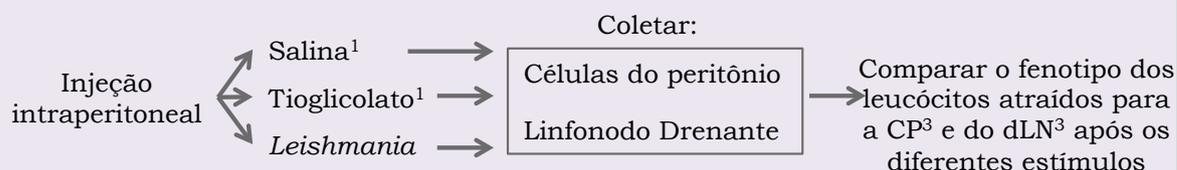
- 1) Avaliar se há alteração da intensidade de migração de populações de fagócitos peritoneais inflamatórios da cavidade peritoneal para o linfonodo drenante após a infecção *in vitro* por *Leishmania*;
- 2) Comparar o fenótipo dos leucócitos atraídos para a cavidade peritoneal e do linfonodo drenante após os estímulos inflamatórios com tioglicolato ou *Leishmania*;
- 3) Comparar a migração de fagócitos da cavidade peritoneal ao linfonodo drenante após os estímulos inflamatórios com tioglicolato ou *Leishmania*;
- 4) Examinar o efeito do contato com *Leishmania* na capacidade migratória *in vivo* de diferentes subpopulações de fagócitos;
- 5) Definir a cinética e potenciais vias de disseminação do parasito *Leishmania* do sítio de injeção para o linfonodo drenante, utilizando um modelo de migração *in vivo*.

## 5. DESENHO EXPERIMENTAL

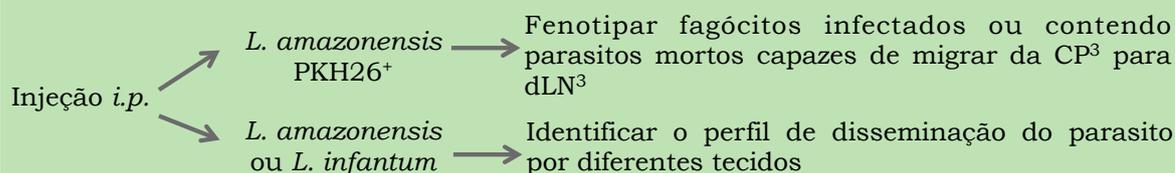
### ESTUDO SOBRE FAGÓCITOS QUE TÊM O PERFIL DE MIGRAÇÃO ALTERADO PELA INFECÇÃO



### FENÓTIPO DOS LEUCÓCITOS ATRAIDAS A CAVIDADE PERITONEAL OU MIGRANTES PARA O LINFONODO DRENANTE



### ESTUDO DA CINÉTICA E POTENCIAIS VIAS DE DISSEMINAÇÃO DO PARASITO *LEISHMANIA* DO SÍTIO DE INJEÇÃO PARA O LN<sup>3</sup>



<sup>1</sup> Dados coletados da dissertação de mestrado (Hermida, 2007)

<sup>2</sup> Dados sobre a caracterização das células peritoneais que foram coletadas da dissertação de mestrado (Hermida, 2007)

<sup>3</sup> CP- Cavidade peritoneal; dLN - Linfonodo

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### **CONSIDERAÇÕES ÉTICAS:**

Os experimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com a Lei Brasileira Federal em Experimentação Animal (Lei 11794) (SALDANHA MACHADO et al., 2009) ([http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato20072010/2008/lei/111794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato20072010/2008/lei/111794.htm)). Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM)-FIOCRUZ (Ceua, licença N. 018/2009).

### **ANIMAIS:**

Camundongos das linhagens BALB/c, C57Bl/6, C57BL/6 SJL de seis-oitos semanas de idade, independente do sexo, foram obtidos do biotério do CPqGM-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 libitum*. Foram utilizados de três a seis camundongos por experimento.

A migração de células do peritônio para o linfonodo paratímico foram avaliados com experimentos de transferência e rastreamento de células adotivas, usando imunofluorescência e citometria de fluxo como técnicas de análise. As mudanças morfológicas presentes no linfonodo durante a migração dos leucócitos foram confirmadas pela microscopia óptica convencional.

### **PERITONITE INDUZIDA POR TIOGLICOLATO E PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DO LINFONODO DRENANTE:**

Camundongos das linhagens BALB/c, C57Bl/6, C57BL/6 SJL foram injetados com 3ml da solução estéril de tioglicolato a 3% (Sigma, EUA) ou apenas com salina estéril. Três a quatro dias depois do estímulo com tioglicolato as células do exsudato peritoneal (PEC) e o linfonodo drenante

paratímico foram coletados. A escolha do terceiro a quarto dia definidos para o estudo da migração de células foi definido com base nos dados da publicação de Bellingan e colaboradores (1996) (BELLINGAN, 1996) e nos resultados dos experimentos de cinética realizados em nosso laboratório (HERMIDA, 2007). As PEC 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.

O Linfonodo paratímico foram fixados em solução de Bouin para análise histologia ou criopreservados em meio para congelamento (Tissue-Teck, Sakura, USA) e depois cortados no cirostato. Para avaliação das células do linfonodo para citometria de fluxo eles foram cortados em pequenos fragmentos. Digeridos com colagenase D (0.5 mg/ml, Boehringer-Mannheim, Alemanha) e diluído em meio RPMI 1640 suplementado com 3% de Soro Fetal Bovino (Cultilab) e 0,1% DNase I (Roche Diagnostic, Alemanha) por 10 minutos a 37°C em agitação contínua. A suspensão de células foi filtrada através de gaze e lavada duas vezes em PBS suplementado com 5% de SFB e 5 mM EDTA contendo 5 mg/ml DNase I. Depois do isolamento as células foram preparadas para marcação com anticorpos específicos ou levadas para cultura. O número de células coletados de cada animal foram estimados usando a câmara de Neubauer. A viabilidade das célula foi medida usando a técnica de exclusão por trypan blue. Todos os experimentos foram executados com não menos que 90% de viabilidade das células. A população de células foi morfológicamente definida em lamínas com citocentrifugado de células e identificação por anticorpo específicos através da citometria de fluxo.

#### **ANÁLISE HISTOLÓGICA:**

Depois da fixação com solução de Bouin os linfonodos paratímicos foram mergulhados em parafina e emblocados. Secções de 4-5 µm de espessura foram cortados e corados com haematoxilina e eosina (H&E). As secções foram examinadas em conjunto com o patologista (WLCS) tendo em conta os parâmetros de identificação de células descrito abaixo.

### **IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS LEUCÓCITOS PRESENTES NO EXSUDATO PERITONEAL E NOS LINFONODOS DRENANTE:**

A identificação morfológica das células recrutadas na cavidade peritoneal depois do estímulo inflamatório foi feita usando lamínas preparadas com células citocentrifugadas e coradas por método de Papanicolau. As células do linfonodo drenante foram usadas secções coradas com H&E. As seguintes características foram usadas para identificação das diferentes populações de leucócitos: (1) Linfócitos: células com núcleos redondo contendo cromatina condensada, nucléolos discretos, e citoplasma escasso. (2) Macrófagos: células grandes com núcleo oval ou reniforme com cromatina frouxamente embalado rodeado por uma borda de citoplasma eosinofílico. No grupo de animais injetados com tioglicolato, alguns destes macrófagos continham grandes vacúolos citoplasmáticos, presumivelmente por causa da fagocitose de partículas de ágar presentes no meio de tioglicolato (EICHNER; SMEATON, 1983). (3) Granulócitos: células com núcleos altamente lobulados com cromatina densa.

### **CULTIVO DOS PARASITOS:**

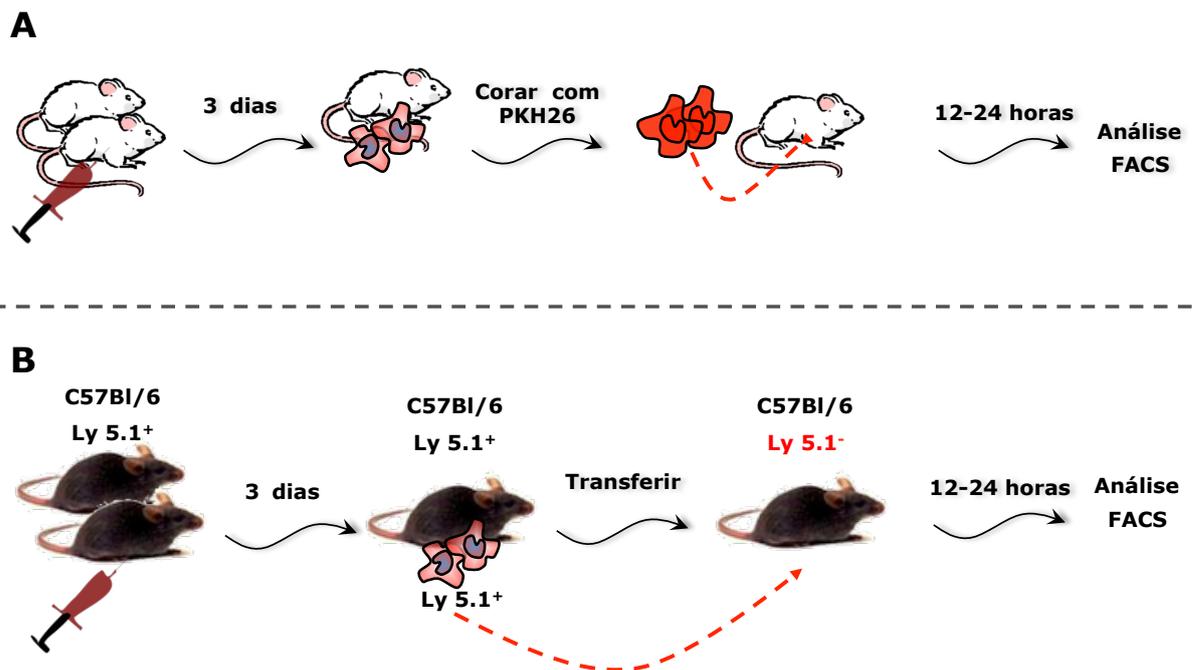
As promastigotas de *L. amazonensis* (cepa MHOM/Br88/Ba-125) e *L. chagasi* (MHOM/BR2000/Merivaldo2) foram isoladas de camundongos da linhagem BALB/c e cultivadas *in vitro* em meio de Schneider's (Sigma, USA) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB; Cultilab, Brasil) a 22°C. Os parasitos na fase 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.

### **EXPERIMENTO COM TRANSFERÊNCIA E RASTREAMENTO DE CÉLULAS ADOTIVAS:**

A migração de células do peritônio para o linfonodo drenante foi confirmada pela injeção e rastreamento de células marcadas com corante PKH26 (marcador lipofílico fluorescente vermelho Sigma, EUA). E resumo, camundongos da linhagem BALB/c foram estimulados com tioglicolato ou *L. amazonensis* intraperitonealmente (*i.p.*). Após três dias as PEC foram coletadas e coradas *in vitro* com PKH26 de acordo com as descrições do

fabricante. Subsequentemente,  $1 \times 10^7$  células coradas foram injetadas *i.p.* em animais recipientes. Vinte e quatro horas após a transferência, as PEC e linfonodo paratímico foram coletados (Figura 4 A). As PEC foram citocentrifugadas em lamínas ou preparadas para marcação contra anticorpos específicos para aquisição no citômetro de fluxo. Os linfonodos paratímicos foram mergulhados em meio para congelamento (Sakura, EUA) e secções foram cortadas em criostato e colocadas em lamínas para avaliação na microscopia de fluorescência. As PEC e as secções dos linfonodos paratímicos foram montadas com Vectashield contendo DAPI (Vector, EUA) e a distribuição das células coradas foram determinadas através do microscópio de fluorescência. Os parâmetros para identificação da intensidade de fluorescência foram determinados através de escores definidos entre 0+ a 4+. Onde 0+ apresenta nenhuma fluorescência; 1+ intensidade de fluorescência (IMF) fraca; 2+ média IMF; 3+ e 4+ alta IMF.

Em alguns experimentos as células dos linfonodos paratímicos coletados foram dissociadas e tratadas contra anticorpos para avaliação na citometria de fluxo. Outros modelos de migração e rastreamento de células foram realizados sempre utilizando o mesmo tratamento entre os animais. Tais como, transferência de células entre animais da linhagem C57BL/6 JSL que possuem células Ly5.1<sup>+</sup> e transferimos para animais da linhagem C57BL/6 os quais apresentam células Ly5.1<sup>-</sup> (Figura 4B); e transferência de células entre animais com MHC-I diferente, ou seja, transferência de células de C57BL/6 (expressão H-2K<sub>b</sub>) para animais BALB/c (não expressão H-2K<sub>b</sub>). Seguimos o mesmo procedimento descritos com as células do peritônio e linfonodo coradas com PKH26.



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

#### ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO:

As PEC e células do linfonodo paratímico foram lavadas, contadas e ressuspensas em tampão de FACS (PBS, contendo 2mM de azida, 5% de SFB) por 30 minutos para bloqueio das ligações inespecíficas. As células ( $1-2 \times 10^6$  células/marcação) foram incubadas com anticorpos ligados a isotiocianato de Fluoresceína (FITC): anti-CD11b (M1/70), anti-CD3e (145-2C11), anti-CD45R/B220 (RA3-6B2), anti-I-A<sup>d</sup> (AMS-32.1), anti-GR-1 (RB6-8C5) (BD-Pharmingen; San Jose, Califórnia, EUA) e anti-antígeno F4/80 (R1-2; Caltag; San Diego, Califórnia, EUA); phicoeritrina conjugates (PE): anti-F4/80 (R1-2; Caltag, EUA), anti-H2kb (AF6-88.5) e anti-CCR5 (BD-Pharmingen; San Jose, Califórnia, EUA); e anticorpo biotilado: anti-CD11c (HL3), CD45.1 (A20; BD-Pharmingen; San Jose, Califórnia, USA) e anti-CCR7 (Y59; Abcam, EUA) seguidos por streptoavidina conjugada a Cy-5 (BD-Pharmingen; San Jose, Califórnia, EUA). Todos os anticorpos foram previamente titulados para determinação da concentração ideal de uso. Todas as incubações com anticorpos foram feitas a 4°C por vinte minutos e foram seguidas por três lavagens 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). Cinquenta mil eventos foram analisados por amostra (PINHEIRO *et al.*, 2006). Os parâmetros para definição das populações celulares foram descritos em estudos prévios (LAGASSE; WEISSMAN, 1996; NIBBERING; LEIJH; VAN FURTH, 1987; PULENDRAN *et al.*, 1999; VREMEC; SHORTMAN, 1997; WU; LI; SHORTMAN, 1996; WU *et al.*, 2004). Por exemplo, a expressão de CD11b e antígeno F4/80 foram definidos como macrófagos, populações de células com alta granulosidade e a alta expressão de GR-1 foram definidas os neutrófilos, os linfócitos T foram às células positivas para CD3 e os linfócitos B foram células positivas para B220.

#### **INFECÇÃO DE FAGÓCITOS INFLAMATÓRIOS POR *LEISHMANIA*:**

Os fagócitos 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* na fase estacionária a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A infecção foi feita na proporção de 10 parasitos:1 fagócito. Os parasitos foram ressuspensos na concentração de 2x10<sup>7</sup>/ml e incubados com as células na concentração de 2x10<sup>6</sup>/ml, por um período de dezoito a vinte e quatro horas. Depois da incubação as células foram lavadas e reinjetadas em animais recipientes ou foram tratadas com anticorpos para aquisição na citometria de fluxo.

#### **CINÉTICA DE DISSEMINAÇÃO DE *LEISHMANIA* DO SÍTIO INFLAMATÓRIO PARA O LINFONODO DRENANTE:**

Camundongos da linhagem BALB/c foram injetados intraperitonealmente com 1 x 10<sup>8</sup> promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. chagasi* em fase estacionária de crescimento em cultura. Nos períodos de 30 min, uma, duas, quatro, seis ou 24 horas os animais serão sacrificados, a cavidade peritoneal foi lavada para coleta das células e os linfonodos paratímicos foram coletados. As células da cavidade peritoneal e as dos linfonodos paratímicos

foram cultivadas para isolamento do parasito. Em resumo: as células peritoneais e do linfonodo drenante de camundongos injetados com *Leishmania* foram isoladas e cultivadas *in vitro* em meio Schneider's (Sigma, EUA) suplementado com 20% Soro Fetal Bovino (SFB; Cultilab, Brasil) a 24°C (PARANHOS-SILVA et al., 2003) em placa de 24 poços. As células de cada animal foram diluídas em série na concentração inicial de 1:5. As placas foram analisadas diariamente durante 10 dias para identificação do ponto inicial de surgimento do parasito entre as células peritoneais ou do linfonodo drenante. Três animais foram injetados com *Leishmania* e três injetados com salina em todos os tempos examinados e os experimento foram repetidos pelo menos em três diferentes oportunidades.

#### **EXPRESSÃO E ANALISE DOS RESULTADOS:**

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).

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DO PERITÔNIO PARA O LINFONODO DRENANTE**

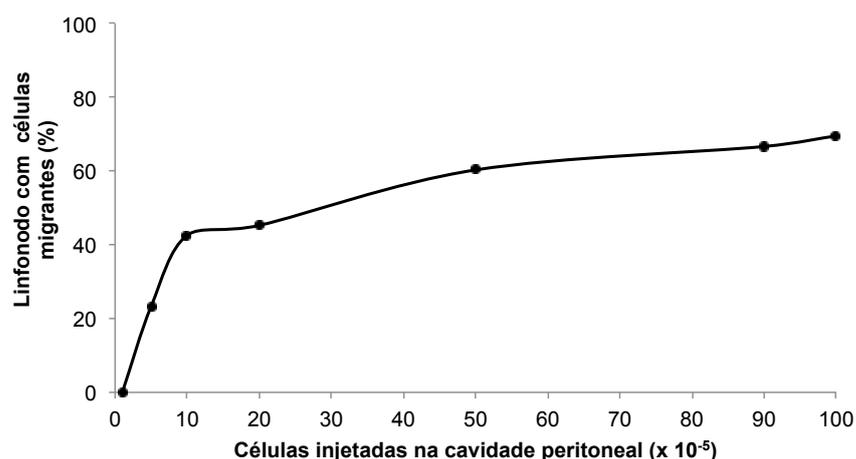
Inicialmente, estabelecemos as condições experimentais para a utilização do modelo de migração celular descrito por Bellingan e colaboradores (BELLINGAN et al., 1996). Dessa forma, pretendemos entender se a desadesão de fagócitos infectado ao tecido conjuntivo, observada nos experimentos *in vitro* descrito pelo nosso grupo (CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006), representa permanência ou migração do fagócito infectado para o linfonodo drenante. Inicialmente, definimos a curva dose resposta entre o número e a migração de células para o linfonodo paratímico.

#### **7.1.1 DEFINIÇÃO CURVA DOSE-RESPOSTA DA MIGRAÇÃO DE FAGÓCITOS PERITONEAIS INFLAMATÓRIOS AO LINFONODO DRENANTE**

Fagócitos inflamatórios corados com PKH26 foram injetados na cavidade peritoneal de camundongos, em diferentes concentrações e, após 24 horas, os linfonodos para-tímicos foram cortados no criostato e observados no microscópio de fluorescência para identificação de células migrantes. Foram estimadas a proporção de linfonodos contendo células migrantes e a intensidade de migração celular com base na intensidade de fluorescência vermelha observada nos linfonodos.

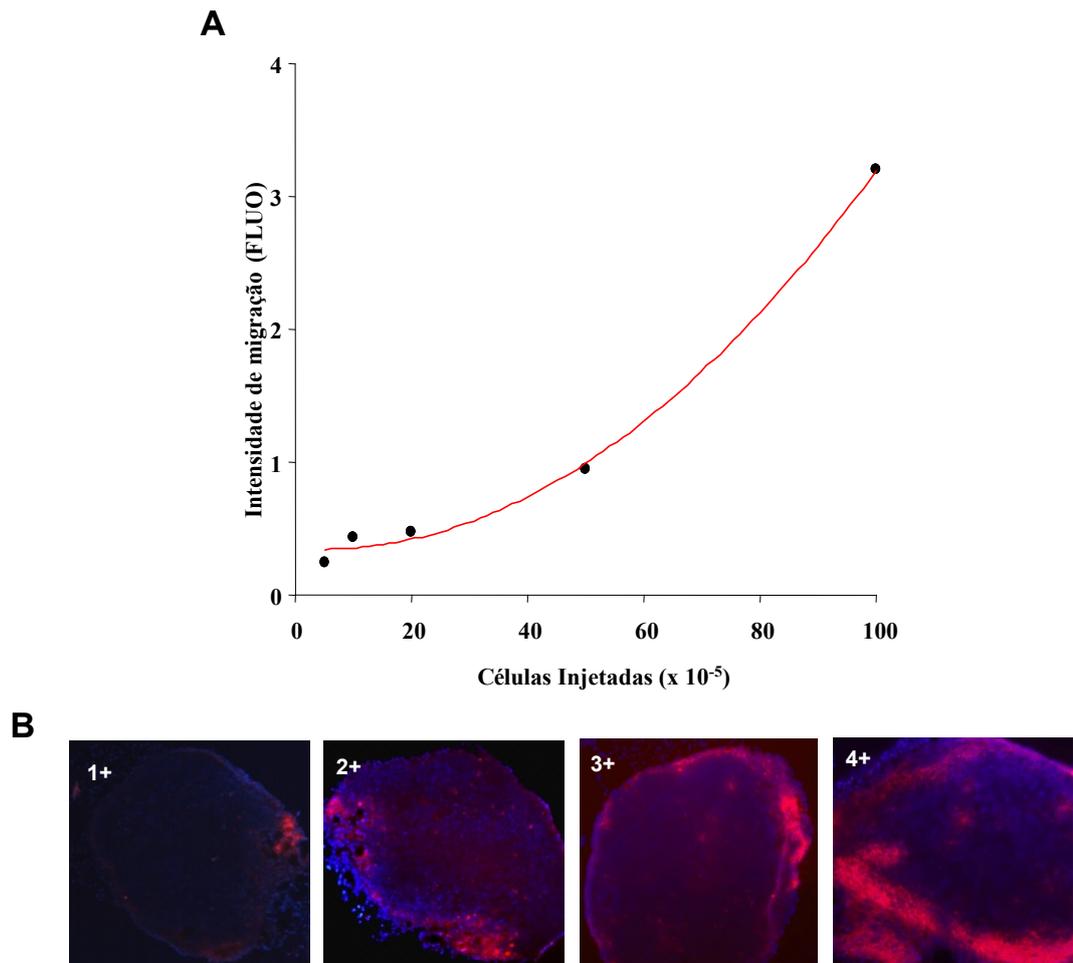
Após a injeção de  $1 \times 10^5$  células na cavidade peritoneal não foram observadas células migrantes nos linfonodos paratímicos. Foram

utilizados três animais por experimento com uma média de cinco linfonodos coletados de cada animal. A injeção de  $5 \times 10^5$  células na cavidade peritoneal resultou na observação de células migrantes em  $23 \pm 7\%$  dos linfonodos dos animais injetados em três experimentos com oito animais cada. A injeção de  $1 \times 10^6$  células na cavidade peritoneal resultou na observação de células migrantes em  $43 \pm 8\%$  dos linfonodos dos animais injetados três experimentos com quatro animais cada. A injeção com  $2 \times 10^6$  células resultou na observação de  $45 \pm 15\%$  células migrantes dos linfonodos dos animais injetados em três experimentos com uma média de três animais em cada. Os linfonodos dos animais que foram injetados com  $5 \times 10^6$  resultou em  $60 \pm 9\%$  de células migrantes nos três experimentos com três animais em cada. A injeção de  $9 \times 10^6$  células na cavidade peritoneal resultou na observação de células migrantes em  $67 \pm 0\%$  dos linfonodos dos animais injetados em um experimento com um animal. No grupo de animais que foram injetados  $1 \times 10^7$  células na cavidade peritoneal,  $70 \pm 15\%$  dos linfonodos dos animais injetados apresentaram células migrantes nos três experimentos com uma média de dois animais cada (Figura 5).



**Figura 5. Percentual dos linfonodos contendo células migrantes do peritônio 24h após a injeção de diferentes concentrações de células na cavidade peritoneal.** Fagócitos inflamatórios corados com PKH26 foram injetados na cavidade peritoneal de camundongos, em diferentes concentrações. Após 24 horas os linfonodos paratímicos foram cortados no criostato e examinados no microscópio de fluorescência, para identificação de células migrantes. O gráfico representa a média percentual dos linfonodos que apresentaram células migrantes entre os três experimentos.

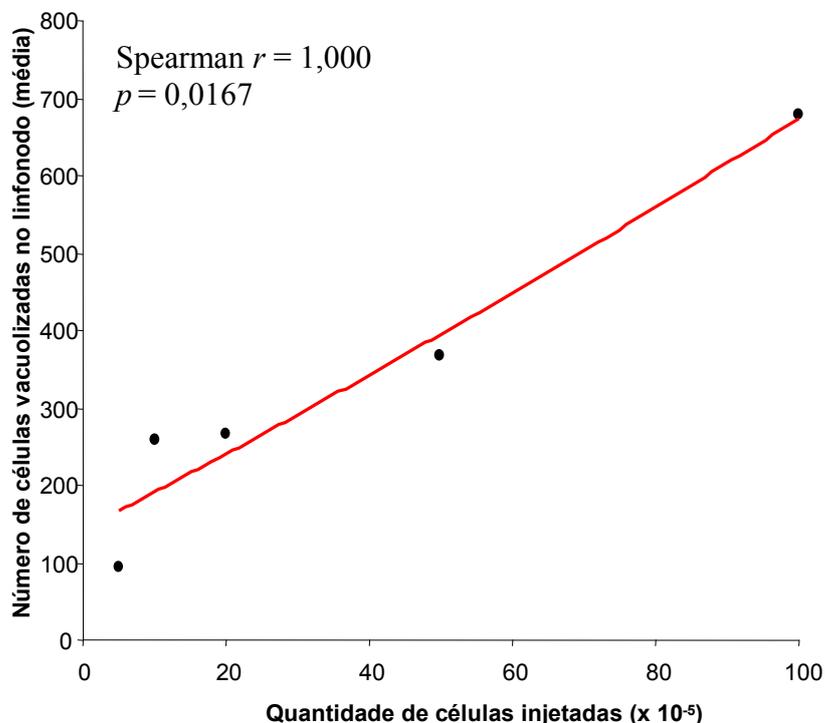
Quanto à intensidade de fluorescência, como um parâmetro indicativo do número de células migrantes, foram feitas as seguintes observações: no grupo de animais que foram injetados com  $1 \times 10^7$  de células coradas com PKH26 na cavidade peritoneal, resultou em uma migração de células para o linfonodo com intensidade de fluorescência de 3+ e 4+. Essa intensidade diminuiu de acordo com a redução do número de células injetadas. A injeção de  $5 \times 10^6$  células na cavidade peritoneal, resultou na observação de uma intensidade de fluorescência média (2+) e fraca (1+) dos linfonodos dos animais injetados. Nos animais injetados com  $2 \times 10^6$  e  $1 \times 10^6$  células na cavidade peritoneal, os linfonodos apresentaram uma intensidade de fluorescência fraca de 1+, ou nenhuma fluorescência (0+). Após a injeção de  $5 \times 10^5$  células na cavidade peritoneal não foi observada intensidade de fluorescência na maioria dos linfonodos (Figura 6).



**Figura 6. Intensidade fluorescência relativa ao número de fagócitos PKH26<sup>+</sup> presentes no linfonodo paratímico 24 h após a injeção na cavidade peritoneal.** Fagócitos mononucleares inflamatórios corados com PKH26 foram injetados na cavidade peritoneal de camundongos, em diferentes concentrações. Após 24 horas os linfonodos paratímicos foram cortados no criostato e examinados no microscópio de fluorescência, para identificação da intensidade de fluorescência. (A) Gráfico de dispersão com uma curva de tendência que relaciona o número de células injetadas no peritônio com a média da intensidade de fluorescência observada nos linfonodos 24h após a injeção das células na cavidade peritoneal. FLUO= média dos escores da intensidade de fluorescência. (B) Imagens representativas de linfonodos paratímicos coletados de animais que tiveram diferentes concentrações de células injetadas na cavidade peritoneal, os quais definiram o escore de intensidade de fluorescência: (1+) fraca, (2+) média, (3+) alta, (4+) muito alta.

Para confirmar esses dados, observamos as lâminas dos linfonodos paratímicos corados com H&E do experimento anterior. Avaliamos o número de fagócitos vacuolizados presente nesses linfonodos. Após a injeção de  $1 \times 10^7$  células na cavidade peritoneal, observou-se o maior número de células vacuolizadas no linfonodo se comparado ao linfonodos dos animais que foram injetadas concentrações menores de

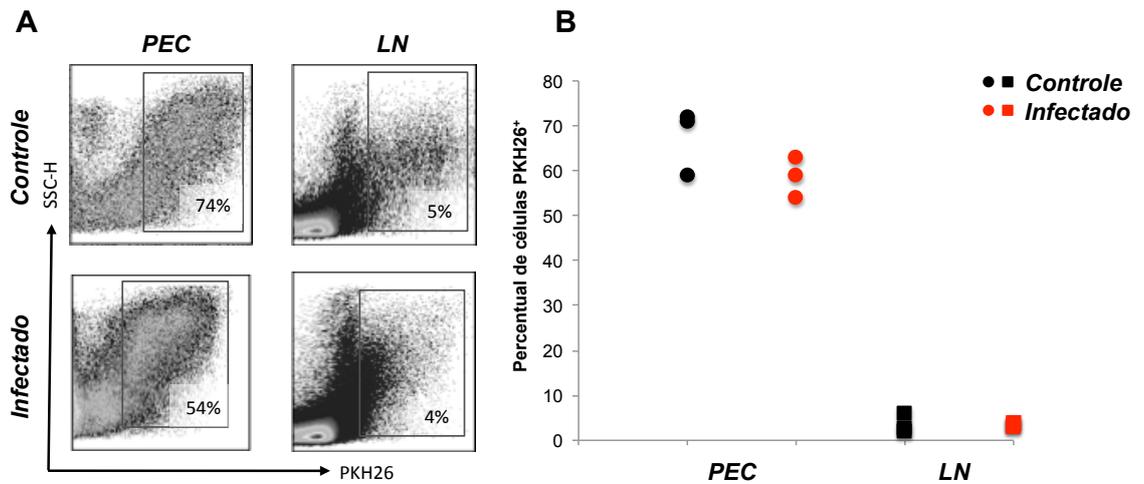
células corados com PKH26 ( $r=1,000$  e  $p=0,0167$ ; teste de *Spearman*) (Figura 7).



**Figura 7. Relação entre o número de fagócitos injetadas no peritônio e o número de fagócitos vacuolizadas presentes no linfonodo drenante.** Fagócitos mononucleares inflamatórios corados com PKH26 foram injetados na cavidade peritoneal de camundongos, em diferentes concentrações. Após 24 horas os linfonodos paratímicos foram cortados no criostato e examinados no microscópio ótico, para identificação de células vacuolizadas.

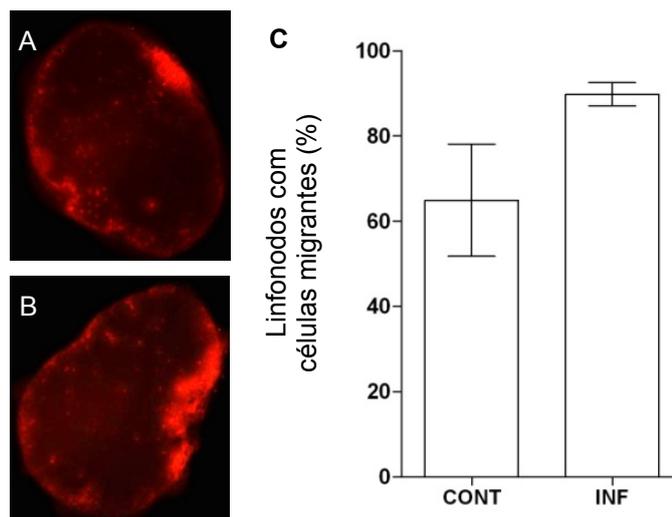
### 7.1.2 EFEITO DA INFECÇÃO POR *L. AMAZONENSIS* NA MIGRAÇÃO DOS FAGOCITOS DO SÍTIO INFLAMATÓRIO PARA O LINFONODO DRENANTE *IN VIVO*

Animais que foram injetados com células não infectadas na cavidade peritoneal, apresentaram o percentual de células PKH26<sup>+</sup> de  $67 \pm 7\%$  entre as PEC e  $4 \pm 2\%$  entre as células dos linfonodos drenante. Nos animais que foram injetados com células incubadas com *L. amazonensis* na cavidade peritoneal, a proporção de células PKH26<sup>+</sup> foi  $59 \pm 5\%$  entre as PEC e  $4 \pm 1\%$  entre as células dos linfonodos drenante (Figura 8).



**Figura 8. Percentual de fagócitos PKH26<sup>+</sup> presentes na cavidade peritoneal e no linfonodo drenante 24h após a sua injeção.** Fagócitos coletados de animais estimulados com tioglicolato por quatro dias foram coletados e infectados por *L. amazonensis* ou incubados apenas com meio por 18 horas. Após, foram corados com PKH26<sup>+</sup> e injetados na cavidade peritoneal. Os fagócitos peritoneais e do linfonodo PKH26<sup>+</sup> foram comparados entre os grupos infectados e não infectados. (A) *Dot plot* representativo de três experimentos. (B) Gráfico comparativo do número de células PKH26<sup>+</sup> presentes na cavidade peritoneal e linfonodo entre os dois grupos avaliados, os pontos referem-se a cada experimento.

As células injetadas migrantes se localizavam principalmente no seio capsular no linfonodo e com pequenos agregados de células na região medular (Figura 9 A-B). Contudo, a frequência de linfonodos contendo células migrantes foi maior nos animais injetados com células pre-incubadas com *L. amazonensis* (Figura 9 B) ( $90 \pm 5\%$ ) do que nos animais injetados com células não infectadas (Figura 9 B) ( $65 \pm 26\%$ ). Tal diferença foi estatisticamente significativa em somente um dos cinco experimentos (Figura 9 C).



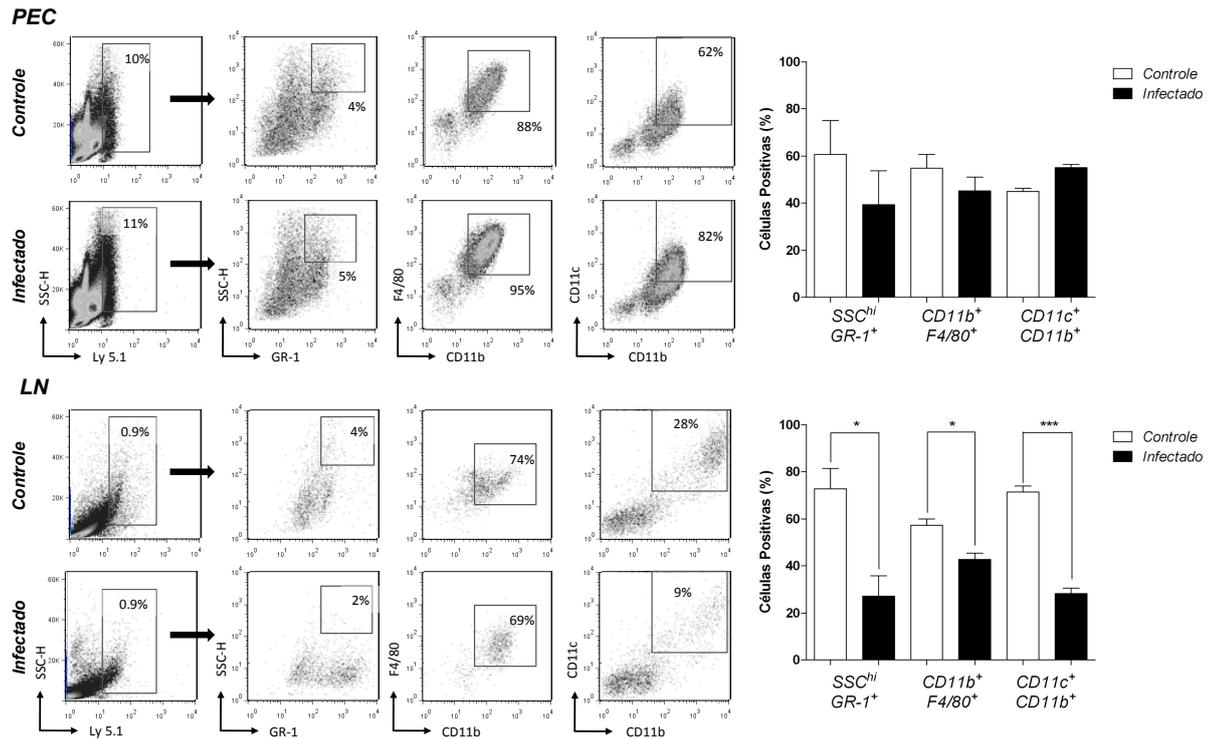
**Figura 9. Ensaio de transferência de células coradas com fluorocromo vermelho comparando migração entre células infectadas ou não por *L. amazonensis*.** (A) linfonodo representativo do grupo de animais que receberam células não infectadas, (B) linfonodo representativo do grupo de animais que receberam células infectadas e (C) comparação do percentual de linfonodos que apresentaram migração de células da cavidade peritoneal entre o grupo de animais que receberam células infectadas (INF) ou não (CONT) por *L. amazonensis*.

### **7.1.3 FENOTIPAGEM DOS FAGÓCITOS INFECTADOS IN VITRO CAPAZES DE MIGRAR DO SÍTIO INFLAMATÓRIO PARA O LINFONODO DRENANTE**

Normalmente após o estímulo inflamatório por tioglicolato há uma atração média de  $2 \times 10^7$  célula para a cavidade peritoneal. Nos experimentos de transferência adotiva nos injetamos  $1 \times 10^7$  célula corada por PKH26 na cavidade peritoneal. Com base nisso, a proporção de células PKH26<sup>+</sup> esperada nos animais vinte e quatro horas após sua injeção deveria ser entre 20-30% do total de células peritoneais. Contudo, esse número excedeu o esperado apresentando valores entre 50-70% de células PKH26<sup>+</sup> (Figura 8). Dessa maneira, nós suspeitamos que um fenômeno tal como trogocitose (GERTNER-DARDENNE et al., 2007) ou a fagocitose de células mortas coradas pelas células do animal receptor pudesse estar interferindo no resultado. Para evitar esse tipo de interferência, nós avaliamos a

migração de células adotivas Ly5.1<sup>+</sup> em animais recipientes Ly5.1<sup>-</sup>. Vinte e quatro horas após a injeção de células Ly 5.1<sup>+</sup> incubadas somente com meio na cavidade peritoneal, as células adotivas representavam  $11 \pm 2\%$  dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal e  $1.12 \pm 0.39\%$  das células migrantes presentes no linfonodo drenante. Entre os fagócitos Ly 5.1<sup>+</sup> presentes na cavidade peritoneal,  $61 \pm 25\%$  eram neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>),  $55 \pm 10\%$  eram macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e  $45 \pm 25\%$  eram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>). Entre as células migrantes (Ly 5.1<sup>+</sup>) presentes no linfonodo drenante,  $73 \pm 15\%$  eram neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>),  $57 \pm 5\%$  eram macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e  $72 \pm 4\%$  eram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) (Figura 10).

Vinte e quatro horas após a injeção de células Ly 5.1<sup>+</sup> incubadas com *L. amazonensis*, as células adotivas representavam  $11 \pm 1\%$  dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal e  $1.15 \pm 0.64\%$  das células migrantes presentes no linfonodo drenante. Entre as células Ly 5.1<sup>+</sup> presentes na cavidade peritoneal,  $39 \pm 24\%$  eram neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>),  $45 \pm 10\%$  eram macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e  $55 \pm 2\%$  eram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>). Entre as células migrantes (Ly 5.1<sup>+</sup>) presentes no linfonodo drenante,  $27 \pm 15\%$  eram neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>),  $43 \pm 5\%$  eram macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e  $28 \pm 4\%$  eram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) (Figura 10).

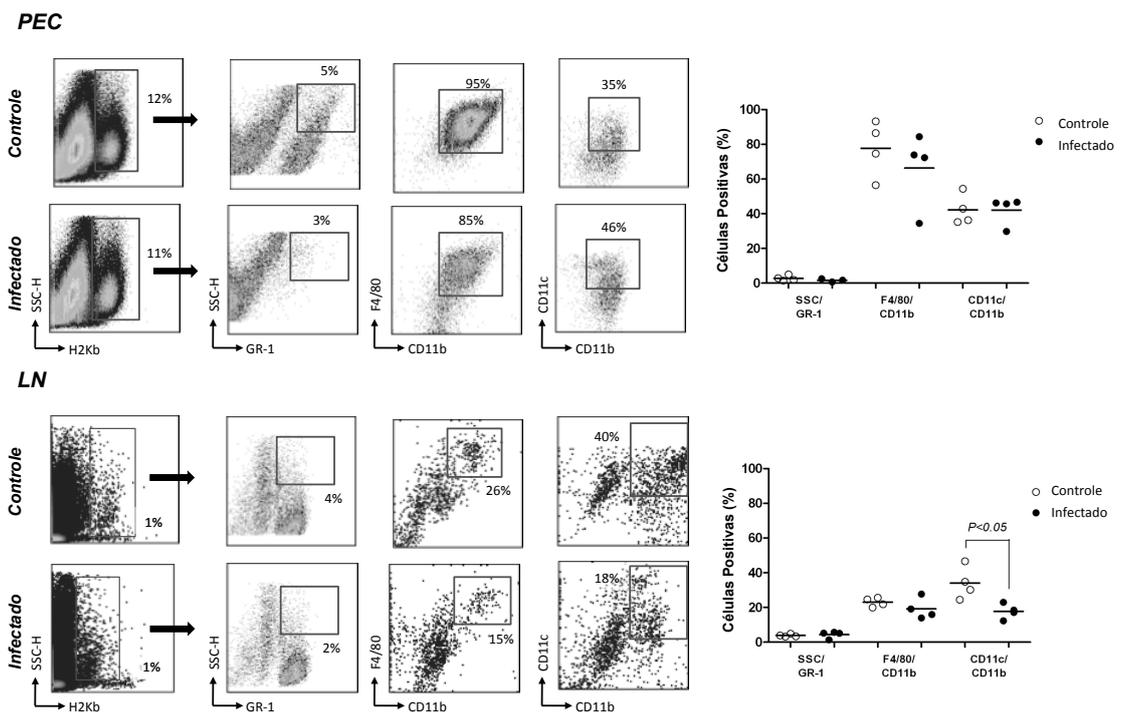


**Figura 10. Análise fenotípica das células Ly 5.1<sup>+</sup> capazes de migrar da cavidade peritoneal para o linfonodo drenante *in vivo* após infecção por *L. amazonensis*.** Camundongo C57BL/6 Ly 5.1<sup>+</sup> foram estimulados com tioglicolato e, após três dias, as células da cavidade peritoneal foram coletadas e incubadas na ausência ou presença de *L. amazonensis* por 24 horas. As células foram então injetadas (*i.p*) em animais C57BL/6 Ly5.1<sup>-</sup> e, depois de 24 horas, as células da cavidade peritoneal e dos linfonodos drenante foram coletadas e os fagócitos migrantes foram caracterizados. Os principais fagócitos foram definidos pela expressão dos marcadores indicados. Os *dot plots* são representativos de dois experimentos diferentes. Os gráficos agrupam os dados relativos dos três experimentos independentes com cinco animais por grupo.

Utilizamos outro modelo de rastreamento celular com transferência de células entre animais com MHC diferentes e observamos resultados similares. Células de camundongos C57BL/6 (H-2Kb<sup>+</sup>) não infectadas ou infectadas foram injetadas no peritônio de camundongos BALB/c (H-2Kb<sup>-</sup>) previamente estimulados com tioglicolato. Nesses experimentos 24 h após a injeção de células não infectadas, as células adotivas representavam  $13 \pm 4\%$  das células presente no peritônio dos animais receptores. Entre essas células,  $3 \pm 1\%$  eram neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>),  $78 \pm 16\%$  eram macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e  $42 \pm 9\%$  eram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>). No linfonodo desses animais,  $1.12 \pm 0.39\%$  das células foram H-2Kb<sup>+</sup>. Entre essas

células migrantes,  $23 \pm 3\%$  eram macrófagos ( $CD11b^+ F4/80^+$ ),  $34 \pm 9\%$  eram células dendríticas mielóides ( $CD11c^+ CD11b^+$ ), e  $4 \pm 1\%$  eram neutrófilos ( $SSC^{hi} GR-1^+$ ) (Figura 11).

No grupo de animais injetados com células infectadas por *L. amazonensis*, a proporção de células  $H-2Kb^+$  no peritônio eram de  $11 \pm 7\%$ . Entre essas células,  $2 \pm 1\%$  eram neutrófilos ( $SSC^{hi} GR-1^+$ ),  $66 \pm 22\%$  eram macrófagos ( $CD11b^+ F4/80^+$ ) e  $42 \pm 8\%$  eram células dendríticas mielóides ( $CD11c^+ CD11b^+$ ). No linfonodo, a proporção das células migrantes  $H-2Kb^+$  eram  $1.15 \pm 0.64\%$ . Entre essas células,  $4 \pm 2\%$  eram neutrófilos ( $SSC^{hi} GR-1^+$ ),  $19 \pm 6\%$  eram macrófagos ( $CD11b^+ F4/80^+$ ) e  $18 \pm 4\%$  eram células dendríticas mielóides ( $CD11c^+ CD11b^+$ ) (Figura 11).



**Figura 11. Análise fenotípica in vivo dos fagócitos infectados ou não por *L. amazonensis* transferidos entre camundongos com MHC diferentes.** Fagócitos inflamatórios coletados de camundongos C57BL/6 ( $H-2Kb^+$ ) foram injetados *i.p.* em camundongos BALB/c ( $H-2Kb^-$ ) previamente estimulados com tioglicolato. Após 24 h as PEC e o LN drenante foram coletados e somente as células  $H-2Kb^-$  foram analisadas. As principais populações de fagócitos foram definidas com base na expressão dos marcadores de superfície celular indicados. Os dot plots são representativos de quatro experimentos independentes. Os gráficos agrupam todos os experimentos representados por cada ponto. Cada experimento foi utilizado cinco animais por grupo. Teste estatístico *t student* não pareado (\*  $P < 0,05$ ).

## 7.2 ALTERAÇÕES NAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS PERITONIAIS E DO LINFONODO DRENANTE APÓS A INJEÇÃO COM DIFERENTES ESTÍMULOS

Em experimentos anteriores do nosso grupo, a indução do estímulo inflamatório foi através da injeção de tioglicolato na cavidade peritoneal. Com o intuito de caracterizar as populações de células peritoneais e do linfonodo drenante no contexto de outro estímulo inflamatório injetamos *L. amazonensis*. Dessa forma, pretendemos entender como diferentes estímulos inflamatórios alteram as populações celulares nos diferentes órgãos.

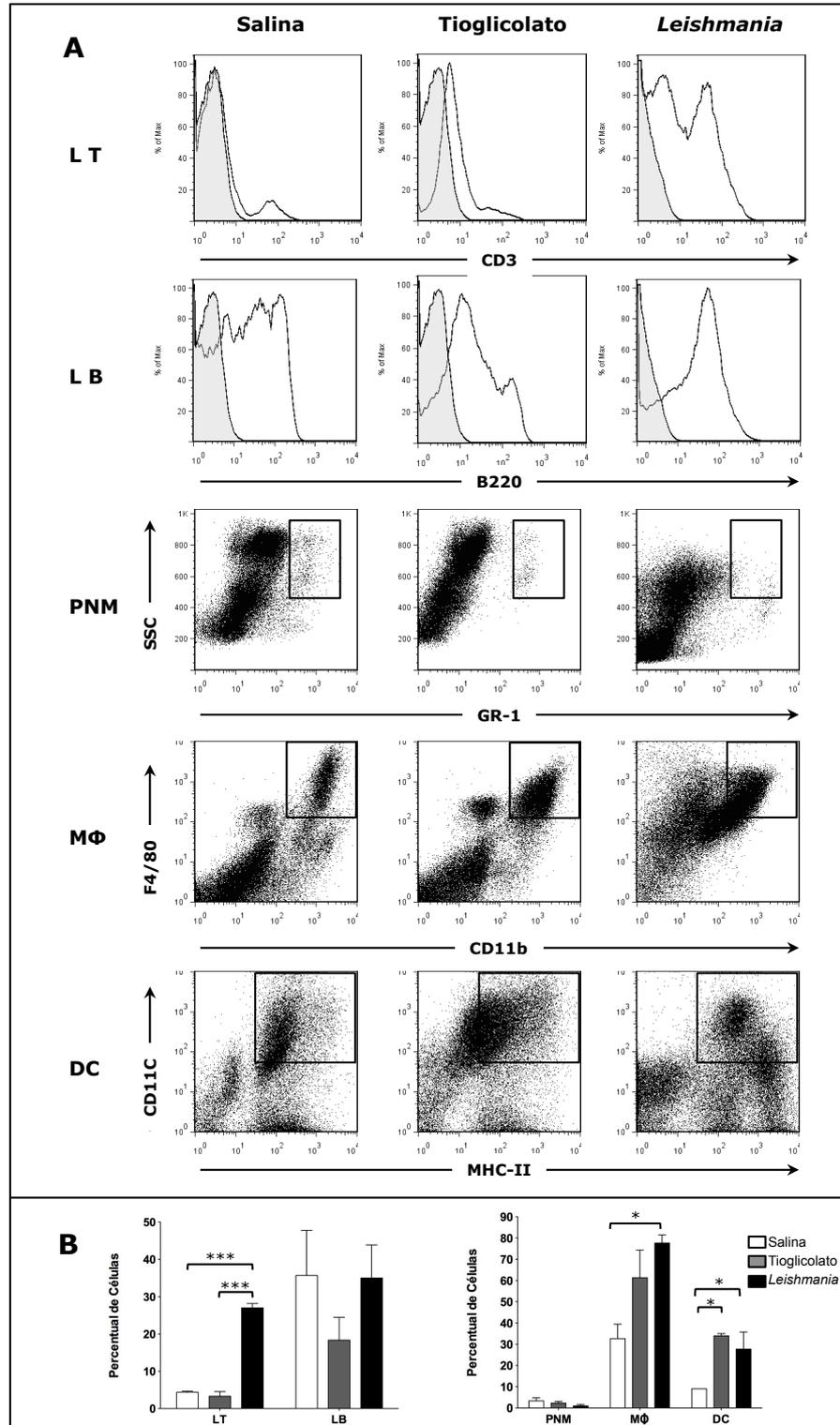
### 7.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PERITONIAIS APÓS INJEÇÃO DE SALINA, TIOGLICOLATO OU *LEISHMANIA*

O número de células peritoneais obtidas nos animais injetados com salina foi entre  $1-2 \times 10^6$  células. Entre essas células, os linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) eram  $4 \pm 1\%$  das células positivas e os linfócitos B (B220<sup>+</sup>) constituíam  $35 \pm 21\%$ . As populações de células fagocíticas eram constituídas por  $3 \pm 1\%$  de neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>),  $33 \pm 12\%$  de macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e  $9 \pm 1\%$  de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>) (Figura 12 A-B). Dentre as células dendríticas presentes no peritônio,  $6 \pm 0.4\%$  eram mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) e  $3 \pm 0.2\%$  delas eram células dendríticas maduras (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>hi</sup>) (Figura 13).

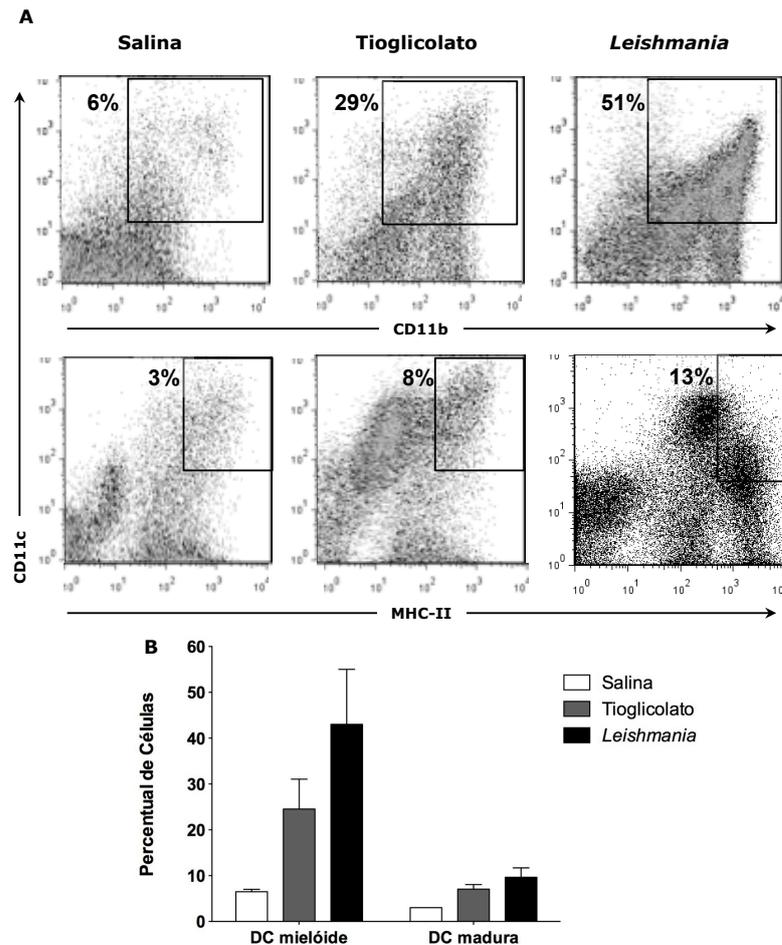
Os animais submetidos a um estímulo inflamatório crônico não infeccioso, com tioglicolato, apresentaram, em média,  $2 \times 10^7$  células na cavidade peritoneal. Os linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) eram  $4 \pm 2\%$  e os linfócitos B (B220<sup>+</sup>) eram  $18 \pm 10\%$  de células positivas. As populações de células fagocíticas eram constituídas por  $2 \pm 1\%$  de neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>),  $61 \pm 21\%$  de macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e  $34 \pm 1\%$  de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>) (Figura 12 A-B). Dessas células dendríticas,  $24 \pm 9\%$  eram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup>

CD11b<sup>+</sup>) e  $7 \pm 1\%$  delas eram células dendríticas maduras (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>hi</sup>) (Figura 13).

As subpopulações peritoneais coletadas quatro dias após a injeção de *L. amazonensis* eram constituídas por  $28 \pm 1\%$  de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) e  $35 \pm 15\%$  de linfócitos B (B220<sup>+</sup>). As populações de células fagocíticas eram constituídas por  $1 \pm 0\%$  de neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>),  $78 \pm 7\%$  de macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e  $28 \pm 14\%$  de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>) (Figura 12 A-B). Entre as células dendríticas presentes no peritônio,  $43 \pm 17\%$  eram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) e  $10 \pm 4\%$  delas eram células dendríticas maduras (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>hi</sup>) (Figura 13).



**Figura 12. Caracterização dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal quatro dias após a injeção de salina, tioglicolato e *Leishmania*.** (A) *Dot plots* representativo de três experimentos nos quais as células peritoneais foram coletadas e analisadas após a injeção de diferentes estímulos. A definição das populações celulares foi baseada na expressão dos marcadores indicados. (B) Representação gráfica das subpopulações celulares presentes na cavidade peritoneal após a injeção de salina, tioglicolato ou *L. amazonensis*; médias de três experimentos independentes com cinco animais em cada grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$  (LT- linfócito T; LB- linfócito B; PNM- polimorfonuclear; MΦ- macrófago; DC- célula dendrítica).



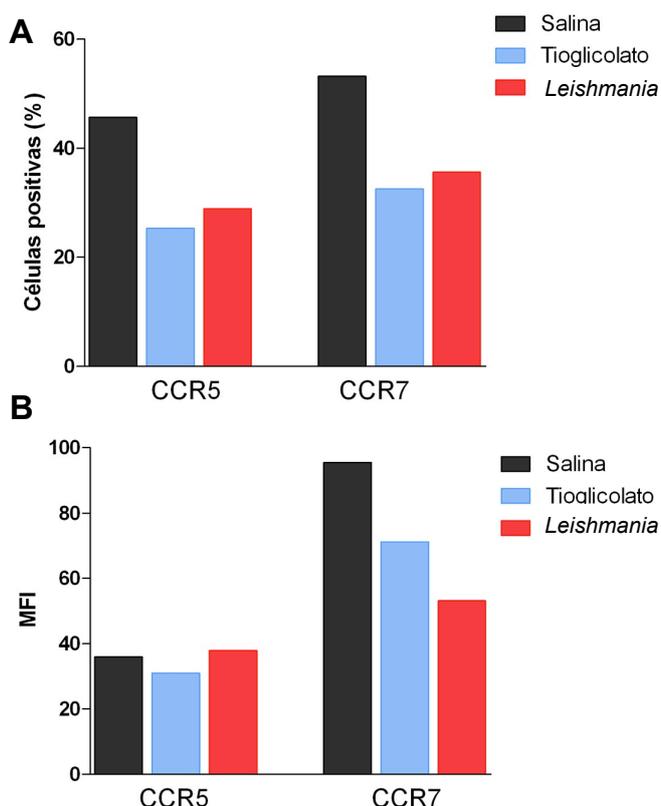
**Figura 13. Caracterização das células dendríticas presentes na cavidade peritoneal quatro dias após a injeção de salina, tioglicolato e *Leishmania*.** (A) *Dot plots* representativo da maturação (CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>hi</sup>) e definição de subtipo mielóide (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) das células dendríticas no peritônio após diferentes estímulos. (B) Representação gráfica das células dendríticas presentes na cavidade peritoneal após a injeção de salina, tioglicolato ou *L. amazonensis*. Dado extraído de dois a três experimentos independentes com cinco animais em cada grupo.

### 7.2.2 AVALIAÇÃO DAS QUIMIOCINAS ENVOLVIDAS NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS PERITONEIAS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES ESTÍMULOS INFLAMATÓRIOS

Para avaliar a potencial resposta migratória das células presentes no exsudato peritoneal para o linfonodo, analisamos a expressão das quimiocinas CCR5 e CCR7. Nos animais que foram injetados com salina, 46% das células eram positivas para o CCR5, e 53% das células eram positivas para o CCR7. Nos animais estimulados com

tioglicolato 25% das células eram positivas para o CCR5, e 32% foram positivas para o CCR7. A infecção *por L. amazonensis* 29% das células eram positivas para o CCR5, e 36% das células eram positivas para o CCR7 (Figura 14 A).

Além disso, avaliamos a média de intensidade de fluorescência (MFI) desses receptores sob os fagócitos coletados da cavidade peritoneal induzidos por diferentes estímulos. Nos animais que foram injetados com salina 36% das células tinham MFI para o CCR5, e 95% das células apresentavam MFI para o CCR7. Nos animais estimulados com tioglicolato 25% das células tiveram MFI para o CCR5, e 32% expressavam MFI para o CCR7. A infecção *por L. amazonensis* 29% das células apresentavam MFI para CCR5, e 36% das células expressavam MFI para o CCR7 (Figura 14 B).



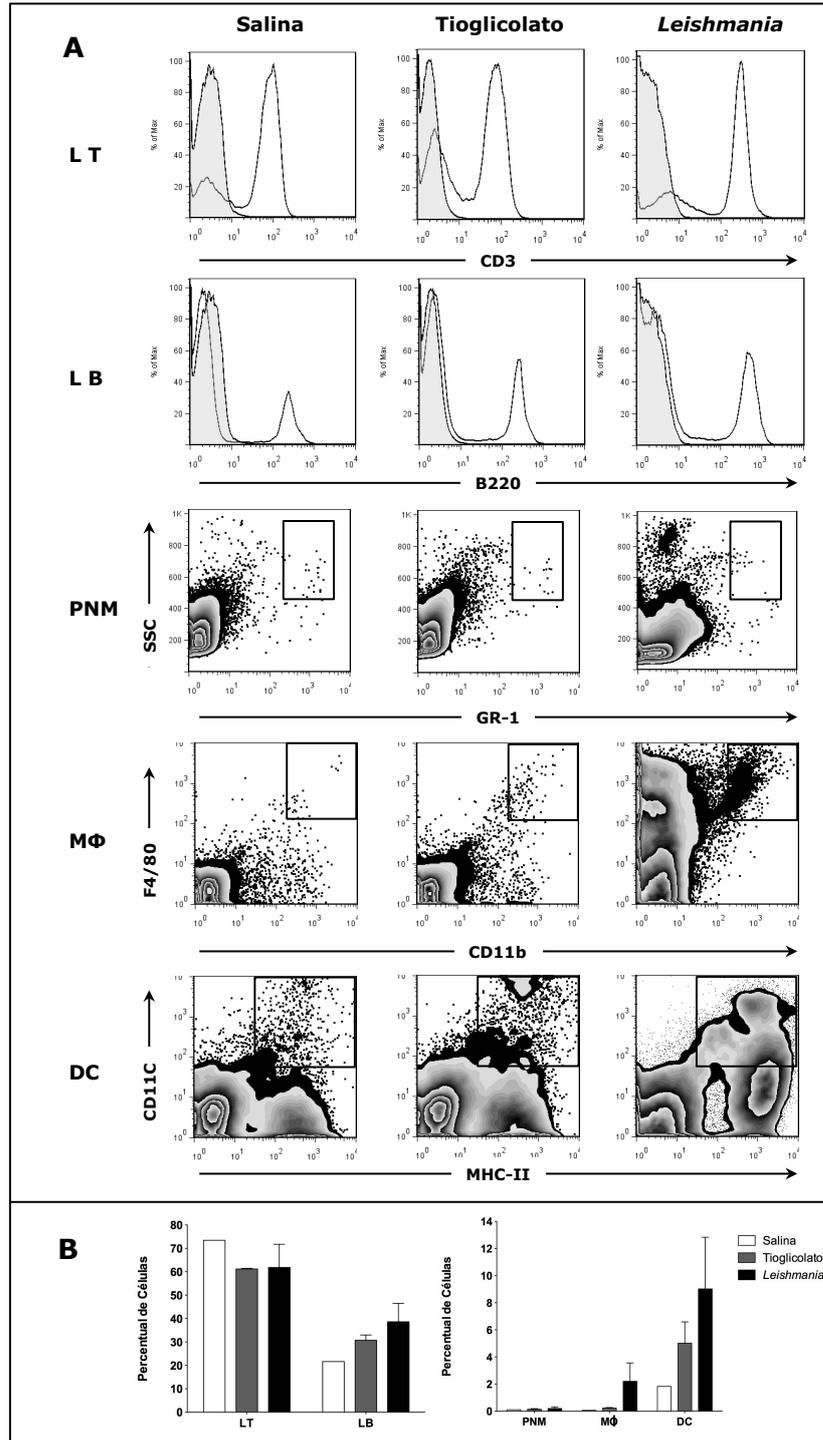
**Figura 14. Alteração na expressão de receptores de quimiocinas nas células do exsudato peritoneal após injeção de salina, tioglicolato ou *L. amazonensis*.** As células peritoneais foram coletadas quatro dias após a injeção de salina, tioglicolato ou *Leishmania*. O número de células positivas (A) e a média de intensidade de fluorescência (B) para os receptores de quimiocinas CCR5 e CCR7 foram avaliados utilizando anticorpos específicos para citometria de fluxo. Os dados apresentados correspondem a um experimento utilizando cinco animais por grupo.

### 7.2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PRESENTES NO LINFONODO DRENANTE APÓS INJEÇÃO DE SALINA, TIOGLICOLATO OU *LEISHMANIA*

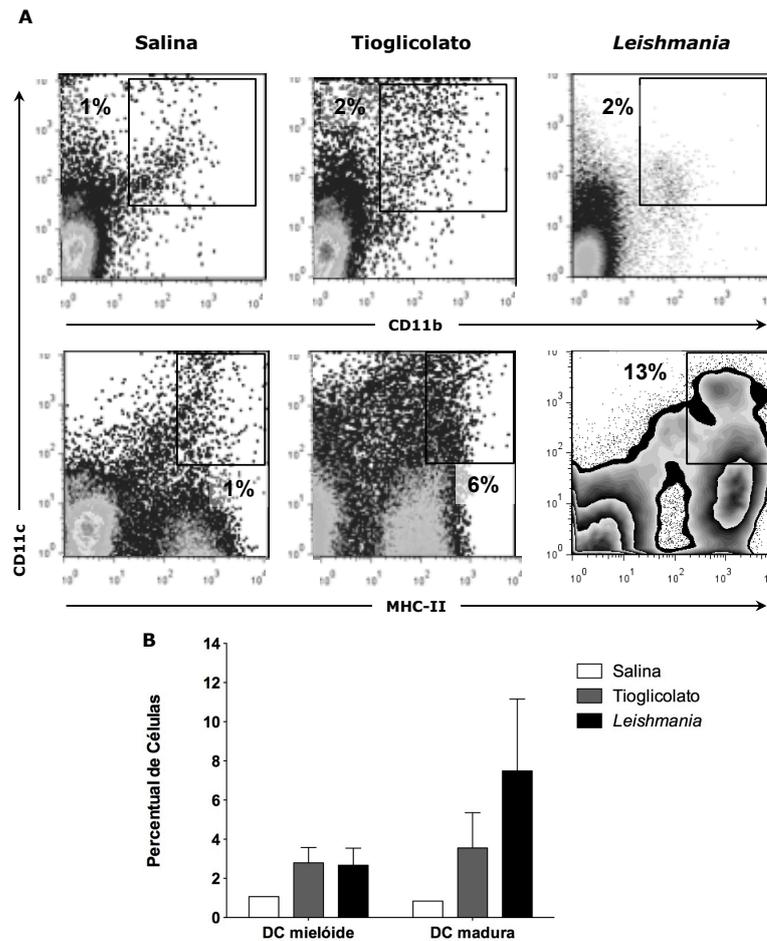
Para examinar as alterações produzidas na distribuição das populações celulares no linfonodo drenante frente aos estímulos inflamatórios com tioglicolato ou *Leishmania*, caracterizamos as populações celulares presentes no linfonodo drenante após quatro dias do estímulo inflamatório. Nos animais que foram injetados com salina, constituíam de 73% de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) e 22% de linfócitos B (B220<sup>+</sup>). As populações de células fagocíticas eram constituídas por menos de 1% de neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>) e de macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e 2% de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>) (Figura 15 A-B). Dentre as células dendríticas encontradas no linfonodo drenante, 1% eram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) e 1% delas eram células dendríticas maduras (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>hi</sup>) (Figura 16).

Os animais estimulados com tioglicolato eram constituídos com 60 ± 2% de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) e 32 ± 5% de linfócitos B (B220<sup>+</sup>). As populações de células fagocíticas eram constituídas por menos que 1% de neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>), 3 ± 2% de macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e 6 ± 3% de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>) (Figura 15 A-B). Dentre as células dendríticas 3 ± 1% eram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) e 4 ± 2% delas estavam maduras (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>hi</sup>) (Figura 16).

Os animais que foram estimulados por *L. amazonensis* demonstraram, após o quarto dia, que 62 ± 20% eram linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) e 39 ± 13% eram linfócitos B (B220<sup>+</sup>). A população de células fagocíticas era constituída por menos que 1% de neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>), 4 ± 2% de macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e 10 ± 8% de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>) (Figura 15 A-B). O número de células dendríticas mielóides era 3 ± 1% e 10 ± 6% das células dendríticas estavam maduras (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>hi</sup>) (Figura 16).



**Figura 15. Caracterização das populações leucocitárias presentes no linfonodo drenante quatro dias após estímulos com tioglicolato ou *Leishmania*.** (A) *Dot plots* representativo de três experimentos nos quais os linfonodos foram coletados e analisados após a injeção de diferentes estímulos. A definição das populações celulares foi baseada na expressão dos marcadores indicados. (B) Representação gráfica das subpopulações celulares presentes na cavidade peritoneal após a injeção de salina, tioglicolato ou *L. amazonensis*; médias de três experimentos independentes com cinco animais em cada grupo (LT- linfócito T; LB-linfócito B; PNM-polimorfonuclear; MΦ- macrófago; DC- célula dendríticas).



**Figura 16. Caracterização das células dendríticas presentes no linfonodo drenante quatro dias após a injeção de salina, tioglicolato ou *Leishmania*.** (A) *Dot plots* representativo da distribuição das células dendríticas maduras ( $CD11c^+ MHCII^{hi}$ ) e do subtipo mielóide ( $CD11c^+ CD11b^+$ ) no linfonodo drenante após os estímulos com salina, tioglicolato ou *L. amazonensis*; (B) Representação gráfica das células dendríticas presentes no linfonodo drenante após a injeção de diferentes estímulos. Os dados apresentados correspondem a dois experimentos utilizando cinco animais por grupo.

### 7.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FAGÓCITOS CAPAZES DE MIGRAR PARA O LINFONODO DRENANTE APÓS UM ESTÍMULO INFLAMATÓRIO CRÔNICO INFECCIOSO

#### **7.3.1 DEFINIÇÃO DA CURVA DOSE RESPOSTA NA MIGRAÇÃO DE *L. AMAZONENSIS* DO PERITÔNIO AO LINFONODO DRENANTE**

Diferentes concentrações de *L. amazonensis* coradas com PKH26 foram injetadas na cavidade peritoneal de camundongos e, após 24 horas, retiramos os linfonodos paratímicos desses animais, que foram cortados no criostato e observados no microscópio de fluorescência para análise das células fluorescentes migrantes.

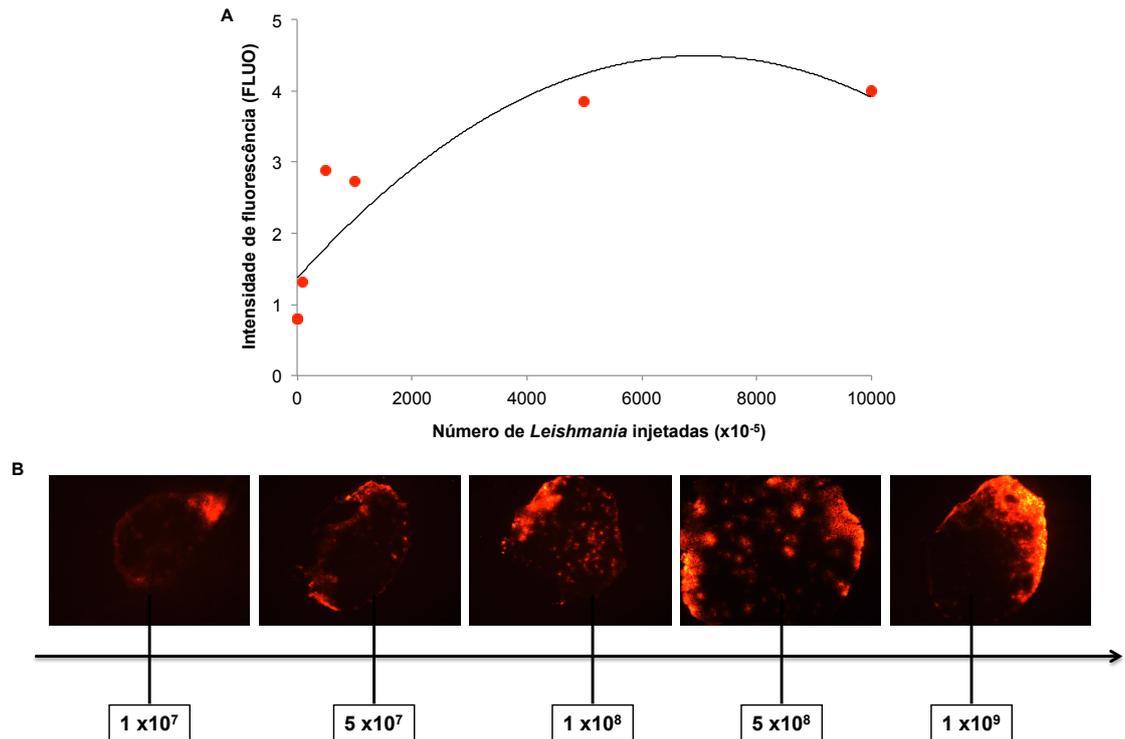
Após a injeção de  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  parasitos PKH26<sup>+</sup> na cavidade peritoneal, não foi observada nenhuma fluorescência nos linfonodos paratímicos. Foram utilizados dois animais em um único experimento com cinco linfonodos coletados dos dois animais. A injeção de  $1 \times 10^7$  parasitas PKH26<sup>+</sup> na cavidade peritoneal resultou na observação de células fluorescentes migrantes em  $25 \pm 0\%$  dos linfonodos dos animais infectados em um experimento com dois animais. A injeção de  $5 \times 10^7$  até  $1 \times 10^9$  de *L. amazonensis* PKH26<sup>+</sup> na cavidade peritoneal a migração de células infectadas ou contendo parasitos mortos foram observados em todos os linfonodos. Na injeção de  $5 \times 10^7$  parasitos na cavidade peritoneal foram utilizados dois animais com uma média de quatro linfonodos coletados em cada. Na injeção com  $1 \times 10^8$  parasitas na cavidade peritoneal foram utilizados dois animais por experimento com uma média de quatro linfonodos coletados de cada animal. A injeção de  $5 \times 10^8$  parasitas corados na cavidade peritoneal, os linfonodos foram coletados de dois animais com uma média de três linfonodos em cada. Finalmente, na injeção de  $1 \times 10^9$  *L. amazonensis*

corados, foram utilizados dois animais com uma média de cinco animais em cada (Tabela 1).

**Tabela 1. Percentual dos linfonodos paratímicos que apresentaram migração de células infectadas ou contendo parasitos mortos após injeção de *L. amazonensis* PKH26<sup>+</sup> na cavidade peritoneal.**

	N° de <i>L. amazonensis</i> injetada na cavidade peritoneal						
	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>9</sup>
<b>N° total de linfonodos</b>	5	5	8	9	15	7	11
<b>Percentual linfonodos com migração de células contendo <i>Leishmania</i> (%)</b>	0	0	25	100	100	100	100

Os linfonodos drenantes também foram analisados quanto a sua intensidade de fluorescência, na tentativa de qualificar a migração de células infectadas ou contendo parasitos mortos. Para isso, classificamos as diferentes quantidades de fluorescência em cruzes. Nos animais injetados com 1 x 10<sup>5</sup> e 1 x 10<sup>6</sup> *L. amazonensis* na cavidade peritoneal, não foi observada intensidade de fluorescência nos linfonodos paratímicos. A injeção com 1 x 10<sup>7</sup> *L. amazonensis* na cavidade peritoneal, resultou na observação de linfonodos com intensidade média (2+) a fraca (1+). Na injeção de 5 x 10<sup>7</sup> e 1 x 10<sup>8</sup> parasitos corados na cavidade peritoneal, resultou em uma intensidade de fluorescência de 3+ restrita à região subcortical nos linfonodo dos animais infectados. Após a injeção de 5 x 10<sup>8</sup> e 1 x 10<sup>9</sup> *L. amazonensis* PKH26<sup>+</sup> na cavidade peritoneal, observou-se uma intensidade de fluorescência de 4+ em todos os linfonodos analisados (Figura 17).



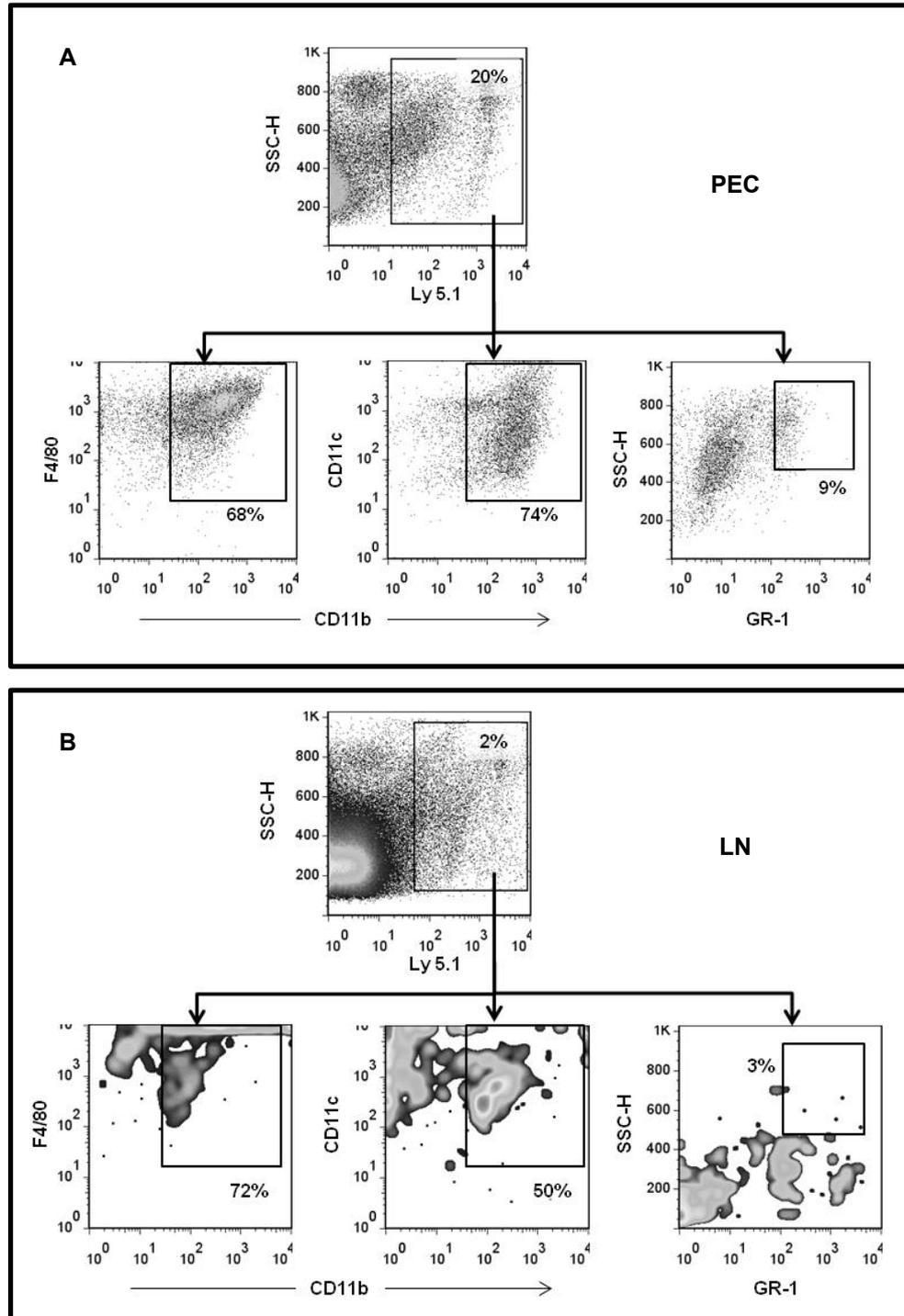
**Figura 17. Intensidade fluorescência no linfonodo paratímico relativa ao número de *L. amazonensis* PKH26<sup>+</sup> após 24h de injetados na cavidade peritoneal.** (A) Gráfico de dispersão com uma curva de tendência que relaciona o número de parasitos PKH26<sup>+</sup> injetadas na cavidade peritoneal com a intensidade de fluorescência observada nos linfonodos 24h após a injeção. (B) Imagens representativas de linfonodos paratímicos coletados de animais que tiveram diferentes concentrações de células injetadas no peritônio. FLUO= média dos escores da intensidade de fluorescência.

### 7.3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FAGÓCITOS INFECTADOS CAPAZES DE MIGRAR PARA O LINFONODO DRENANTE APÓS UM ESTÍMULO INFLAMATÓRIO INFECCIOSO

Com base nos experimentos anteriores, definimos que a injeção de  $1 \times 10^8$  *L. amazonensis* no peritônio permitiu uma visualização da migração de células infectadas ou contendo moléculas dos parasitos. A partir disso, utilizamos como referência esses valores nos experimentos subsequentes. Para identificar os fagócitos infectados capazes de migrar do sítio inflamatório para o linfonodo drenante, infectamos (*i.p.*) animais Ly 5.1<sup>+</sup> com *L. amazonensis* PKH26<sup>+</sup> e, após três dias, coletamos as células peritoneais e injetamos em animais Ly

5.1<sup>-</sup>; após 24 horas caracterizamos a população de fagócitos Ly 5.1<sup>+</sup> capazes de migrar para o linfonodo paratímico. Além disso, identificamos as populações migrantes (Ly 5.1<sup>+</sup>) em animais que não foram infectados, mas sofreram estímulo inflamatório via injeção de tioglicolato.

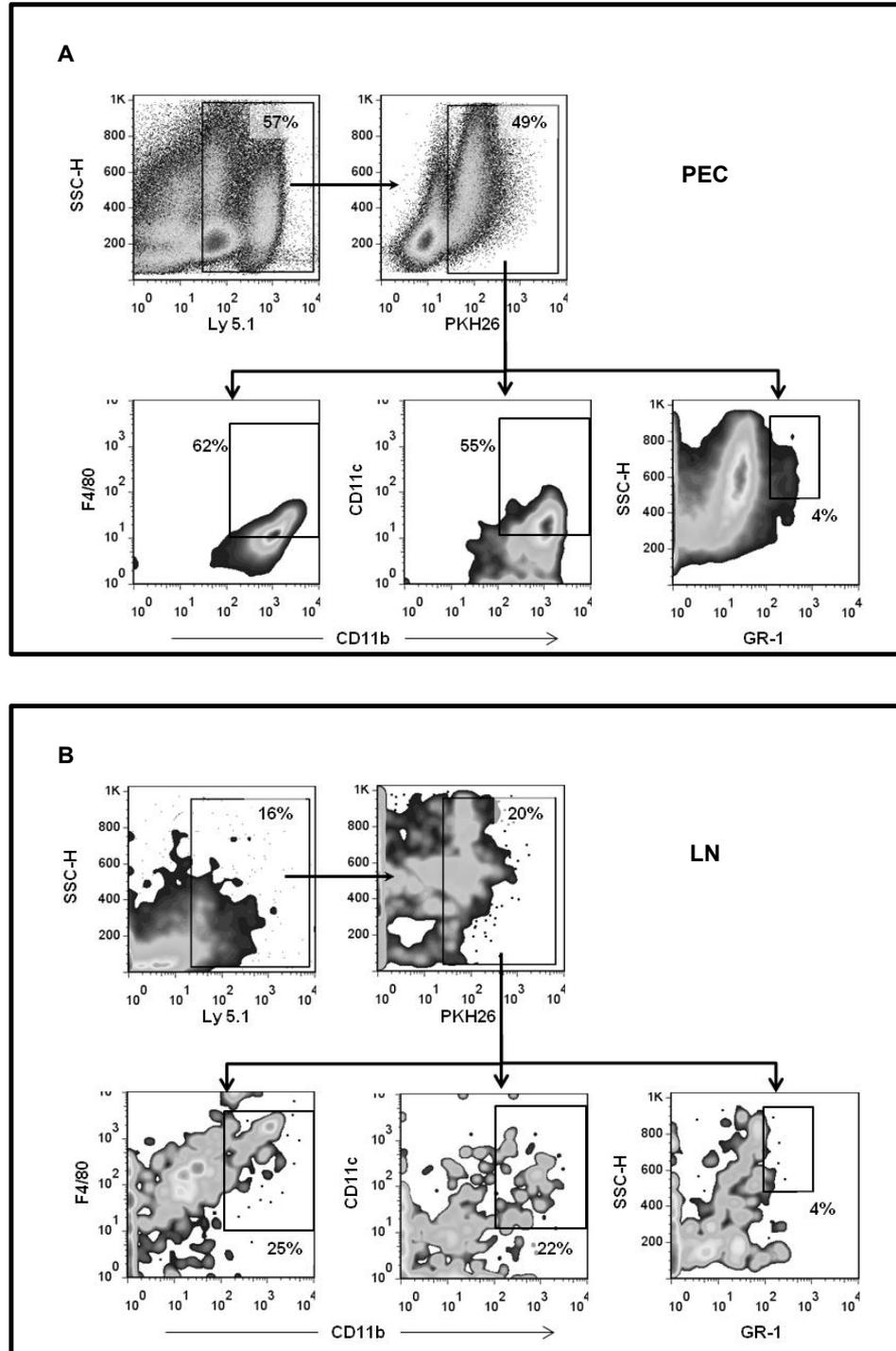
Dentre os fagócitos transferidos, que foram coletados após estímulo inflamatório por tioglicolato,  $54 \pm 20\%$  permaneceram na cavidade peritoneal:  $71 \pm 17\%$  foram macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>),  $57 \pm 13\%$  foram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) e  $14 \pm 5\%$  foram neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>). Entre os fagócitos migrantes (Ly 5.1<sup>+</sup>), encontrados no linfonodo drenante,  $58 \pm 14\%$  foram macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>),  $30 \pm 2\%$  foram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) e  $3 \pm 0.2\%$  foram neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>) (Figura 18 e 20).



**Figura 18. Caracterização dos fagócitos capazes de migrar do sítio inflamatório para o linfonodo drenante em condições de inflamação crônica.** Animais Ly 5.1<sup>+</sup> foram estimulados com tioglicolato e após três dias as células peritoneais foram coletadas e transferidas para um animal receptor Ly 5.1<sup>-</sup>. Após 24 horas as células transferidas (Ly 5.1<sup>+</sup>) encontradas no peritônio (A) e no linfonodo drenante (B) foram caracterizadas de acordo com os marcadores de superfície predeterminados. Macrófagos - F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>, Células dendríticas mielóides - CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> e neutrófilos - SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>. Dados extraídos de um experimento representativo.

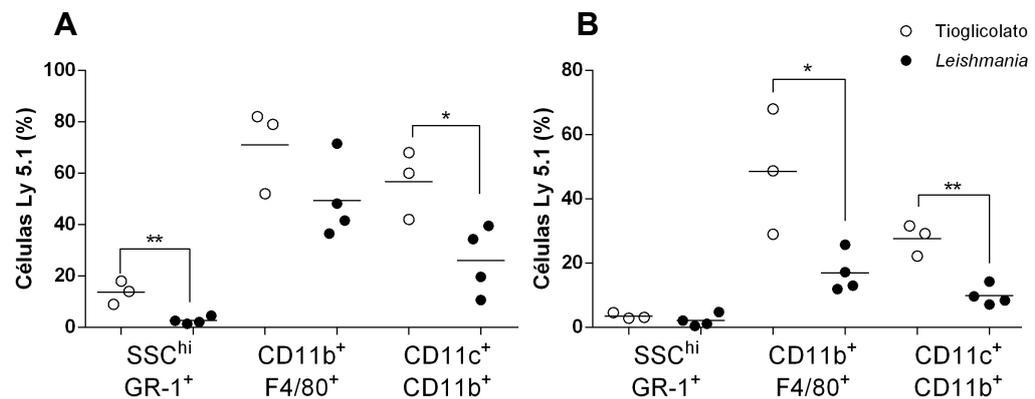
Os fagócitos transferidos que permaneceram no peritônio representaram  $58 \pm 10\%$  e  $49 \pm 16\%$  estavam infectados ou continham moléculas de *L. amazonensis* (PKH26<sup>+</sup>). Entre os fagócitos peritoneais  $49 \pm 15\%$  eram macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>),  $26 \pm 13\%$  eram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) e  $3 \pm 1\%$  eram neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>) (Figura 20). Dessas células a presença de parasito ou suas moléculas foram observadas em  $69 \pm 17\%$  na população de macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>),  $48 \pm 10\%$  das células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) e  $4 \pm 1\%$  dos neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>) (Figura 19).

Entre os fagócitos migrantes (Ly5.1<sup>+</sup>)  $17 \pm 8\%$  eram macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>),  $8 \pm 1\%$  eram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) e  $2 \pm 1\%$  eram neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>) (Figura 20). Entre os fagócitos infectados migrantes (Ly5.1<sup>+</sup>),  $4 \pm 1\%$  eram neutrófilos (SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>),  $21 \pm 4\%$  eram macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e  $15 \pm 5\%$  eram células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) (Figura 19).



**Figura 19. Caracterização dos fagócitos infectados capazes de migrar para o linfonodo drenante.** Animais Ly 5.1<sup>+</sup> foram infectados por *L. amazonensis* corada com PKH26 e após três dias as células peritoneais foram coletadas e transferidas para um animal receptor Ly 5.1<sup>-</sup>. Após 24 horas as células transferidas (Ly 5.1<sup>+</sup>) encontradas no peritônio (A) e no linfonodo drenante (B) foram caracterizadas de acordo com os marcadores de superfície predeterminados. Macrófagos F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>, Células dendríticas mielóides CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> e Neutrófilos SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>. Dados extraídos de um experimento representativo.

Se compararmos os tipos celulares que permaneceram no peritônio após o estímulo por tioglicolato ou pela infecção por *L. amazonensis* observamos uma redução significativa no número de neutrófilos e células dendríticas sofreram estímulo inflamatório do parasito. Entre os fagócitos migrantes para o linfonodo observou-se um redução significativa de macrófagos e células dendríticas dos animais que sofreram estímulo do parasito.



**Figura 20. Caracterização dos fagócitos recrutados através de diferentes estímulos inflamatórios capazes de migrar para o linfonodo drenante.** Animais Ly 5.1<sup>+</sup> foram estimulados *i.p.* com tioglicolato ou com a infecção por *L. amazonensis* corada com PKH26 e após três dias as células peritoneais foram coletadas e transferidas para um animal receptor Ly 5.1<sup>-</sup>. Após 24 horas as células transferidas (Ly 5.1<sup>+</sup>) encontradas no peritônio (A) e no linfonodo drenante (B) foram caracterizadas de acordo com os marcadores de superfície predeterminados. Macrófagos F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>, Células dendríticas mielóides CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> e Neutrófilos SSC<sup>hi</sup> GR-1<sup>+</sup>. Teste estatístico *t student* não pareado (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ).

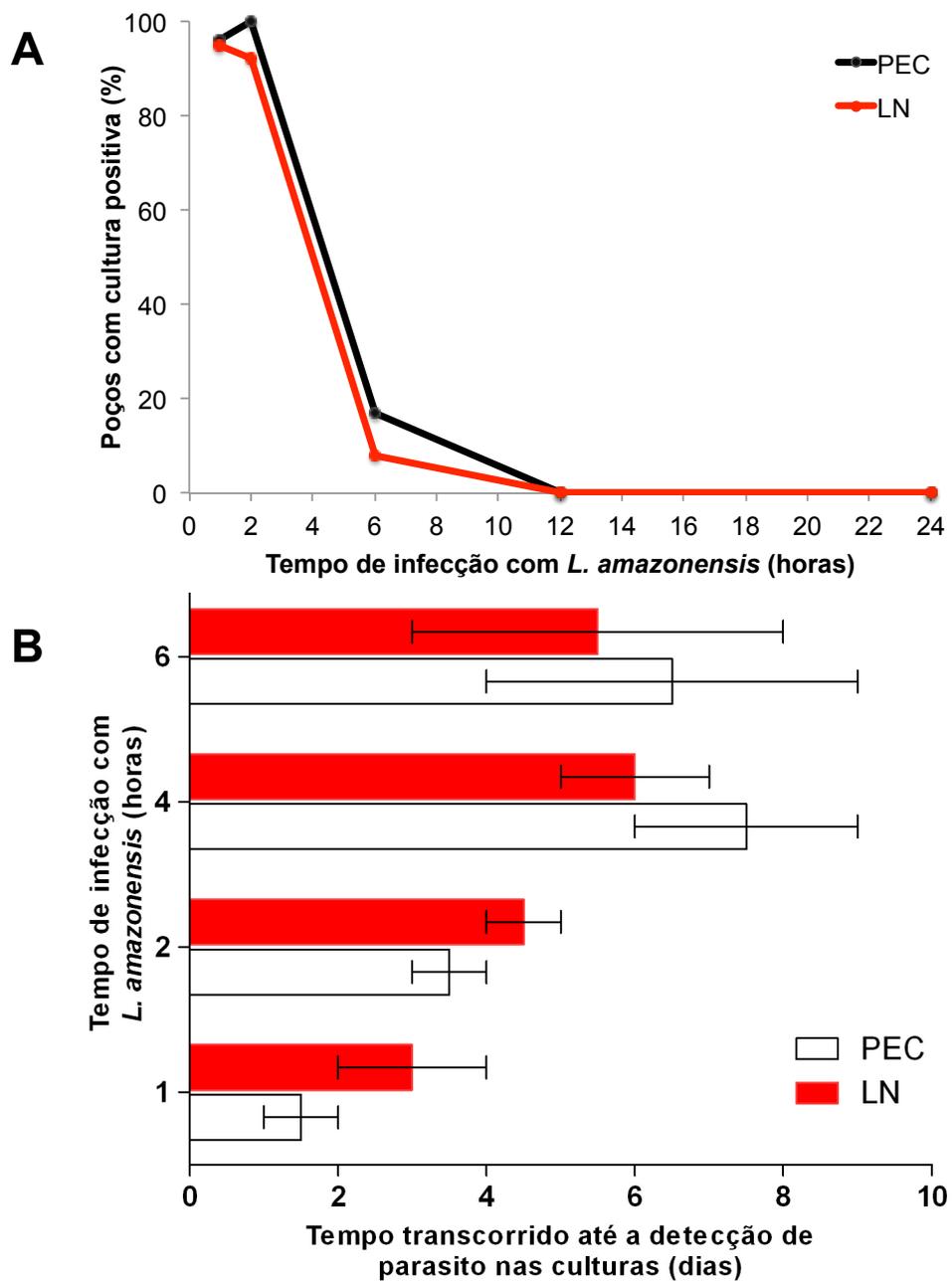
### 7.3.3 CINÉTICA DE DISSEMINAÇÃO DE *L. AMAZONENSIS* DO SÍTIO INFLAMATÓRIO PARA O LINFONODO DRENANTE *IN VIVO*

Para avaliar a cinética de disseminação do parasito de um sítio inflamatório para o linfonodo drenante, camundongos da linhagem BALB/c foram infectados (*i.p.*) com  $1 \times 10^8$  promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária de crescimento em cultura. Após uma, duas, quatro, seis, 12 ou 24 horas da infecção, os animais foram eutanasiados e as células peritoneais e os linfonodos paratímicos foram coletadas e cultivadas, em meio de crescimento de *Leishmania*

por dez dias, para avaliação do tempo necessário até a observação de parasitos nas culturas.

Nos animais com uma hora de infecção, parasitos foram identificados na cultura desde o primeiro dia de cultivo das células peritoneais. Nos animais com duas horas de infecção, parasitos foram identificados em cultura apenas no quarto dia de cultivo. Nos animais com 12 ou 24 h de infecção não foram observadas culturas das células da cavidade peritoneal positivas para *Leishmania*, mesmo após 10 dias de observação (Figura 21).

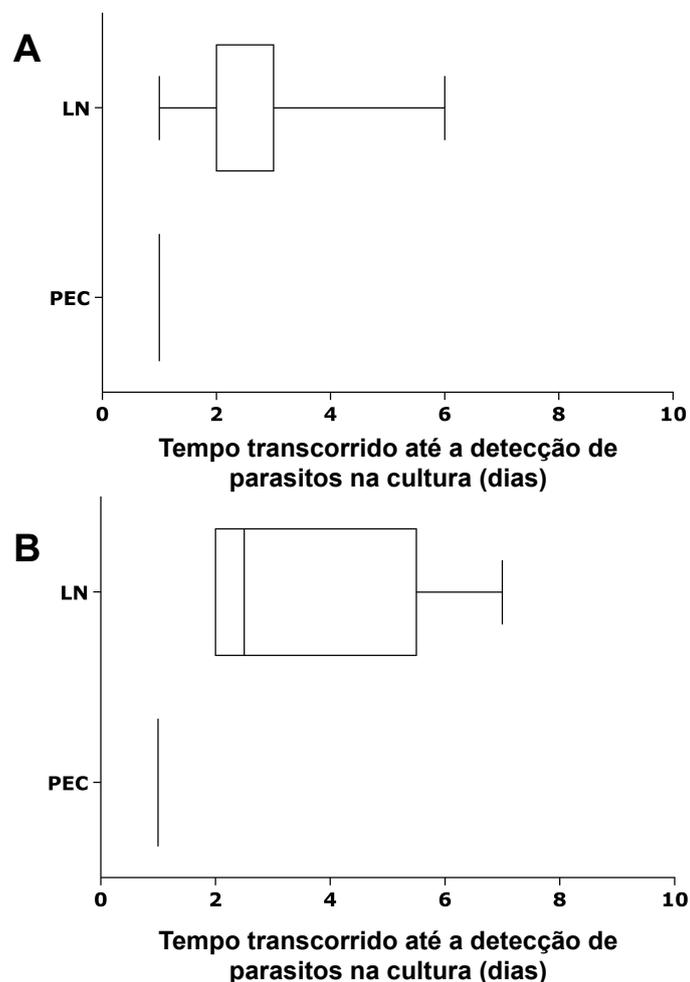
Nos animais com uma hora de infecção, parasitas foram identificados na cultura a partir do segundo dia de cultivo das células do linfonodo. Nos animais com duas horas de infecção, parasitas foram identificados em cultura apenas no quinto dia de cultivo. Houve diminuição do número de culturas positivas na medida em que aumenta o tempo de infecção até seis horas. Nos animais com 12 ou 24 h de infecção não foram observadas culturas das células do linfonodo positivas para *Leishmania*, mesmo após 10 dias de observação (Figura 21).



**Figura 21.** Identificação do parasita em culturas de PEC e de células do linfonodo coletados de camundongos da linhagem BALB/c após uma, duas, quatro, seis, doze ou vinte quatro horas da infecção por *L. amazonensis*. Camundongos da linhagem BALB/c foram infectados *i.p.* por *L. amazonensis* e após um, dois, quatro, seis, doze e vinte e quatro horas as PEC e o linfonodo foram coletados e cultivados. (A) O número de poços com parasitas entre os dois órgãos e (B) o tempo necessário para aparecimento do parasito nas culturas foram comparados em cada período pós infecção.

Em virtude da detecção precoce do parasito nas culturas, testamos períodos inferiores ao de uma hora, como 15 minutos e 30 minutos. Como esperado, o lavado peritoneal apresentou parasitos logo no

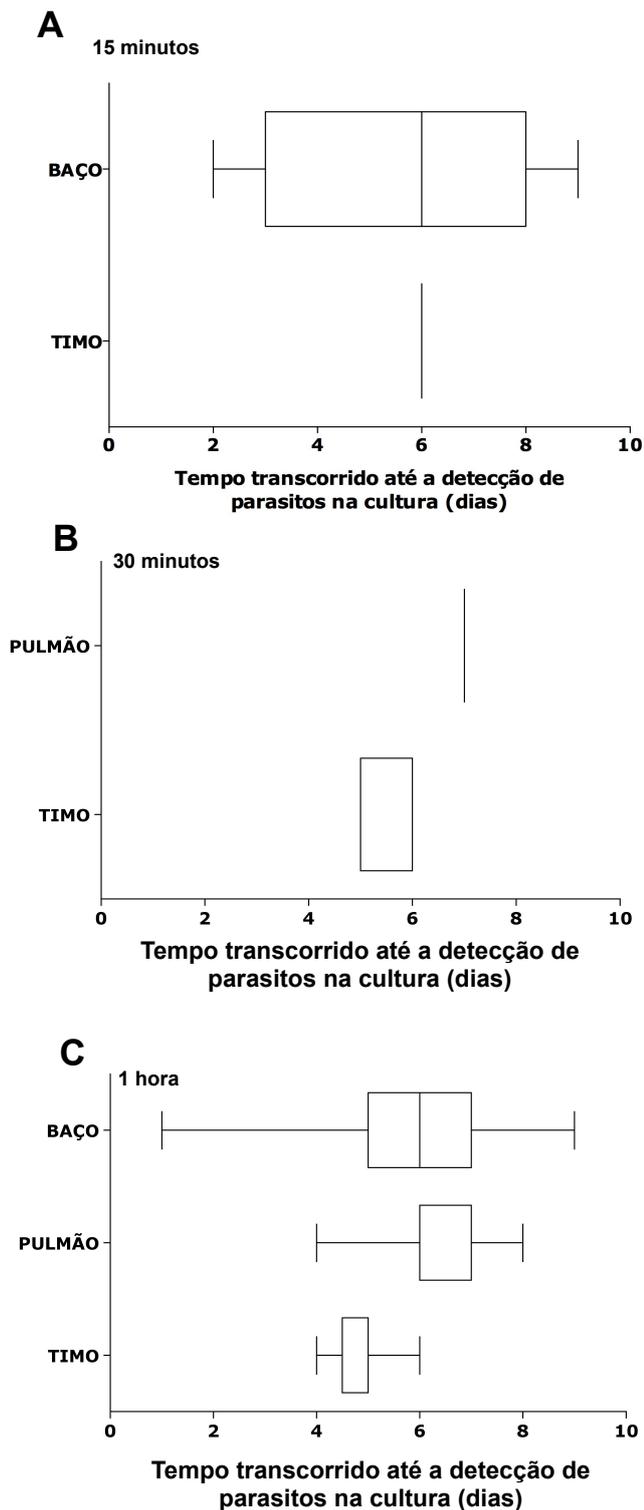
primeiro dia de cultura (Figura 22): 93% dos poços contendo material colhido dos animais após 15 minutos e 100% dos poços contendo material colhido dos animais após 30 minutos de infecção exibiram parasitos (Tabela 2). O cultivo das células do linfonodo drenante dos animais infectados por 15 e 30 minutos apresentou parasitos após dois dias de cultivo (Figura 22). O número de poços positivos foi de 96% com 15 minutos de infecção, e 83% com 30 minutos de infecção (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos na infecção por *L. infantum* (dado não adicionado).



**Figura 22. Tempo transcorrido até positividade das culturas das células peritoneais e do linfonodo de camundongos da linhagem BALB/c que ficaram infectados por *L. amazonensis* por 15 ou 30 minutos.** Camundongos da linhagem BALB/c foram infectados *i.p.* por *L. amazonensis* e, após 15 ou 30 minutos, as PEC e o LN drenate foram coletados e cultivados. O período necessário até o aparecimento do parasito nas cultura de células dos animais com 15 (A) ou 30 (B) minutos pós infecção foram comparados entre as PEC e as células do linfonodo.

Outros órgãos, como o timo e pulmão, também foram removidos e cultivados após 15, 30 minutos e uma hora da infecção por *L. amazonensis* na cavidade peritoneal. A cultura de tecido do timo se tornou positiva no sexto dias de cultivo após 15 minutos da infecção (Figura 23) contendo apenas 4% dos poços avaliados com cultura positiva (Tabela 2). Trinta minutos e uma hora precisaram de cinco dias de cultivo até positividade da cultura (Figura 23) e apresentaram 25% e 58% dos poços com cultura positiva, respectivamente (Tabela 2). O cultivo do tecido pulmonar foi positivo no quarto dia de cultivo após 30 minutos da infecção na cavidade peritoneal (Figura 23), em apenas 8% dos poços apresentaram cultura positiva (Tabela 2). Uma hora após a infecção, parasitas foram visualizados após o quinto dia de cultivo (Figura 23) e 56% dos poços eram positivos (Tabela 2). Esses órgãos foram incluídos na tentativa de descartar a possibilidade do transito de parasito por via transcavitária.

Além disso, em um ensaio subsequente, realizamos a inoculação *L. amazonensis* e coletamos o baço após 15 minutos e uma hora. A cultura 15 minutos após a infecção na cavidade peritoneal se tornou positiva apenas no quinto dia de cultivo (Figura 23) e 78% dos poços avaliados das células cultivadas foram positivos (Tabela 2). Uma hora após a infecção na cavidade peritoneal a cultura foi positiva no sexto dia de cultivo (Figura 23) os quais 70% dos poços avaliados apresentaram cultura positiva (Tabela 2).



**Figura 23.** Tempo transcorrido até positividade das culturas de células coletadas do timo, pulmão e baço colhidos de camundongos infectados por *L. amazonensis* após 15, 30 minutos ou uma hora. Camundongos da linhagem BALB/c foram infectados *i.p.* por *L. amazonensis* e após 15, 30 minutos ou uma hora os diferentes tecidos foram coletados e as suas células cultivadas. O período necessário até o aparecimento do parasito nas culturas de células dos animais com 15 (A), 30 (B) minutos ou uma (C) hora pós infecção foram comparados entre as células dos diferentes tecidos.

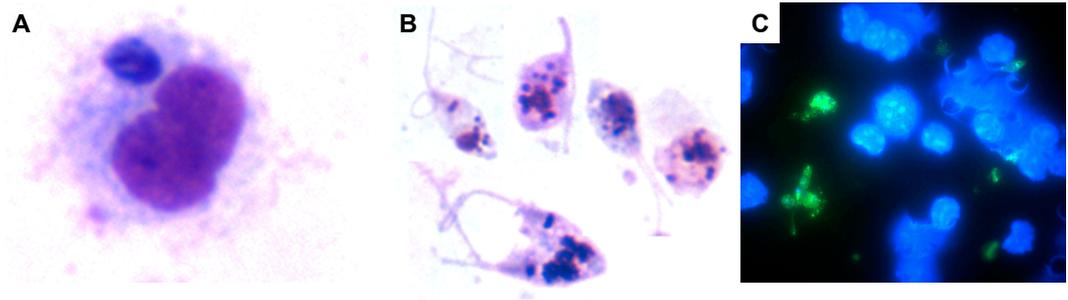
**Tabela 2. Número de poços com culturas positivas para *L. amazonensis* nos diferentes órgãos de acordo com o tempo de inoculação do parasito.**

Tempo de infecção (hora)	Número de poços positivos (%)				
	Órgão				
	PEC	Linfonodo	Timo	Pulmão	Baço
0,25	134/144 (93%)	138/144 (96%)	1/24 (4%)	0/216 (0%)	56/72 (78%)
0,5	48/48 (100%)	40/48 (83%)	6/24 (25%)	2/24 (8%)	-
1	184/192 (96%)	182/192 (95%)	14/24 (58%)	122/216 (56%)	50/72 (70%)

#### **7.3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E TAXA DE INFECÇÃO DAS CÉLULAS PERITONEIAS E DO LINFONODO DRENANTE APÓS A INFECÇÃO POR *L. AMAZONENSIS***

Após a infecção por *L. amazonensis*, coletamos as células peritoneais e realizamos uma citocentrifugação na lâmina para avaliar as características das células presente no exsudato peritoneal estimulado pela infecção. Com 15 minutos de infecção, há uma predominância de células macrofágicas, sendo que a taxa de infecção era de  $53 \pm 18\%$  com grande número de parasitos ainda na forma promastigota, a maioria das vezes preso à superfície das células (Figura 24). Após 30 minutos e uma hora da infecção, ainda encontramos uma predominância de células macrofágicas, porém a taxa de infecção foi mais elevada com  $62 \pm 33\%$  após 30 minutos e  $60 \pm 7\%$  após uma hora. Os parasitos não internalizados apresentaram uma morfologia mais arredondada e a maioria estava presa à membrana da célula em ambos os tempos (Figura 24). A partir de quatro horas após infecção, a maioria das células apresentava baixa taxa de infecção, nos quais  $24 \pm 10\%$  dos fagócitos estavam infectados com  $4 \pm 1\%$  de parasito por fagócito (Figura 24). A presença de neutrófilos foi predominante, nos quais  $16 \pm 4\%$  estavam infectados, dos macrófagos  $24 \pm 5\%$  estavam infectados. Nos pontos subsequentes de seis e 12 horas, foram





**Figura 25. Identificação de fagócitos infectados e parasitos entre as células do linfonodo drenante.** Camundongos da linhagem BALB/c foram infectados *i.p.* por *L. amazonensis* e após 15, 30 minutos ou uma e quatro horas as células do linfonodo foram citocentrifugadas. (A) Fagócito infectado; (B) Parasitos identificados entre as células do linfonodo; (C) Imunofluorescência contra antígeno de *Leishmania* entre as células do linfonodo drenante.

## 8. DISCUSSÃO

Em estudos prévios do nosso grupo, nós mostramos que a infecção por *Leishmania* altera a adesão de diferentes fagócitos mononucleares ao tecido conjuntivo inflamado (CARVALHAL et al., 2004) e a componentes da matriz conjuntiva, tal como fibronectina (PINHEIRO et al., 2006), por um mecanismo dependente da regulação da afinidade de integrinas. Além disso a expressão de receptores de quimiocinas, relacionados com a migração celular, também estão alterados nos fagócitos infectados (PINHEIRO et al., 2006; SATO et al., 2000). Não entendemos ao certo o significado da desadesão desses fagócitos após a infecção no processo de disseminação do parasito no hospedeiro. Devido a isso, baseamo-nos em um modelo de migração de leucócitos, descrito por Bellingan e colaboradores (BELLINGAN et al., 1996), para comparar a migração *in vivo* de fagócitos não infectados ou infectados por *L. amazonensis* de um ambiente com inflamação crônica preexistente para o linfonodo drenante. Além disso, foi possível identificar os tipo de fagócitos inflamatórios responsáveis pela disseminação dos parasitos ou moléculas de parasito morto.

A definição da curva de dose-resposta, o qual relacionamos o número de células injetadas na cavidade peritoneal, a percentagem de linfonodos drenantes contendo células migrantes e a quantidade de células migrantes, estimada através da intensidade de fluorescência observada nos linfonodos para-tímicos foi crucial para iniciar os ensaios de rastreamento de célula. Estes dados foram confirmados através do exame da relação entre o número de células injetadas na cavidade peritoneal e a quantidade de células vacuolizadas presentes nos linfonodos. Sabe-se que fagócitos mononucleares são capazes de migrar da cavidade peritoneal para linfonodos drenante (HERMIDA, 2007; MOLL et al., 1993; RANDOLPH; OCHANDO; PARTIDA-SÁNCHEZ, 2008). No entanto, não há estudos na literatura que demonstrem a relação entre o número de células injetadas no peritônio e a presença de

células migrantes ou intensidade de migração celular para os linfonodos para-tímicos.

Neste estudo, foi demonstrado que a presença de células migrantes no linfonodo para-tímico depende do número de células injetadas na cavidade peritoneal. Foi observado, por exemplo, que a injeção de  $1 \times 10^5$  células não permite a identificação de células migrantes no linfonodo. A migração de células é identificada a partir da injeção de  $5 \times 10^5$  células e ascende até a injeção de  $5 \times 10^6$  células, mantendo-se num platô do número de linfonodos contendo células migrantes até a injeção de  $1 \times 10^7$  células. É interessante notar que este platô é atingido com uma proporção de linfonodos apresentando células migrantes de 67% e que há uma importante variação entre experimentos, que tende a reduzir-se com a injeção de maiores quantidades de células.

Uma das possíveis explicações para que o platô se estabeleça na faixa de 67% dos linfonodos com migração é que nem todos os linfonodos da cadeia para-tímica sejam atingidos por células migrantes após 24 horas de injeção. Alguns desses linfonodos podem estar dispostos em sequência, e aqueles mais proximais (mais distantes do sítio inflamatório), só receberiam as células após estas terem passado por linfonodos mais distais (mais próximos do sítio inflamatório).

Outro dado interessante é que, apesar de a percentagem de linfonodos com migração celular ser semelhante entre os grupos  $5 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$ , a intensidade da migração (medida pela intensidade de fluorescência e pela contagem de células vacuolizadas no linfonodo) no grupo que recebeu  $1 \times 10^7$  células foi maior em comparação à do grupo que recebeu  $5 \times 10^6$  células. Portanto, a quantidade de células migrantes continua aumentando com o crescente número de células injetadas, confirmando a possibilidade de que as populações de células migrantes sejam restritas e, alternativamente, de que mecanismos indutores ou facilitadores da migração celular sejam

intensificados com a injeção de um número maior de células na cavidade peritoneal.

Uma proporção similar de células inflamatórias do exsudato peritoneal cultivadas apenas com meio ou com *L. amazonensis* migra do sítio inflamatório para o linfonodo drenante. Como mostramos acima, o estímulo inflamatório com tioglicolato induz um exsudato que contém uma variedade de leucócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, incluindo linfócitos, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. A maioria dessas células aparentemente sofre alteração na sua capacidade migratória após o cultivo com *L. amazonensis*. Contudo, as células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) consistentemente apresentam uma redução mais intensa no percentual de células migrantes após a incubação com o parasito. De acordo com esses achados, Jebbari e colaboradores (2002) e Leon e colaboradores (2007) também mostraram a permanência de células dendríticas infectadas no sítio inflamatório (JEBBARI et al., 2002; LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007).

Diferentes subtipos de células dendríticas têm sido consideradas capazes de transportar o antígeno e patógenos do sítio de infecção para o linfonodo drenante. Por exemplo, Steigerwald e Moll mostraram que a infecção de células dendríticas por *L. major* danifica a habilidade migratória em resposta a uma variedade de quimiocinas, exceto CCL21 (STEIGERWALD; MOLL, 2005) Contudo, Ato e colaboradores encontram que a migração de células dendríticas no tecido linfoide esplênico em animais infectados por *L. donovani* foi interrompida em animais deficientes da expressão de receptores de CCL21, CCR7 (ATO et al., 2006). Células dendríticas derivadas de monócitos retidas na pele também expressam menos CCR7 do que as células dendríticas não infectadas capazes de migrar para o linfonodo (LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007). De fato, a infecção por *Leishmania* interfere na diferenciação e expressão de citocinas (ATO et al., 2006; LEÓN;

LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007; STEIGERWALD; MOLL, 2005). Consequentemente, a infecção ou a captura de antígenos podem também afetar diferencialmente o padrão de migração das células dendríticas dependendo do subtipo ou estágio de diferenciação desses fagócitos. Comparativamente, estudos são necessários para confirmar essas hipóteses.

Os mecanismos associados com o desenvolvimento de lesões na pele na leishmaniose cutânea localizada não são completamente entendidos. Evidências sugerem que essas úlceras são desenvolvidas no sítio de inoculação do parasito. A hipersensibilidade celular tipo IV pode estar envolvida; contudo, em um considerável número de pacientes, essa reação não é detectado pelo teste cutâneo de leishmanina durante o curso da ulcera. Recentemente, a subpopulação de células dendríticas tem sido envolvida na manutenção do estado inflamatório nos órgãos periféricos evidenciado em diferentes doenças (YEN; KONG; GANEA, 2010). Devido a isso, as principais funções das células dendríticas migrantes e não migrantes envolvidas no desenvolvimento de úlceras merecem um estudo mais aprofundado. Em desacordo com os trabalhos que demonstraram que a capacidade migratória da população de células mielóides se limita a células dendríticas, nós observamos que os neutrófilos e macrófagos migram de forma consistente do sítio inflamatório para os linfonodos drenantes e que eles têm o potencial para transportar *Leishmania* ou moléculas do parasito. Esta observação é agora apoiada por muitos outros estudos recentes (GHOSN et al., 2010; JEBBARI et al., 2002; LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007; MURAILLE et al., 2003).

Independente do tipo de fagócito capaz de disseminar o parasito, com esses dados observamos que provavelmente a desadesão observada nos estudo *in vitro* do nosso grupo (CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006) está relacionada com a permanência dessas células no sítio inflamatório. Além disso, a falta de adesão desses fagócitos ao tecido conjuntivo inflamado é

modulada pela taxa de parasito na célula e tais mudanças estão relacionadas com a infecção e não apenas a fagocitose de parasitos mortos (PINHEIRO *et al.*, 2006). Dessa forma podemos sugerir que os fagócitos não migrantes, ou seja que permaneceram na cavidade peritoneal estão altamente infectados e que de alguma forma não são capazes de migrar para o linfonodo drenante para induzir uma resposta contra o parasito.

Baseamo-nos em estudos prévios do nosso grupo, os quais mostram que a peritonite induzida pelo tioglicolato estéril reproduz os aspectos gerais da inflamação crônica, com o pico inicial de neutrófilos seguido por um aumento no número e a predominância de fagócitos mononucleares e, mais tardiamente, alterna o predomínio para linfócitos, após o sétimo dia de inflamação. O processo na migração de fagócitos mononucleares do sítio de inflamação para o linfonodo drenante nesse modelo é contínuo, tornando-se evidente após oito horas da injeção com tioglicolato. O quarto dia é o pico máximo de migração dos fagócitos para o linfonodo e permanece elevado se comparado ao controle, até o centésimo dia de observação (HERMIDA, 2007).

Nossos dados mostram uma diversidade de populações de leucócitos, como neutrófilos, linfócitos, um grande número de macrófagos e células dendríticas. A maioria das células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) eram imaturas expressando MHC-II<sup>o</sup>. Esses achados concordam parcialmente com dados publicado por Cook e colaboradores (2003), os quais não identificaram células CD11c<sup>+</sup> residentes na cavidade peritoneal ou recrutadas pelo estímulo com tioglicolato (COOK; BRAINE; HAMILTON, 2003). Contudo, Ghosn e colaboradores (2010), em um trabalho mais recente, demonstraram células dendríticas na cavidade peritoneal de camundongos. Essas células eram menores do que os macrófagos peritoneais e expressavam CD11b mas não antígeno F4/80 (GHOSN *et al.*, 2010).

Saindo do contexto da inflamação induzida por tioglicolato, mostramos que após a infecção por *L. amazonensis* na cavidade peritoneal há um intenso infiltrado de macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) após o quarto dia dos estímulos. Além disso, observou-se um significativo aumento no percentual de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) quando comparado com a injeção de tioglicolato ou o controle (com a injeção de salina). Provavelmente, o quarto dia após o estímulo por *L. amazonensis* seja um ponto um pouco tardio na resposta ao patógeno quando comparado com o estímulo por tioglicolato. A população de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>hi</sup>) está elevada significativamente em ambos os estímulos inflamatórios se comparado ao controle. Contudo, há um maior número de células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) na cavidade peritoneal após o estímulo com *L. amazonensis*. Um grande número de artigos tem sugerido que precursores de células dendríticas são atraídos à área de inflamação e órgãos linfóides durante a infecção, sendo capazes de se transformar em novas células dendríticas (MARTÍN et al., 2002; SERBINA et al., 2003). Como monócitos, células que podem se diferenciar em células dendríticas sob condições inflamatórias não infecciosas ou infecciosas como já foi demonstrado na infecção por *Leishmania in vivo* pelo grupo de Leon. Além disso, essas células dendríticas têm capacidade de migrar para o linfonodo drenante em tempos mais tardios com alta capacidade de produzir IL-12 e estimular células T específicas contra *Leishmania* (LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007).

O mecanismo de adesão e migração celular inclui a regulação e expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas. Em trabalhos anteriores, observamos que a expressão de RNA de quimiocinas relacionadas com a migração celular, como CCR5 e CCR4, está reduzida em fagócitos inflamatórios peritoneais, induzidos por tioglicolato, e infectados por *L. amazonensis* (PINHEIRO et al., 2006). Aqui, demonstramos que ambos os estímulos tendem reduzir o número de células positivas para os receptores de quimiocinas como CCR5 e CCR7 se comparado ao controle. Contudo, a intensidade média de fluorescência para o receptor de quimiocina CCR5

permanece igual após os diferentes estímulos. Isso sugere que mesmo que tenha um grande número de células na cavidade peritoneal após a injeção de salina, essas células apresentam a mesma média de intensidade de fluorescência após o estímulo com tioglicolato ou *Leishmania*. As mudanças que ocorrem na célula residente para célula migrante é controlada pela perda da expressão de receptores de quimiocinas inflamatórias, como CCR5, e aquisição de receptores para quimiocinas linfóides, como a CCR7 (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1999). Steigerwald e colaboradores demonstraram que a expressão de CCR5 está diminuída e CCR7 elevada após a infecção por *L. major* (STEIGERWALD; MOLL, 2005). Contudo, essa modulação da expressão de quimiocinas deve ser dependente da espécie do parasito, visto que, na infecção por *L. donovani*, a expressão de CCR7 está diminuída (ATO et al., 2006).

Para aprofundar os conhecimentos sobre como ocorre a disseminação de parasitos de *Leishmania* vivos ou moléculas parasitárias do sítio de infecção para o linfonodo drenante seguimos o mesmo modelo experimental de rastreamento de células coradas com PKH26 descrito por Bellingan e colaboradores (1996) (BELLINGAN et al., 1996). Neste etapa, coramos os parasitos com PKH26 e injetamos diretamente no peritônio de camundongos. Inicialmente, definimos o número ideal da injeção parasitos necessária para o rastreamento de fagócitos infectados ou contendo moléculas do parasito no linfonodo drenante. Foi demonstrado que o aumento do número de linfonodos contendo fagócitos infectados ou moléculas do parasito depende do número de parasitos injetados. Foi observado que a injeção de  $1 \times 10^6$  não permite a identificação de células migrantes no linfonodo, a qual é iniciada a partir de  $1 \times 10^7$  de parasito injetados ascendendo até  $5 \times 10^7$ , mantendo-se em um platô do número de linfonodos contendo células migrantes até  $1 \times 10^9$ .

Os macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e as células dendríticas mielóides (CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) atraídas ao exsudato peritoneal após a injeção de *L. amazonensis* se mostraram susceptíveis a infecção do parasito, ambas com alta expressão de

CD11b. Esses dados confirmam observações feitas por Muraille e colaboradores, os quais mostram que células CD11b<sup>+</sup> foram as células frequentemente mais infectadas na área da lesão (MURAILLE et al., 2003). Leon e colaboradores mostraram que os macrófagos (CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup>) e células dendríticas derivadas de monócitos (CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) tem alta taxa parasitária entre os leucócitos encontrados no infiltrado dermal após a infecção por *Leishmania in vivo* (LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007).

Apenas uma pequena fração das células capazes de migrar do sitio de infecção para o linfonodo drenante estava infectada ou continham partículas do parasito. Dentre essas células, os macrófagos e as células dendríticas eram as mais infectadas. Interessante notar que a migração dessas células infectadas ou contendo moléculas do parasita pode ser observada logo vinte e quatro horas após a infecção. Esses dados estão de acordo com os dados apresentados por Iezzi e colaboradores (2006), os quais mostraram que as células dendríticas migrantes da pele são encontradas no linfonodo até três dias após infecção na pele. Essas células não se mostraram eficientes na apresentação de antígeno de *Leishmania* às células T presentes no linfonodo. Contudo, a apresentação de antígenos do parasita é iniciada vinte e quatro horas após a infecção e é mediada por células dendríticas residentes do linfonodo (IEZZI et al., 2006). Isso se dá pelo fato de que a migração de células derivadas da pele para o linfonodo drenante requer pelo menos 14 horas, enquanto que proteínas solúveis drenam para o linfonodo dentro de duas horas após a injeção subcutânea (ITANO et al., 2003).

Em contradição, o trabalho de Baldwin e colaboradores (2004) demonstrou que, apesar deles observarem parasitos no linfonodo drenante poucas horas após a infecção na pele, esses parasitas não foram encontrados no interior de células dendríticas no linfonodo até três semanas após a infecção. Contudo, os macrófagos infectados foram capazes de migrar em tempos mais curtos (BALDWIN et al., 2004). Esses macrófagos podem estar relacionados com a disseminação mais intensa do parasito do que a das células dendríticas que, como mostramos, aparentemente, podem permanecer

retidas no sítio inflamatório por um período mais prolongado do que os macrófagos.

Na tentativa de entender como ocorre o carreamento do parasito através da rede linfática até o linfonodo drenante, experimentos de cinética de disseminação foram realizados. Para nossa surpresa, como demonstrado nesse trabalho, parasitos viáveis de *Leishmania* são encontrados no linfonodo drenante logo 15 minutos após a infecção na cavidade peritoneal. Além disto, a disseminação do linfonodo para a corrente sanguínea provavelmente ocorre dentro das primeiras horas após infecção. Esse efeito não está relacionado com a espécie do parasito, visto que obtivemos resultados semelhantes entre *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Esses dados sugerem que provavelmente a resposta contra o parasito ocorra mais cedo do que o esperado, e que essa resposta se dá diretamente no linfonodo drenante. Além disso, a ideia de que é necessário um fagócito para carrear o parasito até o linfonodo e, a partir daí, iniciar a resposta imune contra o parasito não parece ser sustentável. Contudo, mais estudos necessitam ser realizados para confirmação dessa disseminação precoce dos parasitos de forma efetiva.

Em resumo, caracterizamos as populações celulares presentes na cavidade peritoneal e do linfonodo drenante após estímulos inflamatórios induzidos por tioglicolato ou pela infecção direta de *Leishmania* intraperitoneal. Seguindo o modelo de rastreamento celular descrito por Bellingan e colaboradores (1996), padronizamos o número de fagócitos ou parasitos ideais ao estudo da disseminação e carreamento de parasito ou suas moléculas do sítio de inoculação para o linfonodo drenante. Com isso, pudemos caracterizar os fagócitos capazes de carrear o parasito para o linfonodo drenante vinte e quatro horas após sua injeção na cavidade peritoneal. Sugerindo que o macrófago seja a célula principal para essa disseminação inicial, visto que as células dendríticas que tiveram contato com o parasito apresentam uma redução na sua migração se comparada com as células incubadas apenas com meio de cultura. Contudo, parasitos

viáveis foram visualizados em culturas de células do linfonodo tão cedo quanto quinze minutos após sua injeção na cavidade peritoneal. Nesse estudo, mostramos que, mesmo que não ocorra uma intensa migração de células dendríticas para o linfonodo drenante, parasitos de *Leishmania* e seus antígenos podem drenar até o linfonodo independente de células. Esse sistema é interessante porque vislumbramos perspectivas para o estudo de mecanismos de moléculas de integrinas envolvidos na disseminação do fagócito infectado ou contendo antígeno do parasito ou até mesmo do parasito através das redes linfáticas.

## 9. CONCLUSÃO

**1) Há uma redução na proporção de fagócitos migrantes da cavidade peritoneal para o linfonodo drenante apenas após contato com o parasito *Leishmania*** [nossos achados e os descritos por Jebbari e colaboradores (2002) e Leon e colaboradores (2007) demonstram que células dendríticas permanecem retidas no sítio de infecção não sendo assim a célula responsável pela disseminação nos tempos iniciais após a infecção];

**2) Os estímulos inflamatórios induzidos por tioglicolato ou pela injeção de *L. amazonensis* resultam no recrutamento de diferentes populações celulares para os sítios inflamatórios** [nossos dados da fenotipagem celular das células peritoneais demonstram um aumento no número de macrófagos e células dendríticas observadas nesses compartimentos, contudo há uma diferença na atração de linfócitos após a infecção por *Leishmania* que não foi observada na injeção de tioglicolato];

**3) Não há alterações significativas nas populações de células presentes no linfonodo drenante após os estímulos inflamatórios induzido por tioglicolato ou *Leishmania*** [nossos dados da caracterização de células presentes no linfonodo após diferentes estímulos não apresentou diferenças significantes provavelmente devido a ter sido uma análise geral da população e que alterações mais importantes devem ocorrer se caracterizada apenas as populações migrantes do sítio inflamatório];

**4) Apenas uma pequena fração de macrófagos e células dendríticas mielóides infectadas ou contendo moléculas do parasito migram para o linfonodo drenante 24 horas após a injeção de parasitos na cavidade peritoneal** [nossos achados e os descrito por Jezzi e colaboradores (2006) e dados parciais de Baldwin e colaboradores 2004 demonstraram que células dendríticas infectadas migram do sítio de inoculação do parasito para o linfonodo drenante até três dias após a infecção. Contudo, antes disso macrófagos infectados são encontrados no linfonodo drenante, sugerindo serem as células disseminadoras do parasito na fase inicial da infecção];

**5) *Leishmania* são carregadas da cavidade peritoneal para o linfonodo drenante em um período menor ou igual a 15 minutos e atingem a corrente sanguínea na primeira hora após a injeção na cavidade peritoneal** [nossos achados necessitam de uma maior aprofundamento, contudo os dados de Iezzi e colaboradores (2006) e dados parciais de Baldwin e colaboradores 2004 demonstraram que há uma drenagem do parasito ou de antígenos do parasito para o linfonodo drenante independente do carregamento pelas células. Além disso, Itano e colaboradores (2003) demonstrou que proteínas solúveis drenam da pele para o linfonodo dentro de duas horas após injeção subcutânea, e que células necessitam de 14 horas para migrar da pele para o linfonodo, sugerindo que antes da interferência celular na disseminação do parasito, a drenagem do mesmo pode iniciar uma resposta imune diretamente no linfonodo, além de serem capazes de se disseminar para outros tecidos via corrente sanguínea se estabelecendo em diferentes órgãos].

## 10. PERSPECTIVAS

**1) Identificar os tipos de fagócitos migrantes contendo parasitos viáveis no linfonodo drenante vinte e quatro horas após sua injeção na cavidade peritoneal** *[através do rastreamento de fagócitos Ly 5.1<sup>+</sup> em animais Ly 5.1- infectados por Leishmania com fluorescência vermelha, a qual perde a fluorescência quando o parasito esta morto. Identificaremos os fagócitos por meio de citometria de fluxo e confirmação com microscopia confocal];*

**2) Confirmação da disseminação do parasito independente de fagócitos, nos tempos iniciais após a infecção** *[através da injeção de Leishmania metacíclica e utilização do modelo cutâneo com identificação de parasitos fluorescentes através de microscopia ótica, citometria de fluxo e cultivo de células do linfonodo para visualização do crescimento de parasitos viáveis];*

**3) Identificação de mecanismos moleculares envolvidos na retenção de células dendríticas infectadas na cavidade peritoneal** *[através da avaliação de alterações na afinidade de moléculas de integrinas nas células dendríticas incubadas com Leishmania retidas na cavidade peritoneal, por meio de anticorpos que identificam se a molécula estão em um estado de baixa ou alta afinidade. As moléculas de integrinas eram avaliadas através da técnica de citometria de fluxo];*

**4) Redação de três artigos científicos para publicação em revista de indexação internacional** *[no primeiro irá correlacionar o tamanho e a granulidade das populações celulares do exsudato peritoneal inflamatório com as características morfológicas e fenotípicas entre essas células. O Segundo artigo abrange sobre as alterações nos fagócitos inflamatórios induzidos pela infecção in vitro por L. amazonensis. O terceiro artigo descreve a cinética de disseminação do parasite Leishmania do sítio inflamatório para o linfonodo drenante e outros órgãos. Durante o período de um ano do doutorado sanduiche, realizado na Universidade de York na Inglaterra em conjunto com o grupo de Prof. Paul Kaye, nos produzimos um artigo que foi submetido a publicação em revista de indexação internacional (Cell Host & Microbe). O objetivo principal desse trabalho era examinar como macrófagos residentes do fígado (células de Kupffer) respondem a infecção do parasita L. donovani no seu microambiente local in vivo, na presença de inflamação (Anexo 1).]*

## 11. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, T. M.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H. Bacterial infections in patients with visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 162, n. 6, p. 1354–1359, dez. 1990.
- ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases** : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, v. 31, n. 2, p. 109–118, fev. 2012.
- ASHFORD, R. W. The Leishmaniasis as model zoonoses. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 91, n. 7, p. 693–701, out. 1997.
- ASHFORD, R. W. Parasites as indicators of human biology and evolution. **Journal of medical microbiology**, v. 49, n. 9, p. 771–772, set. 2000a.
- ASHFORD, R. W. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269–1281, nov. 2000b.
- ATO, M. et al. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral Leishmaniasis. **Nature Immunology**, v. 3, n. 12, p. 1185–1191, 18 nov. 2002.
- ATO, M. et al. Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice deficient in CCL19 and CCL21. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 9, p. 5486–5493, 1 maio. 2006.
- AUSTYN, J. M.; GORDON, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. **European Journal of Immunology**, v. 11, n. 10, p. 805–815, out. 1981.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 565–568, 9 abr. 1998.
- BALDWIN, T. et al. Dendritic cell populations in *Leishmania major*-infected skin and draining lymph nodes. **Infection and immunity**, v. 72, n. 4, p. 1991–2001, abr. 2004.
- BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 767–811, 2000.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245–252, 19 mar. 1998.
- BARON, E. J.; PROCTOR, R. A. Elicitation of peritoneal polymorphonuclear

neutrophils from mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 49, n. 3, p. 305–313, 26 mar. 1982.

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536–546, maio. 1991.

BEIL, W. J. et al. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous Leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 52, n. 2, p. 135–142, ago. 1992.

BELKAID, Y. 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. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 2, p. 969–977, 15 jul. 2000.

BELKAID, Y.; BUTCHER, B.; SACKS, D. L. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 4, p. 1389–1400, abr. 1998.

BELLI, A. et al. Widespread atypical cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) Chagasi* in Nicaragua. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 3, p. 380–385, set. 1999.

BELLINGAN, G. J. 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. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 157, n. 6, p. 2577–2585, 15 set. 1996.

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

BLACKWELL, J. M. et al. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **The Journal of experimental medicine**, v. 162, n. 1, p. 324–331, 1 jul. 1985.

BLANK, C. et al. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous Leishmaniasis with *Leishmania major*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 2, p. 418–425, fev. 1993.

BLOMGRAN, R.; ERNST, J. D. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 12, p. 7110–7119, 15 jun. 2011.

CAILHIER, J. F. et al. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 4, p. 2336–2342, 15 fev. 2005.

CALLAHAN, H. L. et al. Leishmania spp: temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for tropism in vivo. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 400–409, dez. 1996.

CAMPOS-PONCE, M. et al. Leishmania chagasi/infantum: further investigations on Leishmania tropisms in atypical cutaneous and visceral Leishmaniasis foci in Central America. **Experimental Parasitology**, v. 109, n. 4, p. 209–219, abr. 2005.

CARRERA, L. et al. Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 2, p. 515–526, 1 fev. 1996.

CARVALHAL, D. et al. The modelling of mononuclear phagocyte—connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of infection. **Experimental Parasitology**, v. 107, n. 3-4, p. 189–199, jul. 2004.

CAVANAGH, L. L.; ANDRIAN, VON, U. H. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. **Immunology and cell biology**, v. 80, n. 5, p. 448–462, out. 2002.

CHEN, L. et al. The involvement of neutrophils in the resistance to Leishmania major infection in susceptible but not in resistant mice. **Parasitology international**, v. 54, n. 2, p. 109–118, jun. 2005.

COLMENARES, M. et al. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst Leishmania species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96 Suppl 1, p. S3–7, abr. 2002.

COOK, A. D.; BRAINE, E. L.; HAMILTON, J. A. The phenotype of inflammatory macrophages is stimulus dependent: implications for the nature of the inflammatory response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 9, p. 4816–4823, 1 nov. 2003.

DA SAÚDE DO BRASIL SSM 2010A, M. Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010. **Boletim epidemiológico**, p. 1–1, 31 ago. 2010.

DA SAÚDE DO BRASIL SSM 2010B, M. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009. **Boletim epidemiológico**, p. 1–1, 13 out. 2010.

DA SILVA, R. P. et al. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic promastigotes to human macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 143, n. 2, p. 617–622, 15 jul. 1989.

DE ALMEIDA, M. C. et al. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 861–870, 21 out. 2003.

DEL HOYO, G. M. et al. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. **Nature**, v. 415, n. 6875, p. 1043–1047, 28 fev. 2002.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1455, n. 2-3, p. 341–352, 8 out. 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5, p. 417–423, set. 1996.

DESJEUX, P. Information on the epidemiology and control of the Leishmaniasis by country or territory. Geneva; **World Health Organization**, p. 1-47, feb. 1991.

DIJKSTRA, C. D. et al. Marginal zone macrophages identified by a monoclonal antibody: characterization of immuno- and enzyme-histochemical properties and functional capacities. **Immunology**, v. 55, n. 1, p. 23–30, maio. 1985.

DOS-SANTOS, W. L. C. et al. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis. **Parasitology Research**, v. 92, n. 2, p. 89–94, jan. 2004.

EICHNER, R. D.; SMEATON, T. C. Agar accumulates in rat peritoneal macrophages elicited with thioglycollate broth. **Scandinavian journal of immunology**, v. 18, n. 3, p. 259–263, set. 1983.

FIORINI, M.; MESSINA, M. F.; BARRACCHIA, A. Peripheral intramonocytic and intraneutrophil Leishmanias observed in a chronic myelomonocytic leukemia (CMMoL) patient. **Haematologica**, v. 87, n. 8, p. EIM21, ago. 2002.

FÖRSTER, R. et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. **Cell**, v. 99, n. 1, p. 23–33, 1 out. 1999.

FRUTH, U.; SOLIOZ, N.; LOUIS, J. A. Leishmania major interferes with antigen presentation by infected macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 150, n. 5, p. 1857–1864, 1 mar. 1993.

G KRAAL, M. J. Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. **Immunology**, v. 58, n. 4, p. 665, 1 ago. 1986.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71–82, jul. 2003.

GERTNER-DARDENNE, J., \* et al. Lipophilic Fluorochrome Trackers of Membrane Transfers between Immune Cells. **Immunological Investigations**, v. 36, n. 5, p. 665–685, set. 2007.

GHOSN, E. E. B. et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences**, v. 107, n. 6, p. 2568–2573, 9 fev. 2010.

GILLESPIE, R. D.; MBOW, M. L.; TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite immunology**, v. 22, n. 7, p. 319–331, jul. 2000.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953–964, dez. 2005.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of Leishmaniasis in the New World. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687–725, dez. 1989.

GU, L. et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. **Molecular cell**, v. 2, n. 2, p. 275–281, ago. 1998.

GUARGA, J. L. et al. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. **Acta tropica**, v. 77, n. 2, p. 203–207, 2 nov. 2000.

GUNN, M. D. et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 3, p. 451–460, 1 fev. 1999.

GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. **Infection and immunity**, v. 61, n. 4, p. 1553–1558, abr. 1993.

HAAN, DEN, J. M.; LEHAR, S. M.; BEVAN, M. J. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 12, p. 1685–1696, 18 dez. 2000.

HART, D. N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. **Blood**, v. 90, n. 9, p. 3245–3287, 1 nov. 1997.

HERMIDA, M. D. R. Fagócitos mononucleares inflamatórios potencialmente envolvidos no transporte de *Leishmania* em hospedeiros vertebrados. **Dissertação de Mestrado**, v. v 1, p. 1–92, 30 set. 2007.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 2 out. 1999.

IEZZI, G. et al. Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after *Leishmania major* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 2, p. 1250–1256, 15 jul. 2006.

INABA, K. et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse

bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **The Journal of experimental medicine**, v. 176, n. 6, p. 1693–1702, 1 dez. 1992.

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. **Laboratory Investigation**, v. 42, n. 3, p. 310–317, mar. 1980.

ITANO, A. A. et al. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 47–57, jul. 2003.

IYODA, T. et al. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 10, p. 1289–1302, 20 maio. 2002.

JEBBARI, H. et al. Leishmania major promastigotes inhibit dendritic cell motility in vitro. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 1023–1026, fev. 2002.

JIMÉNEZ, M. et al. Variability of Leishmania (Leishmania) infantum among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. **FEMS microbiology letters**, v. 131, n. 2, p. 197–204, 1 set. 1995.

KAMANAKA, M. 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.

KAMHAWI, S. et al. Protection against cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, v. 290, n. 5495, p. 1351–1354, 17 nov. 2000.

KAYE, P. M. et al. Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 11, p. 2850–2854, nov. 1994.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, ago. 2011.

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic research**, v. 43, n. 1-3, p. 25–61, 2009.

KIM, J.-M. et al. Intracellular glutathione status regulates mouse bone marrow monocyte-derived macrophage differentiation and phagocytic activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 325, n. 1, p. 101–108, 3 dez. 2004.

KURIHARA, T. et al. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. **The Journal of experimental medicine**, v. 186, n. 10, p. 1757–1762, 17 nov. 1997.

- KUZIEL, W. A. et al. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 22, p. 12053–12058, 28 out. 1997.
- LAGASSE, E.; WEISSMAN, I. L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. **Journal of Immunological Methods**, v. 197, n. 1-2, p. 139–150, 16 out. 1996.
- LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes-Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, maio. 2003.
- LEIJH, P. C. et al. Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. **Infection and immunity**, v. 46, n. 2, p. 448–452, nov. 1984.
- LEON, B.; ARDAVIN, C. Monocyte migration to inflamed skin and lymph nodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1. **Blood**, v. 111, n. 6, p. 3126–3130, 15 mar. 2008.
- LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against *Leishmania*. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519–531, abr. 2007.
- LI, Y. M. et al. Glycation products in aged thioglycollate medium enhance the elicitation of peritoneal macrophages. **Journal of Immunological Methods**, v. 201, n. 2, p. 183–188, 28 fev. 1997.
- LIPSCOMB, M. F.; MASTEN, B. J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 97–130, jan. 2002.
- LOCKSLEY, R. M. et al. Cutaneous host defense in Leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. **Infection and immunity**, v. 56, n. 2, p. 336–342, fev. 1988.
- LU, B. et al. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 187, n. 4, p. 601–608, 16 fev. 1998.
- LYTTON, S. D.; MOZES, E.; JAFFE, C. L. Effect of macrophage infection by *Leishmania* on the proliferation of an antigen-specific T-cell line, TPB1, to a non-parasite antigen. **Parasite immunology**, v. 15, n. 8, p. 489–492, ago. 1993.
- MARASKOVSKY, E. et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 5, p. 1953–1962, 1 nov. 1996.

MARTÍN, P. et al. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8 $\alpha$ + B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. **Blood**, v. 100, n. 2, p. 383–390, 15 jul. 2002.

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

MCCONVILLE, M. J. et al. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **The EMBO journal**, v. 11, n. 10, p. 3593–3600, out. 1992.

MEGIOVANNI, A. M. et al. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 5, p. 977–988, maio. 2006.

MEIER, C. L.; SVENSSON, M.; KAYE, P. M. *Leishmania*-induced inhibition of macrophage antigen presentation analyzed at the single-cell level. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 12, p. 6706–6713, 15 dez. 2003.

MISSLITZ, A. C. et al. Two waves of antigen-containing dendritic cells in vivo in experimental *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 3, p. 715–725, mar. 2004.

MIYAZAKI, S. et al. Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide induces dynamic migration of Gr-1<sup>high</sup> polymorphonuclear neutrophils in the murine abdominal cavity. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 11, n. 3, p. 452–457, maio. 2004.

MOLL, H. et al. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 7, p. 1595–1601, jul. 1993.

MOLL, H.; FLOHÉ, S.; RÖLLINGHOFF, M. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 3, p. 693–699, mar. 1995.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 135, n. 4, p. 2785–2789, out. 1985.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, dez. 2008.

MURAILLE, E. 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*. **Infection and immunity**, v. 71, n. 5, p. 2704–2715, maio. 2003.

NG, L. G. et al. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, p. e1000222, nov. 2008.

NIBBERING, P. H.; LEIJH, P. C.; VAN FURTH, R. Quantitative immunocytochemical characterization of mononuclear phagocytes. II. Monocytes and tissue macrophages. **Immunology**, v. 62, n. 2, p. 171–176, out. 1987.

NIEVES, E.; PIMENTA, P. F. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **Journal of medical entomology**, v. 37, n. 1, p. 134–140, jan. 2000.

NOYES, H. et al. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous Leishmaniasis in humans. **Experimental Parasitology**, v. 85, n. 3, p. 264–273, mar. 1997.

PALFRAMAN, R. T. et al. H. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. **The Journal of experimental medicine**, v. 194, n. 9, p. 1361–1373, 5 nov. 2001.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. **Veterinary parasitology**, v. 114, n. 2, p. 97–111, 30 maio. 2003.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 ago. 2008.

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous Leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 1290–1296, set. 2009.

PINHEIRO, N. F. et al. *Leishmania* infection impairs beta 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. **Infection and immunity**, v. 74, n. 7, p. 3912–3921, jul. 2006.

POTTER, P. K. et al. Lupus-prone mice have an abnormal response to thioglycolate and an impaired clearance of apoptotic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 6, p. 3223–3232, 15 mar. 2003.

PRINA, E. 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. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 2, p. 315–

325, 15 jan. 2004.

PUENTES, S. M. et al. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 145, n. 12, p. 4311–4316, 15 dez. 1990.

PULENDRAN, B. et al. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 5, p. 2222–2231, 1 set. 1997.

PULENDRAN, B. et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 3, p. 1036–1041, 2 fev. 1999.

QU, C. et al. Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 10, p. 1231–1241, 15 nov. 2004.

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

RANDOLPH, G. J.; OCHANDO, J.; PARTIDA-SÁNCHEZ, S. Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. **Annual Review of Immunology**, v. 26, n. 1, p. 293–316, abr. 2008.

REIS E SOUSA, C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 1, p. 21–25, fev. 2004.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral Leishmaniasis. **Research in veterinary science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, ago. 2006.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral Leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 87–95, 15 mar. 2009.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual review of entomology**, v. 32, p. 463–478, 1987.

RIBEIRO, J. M.; ROSSIGNOL, P. A.; SPIELMAN, A. Role of mosquito saliva in blood vessel location. **The Journal of experimental biology**, v. 108, p. 1–7, jan. 1984.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 7, p. 4454–4462, 1 abr. 2004.

- RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-Leishmania response. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002536, fev. 2012.
- RITTER, U. et al. CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in Leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 6, p. 1542–1550, jun. 2004.
- RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 16, n. 7, p. 292–297, jul. 2000.
- ROBBIANI, D. F. et al. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. **Cell**, v. 103, n. 5, p. 757–768, 22 nov. 2000.
- RODRIGUES DE-FREITAS, L. A.; DOS-SANTOS, W. L. C. **Patologia**. Tradução. 7. ed. [S.l.] Rio de Janeiro, 2006. p. 1359–1367
- RUB, A. et al. Cholesterol depletion associated with Leishmania major infection alters macrophage CD40 signalosome composition and effector function. **Nature Immunology**, v. 10, n. 3, p. 273–280, mar. 2009.
- SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417–1419, 30 mar. 1984.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annual review of microbiology**, v. 55, p. 453–483, 2001.
- SAHA, B. 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. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 9, p. 2492–2498, set. 1995.
- SALDANHA MACHADO, C. J. et al. Current Brazilian Law on Animal Experimentation. **Science**, v. 324, n. 5935, p. 1643–1644, 25 jun. 2009.
- SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 4, p. 611–614, 15 fev. 1999.
- SANTOS, DOS, M. S. T. et al. Leishmania major: recruitment of Gr-1+ cells into draining lymph nodes during infection is important for early IL-12 and IFN gamma production. **Experimental parasitology**, v. 119, n. 3, p. 403–410, jul. 2008.

SATO, N. 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. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 2, p. 205–218, 17 jul. 2000.

SCAPINI, P. et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological reviews**, v. 177, p. 195–203, out. 2000.

SCHEICHER, C. et al. Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Immunological Methods**, v. 154, n. 2, p. 253–264, 2 out. 1992.

SCHWARTZMAN, J. D.; PEARSON, R. D. The interaction of Leishmania donovani promastigotes and human fibroblasts in vitro. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 34, n. 5, p. 850–855, set. 1985.

SERBINA, N. V. et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 59–70, jul. 2003.

SERBINA, N. V. et al. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. **Annual Review of Immunology**, v. 26, n. 1, p. 421–452, abr. 2008.

SHORTMAN, K.; LIU, Y.-J. Mouse And Human Dendritic Cell Subtypes. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 3, p. 151–161, mar. 2002.

SILVA, F. et al. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to Lutzomyia longipalpis bites. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 1, p. 94–98, jan. 2005.

SIMS, T. N.; DUSTIN, M. L. The immunological synapse: integrins take the stage. **Immunological reviews**, v. 186, p. 100–117, ago. 2002.

SOUZA, G. E. et al. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents and actions**, v. 24, n. 3-4, p. 377–380, jul. 1988.

SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annual review of physiology**, v. 57, p. 827–872, 1995.

STEBUT, VON, E. 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. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 8, p. 1547–1552, 19 out.

1998.

STEIGERWALD, M.; MOLL, H. Leishmania major modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 2564–2567, abr. 2005.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. **The Journal of experimental medicine**, v. 139, n. 2, p. 380–397, 1 fev. 1974.

SÜSS, G.; SHORTMAN, K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 4, p. 1789–1796, 1 abr. 1996.

TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from Lutzomyia longipalpis induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 12, p. 8346–8353, 15 dez. 2005.

THALHOFER, C. J. et al. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan Leishmania infantum chagasi. **Infection and immunity**, v. 79, n. 1, p. 108–117, jan. 2011.

TRAVER, D. et al. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. **Science**, v. 290, n. 5499, p. 2152–2154, 15 dez. 2000.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 128, n. 3, p. 415–435, 1 set. 1968.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 1 dez. 2004.

VICARI, A. P. et al. In vivo manipulation of dendritic cell migration and activation to elicit antitumour immunity. **Novartis Foundation symposium**, v. 256, p. 241–54– discussion 254–69, 2004.

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. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 2, p. 565–573, 15 jul. 1997.

WEI, X. Q. et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 408–411, 1 jun. 1995.

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

WIEGE, K. et al. Defective macrophage migration in *gai2*- but not *gai3*-deficient mice. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 2, p. 980–987, 15 jul. 2012.

WITKO-SARSAT, V. et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory Investigation**, v. 80, n. 5, p. 617–653, maio. 2000.

WRIGHT, S. D.; SILVERSTEIN, S. C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 158, n. 6, p. 2016–2023, 1 dez. 1983.

WU, L. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. **Blood**, v. 98, n. 12, p. 3376–3382, 1 dez. 2001.

WU, L.; LI, C. L.; SHORTMAN, K. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 3, p. 903–911, 1 set. 1996.

WU, Q. et al. Kinetics of the phenotype and function of murine peritoneal macrophages following acute inflammation. **Cellular & molecular immunology**, v. 1, n. 1, p. 57–62, fev. 2004.

WYLER, D. J.; SYPEK, J. P.; MCDONALD, J. A. In vitro parasite-monocyte interactions in human Leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. **Infection and immunity**, v. 49, n. 2, p. 305–311, ago. 1985.

YANG, D. et al. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, n. 1, p. 9–14, jul. 2000.

YEN, J.-H.; KONG, W.; GANEA, D. IFN-beta inhibits dendritic cell migration through STAT-1-mediated transcriptional suppression of CCR7 and matrix metalloproteinase 9. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p. 3478–3486, 1 abr. 2010.

YURDAKUL, P. [Immunopathogenesis of Leishmania infections]. **Mikrobiyoloji bülteni**, v. 39, n. 3, p. 363–381, jul. 2005.

ZER, R. et al. Effect of sand fly saliva on Leishmania uptake by murine macrophages. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 810–814, jun. 2001.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Definition of Human Blood Monocyte. **Journal of leukocyte biology**, v. 67 (5), p. 603–606, maio. 2000

**12. ANEXO**