

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

LUDIMILA PAULA VAZ CARDOSO

**Envolvimento de células ER-MP58⁺ na produção
de IL-12 em linfonodos drenantes da infecção inicial
por *Leishmania major* em camundongos BALB/c**

Orientador:

Prof. Dr. MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA

Co-Orientadora:

Profa. Dra. GLÓRIA MARIA COLLET DE ARAÚJO LIMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Goiânia-GO, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL

LUDIMILA PAULA VAZ CARDOSO

**Envolvimento de células ER-MP58⁺ na produção
de IL-12 em linfonodos drenantes da infecção inicial
por *Leishmania major* em camundongos BALB/c**

Orientador:

Prof. Dr. MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA

Co-Orientadora:

Profa. Dra. GLÓRIA MARIA COLLET DE ARAÚJO LIMA

Dissertação submetida ao CPGMT/IPTSP/UFG
como requisito parcial para obtenção do Grau de
Mestre, em Medicina Tropical, na área de
concentração em Imunologia.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP.

Goiânia-GO, 2006

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

C268e **Cardoso, Ludimila Paula Vaz**
Envolvimento de células ER-MP58⁺ na produção de IL-12 em linfonodos drenantes da infecção inicial por *Leishmania major* em camundongos BALB/c / Ludimila Paula Vaz Cardoso. – Goiânia, 2006.
64 f. : il.

Orientador: Milton Adriano Pelli de Oliveira e co-orientadora: Glória Maria Collet de Araújo Lima

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2006.

Bibliografia: f. 55-64

1. *Leishmania major* – Resposta imune 2. Interleucina 12 3. Células ER-MP58⁺ 4. Células ER-HR3⁺ 5. Resposta Imune 6. Linfocinas I. Oliveira, Milton Adriano Pelli de II. Lima, Glória Maria Collet de Araújo III. Universidade Federal de Goiás. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública IV. Título.

CDU: 616.928.5:612.017

*Os sonhos de ontem são as esperanças de hoje
e amanhã, a realidade...*

*Este trabalho é dedicado aos meus pais: Vilma e Adivaldo Cardoso,
pelo amor, dedicação, apoio financeiro em tantas e
proveitosas oportunidades de estudo que já tive
e pelos incentivos em todos os meus objetivos que desejo ainda alcançar.
Ao meu querido namorado, o primeiro e o grande incentivador disso tudo,
Guilherme Honorato Pinheiro, pelo amor, companheirismo,
compreensão e muita paciência em todos os momentos.*

Agradecimentos

A minha eterna gratidão aos meus orientadores: Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira, por ter me aceitado em seu laboratório, pelo empenho na orientação deste projeto e por ter me apresentado esse mundo tão surpreendente que é a pesquisa; a Dra. Glória Maria Collet de Araújo Lima, por me amparar nesse último ano de trabalho, pela oportunidade em estagiar em seu laboratório na Universidade de São Paulo e pela excepcional contribuição na minha formação.

A grandiosa humana, Dra. Miriam Leandro Dorta, pela permissão de usufruir o seu laboratório, pelos vários incentivos nas horas difíceis e pelo reconhecimento nas horas de alegria.

A notável Dra. Fátima Ribeiro-Dias, também pelo consentimento pelo uso do seu laboratório e pela colaboração intelectual e financeira desde o princípio do desenvolvimento deste projeto.

As Dra. Ises Abrahamsonh e Dra. Glória Maria Collet de Araújo Lima (ICB/USP) pela doação de inúmeros materiais, reagentes e equipamentos.

A Ângela, Tânia, Luís, Laércio, Natalie, Lia e Marilú, pelo suporte durante meu estágio na USP.

Ao Dr. Ruy de Souza Lino Júnior pela prontidão e auxílio na reprodução das fotos das lâminas de imunocitoquímica.

Ao meu "animal care", Guilherme Honorato, por ter tido paciência em segurar os animais para as inoculações.

A Dra. Miriam Leandro Dorta, Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis e ao Dr. Ruy de Souza Lino Júnior pela contribuição na banca de qualificação.

A Dra. Elvira Saraiva, Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis pela contribuição na banca de defesa da dissertação.

A todos os meus amigos do laboratório pelo companheirismo e amizade: Alause, Carina, Carla, Carlos, Fábio, Gabriela, Hélio, Hermínio, José Paulo, Marcos, Marília, Mayara, Maza, Milla, Renata, Robson, Rodrigo, Rose, Rosidete, Tâmara e Tatiana.

A minha amiga Carmem Fleury, pela atenção, cuidado e carinho.

A todos os meus amigos de outros laboratórios, pela sempre boa convivência e amizade: Alessandra, Alexander, Arioldo, Ângela, Cristina Melo-Cardoso, Cristina Rodrigues, Marcos, Mariana, Marize, Mayra, Michelle, Rafael, Rodrigo, Tatiane, Vânia e Viviane.

Aos funcionários do Biotério do IPTSP/UFV, Iraci, Viviane, Marli e Raimundo pela conservação da limpeza, manutenção das linhagens de camundongos e auxílio nos cuidados aos animais.

Aos funcionários do IPTSP/UFV, José Clementino, Kariny, Fernando, Almir, Vanderlei, Divina Helena, Antônia, Cícero, Abigail, Eliane, Fábio, José Moreira, Wagner, Cláudio e Wilson, pela atenção e competência.

A Capes pela assistência financeira através da bolsa de estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC - Células apresentadoras de antígenos

CD62L- L-selectina

D.O. - Densidade óptica

DMSO – dimetil sulfóxido

EDTA - Etilenodiaminotetracético

ELISA - Enzima-imunoensaio

FACS - Sistema de Citometria de Fluxo

FcR - receptor para a porção Fc de imunoglobulinas

FMVZ/USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

gp63 – protease de superfície de 63 kDa

HEVs - vênulas de endotélio alto (do inglês, *high endothelial venules*)

ICB/USP – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

IFN- γ - Interferon -gama

IF Total - células de linfonodos de camundongos BALB/c infectados

IPTSP/UFG – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás

IL-1 - Interleucina -1

IL-1 α – Interleucina 1 alfa

IL-2 - Interleucina -2

IL-4 - Interleucina -4

IL-5 - Interleucina -5

IL-6 - Interleucina -6

IL-12 - Interleucina -12

IL-15 - Interleucina -15

IL-18 - Interleucina -18

IL-23 - Interleucina -23

IL-27 - Interleucina -27

IL-12R β 1 - Cadeia β 1 do receptor para interleucina -12

IL-12R β 2 - Cadeia β 2 do receptor para interleucina -12

IL-12R β 2KO – Knockout da cadeia β 2 do receptor para interleucina -12

IL-23R - receptor para interleucina -23

JAK-STAT - via da Janus kinase de transdução e ativação de transcrição

kDNA - ácido desoxirribonucléico condensado

L. - *Leishmania*

LACK - Proteína imunodominante de *Leishmania* homóloga ao receptor da proteína Kinase C

LAD - leishmaniose anérgica difusa

LDA - Teste de diluição limitante

LPG - Lipofosfoglicano

LPS - lipopolissacarídeo

LTA - leishmaniose tegumentar americana

LV - leishmaniose visceral

MCP-1/CCL2 - monocina quimiotática de monócito 1 (do inglês, *monocyte chemoattractant protein-1*)

MHC - complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, *major histocompatibility complex*)

Mphi - macrófagos inflamatórios

NO - óxido nítrico

OPD - O-fenilindiamina diclorada

PECAM-1 – molécula de adesão de células endoteliais e plaquetas

PBS - Solução salina tamponada com fosfato (do inglês *phosphate buffer saline*)

rIL-12 - Interleucina -12 recombinante

SD - Desvio Padrão

SBF - Soro Bovino Fetal

SFM - Sistema fagocítico mononuclear

TCR V β 4V α 8 CD4 – Cadeia β da porção variável 4 e cadeia α da porção variável 8 do receptor de células T CD4+

Th1 – Linfócitos T auxiliares do tipo 1 (do inglês, T *helper* 1)

Th2 – Linfócitos T auxiliares do tipo 2 (do inglês, T *helper* 2)

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

V. – *Viannia*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida da <i>Leishmania</i> no hospedeiro mamífero e no inseto vetor.....	06
Figura 2. Curva de crescimento <i>in vitro</i> de <i>L. (L.) major</i>	26
Figura 3. Tempo precoce de detecção da produção de IL-12p40 por células de linfonodos drenantes da infecção por <i>L. (L.) major</i>	28
Figura 4. Produção de IL-12p40 por células de linfonodos de camundongos BALB/c infectados com diferentes doses de inóculo de <i>L. (L.) major</i>	30
Figura 5. Produção de IL-12p40 por células de linfonodo em diferentes concentrações/mL em cultura.....	32
Figura 6. Quantificação de parasitos vivos no linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c 48 h após a infecção com <i>L. (L.) major</i>	34
Figura 7. Teste de marcação de células CD31 ⁺ de linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c infectados e de células de medula óssea de camundongos BALB/c controles.....	36
Figura 8. Teste de marcação do sobrenadante de cultura contendo o anticorpo ER-MP58.....	38
Figura 9. Teste de marcação do anticorpo purificado ER-HR3.....	40
Figura 10. Teste de marcação do anticorpo purificado 33D1.....	42
Figura 11. Cinética do aparecimento de células ER-MP58 ⁺ , ER-HR3 ⁺ e 33D1 ⁺ em linfonodos poplíteos nas primeiras 48 h de infecção por <i>L. (L.) major</i>	44
Figura 12. Imunocitoquímica de células ER-HR3 ⁺ e ER-MP58 ⁺	46
Figura 13. Produção de IL-12p40 pela população enriquecida de células ER-MP58 ⁺ e pela população ER-MP58 ⁻ após 48 h de infecção por <i>L. (L.) major</i>	47
Figura 14. Produção de IL-12p40 pela população enriquecida de células ER-HR3 ⁺ e pela população ER-HR3 ⁻ após 48 h de infecção por <i>L. (L.) major</i>	48

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1.INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Leishmaniose: Histórico.....	01
1.2 Leishmaniose: Doença.....	02
1.3 Ciclo de desenvolvimento do parasito e modo de transmissão.....	04
1.4 Imunologia da leishmaniose murina: ênfase na IL-12.....	07
1.5 Sistema fagocítico mononuclear.....	10
2.OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivos Gerais.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Animais.....	16
3.2 Cultivo e manutenção de parasitos de <i>L. (L.) major</i>	16
3.3 Curva de crescimento <i>in vitro</i> dos parasitos de <i>L. (L.) major</i>	17
3.4 Inoculação dos camundongos BALB/c com <i>L. (L.) major</i>	17
3.5 Quantificação de parasitos de <i>L. (L.) major</i> nos linfonodos drenantes.....	17
3.6 Obtenção e cultura de células de linfonodos.....	18
3.7 Obtenção de células de medula óssea.....	18
3.8 Anticorpos.....	19
3.9 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação da IL-12p40.....	20
3.10 Separação das populações celulares ER-MP58 ou ER-HR3 positivas e negativas de linfonodos de camundongos BALB/c.....	21
3.11 Imunocitoquímica para detecção de células CD31 ⁺ , ER-MP58 ⁺ , ER-HR3 ⁺ e 33D1 ⁺	22

3.12 Análises estatísticas.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1 Curva de crescimento <i>in vitro</i> dos parasitos de <i>L. (L.) major</i>	25
4.2 Otimização da produção de IL-12p40 por células de linfonodos de camundongos inoculados com <i>L. (L.) major</i>	27
4.2.1 Definição do tempo precoce da infecção que leva a detecção de IL-12 produzida por células dos linfonodos drenantes do sítio de inóculo.....	27
4.2.2 Avaliação da dose de inóculo de <i>L. (L.) major</i>	29
4.2.3 Avaliação da concentração celular para otimização da detecção de IL-12 nos sobrenadantes de cultura.....	31
4.3 Quantificação dos parasitos em linfonodos drenantes do sítio da infecção de camundongos BALB/c inoculados com <i>L. (L.) major</i>	33
4.4 Estimativa da frequência de células expressando os marcadores reconhecidos pelos anticorpos ER-MP12, ER-MP58, ER-HR3 e 33D1 em linfonodos de camundongos inoculados com <i>L. (L.) major</i>	35
4.4.1. Titulação dos sobrenadantes de cultura de hibridomas contendo os anticorpos ER-MP12, ER-MP58 e dos anticorpos purificados ER-HR3 e 33D1.....	35
4.5. Cinética do aparecimento de células ER-MP58 ⁺ , ER-HR3 ⁺ e 33D1 ⁺ nos linfonodos de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) major</i>	43
4.6. Produção de IL-12p40 por células ER-MP58 ⁺ e ER-HR3 ⁺ de linfonodos de camundongos BALB/c infectados por <i>L. (L.) major</i>	45
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

RESUMO

O desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 é o evento chave para prevenir a infecção murina por *Leishmania* e está interligada à produção de IL-12 por monócitos, células dendríticas, macrófagos e neutrófilos. A sinalização via IL-12 aumenta a produção de IFN- γ por células T, favorecendo o perfil Th1 da resposta imune e o fenótipo de resistência à infecção. A leishmania, no hospedeiro vertebrado, reside em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), o qual também é responsável pela eliminação do parasito. A participação de células indiferenciadas do SFM na produção de IL-12 vem sendo discutida. Foi demonstrado recentemente que uma população de fagócitos mononucleares, derivados de cultura de medula óssea e expressando o marcador ER-HR3 produzia grande quantidade de IL-12p40 após estimulação *in vitro* com formas procíclicas ou metacíclicas de *L. (L.) major*. A produção de IL-12 na infecção por *L. (L.) major* por fagócitos em diferentes estágios de maturação *in vivo* ainda não está claro. Neste trabalho, avaliamos o envolvimento de células em diferentes estágios de maturação em linfonodos drenantes após 48 h de infecção por *L. (L.) major* em camundongos BALB/c, quanto à produção de IL-12p40. Verificamos que células CD31⁺ (precursores de fagócitos mononucleares) estão ausentes nos linfonodos drenantes do sítio do inóculo e que o número de células ER-HR3⁺ (fagócitos mononucleares em estágio intermediário de maturação), células ER-MP58⁺ (fagócitos imaturos) e 33D1⁺ (subpopulações de células dendríticas) aumenta no período de 48 h após a infecção. Mostramos também que, células ER-MP58⁺ são as principais responsáveis por grande parte da produção de IL-12 nos linfonodos drenantes 48 h após a infecção por *L. (L.) major* em camundongos BALB/c. Sugerimos que, *in vivo*, a população ER-MP58⁺, juntamente com as outras populações celulares, conhecidas como produtoras de IL-12, têm um papel relevante na inflamação induzida pelo inóculo parasitário.

ABSTRACT

The development of a Th1 immune response is the key event to prevent *Leishmania* infection and is linked with the IL-12 production by monocytes, dendritic cells, macrophages and neutrophils. The IL-12 signal induces the increase of IFN- γ production by T cells, favoring the profile of the Th1 immune response and the resistance phenotype to the infection. In the vertebrate host, the leishmania inhabits in cells of the mononuclear phagocyte system (MPS), which is also responsible for the elimination of the parasite. The participation of immature cells of MPS in the initial production of IL-12 has been discussed. It was demonstrated recently that a population of mononuclear phagocytes, derived from bone marrow culture and expressing the marker ER-HR3 produced great amount of IL-12p40 after stimulation *in vitro* with procyclic or metacyclic promastigotes of *L. (L.) major*. The initial production of IL-12 by MPS cells is under investigation. It is unclear the role of mononuclear phagocytes, in different stages of maturation, in the production of IL-12p40 *in vivo*. In this work, we evaluated the involvement of MPS cells, in different stage of maturation, with the IL-12p40 production *in vivo* in draining lymph nodes of BALB/c mice after 48 h of infection with *L. (L.) major*. Our results showed that CD31⁺ cells (mononuclear phagocytes precursors) were absent in the draining lymph nodes of the subcutaneously footpad injection and that the number of ER-MP58⁺ cells (immature mononuclear phagocytes), ER-HR3⁺ cells (mononuclear phagocytes in the intermediate stage of maturation) and 33D1⁺ (mature phagocytes) increase in the period of 48 h after infection. We showed, also, that ER-MP58⁺ cells were the main responsible for great part of the draining lymph nodes IL-12 production 48 h after infection with stationary-phase promastigotes of *L. (L.) major* in mice BALB/c. We suggested that, *in vivo*, the ER-MP58⁺ population, together with other cellular populations, known as IL-12 producers, ER-MP58⁺ cell has an important role in the inflammation induced by the parasitic inoculum.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose: Histórico

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, que tem como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania*. Estes protozoários pertencem à classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, sendo caracterizados pela presença de uma mitocôndria única e longa, a qual possui DNA condensado (kDNA) formando uma organela característica, o cinetoplasto (Honigberg *et al.*, 1964; Desjeux, 1996).

Doenças cutâneas com características de leishmaniose vêm sendo descritas desde a antigüidade por "médicos" árabes, incluindo Avicena no Oriente Médio e Pérsia, por egípcios (papiros), estudiosos maometanos (séculos X a XV) e até em textos bíblicos (Belazzoug, 1992). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) foi retratada pelos ceramistas incas no Peru no período pré-hispânico (Serarcangeli & Pennica, 1996).

A leishmaniose visceral (LV) foi descrita na Grécia em 1835 quando então era denominada "ponos" ou "hapoplinakon". Foi na Índia em 1869 que recebeu o nome "kala-jwar" ou "kala-azar" que significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (Leite, 1958; Bailey & Bishop, 1959).

As primeiras observações e a primeira descrição de uma leishmania foram feitas por Borovsky em 1898 na Rússia, isolada de um paciente com a forma cutânea (Hoare, 1938). Em 1900, William Leishman identificou um protozoário no baço de um soldado na Índia, que acabara de vir a óbito decorrente de uma febre local conhecida como febre "Dum Dum" ou "kala-azar". Suas anotações não foram publicadas até 1903 quando Donovan encontrou o mesmo parasito em outro paciente. Leonard Rogers, em 1904, foi o primeiro a conseguir cultivar o parasito e observou formas flageladas nas culturas. Patton, em 1907, observou as formas amastigotas em monócitos e as formas leptomonas (promastigotas) no intestino de insetos (Faust *et al.*, 1974). No Brasil em 1909, Lindenberg, Carini e Paranhos demonstraram a presença de leishmanias em úlceras cutâneas de pacientes no estado de São Paulo.

Em 1911, Splendore diagnosticou a forma mucosa da doença (Rey, 1991).

Somente em 1993 a Organização Mundial de Saúde veio a considerar as leishmanioses como a segunda doença de importância em saúde pública, causada por protozoários.

1.2 Leishmaniose: Doença

Cerca de 12 milhões de pessoas são afetadas com a doença em 88 países de todos os continentes, com exceção da Austrália. Trezentos e cinquenta milhões de pessoas estão expostas ao risco da infecção, com uma incidência anual de 2 milhões de casos novos (WHO, 1998), sendo a sua notificação compulsória em apenas 30 países.

As leishmanioses apresentam uma variedade de manifestações clínicas, que vão desde formas menos graves, como uma simples lesão cutânea de cura espontânea (leishmaniose cutânea localizada), até formas mais graves, como lesões destrutivas da mucosa ou formas viscerais, que podem ser resistentes à terapêutica convencional, podendo levar à morte (Kane *et al.* 2000).

As espécies de *Leishmania* foram separadas em dois subgêneros, de acordo com seu desenvolvimento dentro do vetor: *Leishmania* (aos parasitos que limitam seu desenvolvimento ao estômago de vetor) e *Viannia* (aos parasitos que se aderem às paredes do piloro e/ou íleo através do flagelo) (Shaw, 1994). A esta classificação foram acrescentados outros parâmetros que permitiram a distinção de mais espécies de *Leishmania*.

Especialistas distinguem cerca de 18 espécies de *Leishmania* em função do tipo de lesão que causam e de algumas características imunológicas e moleculares. Apesar de serem todas inoculadas na pele, espécies distintas de *Leishmania* têm preferências por órgãos diferentes e causam lesões maiores ou menores, produzem ou não metástases e podem ser ou não autocuráveis. Induzem imunidade permanente ou temporária e, às vezes, nenhuma destas. Esse conjunto de fatores e suas possíveis combinações com a capacidade de resposta do paciente é o responsável pelas diversas formas clínicas das leishmanioses (Ashford *et al.*, 1992;

Kane *et al*, 2000).

Nos casos mais simples, como do "botão do oriente" no Velho Mundo, causado pela *L. (L.) tropica*, a ulceração da pele é pequena, cura espontaneamente e confere imunidade permanente. Outras duas formas de lesões cutâneas mais agressivas e mutilantes são causadas pela *L. (L.) major* no Oriente Médio e *L. (L.) aethiopica* na Etiópia (Evans, 1993).

No novo mundo, já foram descritos vários tipos de ulcerações cutâneas causadas por leishmanias que recebiam designações regionais: uta, espúndia, pian bois, úlcera de Bauru. As formas tegumentares, no Brasil, são determinadas por seis espécies: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lansonii*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (L.) amazonensis*; a forma mucosa, pela *L. (V.) braziliensis* e eventualmente pela *L. (V.) guyanensis* (Marzochi & Marzochi, 1994). A LTA é caracterizada pelo surgimento de lesões na pele (geralmente úlceras profundas) únicas ou múltiplas, principalmente nas áreas expostas do corpo.

Existe ainda uma forma rara e extremamente grave de leishmaniose denominada leishmaniose anérgica difusa (LAD). A LAD caracteriza-se pela disseminação generalizada do parasito pela pele, evoluindo para a formação de nódulos e placas com caráter altamente deformante e se manifesta em indivíduos com marcada deficiência imunológica. Esta forma está associada à infecção por *L. (L.) amazonensis*. A evolução da doença é invariavelmente letal (Gontijo & Carvalho, 2003).

Outra forma grave da infecção é a forma visceral, também presente no Velho Mundo, em toda a Ásia, incluindo a China e particularmente na Índia. Manifesta-se por febre pouco elevada, mas diária e constante, marcado emagrecimento e grande aumento do baço e fígado. A LV é particularmente grave em crianças e quase sempre evolui para a morte. No Brasil, a LV é causada pela *L. (L.) chagasi* e no Velho Mundo, pela *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* (Shaw 1994; Dickerhoff *et al.*, 1991).

Todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas por insetos vetores (dípteros da subfamília Phlebotominae) do gênero *Phlebotomus* (no Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (no Novo Mundo), sendo parasitos obrigatoriamente intracelulares em hospedeiros vertebrados (Alexander & Russell, 1992). Algumas leishmanias

proliferam-se apenas em uma determinada espécie de flebótomo, outras adotam um largo espectro de vetores. No Brasil, estes vetores são conhecidos como: tatuíra, birigui, mosquito-palha, mosquito pólvora, catuqui, asa branca, cangalha ou cangalhinha. São pequenos, 2 a 3 mm, pouco menores do que os pernilongos comuns, pilosos, coloração clara (amarelo palha) e possuem a característica de pousarem com as asas entreabertas e mantidas eretas sem se entrecruzarem. Estes insetos se alimentam do néctar das flores e sucos das frutas. Apenas as fêmeas são hematófagas (Killick-Kendrick, *et al.*, 1981).

A *Leishmania* é um parasito que se multiplica por divisão binária. No inseto vetor e no meio de cultura os parasitos encontram-se na forma promastigota (15 - 3 x 10 - 20 µm), caracterizada pela presença de um flagelo anterior. Já no hospedeiro vertebrado, os parasitos são encontrados no interior de vacúolos (fagossomos) de macrófagos e monócitos de vários tecidos, sob formas ovais, com um flagelo muito curto, sem motilidade e um diâmetro máximo de 2,5 x 6,8 µm, sendo chamadas de formas amastigotas (Bryceson, 1996).

1.3 Ciclo de desenvolvimento do parasito e modo de transmissão

Os parasitos são transmitidos entre animais silvestres ou de animais silvestres para o homem por meio da picada dos vetores hematófagos. No momento do repasto sanguíneo, o vetor se infecta ao picar um animal ou um homem infectado. O inseto rompe a epiderme e capilares dérmicos do hospedeiro vertebrado e suga juntamente com o sangue as células parasitadas. No intestino médio do flebotomíneo, estas células se rompem liberando as formas amastigotas que se diferenciam em formas promastigotas procíclicas não infectantes. Neste ambiente, os parasitos se dividem rapidamente, sofrem metaciclogênese e se transformam em formas promastigotas metacíclicas infectantes. Durante a metaciclogênese, as leishmanias sofrem alterações estruturais e bioquímicas na sua superfície celular, como aumento da protease de superfície gp63 e alteração na estrutura do lipofosfoglicano (LPG) que se torna incapaz de aderir à parede do intestino e também alterações de motilidade e tamanho (Sacks *et al.*, 1985). Os parasitos migram, então, do intestino anterior para o

esôfago e para a probóscida do inseto e estão prontos para serem inoculados no hospedeiro vertebrado (Da Silva & Sacks, 1987; Mauel, 1996).

Em um repasto sanguíneo subsequente, o vetor infectado ao picar um animal ou um homem, regurgita as formas promastigotas metacíclicas, que são internalizadas por células sanguíneas e posteriormente por fagócitos presentes na epiderme. Uma vez internalizadas, as *Leishmanias* residem em fagossomos, que sofrem maturação e fusão com organelas endocíticas formando assim, o vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo parasitóforo, as formas promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas e se multiplicam por divisão binária, completando o seu ciclo. Esse processo requer de 2 a 5 dias dependendo da espécie de *Leishmania* e apesar das características comuns a todas as espécies, morfológicamente o vacúolo parasitóforo sofre variações. Por exemplo, o vacúolo parasitóforo de *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) mexicana* abriga vários parasitos em um vacúolo grande e na infecção por *L. (L.) major* ou *L. (L.) donovani* formam-se vários vacúolos pequenos e individuais que abrigam apenas um ou poucos parasitos (Solbach *et al.*, 2000). As células abarrotadas de amastigotas rompem-se e os parasitos liberados são fagocitados por novos macrófagos, promovendo o desenvolvimento da infecção (Figura 1).

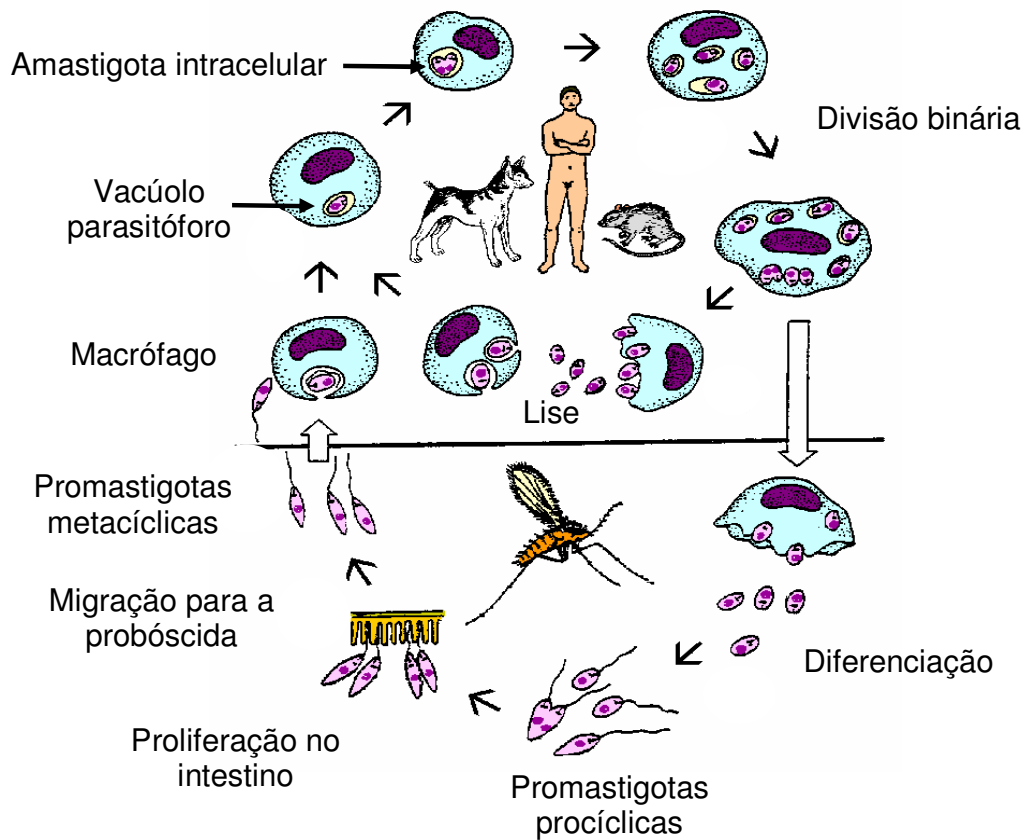


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida da *Leishmania* no hospedeiro mamífero e no inseto vetor.

http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/ls_lc.html

1.4 Imunologia da leishmaniose murina: ênfase na IL-12

Estudos de mecanismos de resposta imune foram realizados em modelos murinos, caracterizando dois padrões de respostas distintas baseadas no perfil de citocinas sintetizadas: Th1 e Th2 (Th do inglês, *T helper*) (Mosmann *et al.*, 1986; Mosmann & Sad, 1996). Desse modo, no modelo murino de infecção causada pela *L. (L.) major*, a resistência do hospedeiro à infecção está associada à ativação seletiva e diferenciação de linfócitos T CD4+ em células efetoras Th1, que secretam citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 2 (IL-2), IFN- γ e TNF- α . Por outro lado, a suscetibilidade à infecção está associada à ativação seletiva e diferenciação de linfócitos T CD4+ em células efetoras Th2, que secretam principalmente citocinas como, IL-4, IL-5 e IL-6 (Liew & O'donnell, 1993; Herwaldt, 1999; Jankovic *et al.*, 2001).

Camundongos de origens genéticas distintas respondem diferentemente a infecção por *L. (L.) major*. Assim, camundongos como o BALB/c são extremamente suscetíveis à infecção por *L. (L.) major* e desenvolvem uma lesão crescente que se visceraliza, culminando com a morte do animal. Nestes camundongos, a suscetibilidade à infecção está relacionada à resposta do tipo Th2. Enquanto que, outros camundongos, como o C57Bl/6, resistentes à infecção, desenvolvem uma lesão que se auto-resolve com o tempo. Nestes camundongos, a resistência à infecção está relacionada à resposta do tipo Th1 (Heinzel *et al.*, 1989; Scott, 1989; Scharon & Scott, 1993).

A resistência à *L. (L.) major* é dependente de uma produção inicial de IL-12 que induz a produção de IFN- γ e geração de células Th1. Esse papel da IL-12 é amplamente aceito na leishmaniose murina, porque a inibição de IL-12 por anticorpos monoclonais nos primeiros dias de infecção é capaz de tornar camundongos resistentes em suscetíveis. De maneira inversa, a adição de IL-12 recombinante (rIL-12) na primeira semana de infecção, mas não após a primeira semana, é capaz de tornar camundongos suscetíveis em resistentes (Heinzel *et al.*, 1993; Sypek *et al.*, 1993). A vacinação de camundongos com antígenos de *Leishmania*, injetados por via subcutânea, não é capaz de induzir resistência. Entretanto, quando este antígeno é

injetado juntamente com o rIL-12, como adjuvante, a vacinação passa a ser eficiente (Afonso *et al.*, 1994).

A IL-12 é uma citocina heterodimérica composta por duas subunidades, p35 e p40, que se associam para formar a molécula p70, a qual é a forma biológica ativa da IL-12. É produzida principalmente por monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células B (Trinchieri, 1998). O receptor da IL-12 é constituído por duas cadeias: a cadeia $\beta 1$ (IL-12R $\beta 1$) e a cadeia $\beta 2$ (IL12R $\beta 2$), que ativa a via Janus kinase de transdução de sinal (JAK-STAT - sinal transdutor e ativador de transcrição) (Presky *et. al*, 1996). A cadeia p40 da IL-12 é geralmente produzida cerca de 10 a 100 vezes mais que a cadeia p70. Por esse motivo, é mais fácil detectar essa subunidade no sobrenadante das culturas das células (Trinchieri & Gerosa, 1996).

Oppmann e colaboradores (2000) descobriram que a cadeia p40 da IL-12 era capaz de se ligar a uma segunda molécula, a p19, formando a citocina heterodimérica chamada IL-23. Eles observaram, também, que cultivando linfócitos T CD4⁺ de baço e linfonodo mesentérico purificados em FACS, na presença de IL-12, ocorria proliferação preferencial de células CD4+CD45RB^{high} (virgens) e na presença de IL-23 (p40/p19) ocorria a proliferação de células CD4+CD45RB^{low} (ativadas/memória). A IL-23 se liga a um receptor formado pela cadeia $\beta 1$ mas não $\beta 2$ do receptor da IL-12 e pela cadeia denominada IL-23R. A capacidade das células em responder a IL-23 ou a IL-12 depende da ligação destas citocinas aos receptores: IL-23R (IL-23R/IL-12R $\beta 1$) ou IL-12R (IL-12R $\beta 1$ /IL-12R $\beta 2$), respectivamente (Parham *et al.*, 2002).

Chakir e colaboradores (2003) mostraram que camundongos C57Bl/6 geneticamente deficientes na cadeia $\beta 2$ do receptor de IL-12 (IL-12R $\beta 2$ KO) e infectados com *L. (L.) major* desenvolveram uma resposta do tipo Th2 similar a observada em camundongo BALB/c selvagem. A via de sinalização da IL-23 foi mantida nos camundongos IL-12R $\beta 2$ KO, reforçando a idéia que a IL-12 e não a IL-23 está envolvida no desenvolvimento da resposta Th1 e na resistência da leishmaniose experimental murina. Além disso, alguns trabalhos mostraram que a IL-12 não é importante apenas no início da infecção por *Leishmania*, mas também no controle da doença crônica mantendo a resposta com perfil Th1 (Stobie *et al.* 2000; Park *et al.*,

2002).

Outras citocinas, como por exemplo, a IL-18, IL-1, IL-15, IL-2, podem atuar sinergicamente com a IL-12 na geração da resposta Th1. A presença de uma ou mais destas citocinas no microambiente com quantidades pequenas de IL-12 gera uma produção muito maior de IFN- γ que na ausência delas (Carson et al., 1995; Seder, 1996; Robinson et al., 1997). Portanto, na leishmaniose murina a IL-12, principalmente quando associada sinergicamente a outras citocinas é essencial para o desenvolvimento da resposta imune do tipo Th1, responsável pelo controle da infecção.

O camundongo BALB/c produz grande quantidade de IL-12 no início da infecção por *L. (L.) major* (Scharton-Kersten, et al, 1995; Oliveira, et al, 2000), fato este que nos levou a escolher esta linhagem de camundongo para ser utilizada em nossos experimentos. A suscetibilidade à infecção por *L. (L.) major* em camundongos BALB/c é resultante da incapacidade destes animais em responder a atividade da IL-12 com uma adequada produção de IFN- γ (Guler et al., 1996; Launois et al., 1997; Nishikomori et al., 2001). A dificuldade destes animais em gerar linfócitos Th1 induzidos pela IL-12, foi mostrada não estar relacionada à incapacidade dos linfócitos T virgens em responder a IL-12, mas sim, na inibição da geração de células Th1 na presença de antígenos do parasito (Guler et al., 1996). A causa aventada para inibição da diferenciação dos linfócitos T em células Th1 foi a grande quantidade de IL-4 presente nos linfonodos de BALB/c infectados nas primeiras horas após a inoculação de *L. (L.) major*. Foi visto ainda que, a produção inicial da IL-4 estava relacionada com a ativação de uma população de células T, cujo receptor (TCR) era constituído pela cadeia β da porção variável 4 e da cadeia α da porção variável 8 ($V_{\beta}4 V_{\alpha}8 CD4^+$) em resposta a uma proteína imunodominante de *Leishmania* homóloga ao receptor da proteína Quinase-C, denominada LACK (Launois et al., 1997). Essa explosão precoce da produção de IL-4 por linfócitos T $CD4^+$ foi considerada como o fator inibidor da geração da resposta Th1, pois reduzia a expressão da cadeia IL-12R β 2, tornando o linfócito T $CD4^+$ parasito-específico pouco responsivo a IL-12 (Himmelrich et al., 1998). Outros estudos mostraram que a diferenciação dos linfócitos T $CD4^+$ em células Th2 induzidas pela IL-4 podia ocorrer mesmo na

presença de uma sinalização persistente IL-12. E que os linfócitos T CD4+ uma vez diferenciados em células Th2, não poderiam se converter em células Th1 via sinalização por IL-12 (Heath *et al.*, 2000; Nishikomori *et al.*, 2000).

Nishikomori e colaboradores (2001) mostraram que camundongos BALB/c expressando IL-12R β 2 transgênico apresentavam uma forte resposta do tipo Th2 à infecção por *L. (L.) major*, idêntico ao camundongo BALB/c selvagem. Os autores demonstraram também que o efeito da IL-4 na indução da resposta Th2, não dependia da capacidade desta citocina em inibir a expressão da cadeia IL-12R β 2. E que a produção contínua da IL-4 nos camundongos BALB/c expressando esta cadeia transgênica estava relacionada à resposta Th2/IL-4 dominante.

Várias são as tentativas de explicar o paradoxo IL-4 *versus* IL-12. Estudos utilizando camundongos BALB/c inoculados com *L. (L.) major* mostraram que a IL-4 presente durante a ativação inicial das células dendríticas fazia com que essas células produzissem IL-12 e promovessem o desenvolvimento de linfócitos Th1. Já quando a IL-4 estava presente depois, durante o período de estimulação (*priming*) dos linfócitos T, esta citocina induzia a diferenciação dos linfócitos T CD4+ em células Th2 (Biedermann *et al.*, 2001). Uma vez que as respostas imunes desenvolvem-se pela ativação sucessiva de células dendríticas e posteriormente de linfócitos T, os efeitos contrastantes da IL-4 no desenvolvimento destas células levam a resposta imune que podem ter fenótipos funcionais opostos.

1.5 Sistema fagocítico mononuclear

O sistema fagocítico mononuclear (SFM) é definido como um grupo de células composto por células progenitoras da medula óssea, monócitos do sangue, células dendríticas e macrófagos teciduais. É caracterizado por marcadores fenotípicos constitutivos e induzíveis e marcadores funcionais cuja combinação é exclusiva para um determinado microambiente tecidual (Bosque *et al.* 1997; Hume *et al.* 2002).

A maior parte dos fagócitos mononucleares presentes nos tecidos normais ou inflamados tem sua origem na medula óssea, embora alguns destes possam ser gerados no próprio tecido (Kennedy & Abkowitz, 1998; Hume *et al.*, 2002). Na medula

óssea, os progenitores hematopoéticos têm como um dos seus marcadores de superfície a molécula CD31/PECAM-1, reconhecida pelo anticorpo monoclonal ER-MP12 (Ling *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1998). A expressão desta molécula na superfície celular define as populações de fagócitos mononucleares em fase inicial de diferenciação na medula óssea, embora também possa estar expressa em grande quantidade na membrana de células endoteliais (Ling *et al.*, 1997; Mcknight & Gordon, 1998; Geutskens *et al.*, 2005). Por isso, foi sugerido que o CD31 participa na diapedese, permitindo o extravasamento de células inflamatórias para o tecido (Mcknight & Gordon, 1998). Este marcador não é expresso em estágios mais tardios no processo de diferenciação (Leenen *et al.*, 1990; Leenen *et al.*, 1994; De Bruijn *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1998).

Os monócitos na medula óssea e os recém liberados para a corrente sanguínea deixam de expressar CD31 e expressam Ly-6C^{high} (ER-MP20). A permanência dos monócitos na circulação induz a diminuição da expressão de Ly-6C, tornando os monócitos sanguíneos células Ly-6C^{low} (Sunderkoter, 2004; Gordon, 2005).

Os monócitos no sangue possuem uma grande plasticidade que lhes permite diferenciar em macrófagos ou subpopulações de células dendríticas após transmigração para o tecido. As células maduras encontradas nos tecidos normais ou inflamadas são células extremamente heterogêneas, no que se refere ao seu fenótipo e função (Turpin & Lopez-Berestein, 1992; Leenen *et al.*, 1994; Leenen *et al.*, 1998).

O anticorpo monoclonal ER-MP58 interage com uma molécula, ainda não definida, expressa na membrana de células precursoras monocíticas CD31^{high}. A diminuição da expressão da ER-MP58 correlaciona o processo de maturação das células monocíticas em macrófagos maduros e a sua alta, intermediária ou baixa expressão, divide a população CD31^{high} em três subpopulações. A subpopulação CD31^{high}/ER-MP58^{high} representa os progenitores comprometidos com a linhagem mielóide (De Bruijn *et al.*, 1996).

Os monócitos que deixam a circulação e penetram nos tecidos periféricos inflamados, capturam antígenos e entram em processo de maturação durante o trânsito para os linfonodos drenantes via linfáticos aferentes (Randolph *et al.*, 1999;

Qu C *et al.*, 2004). É conhecido que macrófagos residentes, células dendríticas dermais e células de Langerhans saem também do tecido inflamado e ganham o linfonodo utilizando a mesma via de entrada (Hendriks *et al.*, 1980; Banchereau & Steinman 1998). Foi demonstrado que além da entrada via dreno do fluido intersticial, durante o processo inflamatório na pele, um grande número de monócitos recém liberados na circulação sanguínea são recrutados diretamente para os linfonodos utilizando as vênulas de endotélio alto (HEVs). Esta segunda via só é acessada pela deposição da proteína MCP-1/CCL2 (do inglês, *monocyte chemoattractant protein-1*) na superfície das HEVs transportada do sítio inflamatório pela linfa até o linfonodo drenante. Estes achados mostraram que tecidos periféricos inflamados projetam o padrão de quimiocinas locais para as HEVs nos linfonodos drenantes e assim, exercem o “controle remoto” sobre a composição da população de leucócitos que migram para estes órgãos vindo da circulação sanguínea (Palframan *et al.*, 2001).

O anticorpo monoclonal ER-HR3 foi primeiramente descrito como específico para células reticulares da medula óssea e marca células com características de macrófagos na microscopia eletrônica e histoquímica, sendo expresso em monócitos sanguíneos, em subpopulações de macrófagos residentes de múltiplos órgãos e células epidérmicas de Langerhans. Estão freqüentemente em íntima associação com células progenitoras de eritrócitos na medula e não foi observada reação cruzada com outros tipos celulares (De Jong *et al.*, 1994) .

O anticorpo monoclonal 33D1 reconhece um epítipo expresso na superfície de células dendríticas, embora não esteja presente em todas as células dendríticas (Nussenzweig *et al.*, 1982) ou pode ser regulado negativamente por certos estímulos, como nas células de Langerhans em testes de hipersensibilidade de contato (Herouet *et al.*, 1999).

Há muito tempo, os macrófagos residentes do tecido cutâneo (macrófago dermal) ou os encontrados em linfonodos drenantes são considerados como as principais células hospedeiras da *Leishmania* por permitirem a transformação e multiplicação das amastigotas em seu interior, não associado à explosão respiratória e produção de óxido nítrico (NO), contrastando com outras populações de

macrófagos não permissíveis (Farah *et al.*, 1975; Locksley *et al.*, 1988; Stafford *et al.*, 2002).

No final dos anos 80, a presença de formas amastigotas de *Leishmania* no interior de células dendríticas sugeriu que estas células também fossem consideradas como células hospedeiras do parasito (Williams, 1988).

As células dendríticas foram descritas como as únicas capazes de induzir a ativação dos linfócitos T virgens. Porém, certas espécies de *Leishmania* infectam as células dendríticas sem induzir a maturação destas e, ainda interferem na sua migração até o linfonodo drenante (Sacks *et al.*, 2002). As células epidermais de Langerhans, que são membro do grupo das células dendríticas, normalmente infectadas com 1 a 2 parasitos por células (baixo parasitismo), apresentam restrição à replicação parasitária de maneira independente de NO. Elas são críticas na indução da resposta imune específica, pois são elas e não os macrófagos parasitados, as responsáveis pelo transporte dos parasitos e/ou antígenos aos linfonodos regionais dando início a resposta imune primária (Moll *et al.*, 1993; Sacks *et al.*, 2002). Elas estão localizadas no local (epiderme) da inoculação natural da *Leishmania* pelo inseto vetor. Dr. von Stebut e colaboradores (1998) mostraram que a internalização do parasito estava associada ao aumento das moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, do inglês, *major histocompatibility complex*), a expressão aumentada de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD54, CD80, e CD86) e a produção da IL-12p40 nas 18 h após a infecção. Eles descreveram também, que a infecção de macrófagos inflamatórios (Mphi) com formas amastigotas ou promastigotas de *L. (L.) major* não conduzia a mudanças significantes na expressão de moléculas de superfície ou na produção de citocinas. Resultados semelhantes foram descritos com infecção por *L. (L.) donovani* (Gorak *et al.*, 1998).

Vários leucócitos estão implicados com a produção de IL-12, como neutrófilos (Scapini *et al.*, 2000; Denkers *et al.*, 2003), macrófagos (Bastos *et al.*, 2004), células dendríticas (Ria *et al.*, 1998; Moser *et al.*, 2000; Moser, 2001). Nos últimos anos, vem sendo discutida a importância das células mielóides, monócitos imaturos e células imaturas na produção de IL-12 (Zou *et al.*, 2000; Morelli *et al.*, 2001; Muller-Berghaus *et al.*, 2005).

É consenso geral que a IL-12 produzida por células apresentadoras de antígeno (APC), entre elas, macrófagos (D'Andrea *et al.*, 1992) e células dendríticas (Macatonia *et al.*, 1995), possivelmente com a colaboração de citocinas como IL-1 α , IL-18, IL-23 e IL-27, coordena a diferenciação e proliferação de linfócitos T CD4⁺ Th1, responsáveis pela resposta protetora à infecção por *L. (L.) major* (Alexander *et al.*, 2005).

Subpopulações de células dendríticas vêm sendo apontadas como produtoras de IL-12 após o estímulo com *Leishmania* (Henri *et al.*, 2002; Sacks *et al.*, 2004). Já, outros autores discutem a participação de outras populações celulares na produção dessa citocina *in vivo* (Saha *et al.*, 1999; Doherty *et al.*, 1999; Denkers *et al.*, 2003; Ehrchen *et al.*, 2004; Oliveira *et al.* 2005).

Desde os anos 80, vem sendo discutida a participação de células indiferenciadas do SFM em infecções por *Leishmania*. Mirkovich e colaboradores (1986) sugeriram que macrófagos/granulócitos indiferenciados estavam relacionados à suscetibilidade à infecção por *L. (L.) major*. Precusores de macrófagos derivados da medula óssea presente no baço de camundongos infectados eram capazes de matar as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) donovani* espontaneamente (Baccarini *et al.*, 1988).

Recentemente Oliveira e colaboradores (2005) demonstram que uma população de fagócitos mononucleares, derivados de cultura de medula óssea e expressando o marcador ER-HR3 produzia grande quantidade de IL-12p40 após estimulação *in vitro* com formas procíclicas ou metacíclicas de *L. (L.) major*.

A participação de fagócitos, em diferentes estágios de maturação, na produção de IL-12 em infecções por *L. (L.) major in vivo* ainda não está claro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o envolvimento de células de linfonodos drenantes, expressando os marcadores de fagócitos imaturos (ER-MP12: anti-CD31/PECAM-1 e ER-MP58), de fagócitos com maturação intermediária (ER-HR3) e de subpopulações de células dendríticas (33D1) na produção de IL-12p40 *in vivo* durante a fase inicial da infecção murina por *L. (L.) major*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência de células CD31⁺, ER-MP58⁺, ER-HR3⁺ e 33D1⁺ nos linfonodos controles e nos linfonodos drenantes de camundongos BALB/c infectados por 48 h com *L. (L.) major*;
- Avaliar a cinética de aparecimento de células CD31⁺, ER-MP58⁺, ER-HR3⁺ e 33D1⁺ nos linfonodos drenantes de camundongos BALB/c inoculados com *L. (L.) major* na fase inicial da infecção;
- Avaliar a presença ou ausência de parasitos vivos nos linfonodos drenantes de camundongos BALB/c infectados por 48 h com *L. (L.) major*;
- Quantificar a produção de IL-12p40 por células totais obtidas de linfonodos drenantes de camundongos BALB/c infectados por 48 h com *L. (L.) major*;
- Quantificar a produção de IL-12p40 por células purificadas positiva e negativamente obtidas de linfonodos drenantes de camundongos BALB/c infectados por 48 h com *L. (L.) major*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Eram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, de idade entre 6 a 12 semanas, obtidos junto ao Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) ou junto ao Biotério da Escola de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Os animais eram mantidos no Biotério do IPTSP/UFG em gaiolas coletivas contendo até 6 camundongos por gaiola, sendo fornecida alimentação e hidratação à vontade. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ (Beira Mar, São Paulo/SP) ou por deslocamento cervical para a execução dos experimentos.

3.2 Cultivo e manutenção de parasitos de *L. (L.) major*

Formas promastigotas *L. (L.) major* clone MHOM/IL/1980/Friedlin, cedida pela Dra. Leda Quércia Vieira (Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG/MG) eram cultivadas em meio de Grace (*Grace's Insect Medium*, Sigma Chemical Co., NY, EUA) suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF, Cripion, São Paulo) inativado (56 °C por 1 h), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co.), denominado Grace completo, em placas de 24 poços (COSTAR, Cambridge, MA, EUA) a 26 °C em estufa D.B.O (Eletro Lab, São Paulo/SP). Eram realizadas passagens dos parasitos para novo meio de cultura a cada dois a três dias, sempre iniciando a cultura com 5 x 10⁵ promastigotas/mL. A enumeração dos parasitos era feita após diluição de uma alíquota da suspensão em paraformaldeído (Merck) 0,2% em PBS e contagem em hemocitômetro. Rotineiras passagens *in vivo* eram feitas para manter a virulência do parasito. Para tanto, 5 x 10⁶ promastigotas de fase estacionária de cultura, eram inoculadas no coxim plantar das patas traseiras dos animais. Um mês após o inóculo, os camundongos eram sacrificados e os parasitos recuperados das patas eram expandidos *in vitro* e parte dos parasitos foi congelada em nitrogênio líquido em SBF contendo 10% de dimetil

sulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co), como estoque. Os parasitos eram expandidos em frascos plásticos de 25 cm² (Becton-Dickinson, New Jersen, EUA) em meio Grace completo para inoculação (Evans, 1989; Oliveira *et al.*, 2000).

3.3 Curva de crescimento *in vitro* dos parasitos de *L. (L.) major*

Os parasitos eram cultivados em Grace completo, em placas de 24 poços (COSTAR, Cambridge, MA, EUA) a 26 °C e, a cultura iniciada com 5 x 10⁵ parasitos/mL. A enumeração dos parasitos era realizada diariamente durante dez dias de cultura. A quantidade de parasitos foi expressa em número de parasitos/mL (Sacks, 1985).

3.4 Inoculação dos camundongos BALB/c com *L. (L.) major*

Os parasitos de fase estacionária de crescimento eram colhidos, lavados três vezes por centrifugação (800 g, 15 min, 10 °C) em solução salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*) estéril. Após a última centrifugação, os parasitos eram ressuspensos em PBS. A concentração dos parasitos era obtida após diluição de uma alíquota da suspensão em paraformaldeído (Merck) 0,2% em PBS e contagem em hemocitômetro. Os camundongos eram inoculados no coxim plantar das duas patas traseiras com 50 µL contendo de 1 x 10⁶ a 1 x 10⁷ promastigotas, como descrito na legenda dos experimentos. Em cada experimento, os grupos de animais não infectados eram compostos de dois a quatro camundongos e aqueles de animais infectados, por três a cinco camundongos. Foram realizados de dois a cinco experimentos conforme descrito nas legendas das figuras.

3.5 Quantificação de parasitos de *L. (L.) major* nos linfonodos drenantes

O número de parasitos presentes nos linfonodos drenantes 48 h após infecção foi estimada utilizando o teste de diluição limitante (LDA) (Lima *et al.*, 1997). O ensaio consistiu em diluições seriadas de 1:5 do homogeneizado de um dos linfonodos

drenantes de cada animal, cultivado em placa de 96 poços de fundo chato (COSTAR), 200 µL/poço em meio de Grace completo, fechada hermeticamente com Parafilme® (Sigma Chemical Co) e incubada a 26 °C em estufa D.B.O. A detecção do aparecimento de promastigotas móveis (poços positivos) era feita por avaliações periódicas utilizando o microscópio invertido. A leitura final era realizada com 14 dias de cultura quando os poços positivos e negativos foram contados para cada diluição.

3.6 Obtenção e cultura de células de linfonodos

Em diferentes períodos após infecção, os camundongos eram sacrificados e os linfonodos drenantes do sítio do inóculo (poplíteos) ou os linfonodos não drenantes (axilares e inguinais) e/ou linfonodos poplíteos de camundongos não infectados, utilizados como controle, eram retirados e macerados separadamente em peneira com a parte traseira do embolo de seringa de 3 mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co.). O macerado foi centrifugado (400 g, 10 min, 10 °C) e as células ressuspensas na concentração de 1×10^7 /mL em meio RPMI suplementado com 10% de SBF (Gibco, Argentina, South America), 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co), 11mM de bicarbonato (Merck), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co), denominado RPMI completo. A viabilidade celular era avaliada pela exclusão do corante vital azul de tripan 0,1% em PBS (Reagen) (Klaus, 1987).

Para a obtenção dos sobrenadantes para a dosagem de IL-12p40, as células eram incubadas em diferentes concentrações em meio RPMI completo, em placas de 96 poços de fundo chato (COSTAR) por 48 h a 37 °C em estufa úmida com 5% de CO₂ (Hepa.Clean CO₂ incubator, Shel Lab).

3.7 Obtenção de células de medula óssea

As células de medula óssea foram obtidas a partir de fêmur e tíbia de camundongos BALB/c, por meio da lavagem do interior desses ossos com meio RPMI 1640 dentro de seringa com agulha.

3.8 Anticorpos

Os sobrenadante de cultura contendo os anticorpos ER-MP12 (IgG2a de rato anti-CD31/PECAM-1) ou ER-MP58 (IgM) e o hibridoma produtor do anticorpo ER-HR3 (IgG2c de rato) foram cedidos pelo Dr. Pieter Leenen (Universidade de Erasmus de Roterdam, Roterdam, Holanda). O hibridoma produtor do anticorpo 33D1 (IgG de rato) foi cedido pela Dra Glória Maria Collet de Araújo Lima (Laboratório de Imunologia Celular das Leishmanioses-ICB/USP). Os hibridomas produtores dos anti-IL-12 p40 C17.8 e C15.6 foram cedidos pelo Dr. Giorgio Trinchieri (NIH, EUA).

O hibridoma produtor do anticorpo ER-HR3 era cultivado em meio RPMI completo em estufa a 37 °C 5% CO₂ para obtenção do sobrenadante contendo os anticorpos. A cada três dias de cultura o sobrenadante era colhido e armazenado a -20 °C até o momento da purificação. Adicionava-se às células restantes na garrafa de cultura, meio RPMI completo para restaurar a cultura. Os anticorpos ER-HR3 eram purificados do sobrenadante de cultura utilizando coluna de proteína G (*Protein G Sepharose*, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) da seguinte forma: o sobrenadante de cultura era centrifugado (800 g, 10 min, 10 °C), filtrado em filtro 0,22 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA) e 0,02% de azida sódica (Synth) adicionada. A coluna de proteína G era lavada duas vezes com tampão glicina 0,1 M (Synth) e em seguida lavada mais duas vezes com PBS. Na seqüência, era adicionado o sobrenadante de cultura contendo os anticorpos ER-HR3. A coluna era lavada por mais duas vezes com PBS e 15 mL de glicina 0,1 M (Synth) era adicionado. Quinze frações de 1 mL eram coletadas em tubos contendo 100 µL de tampão de neutralização [TRIS 10 M pH: 8,5 (S. Goldberg), NaCl 15 M (Merck) e 0,2% de azida sódica (Synth)]. A concentração protéica de cada tudo era avaliada pelo ensaio BIO-RAD BRADFORD. Após utilização a coluna era estocada em etanol 30% (Synth). As frações contendo grande quantidade de proteína eram misturadas e submetidas à diálise (*membrane Spectra/Por*, Spectrum Laboratories Inc., USA) contra PBS por 72 h e a cada 24 h o PBS era trocado. A concentração final de proteína (anticorpos purificados) na solução dializada era obtida pelo ensaio BIO-RAD BRADFORD.

Camundongos BALB/c eram injetados por via intraperitoneal com células do hibridoma produtor do anticorpo monoclonal 33D1. O ascite resultante contendo os anticorpos era precipitado em sulfato de amônio a 76% (Andrew & Titus, 1997). Em resumo: o ascite era diluído na proporção de 1:2,5 em PBS e filtrado em membrana de 0,22 μm (Millipore Corporation, Bedford, MA). Em seguida, era adicionada gota a gota sob agitação e em banho de gelo, a solução de sulfato de amônio a 76% pH: 7,2, até que uma turvação começasse a se formar. A solução, então, era incubada por 90 min a 4 °C e em seguida centrifugada a 5000 *g* por 15 min a 4 °C. O sobrenadante era desprezado e o sedimento ressuspenso em PBS em um volume final de 6 mL. Esta solução era então dialisada contra PBS por 72 h e o PBS trocado a cada 24 h. A concentração final protéica (anticorpos purificados) era avaliada pelo ensaio BIO-RAD BRADFORD, conforme descrito pelo fabricante.

As imunoglobulinas IgG, utilizadas como anticorpos controle obtidas de soro de rato normal da linhagem Wistar (Biotério Central da Universidade Federal de Goiás) e as imunoglobulinas IgG, utilizadas para bloquear o receptor para a porção Fc de imunoglobulinas (FcR) obtidas de soro de camundongo BALB/c normal, foram obtidas após purificação em coluna de proteína G.

3.9 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação da IL-12p40

A detecção da IL-12p40 nos sobrenadantes de cultura era realizada através do ensaio imunoenzimático (ELISA) - sanduíche de captura, empregando anticorpos monoclonais de rato específicos para a detecção da cadeia p40 da citocina IL-12 de camundongo.

Placas de poliestireno para ELISA de alta afinidade de 96 poços (Corning, NY, EUA) eram sensibilizadas com 80 μL do anticorpo C17.8 purificado (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PBS, pH 7,2) e mantidas a 4 °C por 24 h. Após o período de sensibilização, as placas eram lavadas cinco vezes com PBS contendo tween 20 a 0,04% (Merck) e incubadas com solução de bloqueio, leite em pó desnatado a 3% em PBS, 200 $\mu\text{L}/\text{poço}$ (Molico, Nestlé, Brasil) por 1 h a 37 °C. As placas eram lavadas novamente por cinco vezes com PBS-tween 20 a 0,04% e em seguida eram adicionados aos poços 80 μL das

amostras (sobrenadantes de cultura de linfonodos) ou diluições sucessivas (1:2) da citocina murina recombinante IL-12p70, (cedida pela Dra. Ises Abrahamsohn, ICB/USP) em meio RPMI completo, na concentração inicial de 5 ng/mL para as curvas padrão. As placas eram então incubadas a 4 °C por 24 h. Após o período de incubação as placas eram lavadas cinco vezes com PBS-tween 20 a 0,04% e 80 µL do segundo anticorpo monoclonal anti-IL12p40 C15.6 biotinilado (a 5 µg/mL de solução de bloqueio) adicionados aos poços. Após 4 h de incubação em estufa a 35 °C, as placas eram lavadas cinco vezes com PBS-tween 20 a 0,04% e eram adicionados aos poços 80 µL do conjugado enzimático extravidin® peroxidase, (Sigma Chemical Co) diluído 1:2000 em solução de bloqueio. Após mais 1 h de incubação a 35 °C, as placas eram lavadas dez vezes com PBS-tween 20 a 0,04% e então adicionados aos poços 80 µL da solução contendo o substrato (O-fenilindiamina diclorada - OPD, Sigma) a 0,5 mg/mL de tampão citrato - fosfato pH 5,0, (9 g de Na₂HPO₄ PM: 141.96 e 11,48 de H₃C₆H₅O₇ PM: 192.13 para 1 L) acrescida de 0,5 µL/mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes (Merck). As placas eram mantidas ao abrigo da luz durante 10 a 30 min, à temperatura ambiente (~25 °C) e a reação colorimétrica era interrompida com 20 µL de solução de ácido sulfúrico a 2N (Synth) (D'Andrea *et al.*, 1992). A densidade óptica (D.O.) era detectada por leitor de microplacas Thermo Labsystems, com filtro de 492 nm e filtro de referência de 620 nm. A sensibilidade mínima do teste era de 150 pg/mL.

3.10 Separação das populações celulares ER-MP58 ou ER-HR3 positivas e negativas de linfonodos de camundongos BALB/c

A suspensão celular oriunda de linfonodo obtida como descrito no item 3.6, era centrifugada e ressuspensa em tampão de depleção [PBS contendo 5% de SBF e 5 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Sigma)], na concentração de 2×10^7 células/mL. Alíquotas eram dispensadas em tubos de polipropileno e a estes eram adicionados os sobrenadantes de cultura contendo o anticorpo ER-MP58 (10 µL para 2×10^7 células) ou o anticorpo ER-HR3 (5 µg para 2×10^7 células) ou e IgG purificadas de sangue de rato Wistar normal (5 µg para 2×10^7 células) usadas como

controle negativo. Os tubos eram colocados por 30 min a 4 °C em banho de gelo. Após este período as células eram lavadas duas vezes por centrifugação (400 g, 10 min, 10 °C) em tampão de depleção e ressuspensas em 0,3 mL de tampão de depleção. Uma alíquota de 2×10^5 células/200 μ L era citocentrifugada em citocentrífuga Fanen (80 g, 50 seg) para análise pela técnica de imunocitoquímica. Ao restante da suspensão celular era adicionadas esferas magnéticas ligadas a anticorpo IgG de cabra anti- IgG de rato (Miltenyi Biotec) na proporção de 15 μ L para 1×10^7 células e incubadas por 15 min a 4 °C. Em seguida, as células eram separadas pelo sistema de separação paramagnético (MiniMacs, Miltenyi BiotecGmb11, Bergisch Gladbach, Germany), como indicado pelo fabricante. Após a separação, as células positivas e negativas para os marcadores de superfície celular eram centrifugadas (400 g, 10 min, 10°C) e cada suspensão celular era ressuspensa em meio RPMI completo. Uma alíquota de 2×10^5 células/200 μ L em PBS 5% de SBF de cada população era submetida a análise pela técnica de imunocitoquímica. O restante da suspensão celular era ajustado para a concentração para 1×10^7 células/mL e cultivado como indicado no item 3.6.

A eficiência da separação das populações positivas e negativas era checada por imunocitoquímica conforme a técnica descrita abaixo.

3.11 Imunocitoquímica para detecção de células CD31⁺, ER-MP58⁺, ER-HR3⁺ e 33D1⁺

As células CD31⁺, ER-MP58⁺, ER-HR3⁺ e 33D1⁺ eram evidenciadas pela técnica de imunocitoquímica padronizada em nosso laboratório (adaptação de Felizardo, 2005). Lâminas de microscopia óptica contendo as células de linfonodos ou de medula óssea foram centrifugadas em citocentrífuga Fanen (2×10^5 células/200 μ L em PBS 5% de SBF, 80 g, 50 seg) e fixadas com 100 μ L de paraformaldeído 1% (Merck) em PBS. Após 20 min, o paraformaldeído era removido e as lâminas mantidas à temperatura ambiente (~25 °C) por 10 min. A seguir eram adicionados 100 μ L de solução de bloqueio (PBS contendo 5% SBF) contendo imunoglobulinas IgG purificadas de soro de camundongos (1 μ g/ 2×10^5), para bloqueio do FcR, por 15

min. Em seguida, as lâminas eram lavadas com PBS-tween 20 a 0,04% e 100 µL de sobrenadante de cultura contendo os anticorpos ER-MP12 ou ER-MP58, diluídos em 1:20, 1:40, 1:100, 1:200, 1:500 em solução de bloqueio, ou anticorpos ER-HR3 ou 33D1 purificados nas concentrações de 0,5, 1, 5 e 10 µg/mL em solução de bloqueio eram adicionados. As IgG purificadas de soro de rato Wistar normal eram usadas como controle negativo, na concentração de 1 µg/2 x 10⁵ células em solução de bloqueio. Após incubação por 1 h, em câmara úmida à 4 °C, as lâminas eram lavadas cinco vezes com PBS-tween 20 a 0,04%. Em seguida, anticorpos anti-IgG biotinilado (Amersham Pharmacia) na concentração de 1:500 em solução de bloqueio eram adicionados e as lâminas incubadas por 2 h em câmara úmida à 4 °C.

Às lâminas contendo as células de linfonodos submetidas ao sistema de separação por esferas magnéticas era adicionada a solução de bloqueio por 15 min e em seguida diretamente incubadas com a solução de anticorpos anti-IgG biotinilado por 2 h, em câmara úmida à 4 °C.

Na etapa seguinte, todas as lâminas, após incubação, eram lavadas cinco vezes com PBS-tween 20 a 0,04% e o conjugado extravidina® - fosfatase alcalina (Sigma) era adicionado na concentração de 1:500 em solução de bloqueio. Na seqüência, após outro período de incubação por 40 min, em câmara úmida a 4 °C, as lâminas eram lavadas dez vezes com PBS-tween 20 a 0,04% e o cromógeno FAST RED® (Dako) adicionado, seguido por outro período de incubação de 10 a 30 min, à temperatura ambiente (~25 °C). As lâminas, então, eram lavadas com água destilada tipo I, contra-coradas com corante azul (Kit Instant Prov, Pinhais, PR, Brasil) e montadas com glicerol (Reagen). Todas as lâminas eram analisadas sob microscopia óptica (aumento de 40x e 100x) e a número de células positivas era determinada contando-se um total de 1000 células (Henry, 1996).

3.12 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo método estatístico de análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukeys, utilizando o Graph-Pad Prizma Software, versão 4.01. Os resultados estão expressos pela média ± desvio padrão (SD) como

descrito em cada figura. O nível de significância foi estabelecido com o valor de $p < 0,05$.

Os dados da quantificação de parasitos nos linfonodos drenantes foram analisados através do programa ELIDA desenvolvido por Taswell, 1986. Com esse programa era possível estimarmos a frequência dos parasitos nos linfonodos, calculada pela equação de Poisson através do método estatístico do qui-quadrado (χ^2). Os resultados foram apresentados pela estimativa final do número de parasitos e 95% do intervalo de confiança.

4. RESULTADOS

4.1 Curva de crescimento *in vitro* dos parasitos de *L. (L.) major*

Os experimentos relatados nesta dissertação foram realizados utilizando promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major in vitro*. Nesta fase encontra-se a maior proporção de formas metacíclicas infectantes comparado às outras fases de cultura do parasito. Com o objetivo de determinar o período da fase estacionária para nossas culturas parasitárias, parasitos recém isolados da pata de camundongos BALB/c, com 1 mês de infecção, foram expandidos *in vitro* em meio Grace completo, a 26 °C. As promastigotas resultantes eram lavadas e recolocadas em cultura em meio Grace completo na concentração de 5×10^5 parasitos/mL. A cinética de crescimento *in vitro* era obtida pela contagem diária por microscopia óptica do número de parasitos/mL em hemocitômetro durante dez dias. A curva de crescimento está representada na Figura 2. A fase logarítmica, na qual a quase totalidade dos parasitos encontra-se na forma procíclica (não infectante) foi estimada entre o primeiro e terceiro dias de cultura. A fase estacionária do quinto ao sétimo dia de cultura. Optamos por trabalhar com parasitos de quinto ou sexto dia de cultura.

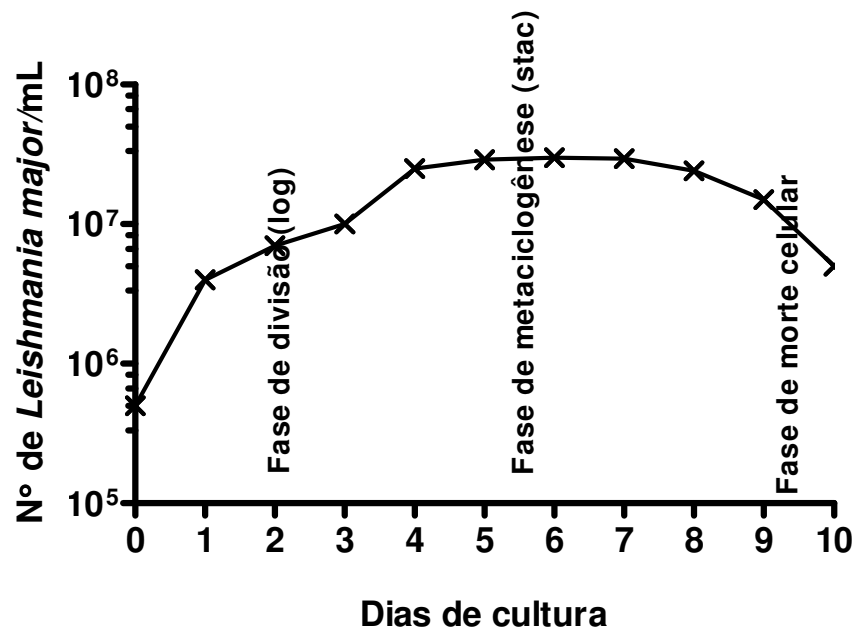


Figura 2. Curva de crescimento *in vitro* de *L. (L.) major*. Formas promastigotas do parasito eram cultivadas na concentração inicial de 5×10^5 parasitos/mL em meio Grace completo, a 26 °C. A quantificação dos parasitos era feita pela contagem diária por microscopia óptica do número de parasitos/mL em hemocitômetro durante dez dias de cultura.

4.2 Otimização da produção de IL-12p40 por células de linfonodos de camundongos inoculados com *L. (L.) major*

Com o objetivo de otimizar a detecção da produção de IL-12 por células de linfonodos drenantes do sítio de infecção, foram realizados experimentos variando a dose de inóculo dos parasitos, o tempo após a infecção para a retirada dos linfonodos e a concentração de células nas culturas para obtenção dos sobrenadantes a serem testados.

4.2.1 Definição do tempo precoce da infecção que leva a detecção de IL-12 produzida por células dos linfonodos drenantes do sítio de inóculo

Camundongos BALB/c eram inoculados com 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* no coxim das patas traseiras e sacrificados em diferentes tempos de infecção. A finalidade destes experimentos era definir o momento precoce após a infecção quando a produção de IL-12 pelas células de linfonodos drenantes pudesse ser detectada. Assim, as células dos linfonodos poplíteos 24 e 48 h após o inóculo eram obtidas, cultivadas na concentração de 1×10^7 células/mL por 48 h e os sobrenadantes resultantes das culturas eram testados quanto a concentração de IL-12p40 por ELISA.

Os resultados apresentados na Figura 3 mostram que a concentração de IL-12p40 nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos obtidas 24 h após o inóculo foi similar à obtida para os sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos controles. Entretanto, os sobrenadantes das culturas das células obtidas dos linfonodos com 48 h de infecção apresentaram uma quantidade de IL-12p40 significativamente maior, média de 0,793 ng/mL. A quantificação da concentração de IL-12p40 nos diferentes sobrenadantes mostrou claramente que deveríamos trabalhar com o tempo de 48 h após infecção: o tempo mais precoce para a detecção desta citocina produzida pelas células de linfonodos drenantes do sítio do inóculo.

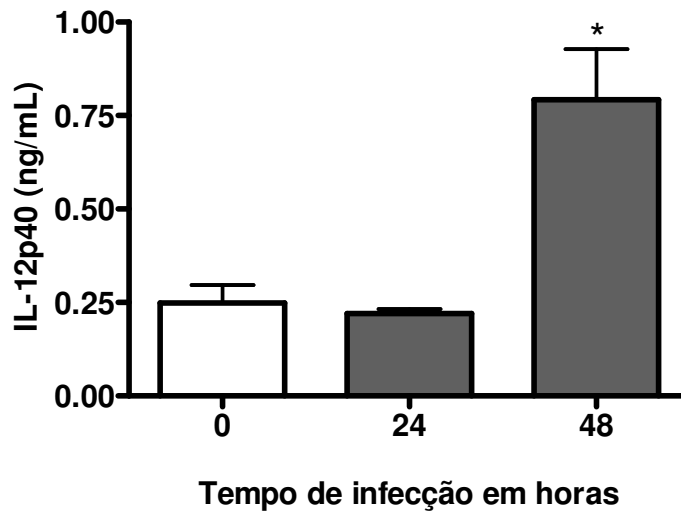


Figura 3. Tempo precoce de detecção da produção de IL-12p40 por células de linfonodos drenantes da infecção por *L. (L.) major*. Camundongos BALB/c eram inoculados com 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* no coxim das patas traseiras. Os linfonodos poplíteos eram retirados após 24 ou 48 h de infecção e as células cultivadas na concentração de 1×10^7 células/mL. Os linfonodos poplíteos de camundongos normais eram retirados e utilizados como controles nas mesmas condições. Os sobrenadantes de 48 h de cultura eram colhidos para dosagem de IL-12p40 pelo método de ELISA. A sensibilidade mínima do teste era de 0,15 ng/mL. Os resultados estão representados pela média e \pm SD de três experimentos independentes utilizando 1 a 2 animais para cada experimento.

* $p < 0,001$ (0 vs 48 h e 24 vs 48 h).

4.2.2 Avaliação da dose de inóculo de *L. (L.) major*

As perguntas feitas a seguir foram: a dose de inóculo poderia interferir com a sensibilização das células produtoras de IL-12? A dose de inóculo utilizada em nossos experimentos não levaria a uma inibição da produção de IL-12 após 48 h de infecção? Para responder a estas questões, grupos de camundongos BALB/c eram inoculados com 1×10^6 , 5×10^6 ou 1×10^7 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* no coxim das patas traseiras. A produção de IL-12p40 foi avaliada pela concentração da proteína nos sobrenadantes de 48 h de cultura de células obtidas dos linfonodos poplíteos drenantes da infecção.

Os resultados apresentados na Figura 4 mostram que o inóculo de 1×10^6 parasitos induziu pouca produção de IL-12p40, similar àquela produzida pelas células dos linfonodos controles. Os inóculos maiores, 5×10^6 ou 1×10^7 parasitos, mostraram resultados semelhantes quanto à produção aumentada de IL-12 comparada ao controle ou a concentração de 1×10^6 parasitos. A dose de inóculo de 5×10^6 promastigotas foi mantida para todos os outros experimentos.

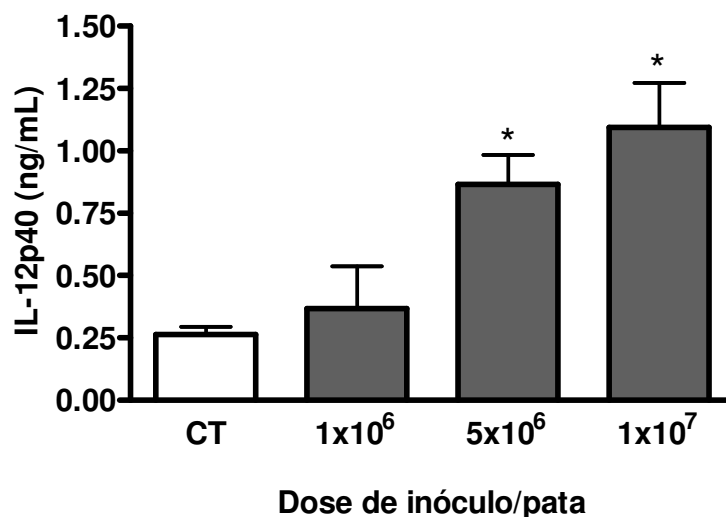


Figura 4. Produção de IL-12p40 por células de linfonodos de camundongos BALB/c infectados com diferentes doses de inóculo de *L. (L.) major*. Camundongos BALB/c eram inoculados com 1×10^6 , 5×10^6 ou 1×10^7 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* no coxim das patas traseiras. Os linfonodos poplíteos eram retirados 48 h após infecção e cultivados na concentração de 1×10^7 células/mL. Os linfonodos distais ao sítio do inóculo (CT) eram retirados e utilizados como controles nas mesmas condições. Os sobrenadantes de 48 h de cultura eram colhidos para dosagem de IL-12p40 pelo método de ELISA. A sensibilidade mínima do teste foi de 0,15 ng/mL. Os resultados estão representados pela média e \pm SD de três experimentos independentes utilizando 1 a 2 animais para cada experimento.

* $p < 0,01$ (CT; 1×10^6 vs 5×10^6 ; 1×10^7).

4.2.3 Avaliação da concentração celular para otimização da detecção de IL-12 nos sobrenadantes de cultura

A concentração celular para obtenção dos sobrenadantes de cultura foi avaliada com o intuito de verificar se a alta concentração utilizada (1×10^7 /mL) poderia estar levando a uma inibição da produção de IL-12.

Camundongos BALB/c eram inoculados com 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* no coxim das patas traseiras. As células obtidas dos linfonodos poplíteos 48 h após infecção eram cultivadas nas concentrações de 2×10^6 , 5×10^6 ou 1×10^7 células/mL. A produção de IL-12p40 era avaliada nos sobrenadantes de 48 h de cultura pelo ensaio de ELISA.

Nossos resultados mostraram que a quantidade de IL-12p40 aumenta com o aumento do número de células (Figura 5). Nos sobrenadantes de cultura com 1×10^7 células/mL foi detectada uma quantidade de IL-12p40 significativamente superior que nos sobrenadantes das culturas onde a concentração celular era inferior. Logo, a concentração celular que vinha sendo utilizada não induzia inibição da produção de IL-12p40. Os linfonodos distais ao sítio do inóculo eram utilizados como controles nas mesmas condições e não detectamos IL-12p40 nestas culturas (dados não mostrados). Além disso, tomamos o cuidado de verificar se haveria mais morte celular nesta concentração comparada às concentrações menores. Observamos aproximadamente 15% de mortalidade celular em todas as culturas após 48 h de incubação.

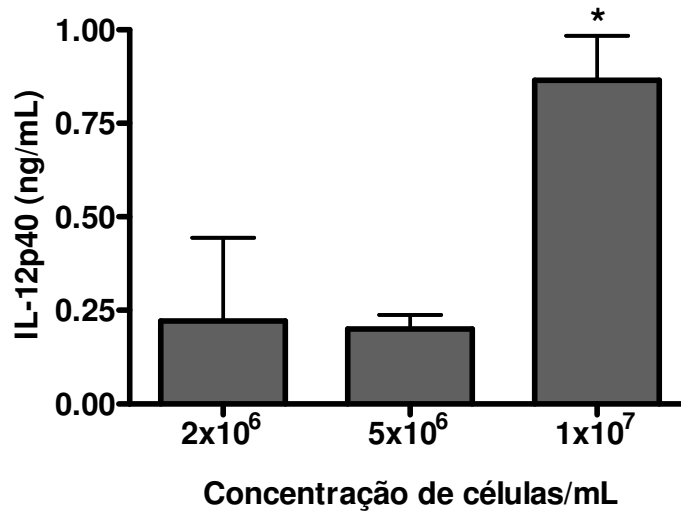


Figura 5. Produção de IL-12p40 por células de linfonodo em diferentes concentrações/mL em cultura. Camundongos BALB/c eram inoculados com 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* no coxim das patas traseiras. Os linfonodos poplíteos eram retirados 48 h após infecção e cultivados na concentração de 2×10^6 , 5×10^6 ou 1×10^7 células/mL. Os sobrenadantes de 48 h de cultura eram colhidos para dosagem de IL-12p40 pelo método de ELISA. A sensibilidade mínima do teste era de 0,15 ng/mL. Os resultados estão representados pela média e \pm SD de três experimentos independentes.
* $p < 0,01$ (2×10^6 ; 5×10^6 vs 1×10^7 células).

4.3 Quantificação dos parasitos em linfonodos drenantes do sítio da infecção de camundongos BALB/c inoculados com *L. (L.) major*

Com o intuito de verificar se às 48 h de infecção poderíamos detectar parasitos vivos, testes de quantificação foram realizados utilizando o método de diluição limitante (LDA), como descrito em materiais e métodos. Para tanto, 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* eram injetadas no coxim das patas traseiras de camundongos BALB/c e os linfonodos poplíteos eram coletados após 48 h de infecção. A Figura 6 mostra que neste tempo de infecção é possível quantificar os parasitos nos linfonodos drenantes do sítio do inóculo e que o linfonodo de um camundongo BALB/c inoculado com 5×10^6 parasitos após 48 h de infecção possui em média 608 parasitos vivos.

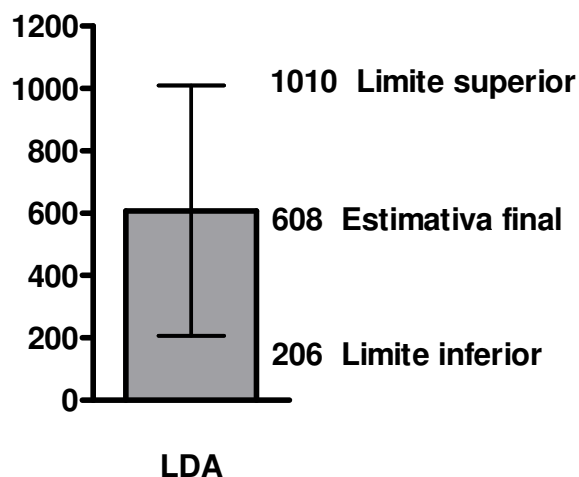


Figura 6. Quantificação de parasitos vivos no linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c 48 h após a infecção com *L. (L.) major*. Camundongos BALB/c eram inoculados com 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* no coxim das patas traseiras. Os linfonodos poplíteos eram retirados 48 h após infecção e a suspensão celular cultivada em meio Grace completo a 26 °C. O número de parasitos foi determinado pelo ensaio de diluição limitante (LDA) e analisado pelo programa ELIDA. Os resultados representam a estimativa do número de parasitos vivos e os intervalos de confiança de 95%.

4.4 Estimativa da frequência de células expressando os marcadores reconhecidos pelos anticorpos ER-MP12, ER-MP58, ER-HR3 e 33D1 em linfonodos de camundongos inoculados com *L. (L.) major*

A técnica de imunocitoquímica recém introduzida no laboratório foi adaptada e padronizada para avaliação da presença das células expressando os marcadores reconhecidos pelos anticorpos ER-MP12 (anti-CD31) e ER-MP58 (fagócitos imaturos), ER-HR3 (fagócitos de maturação intermediária) e 33D1 (fagócitos maduros) em linfonodos de camundongos BALB/c controles e infectados. Os sobrenadantes de cultura contendo os anticorpos monoclonais e os anticorpos purificados específicos cedidos pelo Dr. Pieter Leenen e pelo Laboratório de Imunologia Celular das Leishmanioses - ICB/USP foram titulados e padronizados para serem utilizados nos testes de marcação pela técnica de imunocitoquímica.

4.4.1. Titulação dos sobrenadantes de cultura de hibridomas contendo os anticorpos ER-MP12, ER-MP58 e dos anticorpos purificados ER-HR3 e 33D1

Os sobrenadantes de cultura dos hibridomas contendo os anticorpos ER-MP12 e ER-MP58 e os anticorpos purificados ER-HR3 e 33D1 eram testados em diferentes concentrações em lâminas de vidro contendo células totais de linfonodos de camundongos controles ou infectados por 48 h com *L. (L.) major* através da técnica de imunocitoquímica.

Não foram detectadas células expressando CD31 nos linfonodos de camundongos BALB/c controles ou infectados com *L. (L.) major* (Figura 7A). Como controle positivo, testamos o sobrenadante contendo os anticorpos ER-MP12, não diluído, em células de medula óssea de camundongos BALB/c controles, resultando em 20% de células positivas para CD31 (Figura 7B). Estes resultados sugerem que a quantidade de células expressando CD31 deve ser mínima ou ausente nos linfonodos dos camundongos BALB/c controles ou infectados.

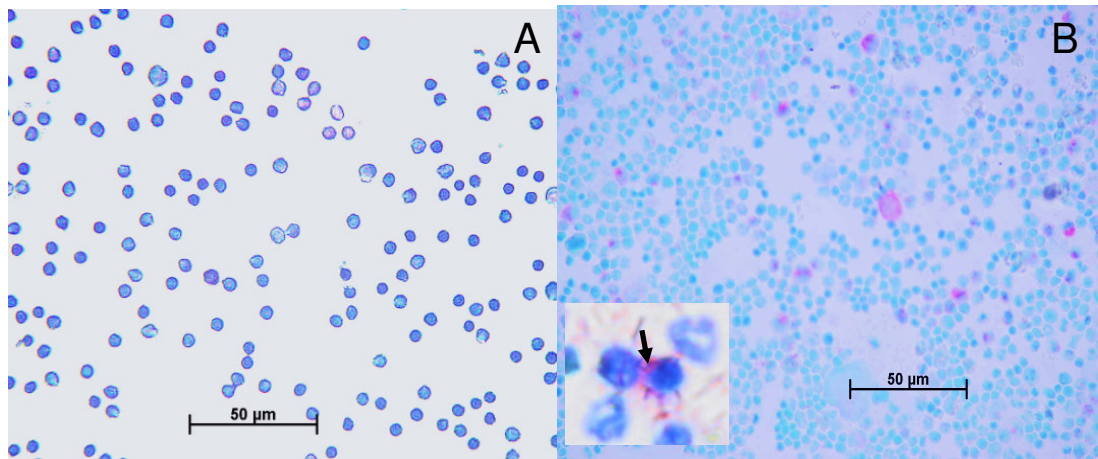


Figura 7. Teste de marcação de células CD31⁺ de linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c infectados e de células de medula óssea de camundongos BALB/c controles. Células de linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c infectados (A) e células de medula óssea de camundongos controles (B) eram citocentrifugadas (2×10^5 células/200 μ L), incubadas com o anticorpo ER-MP12 (anti-CD31) não diluído e a marcação revelada pela adição subsequente do cromógeno FAST RED tendo como conjugado enzimático a extravidina® - fosfatase alcalina. As lâminas eram contra-coradas com corante azul Instant Prov. A porcentagem de células CD31⁺ foi determinada em 1000 células quantificadas. A seta indica o local de marcação entre células.

Os testes utilizando o sobrenadante de cultura contendo o anticorpo ER-MP58 não diluído resultaram em muitas ligações inespecíficas (lâmina na qual quase a totalidade das células estava marcada). Como intuito de diminuir ou eliminar estas ligações inespecíficas, as lâminas contendo células totais de linfonodo de camundongos BALB/c controles eram ensaiadas nas seguintes diluições do sobrenadante: 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:500/2 x 10⁵ células (Figura 8A). Verificamos uma marcação decrescente do número de células até a diluição de 1:500. Na diluição de 1:50 do sobrenadante, a marcação foi expressiva e sem ligações inespecíficas (Figura 8B). Além disso, foi possível observar que a marcação das células era homogênea. Nos testes comparando as células de linfonodo de camundongos BALB/c controles com as células de linfonodo de camundongos BALB/c infectados (48 h após infecção), na diluição de 1:50, obtivemos 0,58% de células ER-MP58⁺ nos linfonodos de camundongos controles *versus* 1,6% de células de linfonodos de camundongos infectados: um aumento de 2,7 vezes.

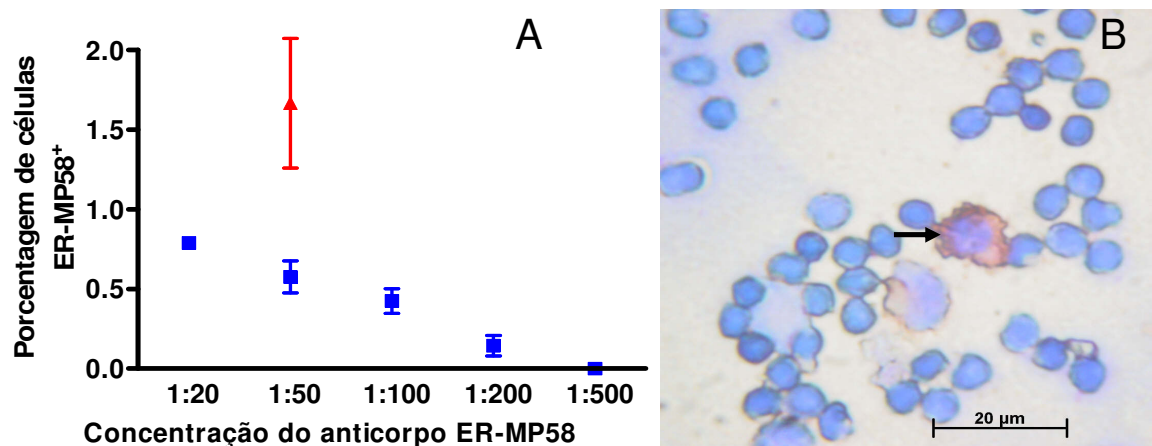


Figura 8. Teste de marcação do sobrenadante de cultura contendo o anticorpo ER-MP58. Em **A**, porcentagem de células de linfonodos de camundongos BALB/c controles (■) ou inoculados no coxim das patas traseiras com 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* obtidas 48 h após infecção (▲). As células eram citocentrifugadas (2×10^5 células/200 μ L) e incubadas com o sobrenadante de cultura contendo o anticorpo ER-MP58 nas concentrações de 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:500 e a marcação revelada pela adição subsequente do cromógeno FAST RED tendo como conjugado enzimático a extravidina® - fosfatase alcalina. As lâminas eram contra-coradas com corante azul Instant Prov e analisadas sob microscopia óptica. A porcentagem de células ER-MP58⁺ foi determinada em 1000 células quantificadas. Os resultados representam a média \pm SD de dois a cinco experimentos independentes. Em **B**, células de linfonodos de camundongos BALB/c controles marcadas com o anticorpo ER-MP58 na concentração de 1:50. A seta representa uma célula ER-MP58⁺.

Em seguida, testamos a marcação das células de linfonodo de camundongos BALB/c controles com o anticorpo purificado ER-HR3, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 5,0 $\mu\text{g}/2 \times 10^5$ células. Na concentração de 0,5 μg a intensidade e o número de células marcadas foi muito baixo. Já a concentração maior (5,0 μg) induziu uma marcação com grande inespecificidade (dados não mostrados). Na concentração de 1 μg , a população celular marcada foi bem homogênea, constituída de células grandes com morfologia típica de fagócitos (Figura 9B); sendo, a quantidade de células marcadas de 0,63% nos linfonodos controles e de aproximadamente 1% nos linfonodos com 48 h de infecção (Figura 9A).

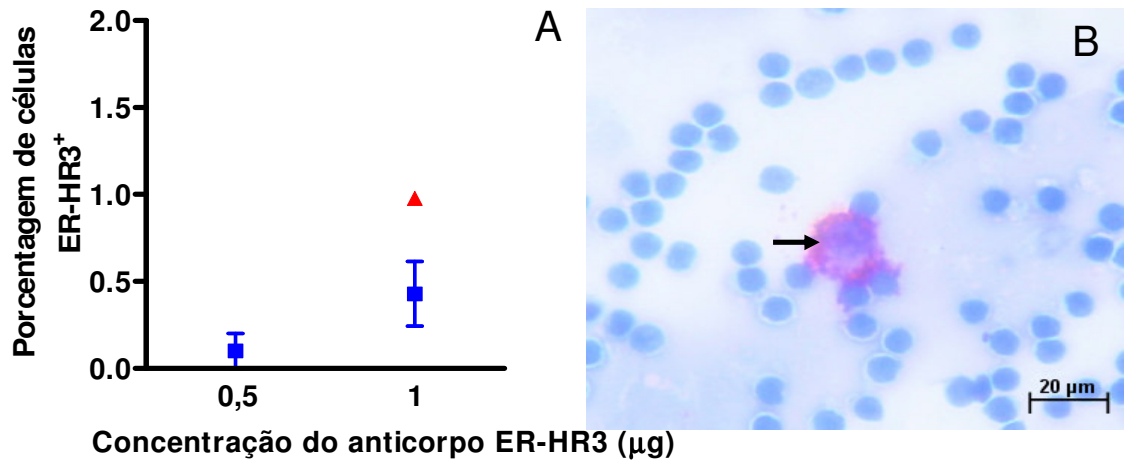


Figura 9. Teste de marcação do anticorpo purificado ER-HR3. Em **A**, porcentagem de células de linfonodos de camundongos BALB/c controles (■) ou inoculados no coxim das patas traseiras com 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* obtidas 48 h após infecção (▲). As células eram citocentrifugadas (2×10^5 células/200 µL) e incubadas com o anticorpo ER-HR3 nas concentrações de 0,5 e 1 µg e a marcação revelada pela adição subsequente do cromógeno FAST RED tendo como conjugado enzimático a extravidina® - fosfatase alcalina. As lâminas eram contra-coradas com corante azul Instant Prov e analisadas sob microscopia óptica. A porcentagem de células ER-HR3⁺ foi determinada em 1000 células quantificadas. Os resultados representam a média \pm SD de três experimentos independentes. Em **B**, células de linfonodos de camundongos BALB/c controles marcadas com o anticorpo ER-HR3 na concentração de 1 µg. A seta representa uma célula ER-HR3⁺.

O anticorpo purificado 33D1 era utilizado em nossos testes de imunocitoquímica nas concentrações de 0,5, 1,0, 5,0 e 10 $\mu\text{g}/2 \times 10^5$ células. As concentrações de 0,5, 1,0 e 5,0 μg do anticorpo não marcou células de linfonodos de camundongos BALB/c controles assim como de linfonodos de camundongos BALB/c infectados. Somente na concentração de 10 μg do anticorpo foi possível detectar 0,25% de células positivas obtidas de linfonodos de camundongos infectados (Figura 10 A e B).

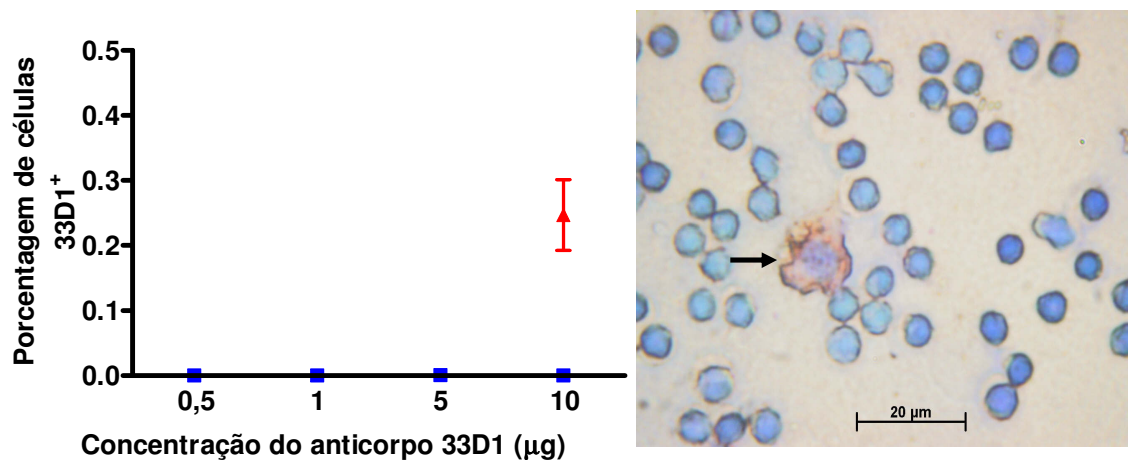


Figura 10. Teste de marcação do anticorpo purificado 33D1. Em **A**, porcentagem de células de linfonodos de camundongos BALB/c controles (■) ou inoculados no coxim das patas traseiras com 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* obtidas 48 h após infecção (▲). As células eram citocentrifugadas (2×10^5 células/200 µL) e incubadas com o anticorpo 33D1 nas concentrações de 0,5, 1, 5 e 10 µg e a marcação revelada pela adição subsequente do cromógeno FAST RED tendo como conjugado enzimático a extravidina® - fosfatase alcalina. As lâminas eram contra-coradas com corante azul Instant Prov e analisadas sob microscopia óptica. A porcentagem de células 33D1⁺ foi determinada em 1000 células quantificadas. Os resultados representam a média \pm SD de três a quatro experimentos independentes. Em **B**, células de linfonodos de camundongos BALB/c controles marcadas com o anticorpo 33D1 na concentração de 10 µg. A seta representa uma célula 33D1⁺.

Até o momento, nossos dados indicam que não é possível detectar células CD31⁺ nos linfonodos de camundongos BALB/c nas primeiras 48 h de infecção por *L. (L.) major*. Foi possível verificar que ocorre um aumento no número de células ER-MP58⁺, ER-HR3⁺ e 33D1⁺ nos linfonodos drenantes de camundongos BALB/c após 48 h de infecção. Estes dados levam a crer que deve ocorrer migração para os linfonodos drenantes de células em diferentes estágios de maturação após a inoculação do parasito.

4.5. Cinética do aparecimento de células ER-MP58⁺, ER-HR3⁺ e 33D1⁺ nos linfonodos de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major*

Para verificar quando, no período de 48 h de infecção por *L. (L.) major*, começa a ocorrer o aumento das células ER-MP58⁺, ER-HR3⁺ e 33D1⁺ nos linfonodos de camundongos BALB/c infectados, eram feitos testes de marcação de células obtidas de linfonodos antes da infecção, 24 e 48 h após a infecção.

Os dados mostraram que a frequência das células ER-MP58⁺ e 33D1⁺ só aumentou significativamente com 48 h de infecção. A frequência das células ER-HR3⁺, entretanto, aumentou significativamente com 24 h após a infecção e manteve-se inalterada até as 48 h (Figura 11).

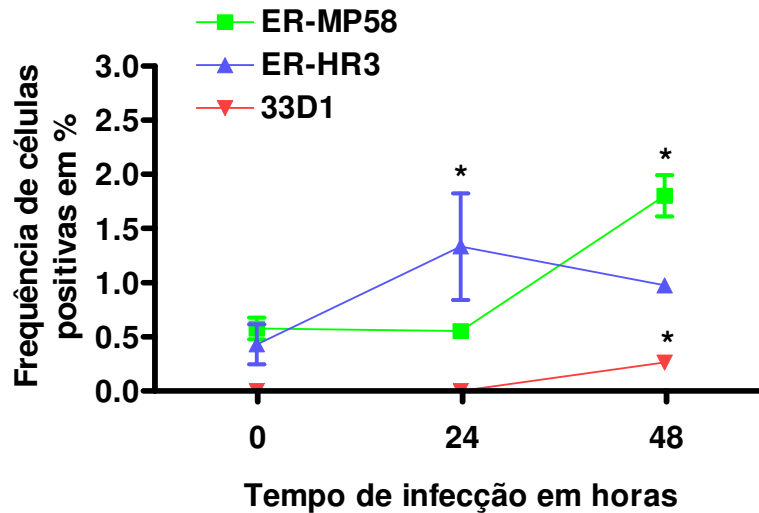


Figura 11. Cinética do aparecimento de células ER-MP58⁺, ER-HR3⁺ e 33D1⁺ em linfonodos poplíteos nas primeiras 48 h de infecção por *L. (L.) major*. Células de linfonodos de camundongos BALB/c controles ou inoculados no coxim das patas traseiras com 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* eram obtidas 48 h após a infecção, citocentrifugadas (2×10^5 células/200 μ L) e incubadas com o sobrenadante de cultura contendo o anticorpo ER-MP58 (1:50) ou os anticorpo purificados ER-HR3 (1 μ g) ou 33D1 (10 μ g). A marcação era revelada pela adição subsequente do cromógeno FAST RED tendo como conjugado enzimático a extravidina® - fosfatase alcalina. As lâminas eram contra-coradas com azul Instant Prov e analisadas sob microscopia óptica. A porcentagem de células ER-MP58⁺, ER-HR3⁺ e 33D1⁺ foi determinada em 1000 células quantificadas. Os resultados representam a média \pm SD de três experimentos independentes.

* $p < 0,001$ (ER-MP58; 33D1 = 0 vs 24 h; 24 vs 48 h)

* $p < 0,05$ (ER-HR3 = 0 vs 24 h)

4.6. Produção de IL-12p40 por células ER-MP58⁺ e ER-HR3⁺ de linfonodos de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) major*

No intuito de evidenciar as populações celulares de linfonodos de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) major* envolvidas na produção de IL-12, utilizamos o sistema de separação celular por microesferas magnéticas da Myltenyi Biotec®.

Devido a ausência ou pequena quantidade de células CD31⁺ e de células 33D1⁺ nos linfonodos de camundongos BALB/c infectados, tornava-se inviável proceder a purificação destas populações para avaliação da produção de IL-12. Assim, só processamos as populações expressando os marcadores ER-MP58 e ER-HR3 nos ensaios de separação. A avaliação do processamento foi feita utilizando a técnica de imunocitoquímica. A eficiência da seleção positiva variou entre 15 a 25% e da negativa de 99,99 a 100%. Assim, a população positiva foi considerada como uma população enriquecida de células positivas (Figura 12).

Nossos resultados mostraram que a produção de IL-12p40 pela população celular total de linfonodo drenante poplíteo depletada de células ER-MP58⁺ diminuiu significativamente ($p < 0,001$). Enquanto que, a produção de IL-12p40 foi mantida na população enriquecida de células ER-MP58⁺ ($p > 0,05$) (Figura 13). Estes dados implicam as células ER-MP58⁺ como produtoras de IL-12p40 na fase inicial da infecção por *L. (L.) major*.

A produção de IL-12p40 foi comparável entre as populações total, enriquecida de células ER-HR3⁺ e ER-HR3⁻. Entretanto, a concentração de IL-12p40 detectada nos sobrenadantes de cultura de células enriquecidas em ER-HR3⁺ e ER-HR3⁻ mostrou diferenças estatisticamente significantes entre estas populações ($p < 0,05$) (Figura 14). Estes resultados mostram que deve haver um envolvimento das células ER-HR3⁺ na produção de IL-12p40 nos linfonodos de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major*.

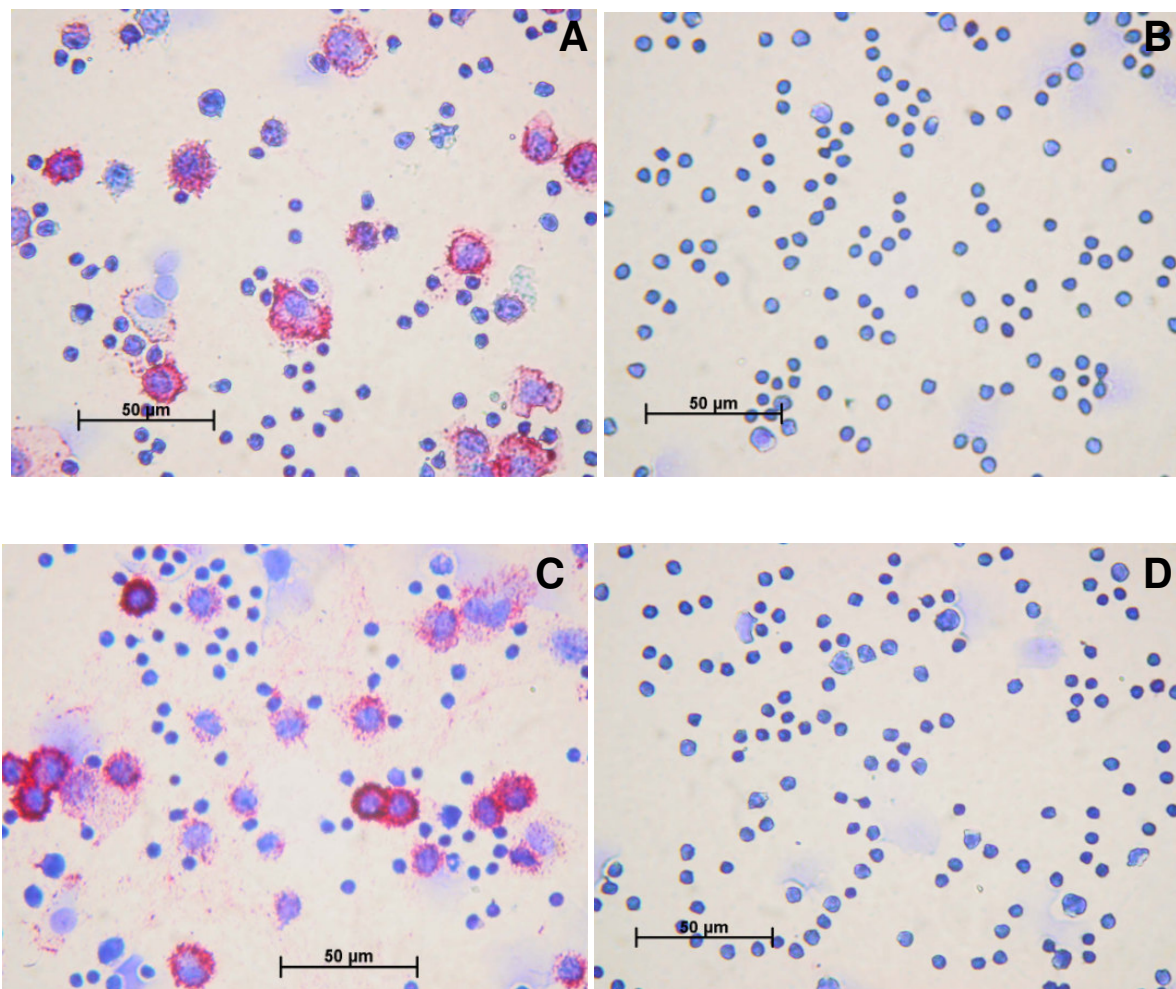


Figura 12. Imunocitoquímica de células ER-HR3⁺ e ER-MP58⁺. Células de linfonodos de camundongos BALB/c inoculados no coxim das patas traseiras com 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* e obtidas 48 h após a infecção, eram separadas utilizando o sistema de separação celular através de microesferas magnéticas da Myltenyi Biotec® e em seguida citocentrifugadas (2×10^5 células/200 μ L). Às lâminas era adicionado o anticorpo de rato anti-camundongo biotinizado na concentração de 1:500 e a marcação revelada pela adição subsequente do cromógeno FAST RED tendo como conjugado enzimático a extravidina® - fosfatase alcalina. As lâminas eram contra-coradas com azul Instant Prov e analisadas sob microscopia óptica. A porcentagem de células ER-MP58⁺ e ER-HR3⁺ foi determinada em 1000 células quantificadas. (Em A: ER-MP58⁺, em B: ER-MP58⁻, em C: ER- HR3⁺ e em D: ER- HR3⁻).

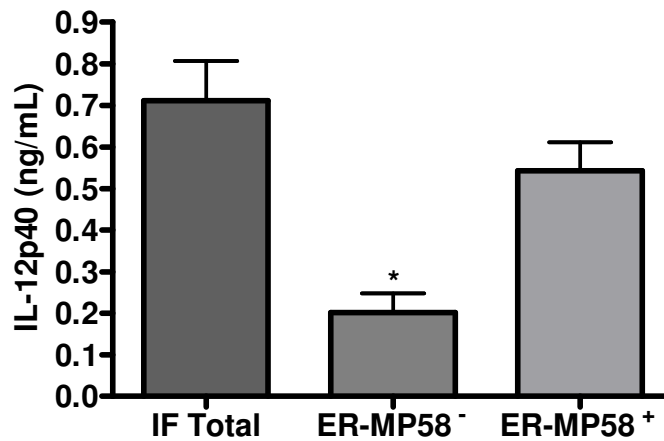


Figura 13. Produção de IL-12p40 pela população enriquecida de células ER-MP58⁺ e pela população ER-MP58⁻ após 48 h de infecção por *L. (L.) major*.

Camundongos BALB/c eram inoculados com 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* no coxim das patas traseiras. A suspensão celular obtida dos linfonodos drenantes do inóculo (IF Total) eram separadas em positivas (ER-MP58⁺) e negativas (ER-MP58⁻) pelo sistema de esferas magnéticas da Mylteniy Biotec® e posteriormente cultivadas na concentração de 1×10^7 células/mL para a obtenção dos sobrenadantes. Os linfonodos distais ao sítio do inóculo eram utilizados como controles nas mesmas condições. Os sobrenadantes de 48 h de cultura eram colhidos para dosagem de IL-12p40 pelo método de ELISA. A sensibilidade mínima do teste era de 0,15 ng/mL. Os resultados foram expressos pela média \pm SD de três experimentos independentes.

* $p < 0.001$ (IF Total vs ER-MP58⁻)

$p < 0.01$ (ER-MP58⁻ vs ER-MP58⁺).

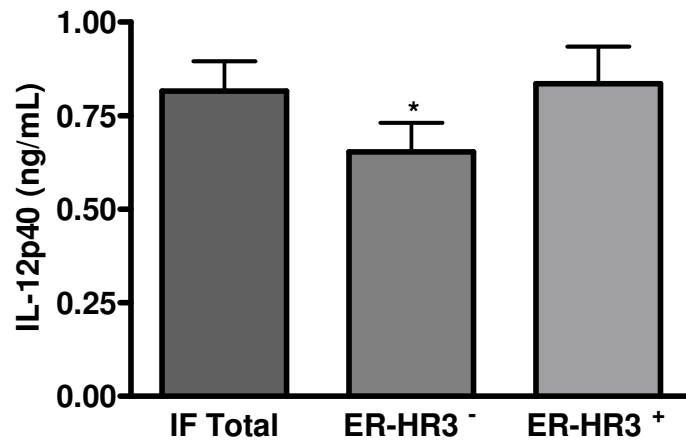


Figura 14. Produção de IL-12p40 pela população enriquecida de células ER-HR3⁺ e pela população ER-HR3⁻ após 48 h de infecção por *L. (L.) major*.

Camundongos BALB/c eram inoculados com 5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura de *L. (L.) major* no coxim das patas traseiras. A suspensão celular obtida dos linfonodos drenantes do inóculo (IF Total) eram separadas em positivas (ER-HR3⁺) e negativas (ER-HR3⁻) pelo sistema de esferas magnéticas da Mylteniy Biotec® e posteriormente cultivadas na concentração de 1×10^7 células/mL para a obtenção dos sobrenadantes. Os linfonodos distais ao sítio do inóculo eram utilizados como controles nas mesmas condições. Os sobrenadantes de 48 h de cultura eram colhidos para dosagem de IL-12p40 pelo método de ELISA. A sensibilidade mínima do teste era de 0,15 ng/mL. Os resultados foram expressos pela média \pm SD de quatro experimentos independentes.

* $p < 0,001$ (ER-HR3⁻ vs ER-HR3⁺).

5. DISCUSSÃO

Uma série de anticorpos monoclonais tem sido utilizada para caracterizar o desenvolvimento de macrófagos e células dendríticas a partir de precursores mielóides da medula óssea de camundongos. Estes marcadores, muitos dos quais marcam proteínas com funções ainda desconhecidas, podem ser usados para indicar os estágios de maturação em que se encontram as células.

Neste trabalho, avaliamos o envolvimento de células de linfonodos drenantes, expressando os marcadores de fagócitos imaturos (ER-MP12: anti-CD31/PECAM-1 e ER-MP58), de fagócitos com maturação intermediária (ER-HR3) e de fagócitos maduros (33D1) na produção de IL-12p40 *in vivo* durante a fase inicial da infecção por *L. (L.) major*.

O modelo de infecção escolhido neste estudo foi o do inóculo alto (5×10^6 promastigotas de fase estacionária de cultura) no coxim plantar de camundongo BALB/c. Neste modelo, os camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* desenvolvem uma doença progressiva e são incapazes de controlar a multiplicação dos parasitos nos linfonodos drenantes (Heinzel *et al.*, 1989; Rogers *et al.*, 2002).

O linfonodo drenante do processo inflamatório resultante da infecção por *Leishmania* muda drasticamente já nas primeiras 16 - 24 h quanto à composição celular e funcional. A inoculação dos parasitos no coxim plantar de diferentes linhagens de camundongos resulta em um aumento do número de células no linfonodo de 5 a 20 vezes em 24 - 48 h. Este aumento no número de células foi discutido como consequência do influxo de células provenientes da circulação sanguínea (Solbach & Laskay 2000). Laskay e colaboradores (1997) mostraram que o bloqueio da interação da L-selectina (CD62L) com a molécula CD34 na superfície das HEVs em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* preveniu tanto o aumento no número de células no linfonodo drenante como possibilitou a estes animais resistirem à infecção experimental.

A contagem do número de células nos linfonodos poplíteos drenantes do coxim plantar em nossos experimentos, revelou um aumento cerca de 2 vezes no número de células nos linfonodos 48 h após o inóculo parasitário. Além disso, confirmamos a

presença de parasitos vivos nos linfonodos drenantes o que demonstra que a via de drenagem linfática contribui com o aporte de células para o linfonodo.

O inóculo de 5×10^6 parasitos/pata e o cultivo de 1×10^7 células/mL mostrou ser a melhor combinação para uma detecção consistente de IL-12 em sobrenadantes de células de linfonodos 48 h após a infecção, o tempo mais precoce onde se observou uma produção expressiva da IL-12p40 nas condições do nosso laboratório.

A árdua padronização das técnicas e estes resultados nos conduziram ao objetivo principal desta dissertação que, consistiu em avaliar o envolvimento de células de linfonodos drenantes em diferentes estágios de maturação na produção de IL-12p40 *in vivo*, durante a fase inicial da infecção murina por *L. (L.) major*.

Os dados apresentados nesta dissertação confirmam a não existência de fagócitos CD31⁺ em linfonodos murinos normais (controles) ou estimulados pela infecção com *L. (L.) major* e a presença de 20% de células CD31⁺ na medula óssea de camundongos BALB/c. Nossos resultados corroboram Leenen e colaboradores (1990) que observou, também, 20% de positividade na medula óssea para esse mesmo marcador. A presença de somente 4% de células CD31⁺ do total de mononucleares no período de 20 - 48 h no peritônio após estimulação por tioglicolato e a ausência antes e depois deste período, mostrou que estas células não são células migratórias e que normalmente não deixam a medula óssea (Chan *et al.*, 1998). É possível que estas células possam migrar para os tecidos inflamados em pequenas quantidades, mas não alcançam o linfonodo ou perdem este marcador durante sua migração para os linfonodos.

Assim, passamos a pesquisar a presença de populações celulares expressando os marcadores ER-MP58, ER-HR3 e 33D1, nos linfonodos de camundongos BALB/c controles e infectados.

Nossos resultados mostraram uma frequência de aproximadamente 37% de células ER-MP58⁺ na medula óssea de camundongos BALB/c controles. De Bruijn e colaboradores (1996) demonstraram que a população CD31^{high}/ER-MP58^{high} na medula óssea representa os progenitores comprometidos com a linhagem mielóide e que a população ER-MP58^{high} na medula óssea era constituída de aproximadamente 39% do total das células. Estas células coradas por giemsa mostraram ter

características morfológicas semelhantes às das células mielóides. No linfonodo de camundongos BALB/c normais detectamos 0,58% de células ER-MP58⁺. O aumento de aproximadamente 3 vezes desta população só foi observado 48 h após o inóculo de *L. (L.) major* nos linfonodos drenantes. Sunderkotter e colaboradores (2004) demonstraram que a população de monócitos sanguíneos era heterogênia e uma delas apresentava o fenótipo Ly-6C⁺ER-MP58⁺CD62L⁺. Além disso, eles observaram um aumento desta população de monócitos imaturos no sangue de camundongos C57Bl/6 cronicamente infectados com *L. (L.) major*. É possível que a maior parte da população ER-MP58 observada nos linfonodos infectados em nossos experimentos, tenha migrado diretamente da circulação sanguínea via HEVs como células recém-liberadas da medula óssea. Chan e colaboradores (1998) presumiram que as células Ly-6C⁺ER-MP58⁺ observadas em grande número no exsudato peritoneal inflamado vinham da circulação sanguínea.

O número de células ER-HR3⁺ aumentou significativamente com 24 h de infecção, não alterando nas primeiras 48 h. A quantidade de células marcadas nos linfonodos controles foi de 0,63% e de aproximadamente 1% nos linfonodos com 48 h de infecção. O anticorpo monoclonal ER-HR3 marca monócitos mais diferenciados no sangue, macrófagos residentes de múltiplos órgãos e células de Langerhans. No sangue, esta subpopulação representa 70% do total dos monócitos. As células ER-HR3⁺ são encontradas também no linfonodo associadas aos linfócitos T (De Jong, *et al.* 1994a). Camundongos cronicamente infectados com BCG apresentaram células ER-HR3⁺ em áreas granulomatosas, sugerindo que macrófagos migratórios expressam este marcador. Estes macrófagos não co-expressam moléculas de classe II do MHC, sugerindo que a molécula reconhecida pelo anticorpo ER-HR3 não está envolvida no processo de ativação dos macrófagos, mas podem estar envolvidas no processo de diferenciação destas células (De Jong, *et al.* 1994b). A expressão da molécula ER-HR3 inicia-se em um estágio intermediário de diferenciação, em fagócitos mononucleares derivados da medula óssea (Oliveira, *et al.* 2003). Portanto, as células ER-HR3⁺ que observamos às 24 h após a infecção por *L. (L.) major* deveriam estar disponíveis na corrente sanguínea e pelo estímulo da inflamação

provocada pelo inóculo do parasito teriam migrado primeiramente para o tecido inflamado e posteriormente para o linfonodo drenante.

Nos linfonodos drenantes dos camundongos BALB/c após 48 h de infecção por *L. (L.) major* detectamos 0,25% de células 33D1⁺. O anticorpo monoclonal 33D1 reconhece um epítipo expresso na superfície de uma população de células dendríticas representada por menos de 1% no baço, linfonodo, timo, medula óssea, cavidade peritoneal e no sangue de camundongos de diferentes linhagens (Nussenzweig *et al.*, 1982). Esta população aumentou aproximadamente 3 vezes nos linfonodos drenantes do sítio do inóculo de camundongos BALB/c com 72 h de infecção por *L. (L.) major* (Nunes, 2003).

Nós observamos um aumento significativo na produção de IL-12p40 em cultura de células de obtidas dos linfonodos com 48 h de infecção por *L. (L.) major*.

Quando analisamos individualmente a produção de IL-12 pelas células positivas e negativas para os marcadores ER-MP58 e ER-HR3, a produção de IL-12p40 é reduzida significativamente na ausência da população enriquecida de células ER-MP58⁺. Somando ao fato de termos observado um aumento significativo de células ER-MP58⁺ somente após 48 h de infecção, esses dados sugerem que as células ER-MP58⁺ devem ser as responsáveis por grande parte da IL-12 observada nos linfonodos drenantes do sítio do inóculo da *L. (L.) major*. Acreditamos que as ER-HR3⁺ possam, também, estar envolvidas com a produção de IL-12p40 local, pois a concentração da IL-12p40 nos sobrenadantes das culturas enriquecida de células ER-HR3⁺ e nas culturas de células ER-HR3⁻, mostrou uma diferença estatisticamente significante para mais ou para menos entre estas populações, respectivamente. A população ER-HR3 diferenciada *in vitro* a partir de células da medula óssea e estimulada com LPS (lipopolissacarídeo) (Oliveira *et al.*, 2003) ou com formas promastigotas de *L. (L.) major in vitro* (Oliveira *et al.*, 2005) foi capaz de produzir grande quantidade de IL-12p40. Os nossos dados sugerem que, a maior parte da IL-12 encontrada nas culturas de células ER-HR3⁻ e ER-HR3⁺ poderia provir da população ER-MP58⁺ presente.

Estudos similares, envolvendo a infecção de 48 h por *L. (L.) major* em BALB/c mostraram que células Gr1/Ly6G⁺, especialmente neutrófilos e monócitos,

migram da corrente sangüínea para o sítio do inóculo dos parasitos e deste para os linfonodos drenantes, contribuindo para a produção de IL-12 e subseqüentemente de IFN- γ (Santos, 2005).

Analisando o conjunto de nossos resultados, podemos conjecturar que nas primeiras 48 h de infecção com *L. (L.) major* em camundongos BALB/c ocorre uma primeira onda de migração de monócitos ER-HR3⁺ que deixam a circulação para o tecido inflamado, onde rapidamente fagocitam os parasitos e migram para os linfonodos drenados pelo sistema linfático. Em seguida, ocorre uma segunda onda na qual os monócitos ER-MP58⁺ recém-liberados da medula óssea para a circulação, chegam nos linfonodos poplíteos diretamente via transmigração pelas HEVs. No linfonodo, estas células ao internalizarem as formas amastigotas do parasito são estimuladas a produzir IL-12.

6. CONCLUSÕES

Conclusões específicas:

- Células do SFM imaturas expressando a molécula CD31 estão ausentes nos linfonodos drenantes do sítio do inóculo nas primeiras 48 h após a infecção por *L. (L.) major* ;
- Ocorreu um aumento no número de células ER-MP58⁺ e 33D1⁺ nos linfonodos drenantes 48 h após a infecção por *L. (L.) major*;
- Ocorreu um aumento no número de células ER-HR3⁺ nos linfonodos drenantes a partir das 24 h após a infecção por *L. (L.) major* ;
- Fagócitos mononucleares indiferenciados, como ER-MP58⁺ e ER-HR3⁺ são responsáveis por grande parte da produção de IL-12 nos linfonodos drenantes 48 h após a infecção por *L. (L.) major* em camundongos BALB/c.

Conclusão geral:

Células ER-MP58⁺, precursoras de células comprometidas com as linhagens de células dendríticas e macrófagos, dão sustância à produção de IL-12 em linfonodos drenantes da infecção por *L. (L.) major*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- Afonso LC, Scharon TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P 1994. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*. 14. 263 (5144):235-7.
- Alexander J, Russell D G 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol*. 31:175-254.
- Alexander J, Bryson K 2005. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters*. 99: 17-23.
- Andrew, SM & Titus JA 1997. Purification and fragmentation of antibodies. In *Current Protocols in Immunology*. Coligan JE., Kruisbeek AM., Margulies DH., Shevach EM., Strober W. (ed). Wiley J and Sons. New York. 2.7.1–2.7.12.
- Ashford RW, Desjeux P, deRaadt P 1992. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitol Today*. 8 (3): 104-105.
- Baccarini M, Hockertz S, Kiderlen AF, Lohmann-Matthes ML 1988. Extracellular killing of *Leishmania* promastigotes and amastigotes by macrophage precursors derived from bone marrow cultures. *J Exp Med*. 167:1486-1492.
- Banchereau J, Steinman RM 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392 (6673): 245-252.
- Bailey H, Bishop WJ 1959. Leishman-Donovan bodies and donovaniasis; Sir William Boog Leishman, 1865-1926; Charles Donovan, 1863-1951. *Br J Vener Dis*. 35:8-9.
- Bastos KR, Marinho CR, Barboza R, Russo M, Alvarez JM, D'Imperio Lima MR 2004. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes Infect*. 6(6):630-6.
- Belazzoug S 1992. Leishmaniasis in Mediterranean countries. *Vet Parasitol*. 44: 15-9.
- Biedermann T, Zimmermann S, Himmelrich H, Gumy A, Egeter O, Sakrauski A K, Seegmüller I, Voigt H, Launois P, Levine A D, Wagner H, Klaus Heeg K, Louis J A, Röcken M 2001. IL-4 instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nature Immunology*. 2 (11):1054-60.
- Bosque F, Belkaid Y, Briend E, Hevin B, Lebastard M, Soussi N, Milon G 1997. The biology of macrophages. *Pathol Biol*. 45:103-109.

¹-Referências Bibliográficas de acordo com as normas da revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.

Bryceson A 1996. Leishmaniasis. In: Cokk G (Ed) *Manson's Tropical Diseases*. ed. London: Saunders, 1213-1246.

Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks DL 1996. Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J. Exp. Med.*183 (2).515-26.

Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Boiani N, Grabstein K, Caligiuri MA 1995. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest.* 96 (6). 2578-82.

Chakir H, Campos-Neto A, Mojibian M, Webb JR 2003. IL-12Rbeta2-deficient mice of a genetically resistant background are susceptible to Leishmania major infection and develop a parasite-specific Th2 immune response. *Microbes Infect.* 5 (4): 241-9.

Chan J, Leenen PJ, Bertoncello I, Nishikawa SI, Hamilton JA 1998. Macrophage lineage cells in inflammation: characterization by colony-stimulating factor-1 (CSF-1) receptor (c-Fms), ER-MP58, and ER-MP20 (Ly-6C) expression. *Blood.* 92 (4). 1423-31.

D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, Chan SH, Kobayashi M, Young D, Nickbarg E 1992. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med.* 5: 1387-98.

Da Silva R, Sacks DL 1987. Metacyclogenesis is a major determinant of Leishmania promastigote virulence and attenuation. *Infect. Immun.* 55 (11). 2802-2806.

De Bruijn MF, Ploemacher RE, Mayen AE, Voerman JS, Slieker WA, Van Ewijk W, Leenen PJ 1996. High-level expression of the ER-MP58 antigen on mouse bone marrow hematopoietic progenitor cells marks commitment to the myeloid lineage. *Eur J Immunol.* 26 (12):2850-8.

De Jong JP, Voerman JS, Van Der Sluijs-Gelling AJ, Willemsen R, Ploemacher RE 1994a. A monoclonal antibody (ER-HR3) against murine macrophages. I. Ontogeny, distribution and enzyme histochemical characterization of ER-HR3-positive cells. *Cell Tissue Res.* 275 (3), 567-76.

De Jong JP, Leenen PJ, Voerman JS, van der Sluijs-Gelling AJ, Ploemacher RE 1994b. A monoclonal antibody (ER-HR3) against murine macrophages. II. Biochemical and functional aspects of the ER-HR3 antigen. *Cell Tissue Res.* 275 (3): 577-85.

Denkers EY, Del Rio L, Bennouna S 2003. Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. *Chem Immunol Allergy.*83: 95-114.

- Desjeux P 1996. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinical Dermatology* 14: 417-423.
- Dickerhoff R, Muller A, Bode U 1990. Visceral leishmaniasis. Personal observation and review of epidemiology, clinical aspects and therapy. *Klin Padiatr.* 202 (5): 347-51.
- Doherty TM, Coffman RL 1999. Ability of macrophage subsets to transfer resistance to murine leishmaniasis is dependent on IL-12 production. *Eur J Immunol.* 29:522-529.
- Ehrchen J, Sindrilaru A, Grabbe S, Schonlau F, Schlesiger C, Sorg C, Scharffetter-Kochanek K, Sunderkotter C 2004. Senescent BALB/c mice are able to develop resistance to *Leishmania major* infection. *Infect Immun.* 72:5106-5114.
- Evans D, Godfrey D, Lanham S, Lanotte G, Modabber F, Schnur L 1989. Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of *Leishmania*. *UNDP/World Bank/WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (Edited by: Evans D).* 1-45.
- Evans TG 1993. Leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am.* 7 (3): 527-46.
- Farah FS, Samra AS, Nuwayri-Salti N 1975. The role of macrophage in cutaneous leishmaniasis. *Immunology.* 29 (4) 755-64.
- Faust EC, Russel PF, Jung RC 1974. *Parasitologia Clínica.* Ed: México: Salvat S.A. 888.
- Felizardo TC 2005. Influência do sítio de inoculação na evolução da doença e da resposta imune na infecção experimental por *Leishmania (L.) amazonensis*. (Tese de Doutorado). Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo.
- Geutskens SB, Otonkoski T, Pullknen MA, Drexhage HA, Leenen PJ 2005. Macrophages in the murine pancreas and their involvement in fetal endocrine development in vitro. *J Leukoc. Biol.* 78 (4):845-52.
- Gontijo B, De Carvalho MDE, L 2003. American Cutaneous Leishmaniasis. *Soc Bras Med Trop.* 36: 71-80.
- Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM 1998. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol.* 28(2):687-95.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity 2005. *Nat Rev Immunol.* 5 (12): 953-64.

- Guler ML, Gorham JD, Hsieh CS, Mackey AJ, Steen RG, Dietrich WF, Murphy KM 1996. Genetic susceptibility to Leishmania: IL-12 responsiveness in Th1 cell development. *Science*. 271 (5251) 16. 984-7.
- Heath VL, Showe L, Crain C, Barrat FJ, Trinchieri G, O'Garra A 2000. Cutting edge: ectopic expression of the IL-12 receptor-beta 2 in developing and committed Th2 cells does not affect the production of IL-4 or induce the production of IFN-gamma. *The Journal of Immunology*. 164 (6):2861-5.
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med*. 169 (1). 59-72.
- Heinzel FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK 1993. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med*. 177 (5). 1505-9.
- Hendriks HR, Eestermans IL, Hoefsmit EC 1980. Depletion of macrophages and disappearance of postcapillary high endothelial venules in lymph nodes deprived of afferent lymphatic vessels. *Cell Tissue Res*. 211:375-389.
- Henri S, Curtis J, Hochrein H, Vremec D, Shortman K, Handman E 2002. Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production. *Infect Immun*. 70:3874-3880.
- Henry JB. Diagnostico clinico e tratamento por métodos laboratoriais. São Paulo: Manole. 1996. 18^aed. 1218 – 1226.
- Herouet C, Cottin M, Galanaud P, Leclaire J, Rousset F 1999. Contact sensitizers decrease 33D1 expression on mature Langerhans cells. *Eur. J. Dermatol*. 9: 185-190.
- Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *The Lancet*. 354: 1191-1199.
- Himmelrich H, Lopez CP, Tacchini-Cottier F, Louis A, Launois P 1998. The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor β 2-chain expression on CD4+ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. *The Journal of Immunology*. 161 (11):6156-63.
- Hoare CA 1938. Early discoveries regarding the parasite of oriental sore (with an English translation of the memoir by P.F. Borovsky: "On sart sore". 1989). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 32: 67-92.
- Honigberg BM, Balamuth W, Bovee EC, Corliss JO, Gojdics M, Hall RP, Kudo RR, Levine ND, Loeblich AR JR, Weiser J, Wenrich DH 1964. A Revised Classification of the Phylum Protozoa. *J Protozool*. 11: 7-20.

- Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T 2002. The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol.* 72 (4):621-7.
- Jankovic D, Sher A, Yap G 2001. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. *Curr Opin Immunol.* 13 (4). 403-9.
- Kane MM, Mosser DM 2000. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol.* 7 (1): 26-31.
- Kennedy DW, Abkowitz JL 1998. Mature monocytic cells enter tissues and engraft. *Proc Natl Acad Sci.* 8; 95 (25):14944-9.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH 1981. Transmission of leishmaniasis by the bite of phlebotomine sandflies: Possible mechanisms. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 75 (1): 152-4.
- Klaus 1987. Lymphocytes. A practical approach, Edited by G G B Klaus. IRL press.
- Laskay T, Wittmann I, Diefenbach A, Rollinghoff M, Solbach W 1997. Control of *Leishmania major* infection in BALB/c mice by inhibition of early lymphocyte entry into peripheral lymph nodes. *J. Immunol.* 158 (3).1246-53.
- Launois P, Maillard I, Pingel S, Swihart KG, Xenarios I, Acha-Orbea H, Diggelmann H, Locksley RM, Macdonald HR, Louis JA 1997. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity.* 6 (5). 541-9.
- Leenen PJ, Slieker WA, Melis M, Van Ewijk W 1990. Murine macrophage precursor characterization. I. Production, phenotype and differentiation of macrophage precursor hybrids. *Eur J Immunol.* 20 (1), Jan.15-25.
- Leenen PJ, De Bruijn MF, Voerman JS, Campbell PA, Van Ewijk W 1994. Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods.* 174 (1-2). 5-19.
- Leenen P J, Radosevic K, Voerman J S, Salomon B, Van Rooijen N, Klatzmann D, Van Ewijk W 1998. Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J. Immunol.* 160 (5).2166-73.
- Leite G 1958. Leishmaniasis visceral. I. Introduction, history & epidemiology. *Rev Bras Med.* 15 (9): 605-10.
- Liew FY, O'donnell CA 1993. Immunology of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 32.161-259.
- Lima HC, Bleyenbergh JA, Titus RG 1997. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitol Today.* 13 (2).80-2.

- Ling V, Luxenberg D, Wang J, Nickbarg E, Leenen PJ, Neben S, Kobayashi M 1997. Structural identification of the hematopoietic progenitor antigen ER-MP12 as the vascular endothelial adhesion molecule PECAM-1 (CD31). *Eur J Immunol.* 27 (2): 509-14.
- Locksley RM, Heinzel FP, Fankhauser JE, Nelson CS, Sadick MD 1998. Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. *Infect Immun.* 56 (2): 336-42.
- Macatonia NA, Hosken M, Litton P, Vieira CS, Hsieh JÁ, Culpepper M, Wysocka G, Trinchieri KM, Murphy, O'Garra 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* 154: 5071-5079.
- Marzochi MC, Marzochi KB 1994. Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica.* 10 Suppl. 2: 359-75.
- Mauel J 1996. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol.* 38. 1-51.
- Mcknight AJ, Gordon S 1998. Membrane molecules as differentiation antigens of murine macrophages. *Adv. Immunol.* 68. 271-314.
- Mirkovich, Galelli, Allison, Modabber 1986. Increased myelopoiesis during *Leishmania major* infection in mice: generation of 'safe targets,' a possible way to evade the effector immune mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* 64:1-7.
- Moll H, Fuchs H, Blank C, Rollinghoff M 1993. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 23: 1595-601.
- Morelli AE, Zahorchak AF, Larregina AT, Colvin BL, Logar AJ, Takayama T, Falo LD, Thomson AW 2001. Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood.* 1;98 (5): 1512-23.
- Moser M 2001. Regulation of Th1/Th2 development by antigen-presenting cells in vivo. *Immunobiology.* 204 (5):551-7;
- Moser M, Murphy KM 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol.* 1 (3):199-205.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL 1986. Two types of murine helper T cell clone. *J Immunol* 136 (7): 2348-2357.

- Mosmann TR & Sad S 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*. 17(3): 142-156.
- Muller-Berghaus J, Olson WC, Moulton RA, Knapp WT, Schadendorf D, Storkus WJ 2005. IL-12 production by human monocyte-derived dendritic cells: looking at the single cell. *J Immunother*. 28 (4): 306-13.
- Nishikomori R, Ehrhardt RO, Strober W 2000. T helper type 2 cell differentiation occurs in the presence of interleukin 12 receptor beta 2 chain expression and signaling. *J Exp Med*. 191 (5):847-58.
- Nishikomori R, Gurunathan S, Nishikomori K, Strober W 2001. BALB/c mice bearing a transgenic IL-12 receptor beta 2 gene exhibit a nonhealing phenotype to *Leishmania major* infection despite intact IL-12 signaling. *J Immunol*. 166 (11). 6776-83.
- Nunes A 2003. O papel das células dendríticas nas infecções murinas por *Leishmania major* ou *Leishmania amazonensis*. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo.
- Nussenzweig MC, Steinman RM, Witmer MD, Gutchinov B 1982. A monoclonal antibody specific for mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 79: 161-169.
- Oliveira MA, Lima GM, Shio MT, Leenen PJ, Abrahamsohn IA 2003. Immature macrophages derived from mouse bone marrow produce large amounts of IL-12p40 after LPS stimulation. *J. Leukoc. Biol*. 74 (5), 857-67.
- Oliveira MA, Santiago HC, Lisboa CR, Ceravollo IP, Trinchieri G, Gazzinelli RT, Vieira LQ 2000. *Leishmania* sp: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. *Exp. Parasitol*. 95 (2). 96-105.
- Oliveira MA, Tadokoro CE, Lima GM, Mosca T, Vieira LQ, Leenen PJ, Abrahamsohn IA 2005. Macrophages at intermediate stage of maturation produce high levels of IL-12 p40 upon stimulation with *Leishmania*. *Microbes Infect*. 7 (2): 213-23.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 13 (5): 715-25.
- Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, Littman DR, Rollins BJ, Zweerink H, Rot A, von Andrian UH 2001. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med*. 5; 194 (9): 1361-73.

Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Wall MR, Moore KW 2002. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol.* 168 (11):5699-708.

Park AY, Hondowicz B, Kopf M, Scott P 2002. The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. *J. Immunol.* 168 (11). 5771-7.

Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, Gately MK, Gubler U. Related Articles 1996. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci.* 26;93 (24):14002-7.

Qu C, Edwards EW, Tacke F, Angeli V, Llodra J, Sanchez-Schmitz G, Garin A, Haque NS, Peters W, van Rooijen N, Sanchez-Torres C, Bromberg J, Charo IF, Jung S, Lira SA, Randolph GJ 2004. Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med.* 200: 1231-1241.

Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity.* 11: 753-761.

Rey L 1991. *Leishmania* e leishmanioses: os parasitos. *Parasitologia.* Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA. 182-192.

Ria F, Penna G, Adorini L 1998. Th1 cells induce and Th2 inhibit antigen-dependent IL-12 secretion by dendritic cells. *Eur J Immunol.* 28(6):2003-16.

Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, Hartley SB, Menon S, Kastelein R, Bazan F, O'garra A 1997. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity.* 7 (4). 571-81.

Rogers KA, DeKrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG 2002 Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *Microbiol Lett.* 19; 209 (1):1-7.

Sacks D, Anderson C 2004. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol Rev.* 201: 225-38.

Sacks D, Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Rev Immunol* 2: 845-858.

Sacks DL, Hieny S, Sher A 1985. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J. Immunol.* 135 (1) 564-9.

- Saha B, Saini A, Germond R, Perrin PJ, Harlan DM, Davis TA 1999. Susceptibility or resistance to *Leishmania* infection is dictated by the macrophages evolved under the influence of IL-3 or GM-CSF. *Eur J Immunol*. 29:2319-2329.
- Santos MSTB 2005. Avaliação das células GR1+ murinas na resposta inata a *Leishmania major*. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal de Goiás.
- Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*. 177:195-203.
- Scharton TM, Scott P 1993. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med*. 178 (2). 567-77.
- Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P 1995. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J. Immunol*. 154 (10). 5320-30.
- Scott P 1989. The role of Th1 and Th2 cells in experimental cutaneous Leishmaniasis. *Experimental Parasitology*. 68 (3):369-72.
- Seder RA 1996. High-dose IL-2 and IL-15 enhance the in vitro priming of naive CD4+ T cells for IFN-gamma but have differential effects on priming for IL-4. *J Immunol*. 156 (7).1. 2413-22.
- Serarcangeli C, Pennica A 1996. Testimonies of an autochthonous illness on the anthropomorphic pottery in ancient Peru. *Med Secoli*. 8:125-141.
- Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications 1994. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 89: 471-478.
- Solbach W, Laskay T 2000. The host response to *Leishmania* infection. *Adv. Immunol*. 74. 275-317.
- Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M 2002. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol* 28: 187-248.
- Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Wu CY, Seder RA 2000. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (15). 8427-32.
- Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon M, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets D, Leenen P 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol*. 172 (7):4410-7.

Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.* 177 (6). 1797-802.

Taswell C 1986. Cell separation: selected methods and applications. In Pretlow TG, Pretlow TP (Eds.) Limiting dilution assays for the separation, characterization and quantification of biologically active particles and their clonal progeny: statistical methods for LDAs used by ELIDA. *Academic Press*, New York, 109-145.

Trinchieri G & Gerosa F 1996. Immunoregulation by interleukin-12. *Journal of Leukocyte Biology.* 59 (4):505-11.

Trinchieri G 1998. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv. Immunol.* 70: 83-243.

Turpin JA, Lopez-Berestein G 1992. Differentiation, maturation, and activation of monocytes and macrophages: functional activity is controlled by a continuum of maturation. In: G. Lopez-Berestein e K. J. (Ed.). *Mononuclear Phagocytes in Cell Biology.* Boca Raton: CRC Press 71-99.

von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC 1998. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med.* 19; 188 (8):1547-52.

WHO 1998. Information by topic or disease: leishmaniasis. <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>.

Williams RO 1988. Invasion of murine dendritic cells by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana mexicana*. *J Parasitol.* 74(1):186-7.