

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Características da resposta imune desenvolvida frente à infecção por
Leishmania (Leishmania) amazonensis mantida em cultura axênica por
passagens sucessivas**

Autora: Míriam Conceição de Souza

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso

Co-orientador: Dr. Eduardo de Almeida Marques da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

Ouro Preto, março de 2009.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

S729c Souza, Miriam Conceição de.
Características da resposta imune desenvolvida frente à infecção por
Leishmania (Leishmania) amazonensis mantida em cultura axênica por
passagens sucessivas [manuscrito] / Miriam Conceição de Souza. – 2009.

xvi, 95 f.: il., color; graf., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Crocco Afonso.
Co-orientador: Dr. Eduardo de Almeida Marques da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto
de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências
Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de protozoários.

Leishmaniose - Teses. 2. Calazar - Teses. 3. Macrófagos - Teses.
4. Quimiocinas - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.993.161

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, sob orientação do Professor Doutor Luís Carlos Crocco Afonso e co-orientação do Doutor Eduardo de Almeida Marques da Silva, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedicatória

*À memória do saudoso
Cônego José Feliciano da Costa Simões*

Agradecimentos

Ao Professor Luís Carlos Crocco Afonso, pela confiança em mim depositada e pelas inumeráveis lições, aprendidas ao longo destes anos de convivência, desde minha iniciação científica. Muito obrigada pelas palavras de incentivo, direcionamentos, repreensões do dia-a-dia e principalmente pela sua amizade, tantas vezes demonstrada.

Ao Doutor Eduardo de Almeida Marques da Silva, pela grande e valiosa colaboração cotidiana na bancada. Muito obrigada pela ajuda na resolução de tantos problemas, por estar sempre disponível para discussão de resultados e dúvidas, e por tornar o LIP um lugar tão alegre e agradável para trabalhar.

Ao Rodrigo, que tanto me auxiliou na parte experimental, muitas vezes deixando de realizar procedimentos do seu próprio projeto, para me ajudar. Muito obrigada pelo sorriso sempre aberto e pelo otimismo e entusiasmo que você sempre me transmitiu.

À Professora Simone Aparecida Rezende, pelo apoio e incentivo, pela convivência diária no laboratório e por sempre proporcionar discussões fecundas sobre imunologia.

Ao Leandro e ao Marcorélio, por manterem o laboratório funcionando, sempre com alegria e boa vontade. Agradeço particularmente ao Marco, pela confiança em mim depositada e por ter me permitido me sentir como uma orientadora!

Aos colegas do LIP, em especial à Juciane e ao Leonardo, que não mais trabalham conosco, mas me treinaram para o trabalho experimental. Agradeço especialmente também à Amanda, à Pauline e ao Tiago, pela ajuda experimental e pela alegria da convivência.

À Cida, grande especialista na resolução de todos os tipos de problemas, pelo auxílio sempre instantâneo e pelo seu contagiante sorriso.

Aos laboratórios associados ao NUPEB, especialmente ao Laboratório de Doença de Chagas, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Enzimologia e Planejamento de Fármacos e Laboratório de Imunopatologia, pela cessão de equipamentos e reagentes.

Aos professores, pelos ensinamentos compartilhados. Agradeço em especial aos professores Ieso de Miranda Castro e Renata Guerra de Sá, pela ajuda na resolução de problemas com a técnica de RT-PCR.

À Phoneutria Biotecnologia, em especial ao Professor Evanguedes Kalapothakis e à consultora Susanne Facchin, pelas tentativas de viabilização da RT-PCR para Foxp3.

Agradecimentos especiais

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter criado a natureza de uma maneira tão instigante e por nos permitir procurar entendê-la. É o mistério da criação que torna tudo tão belo e interessante, e nos impulsiona na busca pelo conhecimento.

Agradeço aos meus pais, que sempre me incentivam em todos os momentos de minha vida. Obrigada por viabilizarem a realização de mais esta etapa de minha formação, e por me deixarem o conhecimento como grande legado.

Agradeço ao meu irmão, Flávio, por sempre me dar bons exemplos e pelo apoio incondicional.

Ao Leonardo, pela presença tão intensa e marcante em todos os momentos de minha vida e por compartilhar comigo as alegrias e decepções do trabalho. É um grande orgulho ter você ao meu lado e contar com seu carinho e compreensão!

Ao grande amigo Rogelio Lopes Brandão, por ter me aberto tantas portas e pela grande lição: “Nada substitui o trabalho”.

Aos colegas da turma de mestrado, pelo apoio e incentivo. Agradeço especialmente à Lílian Figueiredo Moreira, que alegrou muitas vezes meu trabalho cotidiano, não permitindo que o desânimo surgisse, e que me presenteou com sua sincera amizade.

Resumo

Diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania* causam infecções expressivamente distintas em uma mesma espécie de hospedeiro. Enquanto alguns hospedeiros são resistentes à infecção por diversas espécies do parasito, quase todas as linhagens de camundongos são susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*, desenvolvendo lesões crônicas e progressivas em resposta à infecção. Esta pronunciada virulência dos parasitos pode estar relacionada à expressão de moléculas superficiais que favoreçam sua interação com os hospedeiros. As ecto-enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos são um possível fator de virulência para parasitos do gênero *Leishmania*. Para caracterizar a resposta imune desenvolvida por animais infectados com parasitos que apresentam distintos perfis de atividade ecto-nucleotidásica, foram avaliadas infecções por *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens. Esses parasitos, quando mantidos em cultura axênica por muitas passagens, apresentam menor virulência, bem como menor atividade ecto-nucleotidásica. A atividade das suas enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos extracelulares pode ser modulada pela cultura em presença de determinadas moléculas. Assim, os parasitos cultivados em meio suplementado com adenosina, produto final da via catabólica, apresentam redução na sua capacidade hidrolítica e levam a lesões menores em camundongos C57BL/6. Já os parasitos submetidos a muitas passagens em cultura, quando cultivados em meio suplementado com suramina, um inibidor de ecto-ATPases, apresentam aumento na capacidade de hidrólise de ATP e causam lesões maiores em camundongos C57BL/6. De modo interessante, os animais infectados com os parasitos que apresentam maior atividade ATPásica produziram menores quantidades de IFN- γ , após oito semanas de infecção. A infecção de macrófagos pelos parasitos mantidos em cultura axênica por poucas ou muitas passagens também apresenta diferenças marcantes, tanto para macrófagos peritoneais, quanto para macrófagos derivados de medula óssea. Os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens são capazes de infectar maior proporção de macrófagos; entretanto, não são observadas grandes diferenças no parasitismo celular. Não há alterações na produção de citocinas, quimiocinas e NO pelas células infectadas

pelos diferentes parasitos. Dados obtidos *in vivo* permitem inferir que células T reguladoras naturais parecem ser importantes para o retardo do desenvolvimento da lesão. Porém, sua participação parece ser idêntica em animais infectados com parasitos mantidos em cultura axênica por poucas ou muitas passagens. Após uma semana de infecção, há maior produção da quimiocina CCL2 em animais infectados com parasitos mantidos em cultura por poucas passagens. Como esta quimiocina participa do recrutamento de monócitos, pode-se cogitar que os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens promovem um maior recrutamento dessas células para o sítio da infecção. Uma vez diferenciadas em macrófagos, são eficazmente infectadas por estes parasitos. Em conjunto, esses resultados demonstram que as enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos extracelulares desempenham um papel importante na infecção por *L. amazonensis*, podendo ter função direta na aderência do parasito às células-alvo e na modulação da resposta imune subsequente.

Abstract

Infection by different species of parasites from the genus *Leishmania* have distinct outcome in the same species of host. While some mouse strains are resistant to infection by various species of the parasite, almost all strains of mice are susceptible to infection by *L. amazonensis*, developing chronic and progressive lesions in response to infection. This pronounced virulence of parasites may be related to the expression of surface molecules that promote their interaction with hosts. The ecto-enzymes involved in metabolism of nucleotides are a potential factor of virulence for parasites of the genus *Leishmania*. To characterize the immune response developed in animals infected with parasites that have distinct profiles of ecto-nucleotidase activity, we evaluated the infection by *L. amazonensis* kept in axenic culture for few or many passages. These parasites, when maintained in axenic culture for many passages, have lower virulence *in vivo* and reduced ecto-nucleosidase activity. The activity of the enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides can be modulated by culturing the parasites in the presence of certain molecules. Thus, when the culture medium is supplemented with adenosine, the final product of the catabolic pathway, the parasites have reduced ecto-nucleosidase activity capacity and induce smaller lesions in C57BL/6. Parasites that have been kept in culture for a long time, when grown in medium supplemented with suramin, an inhibitor of ecto-ATPases, have increased ability to hydrolyze ATP and cause bigger lesions in C57BL/6. Interestingly, cells recovered from animals infected with the parasites that have a higher ATPase activity produced smaller amounts of IFN- γ , after eight weeks of infection. Infection of macrophages by these parasites also shows marked differences, for both peritoneal macrophages and for macrophages derived from bone marrow. The parasites maintained in culture for few passages are able to infect a greater proportion of macrophages; however, differences in cellular parasitism are not observed. There are no changes in the production of cytokines, chemokines and NO by cells infected by different parasites. Data obtained *in vivo* showed that natural regulatory T cells appear to be important for delaying the lesion development. However, their participation seems to be similar in animals infected with both parasites. After a week of infection, there is increased production of the chemokine CCL2 in animals

infected with parasites maintained in culture for few passages. As this chemokine participates in the recruitment of monocytes, it is possible to imagine that the parasites maintained in culture for few passages leads to greater recruitment of these cells to the site of infection. Once differentiated into macrophages, these cells are effectively infected by these parasites. Together, these results show that the enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides play an important role in infection by *L. amazonensis*, and could have direct role in adhesion of the parasite to target cells and subsequent modulation of immune response.

Índice

Dedicatória.....	III
Agradecimentos	IV
Agradecimentos especiais.....	V
Resumo	VI
Abstract.....	VIII
Índice	X
Lista de figuras.....	XII
Lista de tabelas.....	XIV
Lista de siglas.....	XV
1. Introdução	17
1.1 As leishmanioses e a resposta imune ao parasito	18
1.2 Peculiaridades da <i>L. amazonensis</i>	20
1.3 Ecto-nucleotidases como possíveis fatores de virulência.....	23
1.4 Macrófagos: principais células hospedeiras para <i>Leishmania</i>	26
1.5 Células T reguladoras e o controle da resposta imune.....	28
1.6 Quimiocinas e leishmaniose	29
2. Objetivos.....	33
3. Metodologia.....	35
4. Apresentação e discussão dos resultados.....	47
4.1. Parasitos da espécie <i>L. amazonensis</i> apresentam correlação entre virulência in vivo, tempo de manutenção em cultura axênica e atividade ecto-nucleotidásica.....	48
4.2. <i>L. amazonensis</i> mantida em cultura por poucas ou muitas passagens infecta distintamente macrófagos peritoneais, mas não induz alterações na sua produção de quimiocinas e citocinas	56
4.3. Macrófagos derivados de medula óssea infectados por <i>L. amazonensis</i> mantida em cultura por poucas ou muitas passagens requerem etapa de ativação para responderem aos parasitos	61

4.4. A infecção de macrófagos derivados de medula óssea por <i>L. amazonensis</i> mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, embora distinta, não altera sua produção de quimiocinas e citocinas, após ativação por LPS e IFN- γ	64
4.5. Células T reguladoras (T CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺) não são responsáveis pelas diferenças no desenvolvimento de lesões em animais infectados com <i>L. amazonensis</i> mantida em cultura por poucas ou muitas passagens	69
4.6. Animais infectados com <i>L. amazonensis</i> mantida em cultura por poucas ou muitas passagens apresentam diferenças na produção da quimiocina CCL2, após uma semana de infecção	71
5. Sumário dos resultados e considerações finais	75
6. Conclusão.....	78
7. Referências bibliográficas.....	80

Lista de figuras

- Figura 1:** Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura axênica por diferentes períodos de tempo. 48
- Figura 2:** Efeito da manutenção em cultura axênica sobre a atividade de hidrólise de nucleotídeos por formas metacíclicas de *L. amazonensis*..... 49
- Figura 3:** Efeito da manutenção em cultura axênica e da suplementação do meio de cultura com Ado ou Sur sobre a atividade de hidrólise de nucleotídeos por formas totais de *L. amazonensis*. 51
- Figura 4:** Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura axênica por diferentes períodos de tempo, em meio diferencialmente suplementado. 52
- Figura 5:** Produção de IFN- γ e IL-10 por células dos linfonodos drenantes de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura axênica por diferentes períodos de tempo, em meio diferencialmente suplementado. 54
- Figura 6:** Avaliação da infecciosidade de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, frente a macrófagos peritoneais, *in vitro*.....**Erro!**
Indicador não definido.
- Figura 7:** Produção de citocinas por macrófagos peritoneais, infectados por *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens. 59
- Figura 8:** Expressão relativa do mRNA para quimiocinas em pM Φ infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens. 60
- Figura 9:** Avaliação da infecciosidade de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, frente a macrófagos derivados de medula óssea, *in vitro*..... 62
- Figura 10:** Aspecto de macrófagos infectados por *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas passagens, após 72 horas de infecção..... 63
- Figura 11:** Avaliação da infecciosidade de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, frente a macrófagos derivados de medula óssea ativados com LPS e IFN- γ , *in vitro*. 65

Figura 12: Produção de citocinas por macrófagos derivados de medula óssea, infectados por <i>L. amazonensis</i> mantida em cultura por poucas ou muitas passagens e ativados com LPS e IFN- γ	66
Figura 13: Produção de NO por macrófagos derivados de medula óssea, infectados por <i>L. amazonensis</i> mantida em cultura por poucas ou muitas passagens e ativados com LPS e IFN- γ	67
Figura 14: Expressão relativa do mRNA para quimiocinas em BMM Φ infectados com <i>L. amazonensis</i> mantida em cultura por poucas ou muitas passagens e ativados com LPS e IFN- γ	68
Figura 15: Proporção de células T reguladoras em linfonodos de animais infectados com <i>L. amazonensis</i> mantida em cultura por poucas ou muitas passagens.	70
Figura 16: Expressão relativa do mRNA para quimiocinas em tecidos de patas de camundongos infectados com <i>L. amazonensis</i> mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, uma semana pós-infecção.	72

Lista de tabelas

Tabela 1: Seqüência dos iniciadores e condições de amplificação para os genes avaliados por RT-PCR.	45
Tabela 2: Infeciosidade de <i>L. amazonensis</i> mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, frente a pMΦ ou BMMΦ, após 3 horas de co-cultura	61

Lista de siglas

ABTS: ácido 2,2'-bis-azino-(3-etilbenziltiazol-6-sulfônico)

ACR: domínios conservados de apirase

Ado: adenosina

ADP: difosfato de adenosina

AMP: monofosfato de adenosina

APC: alofocianina

ATP: trifosfato de adenosina

BMM ϕ : macrófagos derivados de medula óssea

cAMP: monofosfato de adenosina cíclico

CMI: resposta imune mediada por células

CPB: cisteína peptidase tipo L-catepsina

CTCM: meio de cultura para células e tecidos

DC: célula dendrítica

DEPC: dietilpirocarbonato

DTH: reação de hipersensibilidade tardia

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

ELISA: imunoenensaio enzimático

E-NTPDase: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

FITC: isotiocianato de fluoresceína

HPRT: hipoxantina fosforribosil transferase

IFN: interferon

IL: interleucina

iNOS: óxido nítrico sintase indutível

kDa: quilodálon

LPS: lipopolissacarídeo

mL: mililitro

MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-]-2,5-difeniltetrazólio

M ϕ : macrófago

μ M: micromolar

NK: *natural killer*
NOS: óxido nítrico sintase
NTP: trifosfato de nucleosídeo
PBS: salina tamponada com fosfato
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
PE: ficoeritrina
Phox: fagócito NADPH oxidase
Pi: fosfato inorgânico
pMφ: macrófago peritoneal
RNI: radical intermediário de nitrogênio
ROI: radical intermediário de oxigênio
RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SDS: lauril sulfato de sódio; duodecil sulfato de sódio
SFB: soro fetal bovino
Sur: suramina
TCR: receptor da célula T
TGF: fator de crescimento e transformação
Th3: célula T reguladora indutível produtora de TGF-β
TNF: fator de necrose tumoral
TR: animais resistentes à tolerância oral
Tr1: célula T reguladora indutível produtora de IL-10
Treg: células T reguladoras naturais CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺
TS: animais susceptíveis à tolerância oral

1. Introdução

1.1 As leishmanioses e a resposta imune ao parasito

Casos de leishmanioses têm sido relatados ao longo dos séculos. Descrições clínicas foram feitas no Velho Mundo, enquanto esculturas primitivas evidenciam sua existência no Novo Mundo. Estudos realizados a partir do século XX permitiram conhecer melhor essas doenças. São causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, transmitidos por picadas de insetos existentes nas regiões tropical e temperada do mundo. Atualmente, existem 350 milhões de pessoas sob risco de contrair a doença, em 88 países (WHO, 2008), e o Brasil está entre os países com maior número de casos (Desjeux, 2004).

As leishmanioses podem apresentar diversas manifestações clínicas, dentre as quais destacam-se as formas visceral, potencialmente fatal, a muco-cutânea, a cutânea difusa e a cutânea localizada, relativamente benigna (Desjeux, 2004). De modo geral, o desenvolvimento dessas diferentes formas clínicas depende tanto da espécie do parasito, quanto da imunocompetência do hospedeiro (Alexander e cols., 1999).

Os parasitos são transmitidos por fêmeas hematófagas de flebotomíneos, representados pelos gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Ao realizarem o repasto sanguíneo sobre o hospedeiro vertebrado, os insetos dilaceram os tecidos superficiais da derme, levando à formação de pequenos *pools* hemorrágicos, onde depositam sua saliva, rica em componentes que auxiliarão na sua alimentação, como anti-coagulantes e vasodilatadores. Ao se alimentar sobre um hospedeiro infectado, o inseto pode ingerir células parasitadas, contendo formas amastigotas, que apresentam flagelo intracelular, de *Leishmania*. Uma vez no interior do tubo digestivo do inseto, estas se diferenciam em formas promastigotas, flageladas, e se multiplicam por divisão binária. Com o declínio da concentração de nutrientes disponíveis, os parasitos se diferenciam em formas metacíclicas, infectantes para o hospedeiro vertebrado, e migram para as partes anteriores do aparelho bucal dos insetos. Ao realizar seu próximo repasto sanguíneo, o inseto inocula no hospedeiro não apenas sua saliva, mas também essas formas promastigotas metacíclicas, que são fagocitadas e, uma vez no interior dos macrófagos (MΦ) do hospedeiro, se diferenciam novamente em amastigotas, re-iniciando o ciclo de transmissão (de Almeida e cols., 2003; Liese e cols., 2008; Awasthi e cols., 2004).

De modo geral, a resistência frente às leishmanioses decorre do desenvolvimento da resposta imune mediada por células (CMI), sendo que a resposta humoral, na ausência da CMI, contribui para a susceptibilidade à doença (McMahon-Pratt & Alexander, 2004). No que se diz respeito especificamente à CMI, sabe-se que a resposta tipo 1 leva à resolução da infecção, enquanto sua progressão decorre de mecanismos mais controversos, como o desenvolvimento de resposta tipo 2, a co-existência de respostas tipo 1 e 2 ou a ausência de resposta tipo 1 (Alexander e cols., 1999; Sacks & Noben-Trauth, 2002).

Além dos linfócitos T, vários tipos celulares e moléculas efetoras estão envolvidos na resposta à infecção por *Leishmania* (Liese e cols., 2008). Merecem destaque as citocinas interleucina (IL)-12, fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-10, e o mediador NO.

A citocina IL-12 bioativa, chamada IL-12p70, é formada pelas subunidades IL-12p40 e IL-12p35. A subunidade p40, sintetizada em excesso em relação à subunidade p35, é produzida exclusivamente em células dendríticas (DCs) e M Φ (Zhang & Wang, 2008). É importante para a diferenciação e proliferação de células T CD4⁺ Th1 (Alexander & Bryson, 2005) e para a ativação das células NK, fonte primária de interferon (IFN)- γ (Alexander e cols., 1999). Por sua vez, esta citocina ativa M Φ , resultando na produção de NO e morte dos parasitos (Alexander & Bryson, 2005). Assim, a IL-12 tem grande participação da iniciação de uma resposta celular protetora frente à leishmaniose (Afonso e cols., 1994).

O TNF- α participa do controle da infecção de M Φ humanos por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (Afonso e cols., 2008) e da indução da migração de DCs para o linfonodo drenante da infecção, no modelo murino (Ritter e cols., 2008). Quando M Φ peritoneais (pM Φ) obtidos a partir de camundongos CBA são tratados com TNF, tornam-se capazes de eliminar *L. major* via produção de NO (Liew e cols., 1990).

Nas leishmanioses, a IL-10 é produzida por células T reguladoras, células Th1 e Th2, DCs e M Φ . Promove a supressão da resposta Th1, com a consequente sobrevivência do parasito e geração de memória imune (Couper e cols., 2008), e é capaz de inativar M Φ (Bogdan e cols., 1991). Sua produção em resposta à *Leishmania* parece se correlacionar com a virulência do parasito e com características genéticas do hospedeiro. Há maior produção de IL-10 por células isoladas de linfonodos de animais

infectados com cepa mais virulenta de *L. braziliensis* (Indiani de Oliveira e cols., 2004) e a infecção de MΦ derivados de medula óssea (BMMΦ) com cepa avirulenta de *L. major* não leva à produção desta citocina (Racoosin & Beverley, 1997). Células T de camundongos BALB/c produzem mais IL-10 que células T de C57BL/6, após ativação *in vitro* (Barbi e cols., 2008).

O NO é um gás produzido por células endoteliais, fagócitos e alguns neurônios, a partir da L-arginina. A enzima que catalisa sua síntese é a óxido nítrico sintase (NOS), que pode ser constitutiva ou indutível (iNOS) (Garcia & Stein, 2006). Este mediador desempenha diversas funções homeostáticas e inflamatórias, como a regulação da função, crescimento e morte de muitos tipos celulares e a eliminação de microrganismos intracelulares (Tripathi e cols., 2007). Neste último caso, pode atuar em sinergia com outras moléculas tóxicas. BMMΦ derivados de camundongos C3H, quando ativados com lipopolissacarídeo (LPS) e IFN- γ , eliminam *L. amazonensis* em mecanismo que requer tanto NO, quanto superóxido (Mukbel e cols., 2007).

1.2 Peculiaridades da *L. amazonensis*

A espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* tem importância médica no Novo Mundo. Em humanos, pode causar as formas cutâneas localizada e difusa da leishmaniose (McMahon-Pratt & Alexander, 2004), o que significa que os parasitos podem se disseminar pelo organismo do hospedeiro (Felizardo e cols., 2007). Dados recentes indicam que podem até mesmo se visceralizar, pois foram isolados de cães, que apresentavam quadro clínico característico de leishmaniose visceral, (Tolezano e cols., 2007).

Grande parte dos estudos sobre a interação do parasito com o hospedeiro foi realizada no modelo murino, que, a despeito de sua ampla utilização, apresenta diferenças marcantes em relação à doença observada em humanos (de Almeida e cols., 2003). A maioria das linhagens de camundongos é susceptível à infecção por *L. amazonensis*. A linhagem BALB/c é muito susceptível, enquanto C3H, C57BL/6, DBA e CBA são consideradas menos susceptíveis, pois apresentam desenvolvimento de lesão mais lento (Pereira & Alves, 2008).

Diferentes mecanismos geram esta susceptibilidade. Em camundongos BALB/c, esta parece ser dependente da produção de IL-4. Quando DCs de BALB/c são infectadas com formas amastigotas de *L. amazonensis*, passam a secretar IL-4 e estimular a diferenciação de células T auxiliares preferencialmente para o subtipo Th2 (Qi e cols., 2001). Embora esta tendência seja observada *in vitro*, durante o curso da infecção *in vivo*, as populações de células Th1 e Th2 expandem-se de modo equilibrado (Ji e cols., 2002). Em C57BL/10, a ausência de resposta Th1 é mais significativa para a progressão da doença que a presença de resposta Th2, uma vez que a neutralização da citocina IL-4, obtida pelo tratamento com anticorpos monoclonais anti-IL-4, não levou à resolução da lesão nesses animais (Afonso & Scott, 1993).

Animais C57BL/6 deficientes em IL-10, quando infectados com *L. amazonensis*, apresentam lesões crônicas, com parasitismo detectável e infiltrado inflamatório com composição celular semelhante à de animais selvagens, mas com focos de necrose. Isso indica que a IL-10 participa do controle da lesão tecidual, mas sua ação supressora não é responsável pela progressão da infecção (Jones e cols., 2002). Em camundongos, a susceptibilidade à indução de tolerância oral a um dado antígeno reflete uma imunossupressão periférica. Os animais susceptíveis à tolerância oral (TS) apresentam naturalmente grande produção de citocinas anti-inflamatórias, e aqueles resistentes à tolerância oral (TR) não possuem esta característica. Quando infectados com *L. amazonensis*, animais TS apresentam lesões discretas com crescimento progressivo do parasito, altas concentrações de IL-4 e IL-10, baixa produção de NO e IL-2 e reação de hipersensibilidade tardia (DTH) discreta. Já os animais TR possuem baixo parasitismo tecidual, com perfil inverso de produção de citocinas e NO e reação de DTH pronunciada, mas suas lesões são maiores que as de TS (Tavares e cols., 2006). Tem-se, assim, indícios de que as citocinas pró-inflamatórias, importantes para o controle do parasito, têm papel fundamental no desenvolvimento das lesões, enquanto citocinas anti-inflamatórias auxiliam no seu controle.

Os parasitos da espécie *L. amazonensis* revertem a resposta imune desenvolvida pelos hospedeiros para sua sobrevivência. Amastigotas apresentam maior proliferação em MΦ tratados apenas com IFN- γ , o que significa que esta citocina participa do controle da infecção apenas quando associado a outros fatores de ativação, como LPS (Qi e cols., 2004). As células T reguladoras, importantes para o controle da auto-

imunidade, parecem favorecer a progressão da doença (Ji e cols., 2005). Os parasitos podem inibir a diferenciação completa de DCs, modulando a expressão de moléculas co-estimuladoras em sua superfície (Favali e cols., 2007); entretanto, quando opsonizados com anticorpos produzidos pelo hospedeiro, potencializam a apresentação de antígenos por DCs, com conseqüente ativação de células T CD4⁺ e patologia tecidual (Wanasen e cols., 2008).

Em uma revisão recente, Pereira e cols (2008) descrevem a participação de mediadores da resposta imune na infecção por *L. amazonensis* e destacam diversas células ou moléculas podem apresentar efeitos opostos, em função de diversos fatores, como *background* genético do hospedeiro e citocinas presentes no meio, dentre outros. Assim, os MΦ podem ter ação leishmanicida ou servirem como “abrigo” para os parasitos, em função das citocinas presentes no meio; DCs podem sintetizar IL-4 ou IL-12 em resposta ao parasito, de acordo com a linhagem da qual foram isoladas; células T CD4⁺ Th1, embora sejam importantes para o controle do parasitismo, estão relacionadas com a ulceração da lesão; a citocina IFN-γ é importante para o controle da infecção em estágios avançados da doença, mas pode estimular a proliferação de amastigotas. Destacam, também, que há maior consenso quanto à atuação de alguns participantes da resposta. Os granulócitos podem ter importância no estabelecimento da infecção, atuando como “cavalos de Tróia”, enquanto as células NK são importantes para a ativação inicial de MΦ.

É evidente que a *L. amazonensis* desenvolveu mecanismos sofisticados para subverter a resposta imune dos seus hospedeiros, muitos dos quais não são observados em outras espécies do mesmo gênero. Isto pode ser explicado pelo fato de que os parasitos desenvolveram adaptações distintas para sobreviver no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado, o que se reflete na existência de diversos fatores de virulência, que podem ter maior ou menor importância para uma dada espécie (Alexander & Bryson, 2005). Alguns fatores de virulência são classicamente reconhecidos, como o gp63, uma enzima de superfície capaz de inativar componentes do sistema do complemento, e o LPG, um fosfoglicano encontrado na superfície dos parasitos (McMahon-Pratt & Alexander, 2004). Para o parasito *L. amazonensis*, a enzima cisteína peptidase tipo L-catepsina (CPB) é crítica para a virulência, por inibir o desenvolvimento de respostas Th1 (Alexander e Bryson, 2005).

1.3 Ecto-nucleotidasas como possíveis fatores de virulência

Diversas enzimas estão envolvidas no controle das concentrações extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos. A importância do controle da duração, magnitude e natureza da sinalização purinérgica é evidenciada pela co-existência de vias de síntese, degradação e interconversão de nucleotídeos na superfície celular, onde também existem receptores para trifosfato de adenosina (ATP) e adenosina (Ado) (Bours e cols., 2006).

As ecto-enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares di- ou trifosfatados são reunidas na família das ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDase; EC 3.6.1.5). Juntamente com a ecto-5'-nucleotidase (CD73; EC 3.1.3.5), são importantes para a regulação dos efeitos de nucleotídeos extracelulares sobre as mais diversas células e tecidos (Robson e cols., 2006). Já foram descritas em tanto em organismos procariotas, quanto em eucariotas (Komoszynski & Wojtczak, 1996). Existem em *Trypanosoma cruzi* (Bisaggio e cols., 2003), *Leishmania tropica* (Meyer-Fernandes e cols., 1997) e *Leishmania amazonensis* (Berredo-Pinho e cols., 2001), dentre outros protozoários (Meyer-Fernandes, 2002). Estas enzimas parecem ter importância fundamental para os tripanosomatídeos, que não são capazes de sintetizar nucleotídeos *de novo*, e dependem de uma via de salvação para obtê-los (Cohn & Gottlieb, 1997). Neste caso, a Ado extracelular pode ser transportada para o citoplasma e incorporada em suas vias de salvação de purinas (Dombrowski e cols., 1998).

Oito genes diferentes *ENTPD* codificam essas enzimas. As E-NTPDases 1, 2, 3 e 8 se localizam na membrana celular, com a face catalítica voltada para o meio externo, enquanto as NTPDases 5 e 6 são secretadas. Já as NTPDases 4 e 7 são intracelulares, com seus sítios catalíticos voltados para o lúmen de organelas (Robson e cols., 2006). Todas as enzimas possuem cinco domínios conservados de apirase (ACR), denominados ACR1 a ACR5 (Sansom e cols., 2008). As E-NTPDases são glicosiladas, e suas massas moleculares preditas variam entre aproximadamente 55 e 70-80 kDa, para as estruturas primárias e glicosiladas, respectivamente (Zimmermann, 1999). Seu pH ótimo de atividade varia entre 6,5 e 7,0, de acordo com a fonte da qual são isoladas (Komoszynski & Wojtczak, 1996). Todas as E-NTPDases requerem Ca^{2+} ou Mg^{2+} para

sua atividade máxima, podendo até mesmo ser inativas em sua ausência (Robson e cols., 2006).

As E-NTPDases não hidrolisam pirofosfato inorgânico ou fosfoésteres, o que implica que a parte orgânica do substrato é necessária para atividade catalítica (Komoszynski & Wojtczak, 1996). A taxa de hidrólise de nucleotídeos é bastante variável: enquanto a E-NTPDase 1 hidrolisa ATP e ADP em taxas semelhantes, as E-NTPDases 3 e 8 agem preferencialmente em trifosfatos de nucleosídeos (NTPs); a NTPDase 2 tem extrema preferência por NTPs e, por isso, foi anteriormente classificada como ATPase (Robson e cols., 2006).

O membro prototípico das E-NTPDases é o CD39. Esse marcador é expresso em neutrófilos, linfócitos e monócitos, células endoteliais humanas e em linhagens de plaquetas, monócitos, células NK e megacariócitos (Pulte e cols., 2007; Koziak e cols., 1999). A atividade ecto-ATPásica é rapidamente induzida em células T por estimulação antigênica (Langston e cols., 2003). Como a expressão de CD39 é restrita a células ativadas e a determinados sítios anatômicos, pode-se sugerir que sua atividade enzimática seja importante para respostas imunes (Wang & Guidotti, 1996).

Nucleotídeos extracelulares modulam diversas funções dos tecidos, dentre as quais as respostas inflamatória e imune (Robson e cols., 2006). De modo geral, os nucleotídeos não cruzam as membranas celulares, exercendo seus efeitos via receptores de superfície (Dombrowski e cols., 1998). No ambiente intracelular, os nucleotídeos estão presentes em concentrações em torno de 5 a 10 μM , enquanto, no meio extracelular, sua concentração está na faixa do nanomolar (la Sala, Ferrari, Di e cols., 2003). Logo, quando há danos teciduais, os nucleotídeos que são liberados podem atuar como moléculas de alerta e exercer seus efeitos em grande variedade de tipos celulares (Bours e cols., 2006).

Diversas funções já foram descritas para o ATP extracelular. Ele estimula a liberação de histamina por mastócitos e a degranulação de neutrófilos (Dombrowski e cols., 1998). Em baixas concentrações, é quimiotático para DCs imaturas (la Sala e cols., 2003). Este nucleotídeo inibe a produção das citocinas pró-inflamatórias por DCs maturadas com LPS, sem afetar sua produção de IL-10 e do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra); assim, quando em presença de ATP, DCs têm menor capacidade de promover a polarização da resposta para o tipo 1 (la Sala e cols., 2001). O ATP

extracelular é necessário para a cascata de sinalização que resulta na transcrição de genes de algumas citocinas, como IFN- γ , IL-2 e TNF- α (Langston e cols., 2003). É importante ressaltar que efeitos contraditórios sobre a resposta imune são devidos à diferenças nas dosagens desse nucleotídeo utilizadas em diferentes estudos.

Sob ação das E-NTPDases, o ATP pode ser hidrolisado a difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP), que é o substrato da ecto-5'-nucleotidase. Nesse processo, é gerada Ado (la Sala e cols., 2001). O ADP estimula a agregação plaquetária (Dombrowski e cols., 1998; Zimmermann, 1999). Já a Ado tem efeitos supressivos sobre a inflamação e a resposta imune e é capaz de atuar sobre diversos tipos celulares, num mecanismo de retroalimentação negativa (Bours e cols., 2006). Tem efeito inibitório sobre a exocitose de grânulos de células NK murinas (Williams e cols., 1997). Em M Φ , suprime a produção de NO e superóxido, a síntese de citocinas pró-inflamatórias, a expressão de moléculas de MHC de classe II (Hasko e cols., 2002) e a produção de TNF- α (Kreckler e cols., 2006). A Ado tem baixa capacidade de induzir a maturação de DCs, mas altera seu perfil de produção de quimiocinas, favorecendo a produção de CCL17 e inibindo a de CXCL10 (Panther e cols., 2003); em DCs plasmacitóides maduras, inibe a produção de IL-6, IFN- α , IL-12p40 e IL-12p70 (Schnurr e cols., 2004). A Ado participa do controle a migração de linfócitos para o interior dos linfonodos, uma vez que em animais deficientes para a ecto-5'-nucleotidase CD73 ocorre maior migração de células para esses órgãos em resposta a estímulos inflamatórios (Takedachi e cols., 2008).

O efeito final da ação seqüencial das enzimas E-NTPDases e ecto-5'-nucleotidase é de supressão da resposta imune. Esta cascata enzimática pode ser mimetizada por NTPDases de patógenos (Sansom e cols., 2008), que, neste processo, utilizariam suas enzimas envolvidas no metabolismo extracelular de nucleotídeos como fatores de virulência.

Dados de nosso laboratório corroboram essa hipótese. Maioli e cols (2004), trabalhando com as espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, demonstraram *L. amazonensis* tem maior atividade AMPásica que *L. braziliensis*, e que a infecção pela primeira levou a maior parasitismo tecidual e menor produção de IFN- γ e TNF por células de linfonodos dos animais infectados. Essas observações permitiram postular que a degradação de AMP pelo parasito, com conseqüente geração de Ado, pode

suprimir a produção de citocinas inflamatórias, favorecendo o estabelecimento da infecção. Marques-da-Silva e cols (2008), trabalhando com *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*, demonstraram que formas metacíclicas de *L. amazonensis* apresentaram maior atividade de hidrólise de nucleotídeos que as demais, e que a administração de Ado juntamente com parasitos da espécie *L. braziliensis* levou a um aumento transiente da lesão e do parasitismo tecidual. Assim, foi evidenciado que a produção de Ado pelos parasitos nos momentos iniciais de interação com o hospedeiro pode interferir com o curso da infecção.

1.4 Macrófagos: principais células hospedeiras para *Leishmania*

Os MΦs constituem uma família heterogênea de fagócitos profissionais. São amplamente distribuídos, localizando-se em linfonodos, baço, fígado, pulmões, trato gastrointestinal, cavidades serosas e sinoviais, ossos, pele e sistema nervoso central (Antoine e cols., 2004). Dentre suas características, destacam-se a morfologia estrelada, a expressão de diversas enzimas, como esterase não-específica, hidrolases lisossomais e ecto-enzimas, bem como a pronunciada capacidade de fagocitar partículas de modo não-específico ou específico, via receptores para as porções Fc de imunoglobulinas e para componentes do complemento (Hume, 2006). Têm papel central na manutenção da homeostase tecidual, pois atuam na remodelação tecidual fisiológica ou de reparo e internalizam células ou corpos apoptóticos, contribuindo para a eliminação de células senescentes (Fortea e cols., 2007). Atuam também como células apresentadoras de antígenos, produtoras de citocinas e efetoras da imunidade celular (Teixeira e cols., 2006), sendo seus principais mecanismos efetores a produção de radicais intermediários de oxigênio (ROIs) e radicais intermediários de nitrogênio (RNIs), por ação das enzimas óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e fagócito NADPH oxidase (phox), respectivamente (Antoine e cols., 2004).

Mills e cols (2000) observaram que pMΦ derivados de linhagens de camundongos tipo 1 são mais facilmente ativáveis para produção de NO que aqueles derivados de animais tipo 2, e que esses MΦs podem direcionar a resposta inflamatória para pólos opostos. Por isso, propuseram a classificação dos MΦ em M-1 e M-2. Em uma revisão recente, Mosser e cols (2008) propuseram a re-classificaram os MΦ em três

subpopulações: MΦ classicamente ativados, MΦ de reparo e MΦ reguladores. Os MΦ classicamente ativados, conforme definição de North (1978), são as células efetoras da imunidade celular, essenciais para a defesa do hospedeiro; sua ativação necessita ser controlada, para evitar lesões teciduais. Os MΦ de reparo se desenvolvem em resposta à IL-4 durante as respostas inata ou adaptativa e secretam componentes da matriz extracelular. Já os MΦ reguladores podem se desenvolver também durante a imunidade inata ou adaptativa, em resposta a diversos fatores, como prostaglandinas, células apoptóticas, IL-10 e glicocorticóides, e são capazes de produzir IL-10. Cabe ressaltar que os MΦ não sofrem mudanças epigenéticas durante sua diferenciação e parecem reter sua plasticidade em responder a sinais ambientais.

Na superfície dos MΦ, encontram-se as enzimas CD39 e CD73, bem como diversos subtipos de receptores para ATP e Ado. Esses fagócitos podem liberar esses dois mediadores quando ativados, o que significa que são susceptíveis à regulação por ATP ou Ado, de modo autócrino ou parácrino. Exercem efeitos pró-inflamatórios e citotóxicos, quando expostos a ATP, e efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios, quando expostos a Ado (Bours e cols., 2006). Como exemplo desta sinalização, pode-se citar o fato de que IFN- γ induz aumento da expressão de receptores para Ado em MΦ, o que culmina na inibição da expressão de moléculas de MHC de classe II, iNOS e citocinas pró-inflamatórias, num mecanismo de retroalimentação negativa (Xaus e cols., 1999).

Os MΦs têm importância destacada na infecção por *Leishmania*, pois são tanto as células hospedeiras necessárias para o sucesso da infecção, quanto o braço efetor de uma resposta imune eficaz (Mauel, 1990). Os parasitos modificam o metabolismo do hospedeiro, afetando a sobrevivência, a multiplicação e a morte das células infectadas (Dogra e cols., 2007).

Os parasitos são internalizados por fagocitose convencional e direcionados para fagolisossomos, sendo que as formas amastigotas resistem ao pH ácido e às enzimas lisossomais (Bogdan & Rollinghoff, 1999). É interessante destacar que os parasitos do gênero *Leishmania* promovem sua própria fagocitose, pois ativam componentes do sistema do complemento e, assim, se tornam opsonizados com C3bi e C3b e são internalizados via receptores para o complemento da superfície do MΦ (Von Stebut, 2007). A fagocitose mediada por receptores do complemento pode facilitar a infecção

ou promover a morte dos parasitos. Em estudo realizado com *L. chagasi*, a opsonização aumentou a eficiência de infecção de MΦ humanos, mas também a explosão respiratórias pelas células infectadas, evidenciando que, para que seja iniciada uma infecção viável, é necessário um balanço entre esses efeitos positivos e negativos para o parasito (Chang e cols., 2007).

1.5 Células T reguladoras e o controle da resposta imune

O controle de infecções é tão importante para o hospedeiro quanto a ausência de danos colaterais a tecidos próprios, conseqüentes a uma resposta imune exuberante (Wohlfert & Belkaid, 2008). Essa resposta eficaz e, ao mesmo tempo, controlada só é possível devido à participação das células T reguladoras no processo inflamatório. Elas podem ter efeitos paradoxais: auxiliam no controle da patologia decorrente da infecção, mas podem promover uma supressão excessiva da resposta imune; ajudam na manutenção da resposta protetora e na supressão de respostas alérgicas ou auto-imunes, mas podem levar à reativação de doenças ou propiciar o crescimento de tumores (Belkaid, 2007).

As células T reguladoras são classificadas como naturais ou indutíveis. As células T reguladoras naturais (Treg) possuem fenótipo $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ e, classicamente, desenvolvem-se no timo e migram para tecidos periféricos. Já as células T reguladoras indutíveis são subdivididas nas populações Tr1, produtoras de IL-10, e Th3, que têm produção característica de fator de crescimento e transformação (TGF)- β . Elas se desenvolvem na periferia, após entrarem em contato com antígenos. Em um tecido infeccionado, a regulação decorre da ação coordenada de várias populações de células T reguladoras (Mills, 2004).

O fator de transcrição Foxp3 é considerado um marcador fidedigno para as células Treg. Em camundongos, é expresso em células T $CD4^+CD25^+$ reguladoras, e sua indução em células T $CD4^+CD25^-$ confere a elas função supressora (Fontenot e cols., 2003). Em humanos, o gene *FOXP3* é crucial para o desenvolvimento e funcionamento das células T $CD4^+CD25^+$ reguladoras (Yagi e cols., 2004).

Evidências experimentais ressaltam características e ações destas células. As células T $CD4^+CD25^+$ purificadas não proliferam em resposta a IL-2 ou à estimulação

do TCR e suprimem a proliferação de células T CD4⁺CD25⁻ *in vitro*, em mecanismo dependente de contato (Thornton & Shevach, 1998). Células Treg promovem a ativação alternativa de MΦ, sem que a síntese de citocinas seja necessária (Tiemessen e cols., 2007). Há evidências de que o monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) é importante o efeito de supressão, pois, em ensaios *in vitro*, é transferido entre as células Treg e T convencional, via junções comunicantes (Bopp e cols., 2007).

Em leishmaniose, sabe-se que, quando camundongos C57BL/6 são infectados por *L. major*, alguns parasitos persistem após resolução da lesão, em mecanismo importante para a manutenção da imunidade frente à re-infecção, que é controlado por células Treg (Belkaid e cols., 2002). Após cura da lesão primária, em um modelo de re-infecção de camundongos C57BL/6 com *L. major*, o segundo desafio levou à re-ativação da lesão no sítio da infecção primária, com aumento da lesão e do parasitismo tecidual, bem como maior expressão local de células Treg (Mendez e cols., 2004). A maioria das células Treg existentes nos linfonodos drenantes de camundongos infectados por *L. major* eram específicas para o parasito e, na sua ausência, morriam rapidamente por apoptose (Suffia e cols., 2006). Assim, ao controlar a resposta imune excessiva, células Treg podem favorecer a sobrevivência dos patógenos, além de serem passíveis de manipulação pelos mesmos (Belkaid e cols., 2006).

Alguns estudos demonstram uma relação entre ecto-enzimas envolvidas no metabolismo de NTPs e células Treg. Foi demonstrado que o fator de transcrição Foxp3 é responsável pela expressão de CD39 em células de camundongos, mas somente quando há ativação do receptor da célula T (TCR) essa enzima se torna ativa (Borsellino e cols., 2007). Em outro trabalho, demonstrou-se que a co-expressão de CD39 e CD73 permite diferenciar as células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dos outros subgrupos de células T. A ação seqüencial dessas enzimas gera Ado, que pode atuar em receptores existentes em células T efectoras, regulando a resposta imune (Deaglio e cols., 2007).

1.6 Quimiocinas e leishmaniose

O termo quimiocinas surgiu como uma contração da expressão citocinas quimiotáticas (Baggiolini, 2001), a fim de nomear pequenas citocinas com propriedades quimiotáticas seletivas (Viola & Luster, 2008). São moléculas estruturalmente

relacionadas, na maioria das vezes de natureza básica, com peso molecular de aproximadamente 8 a 14 kDa (Zlotnik & Yoshie, 2000). Sua estrutura primária apresenta de 70 a 130 aminoácidos, com quatro resíduos de cisteína conservados na porção amino-terminal. Por serem secretadas, são sintetizadas com um pequeno peptídeo sinal, que contém de 20 a 25 aminoácidos (Baggiolini, 2001).

As quimiocinas foram agrupadas em duas famílias, com base em suas estruturas primária, independentemente de suas funções (Rot & von Andrian, 2004). Essa divisão se deu com base na posição dos dois primeiros resíduos de cisteína a partir da porção N-terminal. Quando estes resíduos são adjacentes, definiu-se a família CC; quando há algum aminoácido entre esses resíduos, tem-se a família CXC. Essa classificação apresenta algumas exceções. As duas variantes estruturais já descritas se referem à ausência de dois resíduos de cisteína, família XC, ou à existência de três aminoácidos entre os resíduos de cisteína, família CX3C (Zlotnik & Yoshie, 2000). É interessante destacar que esses resíduos de cisteína formam duas ligações dissulfeto, conferindo às quimiocinas sua estrutura tridimensional característica (Baggiolini, 2001).

Essas proteínas são secretadas constitutiva e indutivamente, e seus efeitos são parácrinos ou autócrinos (Baggiolini, 2001). Dentre as fontes de quimiocinas, podem-se citar monócitos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, eosinófilos, mastócitos, linfócitos T, células NK, DCs, queratinócitos, células epiteliais, hepatócitos, fibroblastos, células musculares lisas e células endoteliais (Strieter e cols., 1996; Steigerwald & Moll, 2005).

As quimiocinas ligam-se a receptores acoplados à proteína-G, com sete domínios transmembrana (Viola & Luster, 2008; Rot & von Andrian, 2004). Esta ligação é bastante promíscua, pois muitos receptores reconhecem a mais de uma quimiocina, e várias quimiocinas ligam-se a mais de um receptor (Baggiolini, 2001). A nomenclatura desses receptores se faz pela junção dos acrônimos CC, CXC, XC ou CX3C com a letra “R”, seguido do número do gene da quimiocina, definido cronologicamente (Zlotnik & Yoshie, 2000). A afinidade das quimiocinas pelos receptores é bastante variável, sendo que estas podem atuar, para um dado receptor, como agonista ou antagonista (Rot & von Andrian, 2004).

A função clássica das quimiocinas é o controle do tráfego de leucócitos, sendo seus principais alvos celulares os neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos (Viola & Luster, 2008; Rot & von Andrian, 2004; Moser e cols., 2004; Brenier-Pinchart e

cols., 2001; Zlotnik & Yoshie, 2000). Entretanto, sabe-se que as quimiocinas exercem diversas outras funções. Assim, atuam no desenvolvimento e funcionamento do sistema imune, mantendo sua homeostasia (Moser & Loetscher, 2001; Zlotnik & Yoshie, 2000), bem como auxiliam na manutenção da arquitetura dos órgãos linfóides secundários (Rot & von Andrian, 2004). Participam da ativação de leucócitos, dos processos de angiogênese e hematopoese, e do desenvolvimento de respostas a doenças inflamatórias e infecções microbianas (Brenier-Pinchart e cols., 2001). Regulam a recirculação, localização e sobrevivência de timócitos e linfócitos T e B maduros, e contribuem para a renovação dos tecidos linfóides (Sallusto & Baggiolini, 2008).

Na leishmaniose, as quimiocinas participam do recrutamento e ativação de leucócitos e de seus mecanismos leishmanicidas (Teixeira e cols., 2006). Em geral, a magnitude da sua produção é maior em infecções por parasitos avirulentos que naquelas por virulentos (Brenier-Pinchart e cols., 2001). Algumas quimiocinas parecem ter envolvimento direto na resposta à infecção por *Leishmania*. Dentre estas, merecem destaque a CCL2 e a CXCL10.

A CCL2 é produzida por fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas, monócitos e células T, entre outros tipos celulares, em resposta a estímulos como TNF- α , IFN- γ , fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fatores relacionados ao estresse (Melgarejo e cols., 2008). A ligação CCL2-CCR2 participa tanto da resposta inata, quanto da resposta adaptativa à infecção, cooperando na definição do balanço entre Th1 e Th2, embora sua ação precisa ainda seja controversa (Teixeira e cols., 2006). Participa do recrutamento de M Φ e linfócitos T para o sítio da infecção por *Leishmania* (Brenier-Pinchart e cols., 2001).

A quimiocina CXCL10 é quimiotática para células NK, sendo também importante para sua ativação (Farber, 1997). Camundongos CXCL10^{-/-} apresentam deficiências na proliferação de células T e na produção de IFN- γ em resposta à estimulação antigênica, bem como na migração de células T CD4⁺ e CD8⁺ para sítios de infecção (Dufour e cols., 2002). Há aumento na expressão de CXCL10 no sítio da infecção e em linfonodos de camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* (Muller e cols., 2001) e também por DCs derivadas de camundongos resistentes a *L. major* infectadas com este parasito (Steigerwald & Moll, 2005). É interessante destacar que o

tratamento com Ado é capaz de inibir a produção de CXCL10 por DCs maduras (Panther e cols., 2003).

Os parasitos do gênero *Leishmania* podem se beneficiar diretamente da produção de quimiocinas pelo hospedeiro, bem como manipulá-la. Roychoudhury e cols (2006) evidenciaram que esses parasitos são capazes de se ligar, com alta afinidade, a algumas quimiocinas produzidas pelo hospedeiro, como CCL3, CCL4 e CCL5. Essa ligação ativa cascatas de sinalização celular na célula do parasito, em mecanismo mediado por ativação de proteína-G, que, para *L. donovani*, culmina com sua quimiotaxia. Van Zandbergen e cols (2002) demonstraram que os parasitos produzem um fator quimiotático para neutrófilos, estimulam sua síntese de CXCL8 e inibem a de CXCL10. Assim, geram um ambiente rico em neutrófilos, que atuam como células hospedeiras, e impedem a ativação de células NK.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar características da resposta imune inicial desenvolvida frente à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* mantida em cultura axênica por passagens sucessivas.

2.2 Objetivos específicos

- ⊕ Investigar possível correlação entre atividade ecto-nucleotidásica e desenvolvimento de lesão em camundongos C57BL/6.
- ⊕ Modular a expressão, no parasito, de ecto-enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, e analisar seu impacto sobre virulência *in vivo* e capacidade de hidrólise de nucleotídeos.
- ⊕ Avaliar a produção de citocinas (TNF e IL-10), NO e quimiocinas (CCL2, CCL5 e CXCL10) por MΦ infectados por parasitos que apresentam diferenças na atividade ecto-nucleotidásica, utilizando pMΦ e BMMΦ.
- ⊕ Analisar a participação de células Treg no curso da infecção em animais infectados com parasitos mantidos em cultura por poucas ou muitas passagens.
- ⊕ Determinar, no sítio do inóculo, a produção de quimiocinas (CCL2, CCL5 e CXCL10) após uma semana de infecção, em camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens.

3. Metodologia

3.1 Animais experimentais

Camundongos C57BL/6, com idade média entre cinco e oito semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais receberam água e alimentação *ad libidum*. Nos experimentos *in vivo*, utilizaram-se fêmeas, enquanto, nos experimentos *in vitro*, utilizaram-se tanto machos, quanto fêmeas. Os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Câmara de Experimentação Animal do Comitê de Ética em Pesquisa da UFOP.

3.2 Parasitos

Formas promastigotas de parasitos da cepa IFLA/BR/67/PH8 da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foram cultivados a 25 °C, em meio de Grace (Sigma Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB - LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), L-glutamina 2 mM (GIBCO BRL-Life Technologies, Grand Island, NY, MO, EUA) e penicilina G 100 U/mL (USB Corporation, Cleveland, OH, USA), pH 6,5. Em experimentos específicos, o meio de cultura foi suplementado, ainda, com 5 mM de Ado (Sigma Aldrich Inc) ou 20 µM de suramina (Sur - Sigma Aldrich Inc).

Os parasitos foram submetidos a novos repiques em meio de cultura a cada três dias. Aqueles mantidos em cultura por menos de dez repiques foram chamados “parasitos de poucas passagens”, enquanto os “parasitos de muitas passagens” foram submetidos a mais de cento e vinte repiques em cultura.

3.3 Purificação de formas promastigotas metacíclicas a partir de culturas de *L. amazonensis*

As formas promastigotas metacíclicas foram obtidas através de uma adaptação do protocolo descrito por Späth e Beverley (2001) e modificado por Marques-da-Silva e cols (2008). Padronizações prévias demonstraram que, após quatro dias de cultivo no meio anteriormente descrito, os parasitos atingiam o início da fase estacionária de crescimento, e esse tempo foi padronizado para todos os experimentos.

As culturas foram lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9% para os experimentos de determinação da atividade enzimática, ou com salina tamponada com fosfato (PBS), para os demais experimentos, através de centrifugação a 1540 x g, a 4

°C, por 10 min. Após as etapas de lavagem, os parasitos foram ressuspendidos em DMEM (Sigma Aldrich Inc) ou RPMI (Sigma Aldrich Inc), pH 7,2 e distribuídos em alíquotas de 2 mL. Sob essa suspensão, foram adicionados 2 mL de Ficoll 10% (Sigma Aldrich Inc) e o gradiente assim formado foi submetido a centrifugação a 1070 x g, a 25 °C, por 15 min. O sobrenadante desta centrifugação, rico em formas promastigotas metacíclicas, foi coletado, e os parasitos lavados duas vezes com solução salina fisiológica ou PBS.

3.4 Ensaios de determinação de atividade nucleotídásica

Culturas de *L. amazonensis* de poucas ou muitas passagens foram enriquecidas em formas metacíclicas, conforme descrito anteriormente. Nas etapas de lavagem, utilizou-se solução de NaCl a 0,9%.

A determinação da atividade ecto-nucleotídásica foi feita conforme descrito por Berredo Pinho e cols (2001). A reação foi conduzida em tampão Hepes-Tris 0,05 M, pH 7,2, contendo NaCl 0,01 M, KCl 0,005 M, glicose 0,005 M e MgCl₂ 0,005 M. Como substratos, utilizaram-se ATP, ADP ou AMP, todos adquiridos da Sigma Aldrich Inc, na concentração final de 5 mM. Os parasitos foram incubados neste meio reacional por 1 h, a 30 °C, e a reação foi interrompida pela adição de HCl 0,2 N. Para compensar a auto-hidrólise dos nucleotídeos, foram realizadas reações controle, nas quais o intervalo de incubação a 30 °C foi realizado na ausência dos parasitos. Em seguida, os tubos de reação foram centrifugados, para que fosse feita a determinação da concentração de fosfato inorgânico (Pi) no sobrenadante.

A reação para quantificação de Pi foi feita por método colorimétrico (TAUSSKY & SHORR, 1953). Para tanto, utilizou-se um reagente de cor contendo FeSO₄.7H₂O (VETEC Química Fina, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e molibdato de amônio (VETEC Química Fina), em meio levemente acidificado com H₂SO₄ (VETEC Química Fina). Foi construída uma curva-padrão, a partir da diluição seriada de uma solução de Na₃PO₄, na qual se deu a interpolação dos valores de absorbância encontrados para as amostras. A quantificação fotométrica foi feita a 650 nm, utilizando o leitor Emax Molecular Devices (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

Os resultados obtidos foram, então, corrigidos pelos valores obtidos para as reações de controle de auto-hidrólise, e ajustados para nmol de Pi/10⁸ parasitos/hora.

3.5 Infecção dos animais experimentais

Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 1×10^5 formas promastigotas metacíclicas suspensas em PBS, no coxim plantar da pata traseira. O volume total do inóculo foi 40 μ L/pata.

Em experimentos de curso de infecção, fêmeas de camundongos C57BL/6 foram infectadas na pata traseira esquerda. O desenvolvimento das lesões foi acompanhado semanalmente, utilizando um micrômetro (Starret, Itu, São Paulo, SP, Brasil). Definiu-se lesão como a diferença de espessura entre a pata infectada e a pata controle (Afonso & Scott, 1993).

Para os experimentos de RT-PCR, os animais foram inoculados em ambas as patas traseiras. Após uma semana de infecção, foram eutanasiados por deslocamento cervical, e as patas coletadas para extração de RNA.

3.6 Estimulação de células mononucleares *in vitro* e quantificação de parasitos

Nos experimentos de curso de infecção, após oito semanas de acompanhamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e o linfonodo poplíteo drenante e a pata infectada foram coletados. O linfonodo foi destinado à avaliação da produção de citocinas, e a pata, à quantificação de parasitos.

Os linfonodos foram processados em homogeneizador de vidro, em DMEM suplementado com 1% de SFB inativado, L-glutamina 2 mM, penicilina G 100 U/mL e HEPES 25 mM (USBiological, Swampscott, MA, USA), pH 7,2. As células recuperadas tiveram sua concentração ajustada para 5×10^6 células/mL, em meio de cultura completo para células e tecidos (CTCM), composto por DMEM suplementado com 10% de SFB inativado, L-glutamina 2 mM, penicilina G 100 U/mL 50 μ M de mercaptoetanol (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suíça) e HEPES 25 mM, pH 7,2. Foram distribuídas em placas de 48 poços e estimuladas com 50 μ g/mL de antígeno particulado de *L. amazonensis* (Maioli e cols., 2004). O sobrenadante foi coletado após 72 horas, para dosagem de citocinas.

Para quantificação de parasitos, utilizou-se a técnica da diluição limitante (Afonso & Scott, 1993). Após sacrifício dos animais, as patas foram coletadas e maceradas em processador de vidro, em meio de Grace, pH 6,5. Após centrifugação a 50 x g, a 4 °C, por 1 min, para retirada de *debris* grosseiros, o sobrenadante foi coletado

e submetido a centrifugação, a 1540 x g, a 4 °C, por 10 min, para sedimentação dos parasitos. Estes foram ressuspensos em meio de Grace suplementado com 10% de SFB inativado, L-glutamina 2 mM e penicilina G 100 U/mL, pH 6,5. Essa suspensão de parasitos foi submetida à uma diluição seriada na proporção de 1:10, em placa de 96 poços, que foram incubadas a 25 °C por 15 dias. Após este tempo, as placas foram avaliadas com relação à presença de parasitos. Os resultados foram expressos como logaritmo negativo do título de parasitos, correspondendo à última diluição na qual estes foram observados.

3.7 Obtenção de macrófagos peritoneais (pMΦ)

Obtiveram-se pMΦ conforme descrito por Titus e cols (1984), com poucas modificações. Camundongos C57BL/6 foram inoculados, no peritônio, com solução de tioglicolato 3% (Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil). Após cinco dias, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e a cavidade peritoneal foi lavada com DMEM suplementado com 1% de SFB inativado, L-glutamina 2 mM, penicilina G 100 U/mL e HEPES 25 mM, pH 7,2.

Para os ensaios de infecciosidade, as células assim obtidas tiveram sua concentração ajustada para 1×10^6 células/mL em CTCM e foram distribuídas em placas de cultura. Após incubação por noventa minutos em estufa a 37 °C, 5,0% CO₂, as células não aderentes foram retiradas através de lavagem com PBS.

3.8 Cultura de células L929

Células L929, produtoras de M-CSF, foram cultivadas em CTCM, com concentração inicial de 2×10^5 células/mL. Ao se tornarem confluentes, realizou-se a troca do meio de cultura por meio fresco. Após três dias de cultura, o sobrenadante foi coletado, centrifugado (1540 x g, 4 °C, 10 min) e esterilizado por filtração. Adicionou-se meio fresco às culturas. A coleta de sobrenadante foi realizada três vezes, antes que fosse feito novo repique das células.

3.9 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ)

BMMΦ foram obtidos segundo descrito por Boltz-Nitulescu e cols (1987).

Camundongos C57BL/6 foram eutanasiados por deslocamento cervical. Em seguida, foram retirados assepticamente os fêmures e as tíbias. Os ossos foram mergulhados por dois minutos em álcool 70 °GL e lavados com PBS contendo 5% de SFB inativado.

Em seguida, as epífises foram cortadas e as diáfises ósseas lavadas com PBS/5 % de SFB, para retirada da medula óssea. As células foram ressuspensas em meio de diferenciação, composto por DMEM suplementado com 30% de sobrenadante de cultura de L929, 20% de SFB, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina G, distribuídas em placas de Petri e incubadas a 37 °C, 5% de CO₂. No quarto e no sétimo dia após a retirada da medula óssea, adicionou-se mais meio de diferenciação às placas.

No nono dia de cultura, o sobrenadante foi aspirado e descartado. Em cada placa, adicionou-se solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 20 mM (Synth, Diadema, SP, Brasil), e seguiu-se incubação a 37 °C, 5% de CO₂, por 20 minutos. A liberação dos BMMΦ foi acompanhada através de um microscópio invertido (Telaval 31, Carl Zeiss Inc, Thornwood, NY, USA). Ao fim do período de incubação, adicionou-se SFB às placas, a fim de neutralizar o EDTA. Células eventualmente ainda aderidas foram liberadas utilizando *cell scraper*, e a suspensão celular assim obtida foi transferida para tubos de fundo cônico. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, e tiveram sua concentração ajustada para 1×10^6 células/mL, em meio CTCM. Por fim, as células foram distribuídas em placas de poliestireno.

Ao fim do processo de diferenciação, obteve-se, em média, 28 - 30% de BMMΦ, em relação ao número inicial de células isoladas da medula óssea dos animais.

3.10 Infecção *in vitro* de macrófagos (MΦ)

Os experimentos de infecção de MΦ *in vitro* foram realizados tanto com pMΦ, quanto com BMMΦ.

Formas metacíclicas dos parasitos foram isoladas, conforme já descrito. Esses parasitos tiveram sua concentração ajustada, em CTCM, para 5×10^6 formas metacíclicas/mL, para os experimentos com pMΦ, ou para 2×10^6 formas metacíclicas/mL, para os experimentos com BMMΦ. Em seguida, os parasitos foram adicionados à cultura de MΦ, nas proporções de 5 parasitos:pMΦ e 2 parasitos:BMMΦ, uma vez que estas geraram dados de infecciosidade comparáveis nesses dois modelos

experimentais. Após 3 h de co-cultura, as células foram lavadas com PBS, a fim de eliminar parasitos não internalizados.

Nos experimentos realizados com pMΦ, após a etapa de lavagem, adicionou-se meio CTCM às culturas, que foram novamente incubadas a 37 °C, 5% de CO₂. Como controle, foram feitas culturas de pMΦ não infectados.

Já naqueles experimentos realizados com BMMΦ, foi necessária a realização de uma etapa de ativação, para que as células pudessem responder aos parasitos. Para tanto, após a lavagem, as células receberam meio CTCM suplementado com 100 pg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) obtido de *E. coli* (Sigma Aldrich Inc) e 10 U/mL de IFN-γ murino recombinante (R&D Systems Inc, Mineapolis, MN, USA). Como controles, foram feitas culturas de BMMΦ não infectados e não ativados, e de BMMΦ não infectados e ativados. Essas células foram novamente incubadas a 33 °C, 5% de CO₂.

Decorridas 24 h de infecção, foi coletado sobrenadante para dosagem de fator de necrose tumoral (TNF), armazenado a -80 °C até o momento da realização do bioensaio. O fim do experimento se deu após 72 h de infecção, com a coleta do sobrenadante das culturas, das lamínulas de vidro, quando existentes, e do material celular, para extração de RNA.

3.11 Avaliação da infecciosidade *in vitro*

Para avaliação da infecciosidade *in vitro*, foi realizada a análise de células aderidas em lamínulas de vidro. Para tanto, acondicionaram-se lamínulas de vidro de 13 mm ou 9,5 mm de diâmetro em placas de 24 ou 48 poços, respectivamente. Sobre essas lamínulas, foram adicionados MΦ, que foram infectados conforme descrito anteriormente.

A coleta de lamínulas se deu após 3 ou 72 h de infecção, a fim de avaliar a fagocitose e a sobrevivência intracelular dos parasitos, respectivamente. Essas lamínulas foram fixadas por 10 min em metanol P.A. (VETEC Química Fina) e coradas, após secas, utilizando o kit Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), conforme instruções do fabricante. Por fim, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro, utilizando Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), e deixadas *overnight* para completa fixação, antes da avaliação microscópica.

A análise foi feita utilizando um microscópio ótico Olympus BX50 (Olympus, Center Valley, PA, USA). Determinou-se o número de células infectadas e não infectadas, bem como o número de parasitos existentes nas células infectadas. Em todas as situações, avaliou-se um número mínimo de 200 MΦ/lamínula. A fim de explicitar o aspecto das células infectadas, foram capturadas imagens das lamínulas utilizando um microscópio Leica DM 5000B (Leica, Wetzlar, Germany).

3.12 Bioensaio para dosagem de TNF

Utilizou-se a metodologia descrita por Lattime e cols (1988). Nesse bioensaio, são utilizadas células WEHI, derivadas de fibrossarcoma, altamente sensíveis ao TNF.

Prepararam-se diluições das amostras e do padrão em meio para WEHI, cuja composição é RPMI suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina G, 1% de piruvato de sódio (GIBCO BRL-Life Technologies) e 1% de solução 100X concentrada de aminoácidos não-essenciais (GIBCO BRL-Life Technologies), com pH final igual a 7,2 (Marques-da-Silva, 2008). Como padrão, foi feita uma diluição seriada 1:4 a partir de uma solução de TNF recombinante murino (R&D Systems Inc), cuja concentração inicial era 2,5 ng/mL. As amostras foram diluídas nas proporções de 1:4 e 1:16. Como controles, foram preparados poços contendo apenas meio de cultura (branco-meio), e outros poços destinados a conter apenas células WEHI (branco-células), conforme descrito abaixo.

As células WEHI foram previamente tratadas com actinomicina D (Sigma Aldrich Inc) 0,75 µg/mL, e sua concentração foi ajustada para 1×10^6 células/mL de suspensão. Após diluição das amostras e do padrão, foi feita a adição de 5×10^4 células/poço, em todos os poços, exceto no branco-meio. Seguiu-se incubação, a 37 °C, 24 h.

Em seguida, adicionou-se em todos os poços uma solução 2,5 mg/mL de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-]-2,5-difeniltetrazólio (MTT - Sigma Aldrich Inc), que, atuando como acceptor de elétrons da cadeia respiratória, permite a detecção das células viáveis, ou seja, aquelas que sobreviveram à ação do TNF. As placas foram incubadas novamente a 37 °C, 4 h. Então, adicionou-se em todos os poços solução de lauril sulfato de sódio (SDS – VETEC Química Fina) a 10% em HCl 0,01 M, e seguiu-se nova incubação a 37

°C, por 18 h. Por fim, foi feita a quantificação fotométrica, a 570 nm, utilizando o leitor Emax Molecular Devices (Molecular Devices).

A interpolação das absorbâncias obtidas para as amostras na curva-padrão foi feita utilizando-se a regressão log-logit. Os resultados foram expressos em pg/mL de TNF.

3.13 Dosagem de óxido nítrico

A metodologia de Greiss, baseada na dosagem de nitrito, foi utilizada para avaliação da produção de NO pelos MΦ (Green e cols., 1990).

As dosagens foram realizadas no sobrenadante de 72 horas de cultura. A curva-padrão foi construída a partir da diluição seriada de uma solução de NaNO₂ 250 µM. O reagente de cor foi preparado a partir de soluções de sulfanilamida 1% de H₃PO₄ 2,5% e diidrocloreto de N-1-(1-naftil)-etilenodiamônio 0,1 % em H₃PO₄ 2,5%, na proporção de 1:1.

Após adição do reagente de cor, as amostras foram incubadas por 10 min, protegidas da luz. Procedeu-se a leitura fotométrica, a 570 nm, no leitor Emax Molecular Devices (Molecular Devices Corporation).

Os resultados foram expressos em µM de nitrito.

3.14 Dosagem de citocinas

A metodologia empregada foi o imunoenensaio enzimático (ELISA).

Para a dosagem de IL-10, utilizou-se o kit comercial para dosagem de IL-10 murino, comercializado pela Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Já para a dosagem das citocinas IFN-γ, IL-4 e IL-12p70, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de cobertura por 18 h, a 4 °C. Após bloqueio com solução de SFB a 5% em PBS, lavaram-se as placas e amostras e padrão foram adicionados. Seguiram-se 2 h de incubação (25 °C), ao fim das quais as placas foram lavadas e o segundo anticorpo adicionado. Após 1 h de incubação a 25 °C, adicionou-se o conjugado e as placas foram, novamente, incubadas por 1 h a 25 °C. Utilizou-se o substrato ácido 2,2'-bis-azino-(3-etilbenziltiazol-6-sulfônico) (ABTS – Sigma Aldrich Inc) e H₂O₂ para formação do produto colorido. A reação foi interrompida pela adição

de SDS 1 %, e a leitura fotométrica foi feita a 405 nm, utilizando o leitor Emax Molecular Devices (Molecular Devices Corporation).

Para a dosagem de IFN- γ , o anticorpo de cobertura e o segundo anticorpo utilizados foram, respectivamente, R46A2 e o IgG de coelho anti-IFN- γ . O conjugado utilizado foi anti-IgG de coelho peroxidase (Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA, USA). Para a dosagem de IL-4, utilizaram-se os anticorpos 11B11 e BVD-6 biotilado para cobertura e detecção, respectivamente. O conjugado utilizado foi estreptoavidina peroxidase. Quanto à dosagem de IL-12p70, o anticorpo de cobertura foi o C17.15, e o segundo anticorpo, C15.6 biotilado. Neste caso, também utilizou-se estreptoavidina peroxidase como conjugado.

3.15 Extração de RNA

A extração de RNA foi feita utilizando-se o kit comercial RNAgents Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras utilizadas foram obtidas a partir de culturas de M Φ ou patas de camundongos. As culturas de M Φ foram lavadas com PBS esterilizado e tratadas com solução desnaturante. A pele das patas foi retirada, permitindo a coleta de fragmentos de tecido, que foram também mergulhadas em solução desnaturante e maceradas com pistilos previamente tratados com NaOH 0,1 M. Em seguida, adicionou-se às amostras acetato de sódio 4 M e fenol:clorofórmio. Seguiu-se homogeneização em vórtex e incubação no gelo, por 15 min, ao fim da qual as amostras foram centrifugadas (10000 x g, 20 min, 4 °C).

Procedeu-se à fase de precipitação do RNA. A fase aquosa foi coletada, tratada com igual volume de isopropanol e incubada a -20 °C/30 min. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (10000 x g, 10 min, 4 °C), lavadas com etanol 75% em água tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC – Sigma Aldrich Inc.) e centrifugadas a 7500 x g, 5 min, 4 °C). Por fim, as amostras foram secas brevemente ao ar, ressuspendidas em água livre de nucleases e incubadas a 56 °C/10 min, para total dissolução do RNA isolado.

A quantificação do RNA foi feita fotometricamente, pela absorbância a 260 nm. A relação entre as absorbâncias a 260 e 280 nm foi utilizada como um indicador da pureza do material obtido.

3.16 RT-PCR

A transcrição reversa foi feita a partir de 0,2 µg de RNA total.

Primeiramente, as amostras foram tratadas com RQ1 DNase (Promega Corporation). A transcrição reversa foi feita utilizando-se a transcriptase reversa ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega Corporation). Ambas as etapas foram feitas conforme instruções do fabricante.

O DNA complementar (cDNA) obtido foi submetido à amplificação por PCR, na qual foi utilizada a Taq DNA Polimerase Phoneutria (Belo Horizonte, MG, Brasil). Os iniciadores e as condições de amplificação utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores e condições de amplificação para os genes avaliados por RT-PCR.

Gene	Iniciadores	Produto	Anelamento	Ciclos
HPRT	5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTT-3' 5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3'	271 bp	58 °C	30
CCL2/ MCP-1	5'-CACTCACCTGCTGCTACTCATTCA-3' 5'-GGATTCACAGAGAGGGAAAAATGG-3'	488 bp	62 °C	30
CCL5/ RANTES	5'-CCACGTCAAGGAGTATTTCTACACC-3' 5'-CTGGTTTCTTGGGTTTGCTGTTG-3'	309 bp	54 °C	26
CXCL10/ IP-10	5'-TGAGCAGAGATGTCTGAATC-3' 5'-TCGCACCTCCACATAGCTTACAG-3'	383 bp	62 °C	32

Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida a 6,0%, e corados com nitrato de prata (Righetti, 2005). A quantificação densitométrica

das bandas obtidas foi feita pelo *software* Quantity One 4.5.2 (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, USA).

3.17 Quantificação de células T reguladoras

Foi utilizado o kit comercial Mouse Regulatory T Cell Staining Kit (eBioscience, San Diego, CA, USA).

Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram inoculadas, em ambas as patas, com 1×10^5 formas metacíclicas de *L. amazonensis*, mantidas em cultura por poucas ou muitas passagens, conforme descrito anteriormente. Após uma ou quatro semanas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os linfonodos poplíteos retirados e processados em homogeneizador de vidro, para liberação das células. As células foram contadas e sua concentração ajustada, conforme instruções do fabricante.

Após titulação prévia dos anticorpos, padronizou-se, para 5×10^5 células, a utilização de 0,0125 µg de anti-CD4 murino, clone RM4-5, marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), 0,03 µg de anti-CD25 murino, clone PC61.5, marcado com alofocianina (APC) e 0,25 µg de anti-Foxp3 murino, clone FJK-16s, marcado com ficoeritrina (PE). Os controles de isotipo IgG2a FITC, IgG1 APC e IgG2a PE foram utilizados nas mesmas quantidades.

Para as leituras, utilizou-se citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Foram lidos 10000 eventos, e as análises foram feitas com o *software* CellQuest Pro (BD Biosciences).

3.18 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por teste *t* de Student ou por ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni, de acordo com as características de cada avaliação.

4. Apresentação e discussão dos resultados

4.1. Parasitos da espécie *L. amazonensis* apresentam correlação entre virulência *in vivo*, tempo de manutenção em cultura axênica e atividade ecto-nucleotidásica

Dados anteriores de nosso laboratório indicavam diferenças marcantes na virulência *in vivo* de parasitos da espécie *L. amazonensis*, quando mantidas por períodos prolongados de tempo em cultura axênica (Assis, 2008). A fim de verificar esta observação, camundongos C57BL/6 foram infectados com formas metacíclicas de parasitos mantido em cultura por diferentes intervalos de tempo. O desenvolvimento da lesão foi acompanhado semanalmente, conforme observado na figura 1.

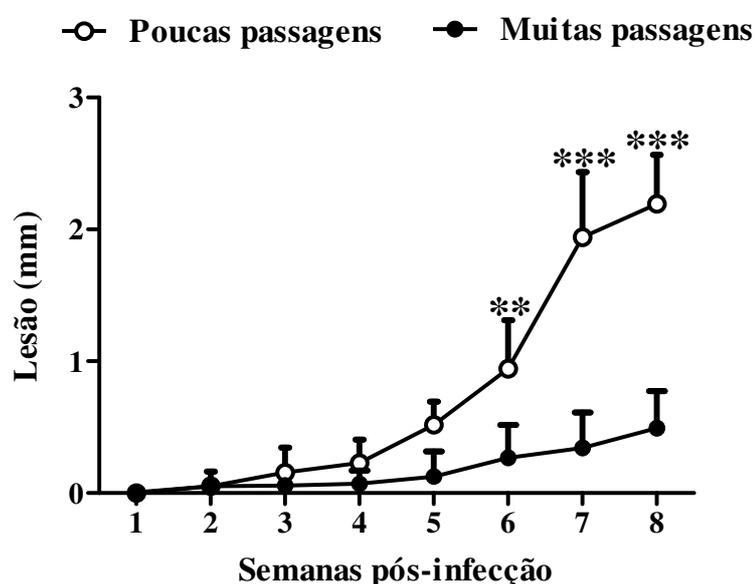


Figura 1: Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura axênica por diferentes períodos de tempo. Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram inoculadas, na pata esquerda traseira, com 1×10^5 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens. O tamanho da lesão foi determinado semanalmente, através da diferença de espessura entre a pata infectada e a pata controle. São apresentados a média e o desvio-padrão de quatro animais por grupo. Os dados foram analisados por Two-way ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni. (**) indica p -valor $< 0,01$ e (***) indica p -valor $< 0,001$.

Esses resultados evidenciam que a manutenção de *L. amazonensis* em cultura por períodos prolongados de tempo altera sua virulência, com diferenças bastante pronunciadas em tempos tardios de infecção. Cabe ressaltar que os parasitos mantidos

em cultura por muitas passagens não perdem completamente sua infecciosidade, uma vez que, embora mais lento e menos pronunciado, há o desenvolvimento progressivo de lesão nos animais infectados.

A perda de virulência dos parasitos decorrente do cultivo axênico prolongado já foi observada em outros estudos. Sabe-se, por exemplo, que a manutenção de *L. major* em cultura leva à perda de sua virulência, possivelmente em decorrência da menor metaciclogênese dos parasitos (Cysne-Finkelstein e cols., 1998; da Silva & Sacks, 1987).

Passou-se, então, à análise do efeito da manutenção da *L. amazonensis* em cultura sobre a atividade hidrolítica de nucleotídeos. O ensaio de atividade ectonucleotidásica foi feito com formas promastigotas metacíclicas dos parasitos mantidos em cultura por poucas ou muitas passagens, e seus resultados estão apresentados na figura 2.

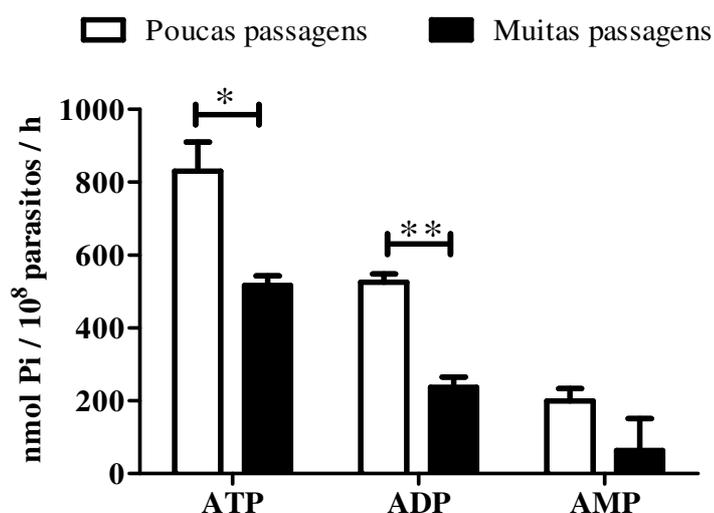


Figura 2: Efeito da manutenção em cultura axênica sobre a atividade de hidrólise de nucleotídeos por formas metacíclicas de *L. amazonensis*. Formas promastigotas metacíclicas dos parasitos mantidos em cultura por poucas ou muitas passagens foram enriquecidas a partir de culturas de quatro dias. Após incubação por 1 hora, a 30 °C, em presença dos substratos, foi feita a quantificação do fosfato inorgânico liberado no meio reacional, por método colorimétrico. Os dados são apresentados como média e desvio-padrão de dois experimentos independentes. Para cada substrato, os resultados foram avaliados por teste *t* de Student. (*) indica *p*-valor < 0,05, e (**) indica *p*-valor < 0,01.

Os parasitos mantidos em cultura por diferentes intervalos de tempo apresentam diferenças na atividade hidrolítica de ATP e ADP. Esses resultados confirmam aqueles obtidos anteriormente em nosso laboratório por Assis (2008).

Em seguida, os parasitos foram cultivados em meio suplementado com diferentes compostos, a fim de modular a atividade das ecto-enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos. Os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens, que apresentam maior atividade enzimática, foram cultivados em meio suplementado com Ado 5 mM. Como este é o produto final da via catabólica, sua presença no meio de cultura tende a reprimir a expressão das enzimas. Em outro conjunto de experimentos, os parasitos mantidos em cultura por muitas passagens foram cultivados com Sur 20 μ M, que é um inibidor de ATPases. Em sua presença, os parasitos tendem a aumentar a expressão das enzimas envolvidas no metabolismo de ATP e conseqüente geração de Ado, fundamental para sua sobrevivência e proliferação. Ambos os protocolos foram adaptados de Berrêdo-Pinho e cols (2001).

Os parasitos foram cultivados nestes meios diferencialmente suplementados por, no mínimo, quatro passagens, a fim de garantir total adaptação. Decorrido este tempo, foram submetidos a um ensaio de atividade ecto-nucleotidásica, para verificar a eficácia dos protocolos de modulação (figura 3).

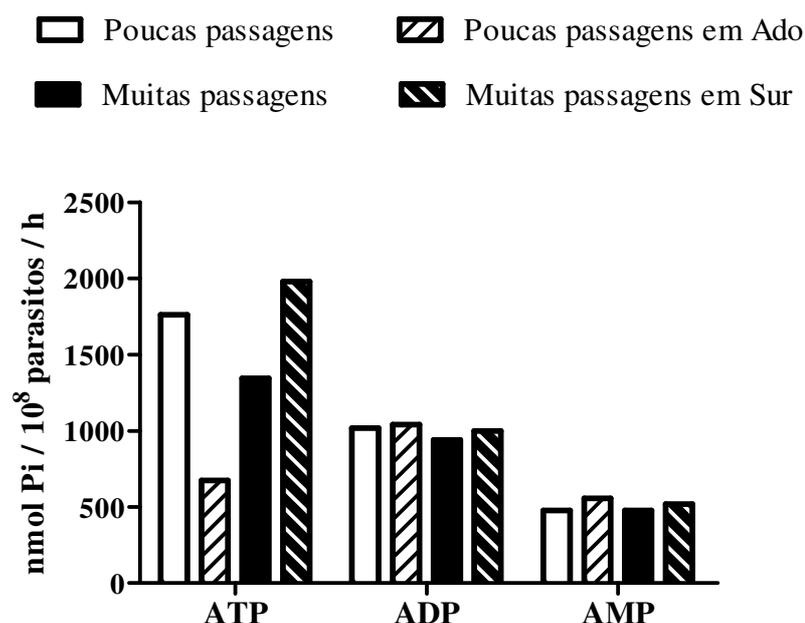


Figura 3: Efeito da manutenção em cultura axênica e da suplementação do meio de cultura com Ado ou Sur sobre a atividade de hidrólise de nucleotídeos por formas totais de *L. amazonensis*. Formas promastigotas totais dos parasitos mantidos em cultura por poucas ou muitas passagens, em meio suplementado com Ado 5 mM ou Sur 20 μ M, respectivamente, foram obtidas a partir de culturas de quatro dias. Após incubação por 1 hora, a 30 °C, em presença dos substratos, foi feita a quantificação do fosfato inorgânico liberado no meio reacional, por método colorimétrico. São apresentados os dados referentes a um experimento.

Pode-se observar que parasitos mantidos em cultura por poucas passagens, quando cultivados em meio suplementado com Ado, apresentam qualitativamente menor capacidade de hidrólise de ATP. Já o cultivo de parasitos mantidos em cultura por muitas passagens em meio suplementado com Sur aumenta qualitativamente a capacidade de hidrólise de ATP pelos parasitos.

O efeito da adição de Ado ao meio de cultura sobre a atividade nucleotidásica de *L. amazonensis* já havia sido anteriormente observado em nosso laboratório (Assis, 2008) e em outros trabalhos. Berredo-Pinho e cols (2001) demonstraram que *L. amazonensis*, quando cultivada em meio suplementado com Ado 5 mM, apresenta menor atividade ecto-ATPásica. Em um experimento de modulação de atividade de ecto-enzimas anteriormente realizado em nosso laboratório, Marques-da-Silva (2008)

cultivou *L. braziliensis* em meio suplementado com molibdato de amônio 5 μ M. Este sal é um inibidor da enzima ecto-5'-nucleotidase. Os parasitos cultivados neste meio apresentaram maior atividade AMPásica, demonstrando, mais uma vez, que a presença de inibidores enzimáticos no meio de cultura pode levar a um aumento da expressão de suas enzimas-alvo. Trabalhando com *Trypanosoma cruzi*, Bisaggio e cols (2003) demonstraram que o tratamento em cultura com Sur é capaz de aumentar sua atividade ecto-ATPásica.

Em seguida, camundongos C57BL/6 foram infectados com estes parasitos modulados e o desenvolvimento da lesão acompanhado semanalmente. Os resultados obtidos estão representados na figura 4.

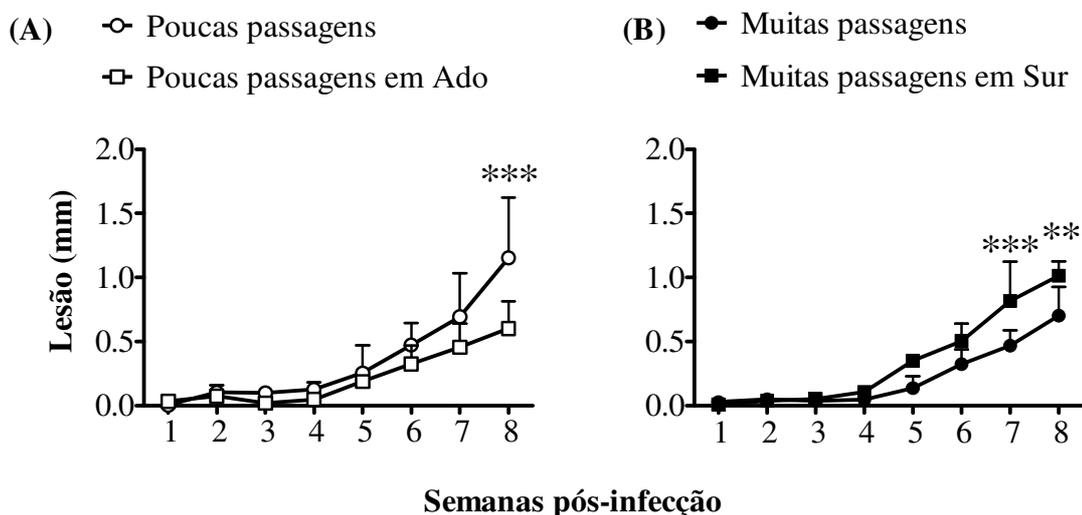


Figura 4: Curva de desenvolvimento de lesão em camundongos infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura axênica por diferentes períodos de tempo, em meio diferencialmente suplementado. Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram infectadas, na pata esquerda traseira, com 1×10^5 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, em meio suplementado, ou não, com Ado 5 mM ou Sur 20 μ M, respectivamente. O tamanho da lesão foi determinado semanalmente, através da diferença de espessura entre a pata infectada e a pata controle. (A) Desenvolvimento de lesão em animais infectados com parasitos mantidos em cultura por poucas passagens, cultivados em meio suplementado ou não com Ado 5 mM. (B) Desenvolvimento de lesão em animais infectados com parasitos mantidos em cultura por muitas passagens, cultivados em meio suplementado ou não com Sur 20 μ M. São apresentados a média e o desvio-padrão de quatro animais por grupo. Os dados foram analisados por Two-way ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni. (**) indica p -valor < 0,01 e (***) indica p -valor < 0,001.

Pode-se observar que os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens, quando cultivados em meio suplementado com Ado, levam ao desenvolvimento de lesões significativamente menores que aquelas causadas por parasitos cultivados no meio de cultura padrão. De modo semelhante, o cultivo dos parasitos mantidos em cultura por muitas passagens em meio suplementado com Sur leva a lesões significativamente maiores que as dos parasitos que não foram cultivados em meio suplementado.

Pinheiro e cols (2006) demonstraram que parasitos cultivados em meio suplementado com Ado apresentaram menor índice de associação a pMΦ, definido como o produto entre a porcentagem de infecção e o número médio de parasitos por célula infectada. Assis (2008) demonstrou que parasitos cultivados em Ado geram lesões menores em camundongos C57BL/6 que aqueles cultivados sem este suplemento. Bisaggio e cols (2003) demonstraram que, quando *T. cruzi* é cultivado em meio contendo Sur, sua capacidade de adesão a MΦ aumenta consideravelmente, de modo correlacionado com o aumento de sua atividade ecto-ATPásica.

As células dos linfonodos poplíteos desses animais infectados com parasitos mantidos em cultura por poucas ou muitas passagens, em meio contendo ou não Ado ou Sur, respectivamente, foram avaliadas quanto à sua capacidade de produção de citocinas após estimulação *in vitro* com antígeno particulado de *L. amazonensis*. Os resultados obtidos podem ser visualizados na figura 5.

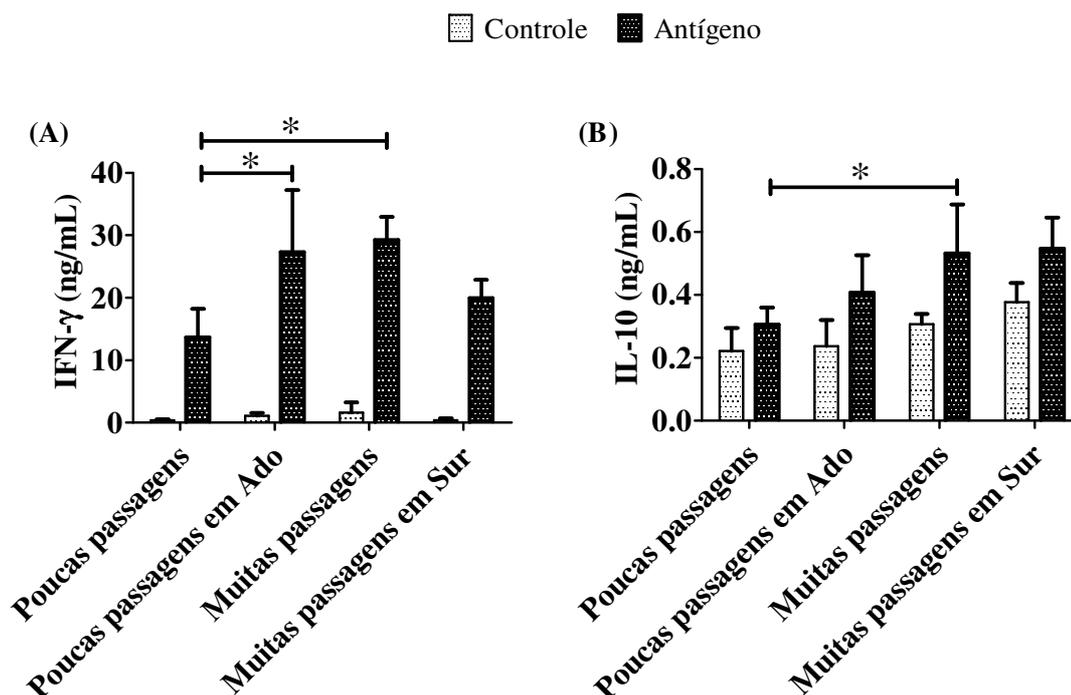


Figura 5: Produção de IFN- γ e IL-10 por células dos linfonodos drenantes de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura axênica por diferentes períodos de tempo, em meio diferencialmente suplementado. Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram infectadas, na pata esquerda traseira, com 1×10^5 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, em meio suplementado, ou não, com Ado 5 mM ou Sur 20 μ M, respectivamente. Após oito semanas de infecção, os animais foram sacrificados e os linfonodos drenantes processados. As células obtidas foram estimuladas *in vitro* com antígeno particulado de *L. amazonensis*, por 72 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. (A) Produção de IFN- γ , quantificada por ELISA. (B) Produção de IL-10, quantificada por ELISA. São apresentados a média e o desvio-padrão de quatro animais por grupo. Para comparação da produção de citocinas observada para os grupos estimulados, os dados foram avaliados por One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. (*) indica p -valor < 0,05.

Frente à estimulação *in vitro*, células de animais infectados com parasitos mantidos em cultura por poucas passagens produziram menor quantidade de IFN- γ que aquelas de animais infectados com parasitos cultivados em meio suplementado com Ado ou mantidos em cultura por muitas passagens. Assim, a produção de IFN- γ foi maior nos grupos onde os parasitos apresentavam menor atividade ATPásica. A única diferença com relação à produção de IL-10 foi observada entre os grupos de animais

infectados com parasitos mantidos em cultura por poucas ou muitas passagens, sendo que este último apresentou maior produção desta citocina.

Em nosso laboratório, experimentos anteriores já haviam demonstrado que *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas passagens leva à menor produção de IFN- γ que aquela mantida em cultura por muitas passagens, e também que a suplementação do meio com Ado leva a um aumento da produção de IFN- γ (Assis, 2008). A maior produção de IL-10 no grupo infectado com parasitos mantidos em cultura por muitas passagens pode ser atribuída à função reguladora desta citocina, uma vez que a maior produção de IFN- γ resultaria em maior dano tecidual.

Por fim, os animais foram avaliados com relação ao parasitismo no sítio da lesão. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (dados não mostrados).

Dados da literatura permitem apontar enzimas envolvidas no metabolismo extracelular de ATP como potenciais fatores de virulência para parasitos do gênero *Leishmania*. Berrêdo-Pinho e cols (2001) descreveram a existência de uma ecto-ATPase dependente de Mg^{2+} na superfície celular de parasitos da espécie *L. amazonensis* e demonstraram que a atividade ATPásica de parasitos virulentos é duas vezes maior que a de parasitos menos virulentos. Coimbra e cols (2002) identificaram, na membrana plasmática de *L. amazonensis*, uma enzima capaz de hidrolisar ATP e ADP.

Sabe-se que a manutenção de parasitos do gênero *Leishmania* em cultura por períodos prolongados pode alterar a expressão de moléculas superficiais. Beetham e cols (2003) demonstraram que, em *L. chagasi*, à medida que são feitas passagens consecutivas dos parasitos em cultura, há menor expressão de GP46 e GP63, de modo correlacionado com sua infecciosidade.

Ji e cols (2003) demonstraram grandes diferenças na resposta imune inicial desenvolvida por camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* ou *L. major*, e postularam que essas diferenças poderiam influenciar a susceptibilidade ou resistência desses camundongos a essas espécies, respectivamente. Por isso, decidiu-se avaliar se os diferentes perfis de progressão da doença causada por parasitos mantidos em cultura por poucas ou muitas passagens decorreriam, também, de diferenças na resposta imune inicial deflagrada contra os mesmos.

4.2. *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens infecta distintamente macrófagos peritoneais, mas não induz alterações na sua produção de quimiocinas e citocinas

Como parasitos do gênero *Leishmania* infectam principalmente os macrófagos do hospedeiro (Behin e cols., 1975; Berman e cols., 1979; Farah e cols., 1975), optou-se, primeiramente, pela avaliação da resposta desenvolvida por macrófagos infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens. Maia e cols (2007) avaliaram a infecciosidade de *L. infantum* frente a MΦ obtidos de cinco fontes distintas e observaram diferenças significativas entre elas, evidenciando que extrapolações e comparações entre estudos devem ser feitas com cautela.

Neste trabalho, utilizaram-se inicialmente macrófagos peritoneais. Essas células foram isoladas de camundongos C57BL/6 e infectadas com parasitos mantidos em cultura por poucas ou muitas passagens. As capacidades de infecção e sobrevivência dos parasitos foram avaliadas em diferentes momentos. Houve uma variação considerável entre as repetições, que pode ser atribuída a diferenças no padrão de ativação dos pMΦ e a alterações dos parasitos. Como o perfil de resposta foi semelhante em todos os experimentos realizados, são apresentados os dados referentes a um experimento representativo (figura 6).

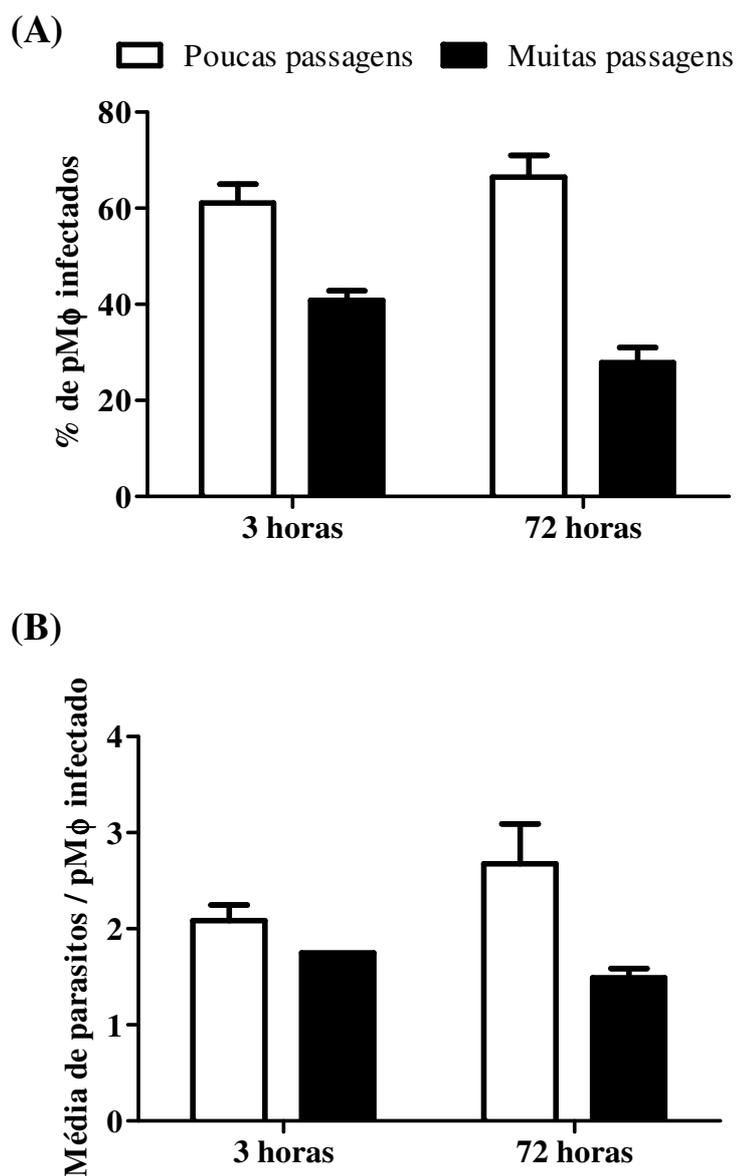


Figura 6: Avaliação da infecciosidade de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, frente a macrófagos peritoneais, *in vitro*. Camundongos C57BL/6 foram inoculados intraperitonealmente com tioglicolato 3% e, após cinco dias, os MΦ recrutados foram coletados e infectados com formas promastigotas metacíclicas de parasitos mantidos em cultura por poucas ou muitas passagens, na proporção de 5 parasitos : pMΦ. Após 3 horas de co-cultura, os parasitos não internalizados foram retirados por lavagem. A avaliação final foi feita após 72 horas de infecção. (A) Porcentagem de pMΦ infectados, após 3 ou 72 horas de co-cultura. (B) Número médio de parasitos por pMΦ infectado, após 3 ou 72 horas de co-cultura. São apresentados a média e o desvio-padrão obtidos para um experimento representativo de duas ou três repetições.

Qualitativamente, pode-se observar que os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens infectam maior porcentagem de pMΦ que aqueles mantidos em cultura por muitas passagens. Tem-se, assim, indícios de que os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens são fagocitados por pMΦ mais facilmente que os mantidos em cultura por muitas passagens. Além disso, pode-se observar que não há reduções pronunciadas no parasitismo após 72 horas em nenhum dos grupos, o que permite supor que ambos os parasitos apresentam resistências semelhantes aos mecanismos leishmanicidas.

Pode-se supor que a menor atividade ecto-nucleotidásica dos parasitos mantidos em cultura por muitas passagens deve-se à redução da expressão das ecto-NTPDases, pois Marques-da-Silva e cols (2008) demonstraram, por *Western blotting*, a existência de uma correlação entre atividade ecto-nucleotidásica e expressão da enzima NTPDase na superfície celular. Berrêdo-Pinho e cols (2001) aventaram a possibilidade de que a enzima ecto-ATPase poderia ser utilizada como uma molécula de adesão para *L. amazonensis*, e essa hipótese foi corroborada por estudo que demonstrou que o cultivo de parasitos da espécie *L. amazonensis* com Ado foi capaz de modular negativamente a expressão da ecto-NTPDase, o que resultou na redução da associação a pMΦ (Pinheiro e cols., 2006). Assim, a menor expressão de ecto-NTPDases em parasitos mantidos em cultura por muitas passagens pode se refletir em uma menor aderência aos pMΦ e, conseqüentemente, em menor infecciosidade.

Em seguida, passou-se à avaliação da resposta desenvolvida pelos pMΦ à *L. amazonensis*. Sabe-se que MΦ produzem diversas citocinas, como IL-1, IL-6, TNF, IFN- α/β , IL-10, TGF- β , IL-12p40 e IL-12p70, e que este é um dos mecanismos pelos quais influenciam e direcionam a resposta imune do hospedeiro (Dale e cols., 2008; Bogdan & Rollinghoff, 1999). A fim de verificar se a infecção por parasitos mantidos em cultura por poucas ou muitas passagens leva à produção diferencial de citocinas, realizou-se a dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-12p70 e da citocina anti-inflamatória IL-10 no sobrenadante das culturas. Os resultados estão representados na figura 7.

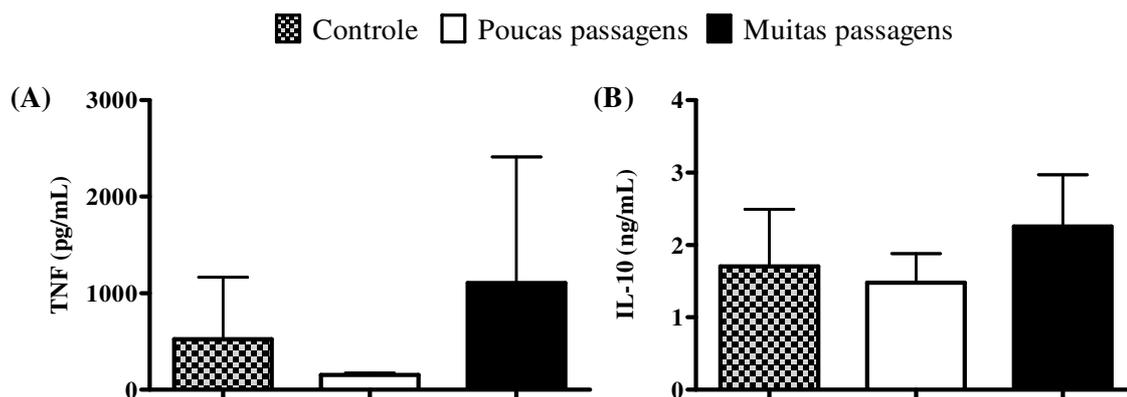


Figura 7: Produção de citocinas por macrófagos peritoneais, infectados por *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram isolados e infectados conforme descrito anteriormente. Alternativamente, foram mantidos não-infectados, como controle. Após 24 ou 72 horas de co-cultura, coletou-se sobrenadante das culturas para dosagem das citocinas. (A) Produção de TNF, avaliada por bioensaio com células WEHI. (B) Produção de IL-10, determinada por ELISA. Os dados representam a média e o desvio-padrão obtidos a partir de três repetições independentes. Os resultados foram analisados por One-way ANOVA, e não foram observadas diferenças significativas.

A infecção de pMΦ por *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens não levou a diferenças na produção de TNF e IL-10. A citocina IL-12p70 não foi detectada em nenhuma das amostras (dados não mostrados), o que está de acordo com o trabalho de Racoosin e cols (1997), que observaram que a infecção de BMMΦ por *L. major* não leva à produção de IL-10 e IL-12.

A produção de NO é bem caracterizada como mecanismo leishmanicida de MΦ (Antoine e cols., 2004; Brandonisio e cols., 2002; Green e cols., 1990). Por isso, o sobrenadante das culturas foi submetido à dosagem de NO, mas este não foi detectado em nenhum dos grupos experimentais (dados não mostrados). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Green e cols (1990), que observaram que a infecção de pMΦ por *L. major* não é capaz de levar à produção de NO na ausência de IFN- γ ou LPS, e com aqueles de Racoosin e cols (1997), que não detectaram a expressão da enzima iNOS em BMMΦ infectados por *L. major*.

Sabe-se que MΦ são capazes de produzir quimiocinas em resposta à infecção por *L. major* (Racoosin & Beverley, 1997). Como na infecção por *Leishmania* esses

mediadores têm participação no controle do parasitismo e no direcionamento da resposta imune do hospedeiro (Brandonisio e cols., 2002; Racoosin & Beverley, 1997; Teixeira e cols., 2006; Vasquez & Soong, 2006; Vester e cols., 1999), passou-se à avaliação da produção de quimiocinas por pMΦ infectados. Para tanto, células infectadas foram submetidas à técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Os resultados obtidos para as quimiocinas foram normalizados em função do gene constitutivo hipoxantina fosforribosil transferase (HPRT) e são apresentados como indução no grupo infectado com parasitos de muitas passagens em relação ao grupo infectado com parasitos de poucas passagens (figura 8).

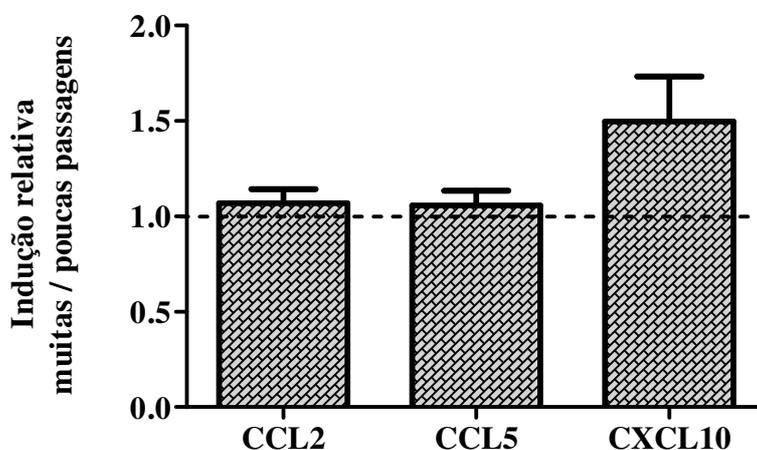


Figura 8: Expressão relativa do mRNA para quimiocinas em pMΦ infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens. pMΦ foram isolados de camundongos C57BL/6 e infectados conforme descrito anteriormente. Após 72 horas de cultura, as células foram coletadas e submetidas à extração de RNA, para realização de RT-PCR. Os resultados obtidos para cada amostra foram normalizados em função do gene constitutivo HPRT. Os diferentes grupos de infecção foram relacionados a grupo controle não-infectado; posteriormente, foram relacionados entre si, gerando os dados de indução relativa no grupo infectado com parasitos de muitas passagens em relação ao grupo infectado com parasitos de poucas passagens. Os dados apresentados referem-se à média e o desvio-padrão de três repetições independentes. Foram analisados por teste *t* de Student para uma amostra, mas não foram observadas diferenças significativas.

Os resultados obtidos evidenciam que, em pMΦ, a infecção por *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens não leva à indução diferencial das quimiocinas CCL2, CCL5 e CXCL10.

4.3. Macrófagos derivados de medula óssea infectados por *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens requerem etapa de ativação para responderem aos parasitos

Diversos estudos com *Leishmania* têm sido realizados em BMM Φ , uma população celular mais pura e homogênea em relação ao lavado peritoneal, que apresenta grande variedade de tipos celulares previamente ativadas *in vivo* (Maia e cols., 2007; Cunnick e cols., 2006; Cunnick e cols., 2006).

Experimentos preliminares revelaram que a proporção de parasitos anteriormente utilizada (5 metacíclicos/pM Φ) gerou, em BMM Φ , infecções exuberantes já após as primeiras 3 horas de co-cultura, com praticamente todos os macrófagos parasitados. Dados da literatura indicam que BMM Φ são mais permissivos à infecção por *L. infantum* que pM Φ (Maia e cols., 2007). A fim de evitar condições tão extremas, utilizou-se nos experimentos com BMM Φ a proporção de 2 metacíclicos/BMM Φ , que gerou infecções semelhantes às anteriormente obtidas para pM Φ , após 3 horas de infecção (tabela 2).

Tabela 2: Infeciosidade de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, frente a pM Φ ou BMM Φ , após 3 horas de co-cultura

Parasito	Proporção de metacíclicas : M Φ	Origem do M Φ	Infecção (%)
Poucas passagens	5 : 1	pM Φ	52,68 \pm 11,94
	2 : 1	BMM Φ	41,30 \pm 13,75
Muitas passagens	5 : 1	pM Φ	34,63 \pm 8,789
	2 : 1	BMM Φ	26,67 \pm 11,54

Em seguida, foram realizados experimentos a fim de verificar a infeciosidade e o parasitismo de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens em BMM Φ . As avaliações foram feitas após 3 ou 72 horas de co-cultura. Os resultados obtidos para a avaliação após 3 horas podem ser observados na figura 9.

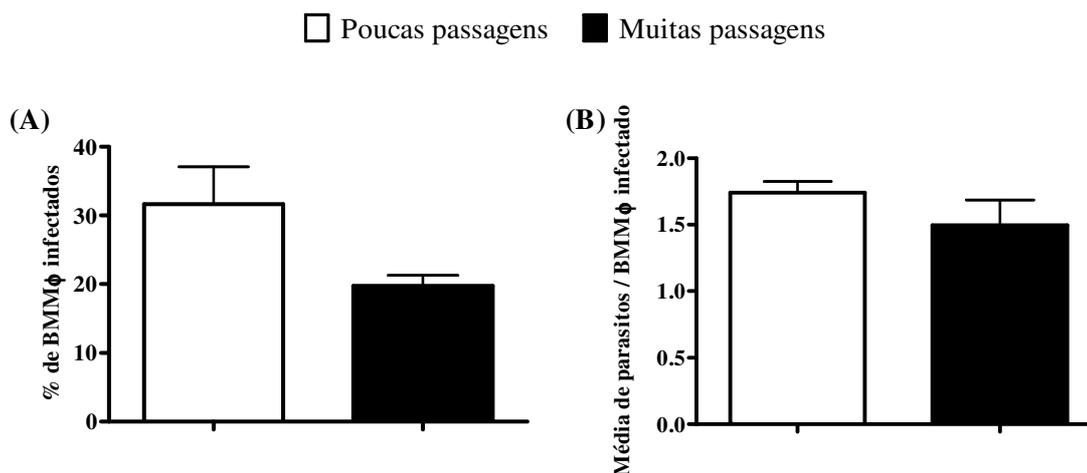


Figura 9: Avaliação da infecciosidade de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, frente a macrófagos derivados de medula óssea, *in vitro*. Células de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram diferenciadas em macrófagos, após nove dias de cultura em meio enriquecido com sobrenadante de cultura de células L929. Os BMMΦ obtidos foram transferidos para placas de cultura de 24 poços e, após incubação por 16 horas, foram infectados com formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, na proporção de 2 parasitos : BMMΦ. Após 3 horas de co-cultura, foram coletadas lamínulas para avaliação da infecciosidade e do parasitismo (A) Porcentagem de BMMΦ infectados, após 3 horas de co-cultura. (B) Número médio de parasitos por BMMΦ infectado, após 3 horas de co-cultura. São apresentados a média e o desvio-padrão obtidos para um experimento representativo de duas repetições.

Pode-se observar que os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens são capazes de infectar, qualitativamente, maior porcentagem de BMMΦ que aqueles mantidos em cultura por muitas passagens, e que diferenças no parasitismo são bem mais sutis. Entretanto, a avaliação após 72 horas de infecção revelou que BMMΦ são incapazes de controlar a infecção. Conforme pode ser observado na figura 10, lamínulas referentes a BMMΦ não ativados apresentam poucas células aderidas, em sua maioria densamente parasitadas. Isso permite supor que houve proliferação excessiva dos parasitos, com rompimento dos macrófagos parasitados e infecção de outras células (Trager, 1974).

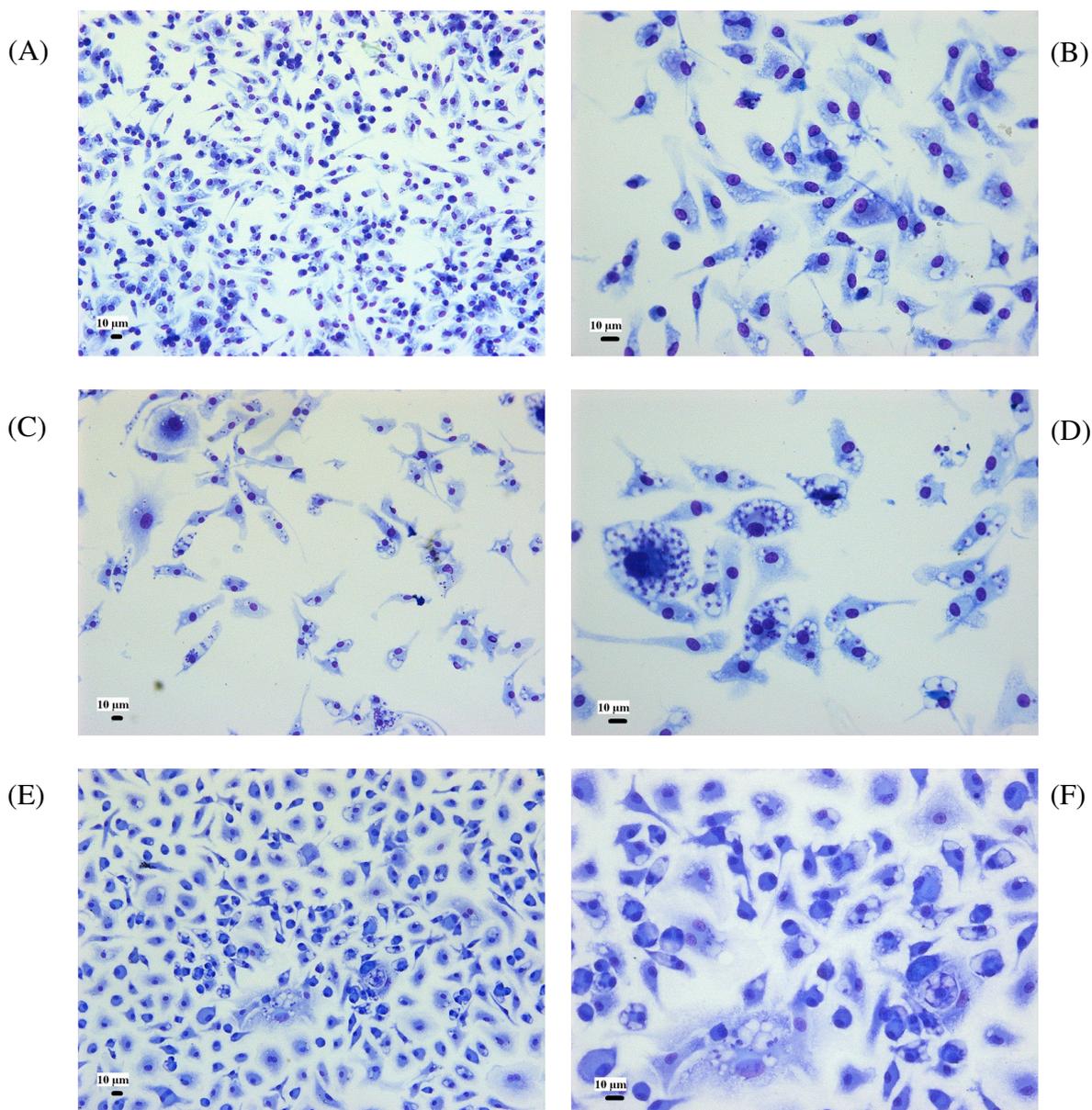


Figura 10: Aspecto de macrófagos infectados por *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas passagens, após 72 horas de infecção. Macrófagos foram infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas passagens, conforme anteriormente descrito. Após 72 horas de co-cultura, capturaram-se imagens das lamínulas coletadas, a fim de ilustrar o parasitismo celular. **(A e B)** pMΦ infectados com *L. amazonensis*; (A) aumento de 20x; (B) aumento de 40x. **(C e D)** BMMΦ infectados com *L. amazonensis*; (C) aumento de 20x; (D) aumento de 40x. **(E e F)** BMMΦ infectados com *L. amazonensis* e ativados por LPS e IFN- γ , após 3 horas de infecção, conforme descrição seguinte; (E) aumento de 20x; (F) aumento de 40x. As barras representam 10 μ m.

A grande proliferação de parasitos impediu sua quantificação por microscopia ótica, e a realização de RT-PCR a partir dessas células gerou bandas extremamente delgadas. Optou-se, então, pela ativação dos BMM Φ infectados.

Para que sejam ativados, os BMM Φ requerem a ação conjunta das citocinas IFN- γ e TNF. A produção de TNF é deflagrada experimentalmente pela utilização de um ligante de receptor tipo Toll (TLR), como o LPS bacteriano (Mosser & Edwards, 2008). Parasitos das espécies *L. major* e *L. mexicana* suprimem a expressão celular das cadeias α e β do receptor de IFN- γ (IFN- γ R α e IFN- γ R β) e alteram as vias de sinalização celular decorrentes de sua ativação, diminuindo a responsividade ao IFN- γ (Bhardwaj, Rosas, Lafuse e cols., 2005). Considerando essas informações, optou-se pela ativação dos BMM Φ pela utilização simultânea de IFN- γ e LPS, o que é condizente com outros estudos (Roach e cols., 1991; Balestieri e cols., 2002; Brodie e cols., 2007).

Por meio de testes preliminares, padronizou-se a utilização de 100 pg/mL de LPS associados a 10 U/mL de IFN- γ para ativação dos BMM Φ . Em todos os experimentos, esses mediadores foram adicionados às células após a remoção dos parasitos não internalizados, ou seja, após 3 horas de co-cultura.

Após infectados e ativados, os BMM Φ apresentaram alterações morfológicas em relação às células não ativadas (**figuras 10E e 10F**), apresentando-se mais arredondados e com citoplasma mais abundante, o que está de acordo com a descrição de Cunnick e cols (2006). Também é possível observar que os vacúolos parasitóforos são grandes. Segundo trabalhos anteriores, a maior parte das espécies de *Leishmania* se abriga em vacúolos pequenos, contendo apenas um ou dois parasitos, mas isto não ocorre para parasitos do Complexo Mexicana (Antoine e cols., 2004; Real e cols., 2008).

4.4. A infecção de macrófagos derivados de medula óssea por *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, embora distinta, não altera sua produção de quimiocinas e citocinas, após ativação por LPS e IFN- γ

Considerando o novo delineamento experimental, foram realizados estudos de infecciosidade, após 3 ou 72 horas de infecção. Em função da grande variabilidade entre experimentos, são apresentados os resultados de um experimento representativo (figura 11).

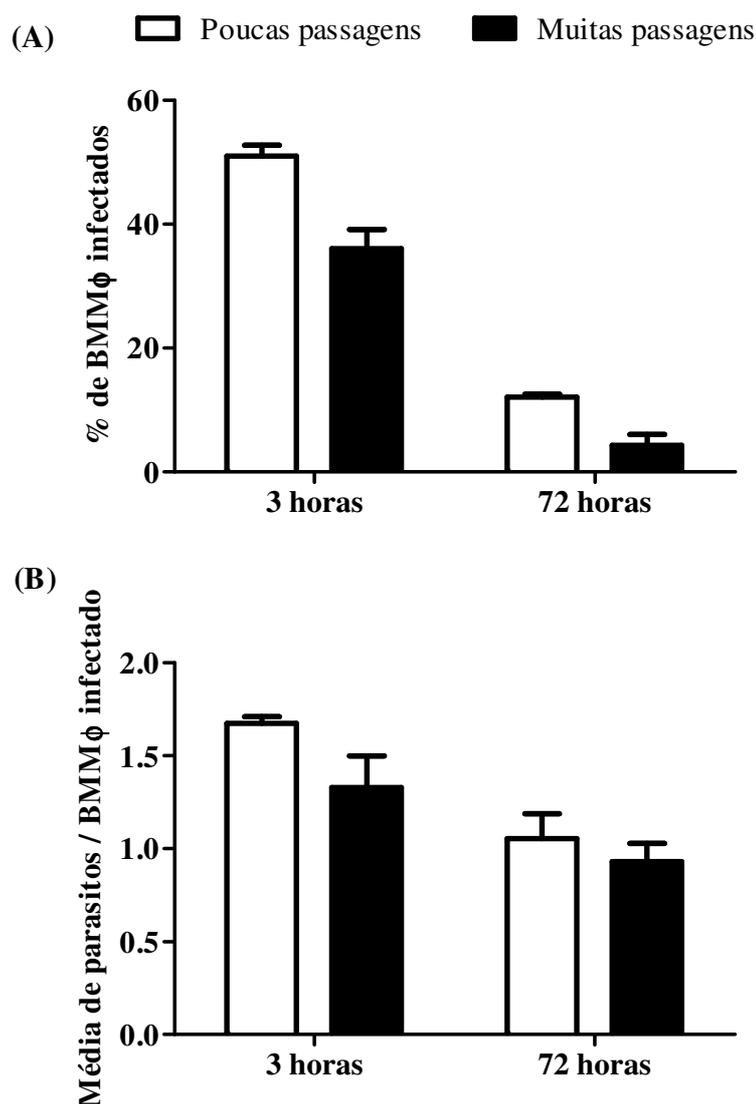


Figura 11: Avaliação da infecciosidade de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, frente a macrófagos derivados de medula óssea ativados com LPS e IFN- γ , *in vitro*. Células de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram diferenciadas em macrófagos, após cultura em meio enriquecido com sobrenadante de cultura de células L929. Os BMM ϕ obtidos foram infectados com formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, na proporção de 2 parasitos : BMM ϕ . Após 3 horas, os parasitos não internalizados foram retirados e adicionaram-se LPS 100 pg/mL e IFN- γ 10 U/mL. A avaliação final foi feita após 72 horas. **(A)** Porcentagem de BMM ϕ infectados, após 3 ou 72 horas de co-cultura. **(B)** Número médio de parasitos por BMM ϕ infectado. São apresentados a média e o desvio-padrão obtidos para um experimento representativo de três repetições

Após 3 horas de infecção, os parasitos mantidos em cultura por poucas passagens infectaram qualitativamente maior proporção de BMM Φ que aqueles mantidos em cultura por muitas passagens. Além disso, a ativação dos BMM Φ foi eficaz, uma vez que houve diminuição da porcentagem de células infectadas de 3 para 72 horas de cultura. Com relação ao parasitismo intracelular, novamente as diferenças observadas foram discretas. Corroborando os resultados obtidos para pM Φ , pode-se observar que a manutenção em cultura parece afetar a capacidade de adesão dos parasitos às células.

Em seguida, foi avaliada a produção de citocinas pelos BMM Φ infectados com os diferentes parasitos. Os resultados estão representados na figura 12.

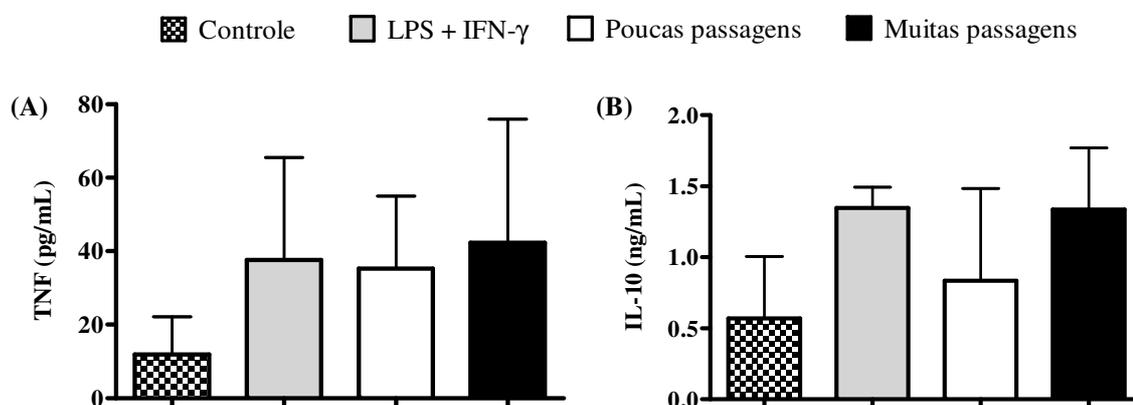


Figura 12: Produção de citocinas por macrófagos derivados de medula óssea, infectados por *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens e ativados com LPS e IFN- γ . BMM Φ obtidos de camundongos C57BL/6 foram diferenciados, infectados e ativados com LPS e IFN- γ , conforme descrito anteriormente. Como controles internos, foram realizadas culturas de BMM Φ não-infectados e não-ativados, ou não-infectados e ativados. Após 24 ou 72 horas de co-cultura, coletou-se sobrenadante das culturas para dosagem das citocinas TNF e IL-10, respectivamente. (A) Produção de TNF, avaliada por bioensaio com células WEHI. (B) Produção de IL-10, determinada por ELISA. Os dados representam a média e o desvio-padrão obtidos a partir de três repetições independentes. Foram avaliados por One-way ANOVA, mas não foram observadas diferenças significativas.

Não houve diferenças na produção das citocinas TNF e IL-10 entre os grupos experimentais avaliados.

Em seguida, foi feita a dosagem de NO no sobrenadante das culturas de BMM Φ , e seus resultados são expressos na figura 13.

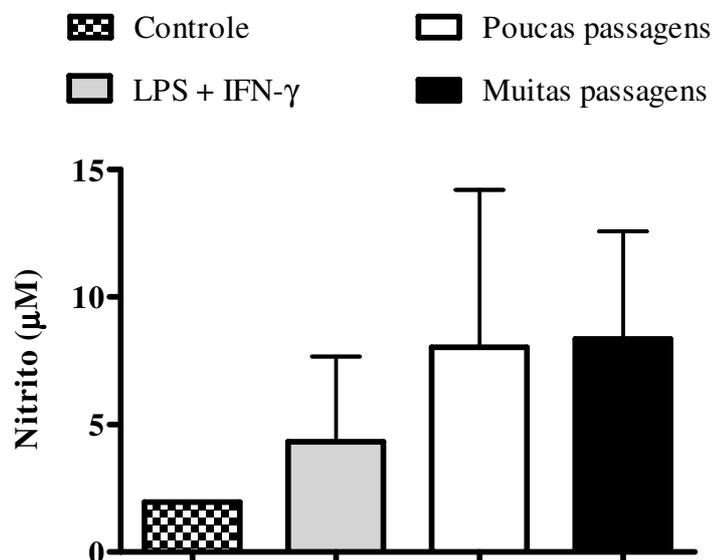


Figura 13: Produção de NO por macrófagos derivados de medula óssea, infectados por *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens e ativados com LPS e IFN- γ . BMM Φ obtidos de camundongos C57BL/6 foram diferenciados, infectados e ativados com LPS e IFN- γ , conforme descrito anteriormente. Como controles internos, foram realizadas culturas de BMM Φ não-infectados e não-ativados, ou não-infectados e ativados. Após 72 horas de co-cultura, coletou-se sobrenadante das culturas para dosagem de NO. Os dados representam a média e o desvio-padrão obtidos a partir de cinco repetições independentes. A análise dos resultados foi feita por One-way ANOVA; entretanto, não foram observadas diferenças significativas.

Não houve diferenças significativas na produção de NO. Entretanto, cabe ressaltar que, embora a produção de NO seja numericamente baixa, ela é biologicamente relevante, uma vez que foi observada redução na proporção de BMM Φ infectados nos diferentes tempos avaliados.

Os resultados obtidos para NO neste trabalho contradizem estudos anteriores. Corradin e cols (1991) observaram que a infecção de BMM Φ derivados de camundongos C3H/HeJ ou CBA por *L. enriettii* aumenta a produção de NO, deflagrada pela estimulação com IFN- γ e LPS. De modo semelhante, Balestieri e cols (2002), trabalhando com a linhagem J774-G8, demonstraram que a infecção por *L. amazonensis*

suprime a produção de NO decorrente da estimulação por LPS, mas que a ativação dos M Φ com IFN- γ e LPS é capaz de revertê-la. Cabe ressaltar, ainda, que nestes experimentos foi utilizado meio de cultura suplementado com SFB, componente que pode apresentar concentrações de TGF- β capazes de inibir a produção de NO por M Φ (Mills e cols., 2000).

Também foi avaliada a produção de quimiocinas por BMM Φ , a fim de detectar possíveis alterações em sua síntese decorrentes da infecção por *L. amazonensis*. Para tanto, BMM Φ foram infectados com parasitos mantidos em cultura por poucas ou muitas passagens, ou mantidos não-ativados e não-infectados ou apenas ativados, como controles internos. Os resultados (figura 14) são expressos como vezes de indução em relação ao controle não-ativado e não-infectado.

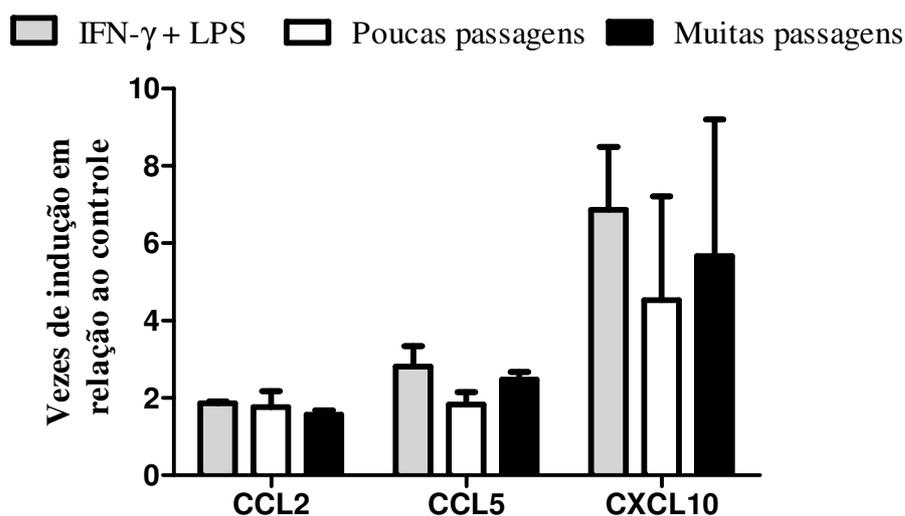


Figura 14: Expressão relativa do mRNA para quimiocinas em BMM Φ infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens e ativados com LPS e IFN- γ . BMM Φ obtidos de camundongos C57BL/6 foram diferenciados, infectados e ativados conforme descrito anteriormente. Como controles internos, foram realizadas culturas de BMM Φ não-infectados e não-ativados, ou não-infectados e ativados. Após 72 horas de co-cultura, coletaram-se as para extração de RNA e realização de RT-PCR. Os resultados obtidos para cada amostra foram normalizados em função do gene constitutivo HPRT, e os diferentes grupos de infecção foram relacionados a grupo controle não-infectado. Os dados apresentados referem-se à média e o desvio-padrão de duas repetições independentes. A avaliação dos resultados foi feita por One-way ANOVA, mas não foram encontradas diferenças significativas.

Pode-se observar que não houve diferenças entre nenhum dos grupos avaliados, o que pode decorrer da ativação das células com IFN- γ e LPS. Este tratamento leva à expressão da mensagem para diversas quimiocinas, sendo, inclusive, utilizado como controle positivo em trabalho desenvolvido por Racoosin e cols (1997).

4.5. Células T reguladoras (T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) não são responsáveis pelas diferenças no desenvolvimento de lesões em animais infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens

O envolvimento de células Treg na infecção por *Leishmania* já foi descrito em diversos trabalhos (Mendez e cols., 2004; Suffia e cols., 2006). Por isso, investigou-se a participação das células Treg na resposta desenvolvida pelos camundongos infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens.

Camundongos infectados foram sacrificados após uma ou quatro semanas de infecção, e a proporção de células Treg avaliada nos linfonodos drenantes. Animais não infectados foram avaliados para determinação da proporção basal dessas células. A análise da proporção de células CD25⁺Foxp3⁺ foi feita dentro da população de linfócitos T CD4⁺. Os resultados obtidos podem ser visualizados na figura 15.

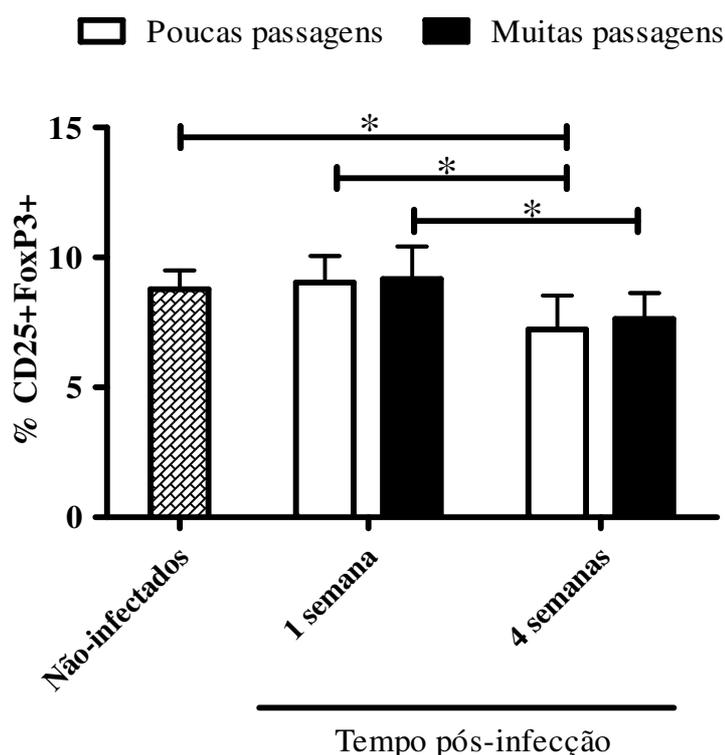


Figura 15: Proporção de células T reguladoras em linfonodos de animais infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens. Fêmeas de camundongos C57BL/6 foram infectadas, em ambas as patas, com 1×10^5 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens. Após uma ou quatro semanas, os animais foram sacrificados, e os linfonodos processados para liberação das células, que foram avaliadas quanto à proporção de células T reg. Dentre a população de linfócitos, foram selecionados aqueles $CD4^+$ e, dentre estes, foram caracterizadas as células T reg, com fenótipo $CD25^+Foxp3^+$. Também foi determinada a proporção de células T reg em linfonodos de animais *naives*. Os dados referem-se à média e desvio-padrão de duas repetições independentes. A análise estatística foi feita por One-way ANOVA, seguida do pós-teste de Bonferroni. (*) indica p -valor $< 0,05$.

Não há alterações na proporção de células Treg nos linfonodos drenantes dos animais infectados após uma semana de infecção. Após quatro semanas de infecção, há uma queda na sua proporção, o que é coerente com o início do desenvolvimento da lesão nos camundongos. Entretanto, não há diferenças entre os grupos experimentais avaliados.

A fim de analisar a participação das células Treg na infecção por *L. amazonensis*, Ji e cols (2005) realizaram um trabalho com camundongos C57BL/6 e

BALB/c infectados e observaram que células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ eram capazes de conter a proliferação de células T efectoras CD4⁺CD25⁻, bem como sua produção de citocinas. Demonstraram, também, que camundongos C57BL/6 RAG1^{-/-}, ao receberem esplenócitos depletados de células T CD25⁺, se tornavam mais susceptíveis à infecção. Por fim, foi mostrado que os efeitos benéficos das células Treg eram transitórios, diminuindo ao longo do curso de infecção, o que também foi visto em nosso trabalho.

4.6. Animais infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens apresentam diferenças na produção da quimiocina CCL2, após uma semana de infecção

A infecção por *Leishmania* é capaz de alterar a produção de quimiocinas *in vivo* e *in vitro*, e estas alterações parecem estar relacionadas com a manifestação clínica da doença. Segundo Ritter e Korner (2002), lesões de pacientes com leishmaniose cutânea apresentam alta expressão de CCL2, CXCL9 e CXCL10, enquanto há maior expressão de CCL3 em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea difusa. Portanto, decidiu-se investigar uma possível relação entre os perfis de lesão observados *in vivo* e as quimiocinas produzidas no local do inóculo. Para tanto, camundongos C57BL/6 foram infectados com formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*, mantida em cultura por poucas ou muitas passagens. Após uma semana de infecção, o tecido da pata foi submetido à RT-PCR. Os resultados foram normalizados em função do gene constitutivo HPRT (figura 16).

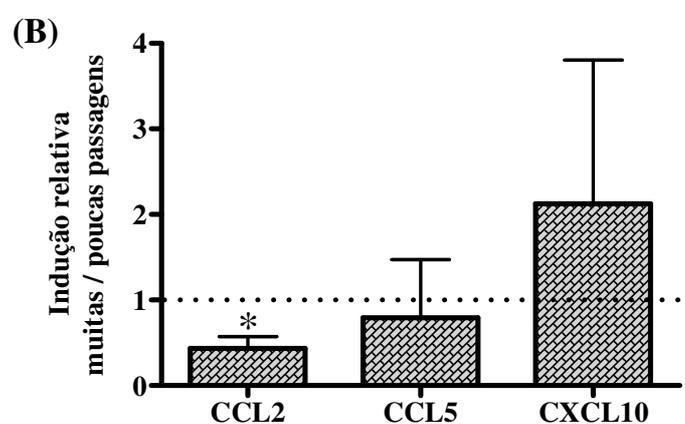
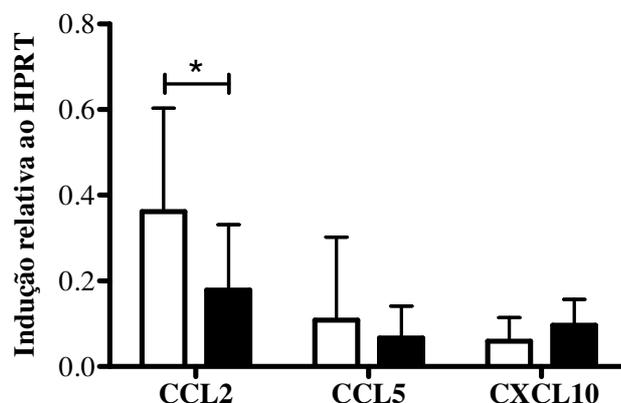
(A) Poucas passagens Muitas passagens

Figura 16: Expressão relativa do mRNA para quimiocinas em tecidos de patas de camundongos infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas ou muitas passagens, uma semana pós-infecção. Camundongos C57BL/6 foram infectados, em ambas as patas traseiras, com $1,0 \times 10^5$ formas metacíclicas de *L. amazonensis* mantida em cultura por diferentes períodos de tempo. Após uma semana de infecção, os animais foram sacrificados, e tecidos da pata foram coletados e submetidos à RT-PCR. Os resultados obtidos para cada amostra foram normalizados em função do gene constitutivo HPRT. (A) Expressão relativa do mRNA para cada quimiocina, em relação ao gene constitutivo HPRT. (B) Expressão relativa do mRNA para as quimiocinas nos diferentes grupos avaliados, que foram relacionados entre si, gerando os dados de indução relativa no grupo infectado com parasitos de muitas passagens em relação ao grupo infectado com parasitos de poucas passagens. Os dados apresentados referem-se à média e ao desvio-padrão de três repetições independentes, e foram avaliados por teste t de Student. (*) indica p -valor $< 0,05$.

Pode-se observar que houve uma maior expressão da mensagem para a quimiocina CCL2 dentre os animais infectados com parasitos mantidos em cultura por poucas passagens; já para as quimiocinas CCL5 e CXCL10 não foram observadas diferenças.

O envolvimento da quimiocina CCL2 na infecção por *Leishmania* já foi descrito anteriormente, embora de modo controverso.

Em alguns trabalhos, observa-se uma relação entre expressão de CCL2 e resistência à infecção por *Leishmania*. Trabalhando com infecção BMM Φ derivados de camundongos BALB/c com cepas avirulentas e virulentas de *L. major*, (Racoosin & Beverley) (1997) observaram maior expressão de CCL2 nas células infectadas com cepas avirulentas, indicando uma possível participação desta quimiocina no controle da infecção. Essa hipótese é corroborada por Ji e cols (2003), que detectaram maior expressão de CCL2 em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* que em animais infectados com *L. amazonensis*.

Comparando a infecção de camundongos C57BL/6 e BALB/c com *L. major*, Vester e cols (1999) detectaram a expressão de CCL2 apenas em camundongos C57BL/6, após um dia de infecção. Neste mesmo estudo, os autores demonstram que células de linfonodos de C57BL/6 apresentam maior atividade citotóxica, e correlacionaram este fato à maior migração de NK em resposta à CCL2 produzida. Em um trabalho semelhante, Zaph e Scott (2003) observaram que CCL2 é mais expressa camundongos C3H infectados com *L. major* que em camundongos BALB/c, e que esta resposta aparentemente é dependente da produção de IL-12.

Brandonisio e cols (2002) demonstram que o tratamento com CCL2 aumenta a produção de NO e a atividade leishmanicida de M Φ humanos infectados com *L. infantum*. Em outro trabalho, Bhattacharyya e cols (2002) trataram BMM Φ derivados de BALB/c e infectados com *L. donovani* com CCL2, o que resultou em maior síntese de NO e TNF- α e na inibição da proliferação intracelular os parasitos. Vasquez e Soong (2006) demonstraram que, em BMM Φ derivados de BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ, o tratamento com CCL2 antes da infecção por *L. amazonensis* leva à diminuição do parasitismo celular.

Em nosso trabalho, detectou-se maior produção de CCL2 em animais infectados com *L. amazonensis* mais virulenta, o que está de acordo com outros dados da literatura

que indicam uma possível correlação entre CCL2 e maior susceptibilidade a infecção. Gu e cols (2000), trabalhando com camundongos BALB/c deficientes para esta quimiocina (CCL2^{-/-}), observaram que estes apresentam lesões menores frente à infecção por *L. major* que os animais selvagens, o que indica a possível participação de CCL2 no desenvolvimento e progressão da lesão. Além disso, quando camundongos BALB/c e C57BL/6 são infectados por *L. major*, há maior expressão de CCL2 nos primeiros, que são mais susceptíveis à infecção (Santiago e cols., 2004). De modo muito interessante, Teixeira e cols (2005) observaram maior expressão de CCL2 em camundongos BALB/c infectados com cepa mais virulenta de *L. braziliensis*, o que também foi observado em nosso trabalho.

5. Sumário dos resultados e considerações finais

- ⊕ Parasitos da espécie *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas passagens levam ao desenvolvimento de lesões significativamente maiores que aqueles mantidos em cultura por muitas passagens, em camundongos C57BL/6. De modo interessante, parasitos mantidos em cultura por poucas passagens apresentam maior atividade ATPásica e ADPásica que aqueles mantidos em cultura por muitas passagens.
- ⊕ A presença de Ado no meio de cultura leva à redução da atividade ATPásica de parasitos mantidos em cultura por poucas passagens. Esses parasitos cultivados em Ado causam menores lesões em camundongos C57BL/6 que aqueles cultivados no meio de cultura padrão. Quando parasitos mantidos em cultura por muitas passagens são cultivados em meio contendo Sur, apresentam maior atividade ATPásica e levam a maiores lesões que aqueles cultivados em meio de cultura padrão. Células de linfonodo isoladas de animais infectados com parasitos que apresentam maior atividade ATPásica produzem menor quantidade de IFN- γ e IL-10, quando comparadas às células de animais infectados com parasitos que apresentam menor atividade ATPásica.
- ⊕ Para responderem à infecção por *L. amazonensis*, é necessário que BMM Φ sejam ativados com IFN- γ e LPS.
- ⊕ Parasitos mantidos em cultura por poucas passagens infectam qualitativamente maior proporção de pM Φ e BMM Φ , após 3 ou 72 horas de co-cultura. As diferenças no parasitismo celular são mais discretas. Não há diferenças na produção de citocinas, quimiocinas e NO. Assim, a maior facilidade com que os parasitos de poucas passagens são internalizados pelos M Φ pode se relacionar com sua maior expressão superficial de ecto-NTPDases.
- ⊕ Células Treg são detectadas em proporções idênticas em linfonodos de animais infectados com ambos os parasitos, em diferentes tempos de infecção, o que indica que não participam do desenvolvimento diferencial da lesão previamente observados.
- ⊕ Há maior produção de CCL2 no sítio da infecção em camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* mantida em cultura por poucas passagens, em relação aos animais infectados com parasitos mantidos em cultura por muitas passagens.

Com base nestas observações, pode-se propor um mecanismo geral pelo qual *L. amazonensis* que expressa maior quantidade de ecto-NTPDases leva ao desenvolvimento de lesão mais exuberante em camundongos C57BL/6. Ao infectarem os animais, estes parasitos são capazes de criar um ambiente anti-inflamatório, pela degradação de ATP e conseqüente geração de Ado. Além disso, parecem se ligar com maior facilidade aos MΦ. Uma vez internalizados pelos diferentes tipos celulares existentes no hospedeiro, como MΦ residentes, neutrófilos e DCs, os parasitos deflagram a produção local da quimiocina CCL2. Esta recruta monócitos para o sítio da infecção que, por sua vez, servem como um abrigo seguro para os parasitos. Nos momentos iniciais da infecção, as células Treg garantem que não haja a montagem de uma resposta inflamatória excessiva. Entretanto, quando a proporção destas células no linfonodo começa a declinar, cria-se um ambiente inflamatório, condizente com o desenvolvimento da lesão. Assim, a maior expressão das ecto-NTPDases, com conseqüente maior atividade ecto-nucleotidásica, garantem à *L. amazonensis* uma ferramenta poderosa para infecção e sobrevivência do hospedeiro, o que permite caracterizar essa enzima como um fator de virulência do parasito.

6. Conclusão

Os dados obtidos permitem apontar diferenças na resposta imune deflagrada pela infecção por parasitos da espécie *L. amazonensis* que apresentam diferenças em sua atividade ecto-nucleotidásica. Os parasitos que apresentam maior atividade causam lesões maiores em camundongos C57BL/6 e suprimem a produção de IFN- γ por células isoladas de seus linfonodos, decorridas oito semanas de infecção. Células Treg parecem não estar envolvidas nestes processos. Em tempos iniciais da infecção, esses mesmos parasitos levam à maior expressão da quimiocina CCL2 no sítio do inóculo. *In vitro*, infectam maior proporção de M Φ , sem alterar sua produção de mediadores inflamatórios.

7. Referências bibliográficas

- AFONSO L., BORGES V.M., CRUZ H., RIBEIRO-GOMES F.L., DOSREIS G.A., DUTRA A.N., CLARENCIO J., DE OLIVEIRA C.I., BARRAL A., BARRAL-NETTO M. & BRODSKYN C.I. (2008) Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc.Biol.* **84**, 389-396.
- AFONSO L.C., SCHARTON T.M., VIEIRA L.Q., WYSOCKA M., TRINCHIERI G. & SCOTT P. (1994) The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* **263**, 235-237.
- AFONSO L.C. & SCOTT P. (1993) Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect.Immun.* **61**, 2952-2959.
- ALEXANDER J. & BRYSON K. (2005) T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol.Lett.* **99**, 17-23.
- ALEXANDER J., SATOSKAR A.R. & RUSSELL D.G. (1999) *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* **112 Pt 18**, 2993-3002.
- ANTOINE J.C., PRINA E., COURRET N. & LANG T. (2004) *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Adv.Parasitol.* **58**, 1-68.
- Assis, E. A. Influência da manutenção de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em meio de cultura axênico sobre a infecciosidade dos parasitos e sua correlação com a atividade ecto-nucleotidásica. 2008. Universidade Federal de Ouro Preto. (GENERIC)
Ref Type: Thesis/Dissertation
- AWASTHI A., MATHUR R.K. & SAHA B. (2004) Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res.* **119**, 238-258.
- BAGGIOLINI M. (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* **250**, 91-104.
- BALESTIERI F.M., QUEIROZ A.R., SCAVONE C., COSTA V.M., BARRAL-NETTO M. & ABRAHAMSOHN I.A. (2002) *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes.Infect.* **4**, 23-29.

- BARBI J., BROMBACHER F. & SATOSKAR A.R. (2008) T cells from *Leishmania* major-susceptible BALB/c mice have a defect in efficiently up-regulating CXCR3 upon activation. *J Immunol.* **181**, 4613-4620.
- BEETHAM J.K., DONELSON J.E. & DAHLIN R.R. (2003) Surface glycoprotein PSA (GP46) expression during short- and long-term culture of *Leishmania chagasi*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **131**, 109-117.
- BEHIN R., MAUEL J., BIROUM N. & ROWE D.S. (1975) Mechanisms of protective immunity in experimental cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. II. Selective destruction of different *Leishmania* species in activated guinea-pig and mouse macrophages. *Clin Exp.Immunol.* **20**, 351-358.
- BELKAID Y. (2007) Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat.Rev Immunol.* **7**, 875-888.
- BELKAID Y., PICCIRILLO C.A., MENDEZ S., SHEVACH E.M. & SACKS D.L. (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* **420**, 502-507.
- BELKAID Y., SUN C.M. & BOULADOUX N. (2006) Parasites and immunoregulatory T cells. *Curr.Opin.Immunol.* **18**, 406-412.
- BERMAN J.D., DWYER D.M. & WYLER D.J. (1979) Multiplication of *Leishmania* in human macrophages in vitro. *Infect.Immun.* **26**, 375-379.
- BERREDO-PINHO M., PERES-SAMPAIO C.E., CHRISPIM P.P., BELMONT-FIRPO R., LEMOS A.P., MARTINY A., VANNIER-SANTOS M.A. & MEYER-FERNANDES J.R. (2001) A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Arch.Biochem.Biophys.* **391**, 16-24.
- BHATTACHARYYA S., GHOSH S., DASGUPTA B., MAZUMDER D., ROY S. & MAJUMDAR S. (2002) Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J Infect.Dis.* **185**, 1704-1708.
- BISAGGIO D.F., PERES-SAMPAIO C.E., MEYER-FERNANDES J.R. & SOUTO-PADRON T. (2003) Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi*

- and its possible role in the parasite-host cell interaction. *Parasitol.Res.* **91**, 273-282.
- BOGDAN C. & ROLLINGHOFF M. (1999) How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol.Today* **15**, 22-28.
- BOGDAN C., VODOVOTZ Y. & NATHAN C. (1991) Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp.Med* **174**, 1549-1555.
- BOLTZ-NITULESCU G., WILTSCHKE C., HOLZINGER C., FELLINGER A., SCHEINER O., GESSL A. & FORSTER O. (1987) Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *J Leukoc.Biol.* **41**, 83-91.
- BOPP T., BECKER C., KLEIN M., KLEIN-HESSLING S., PALMETSHOFER A., SERFLING E., HEIB V., BECKER M., KUBACH J., SCHMITT S., STOLL S., SCHILD H., STAEGE M.S., STASSEN M., JONULEIT H. & SCHMITT E. (2007) Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J.Exp.Med.* **204**, 1303-1310.
- BORSELLINO G., KLEINWIETFELD M., DI M.D., STERNJAK A., DIAMANTINI A., GIOMETTO R., HOPNER S., CENTONZE D., BERNARDI G., DELL'ACQUA M.L., ROSSINI P.M., BATTISTINI L., ROTZSCHKE O. & FALK K. (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **110**, 1225-1232.
- BOURS M.J., SWENNEN E.L., DI V.F., CRONSTEIN B.N. & DAGNELIE P.C. (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* **112**, 358-404.
- BRANDONISIO O., PANARO M.A., FUMAROLA I., SISTO M., LEOGRANDE D., ACQUAFREDDA A., SPINELLI R. & MITOLO V. (2002) Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clin Exp.Med* **2**, 125-129.

- BRENIER-PINCHART M.P., PELLOUX H., ROUICH-GUERGOUR D. & MBROISE-THOMAS P. (2001) Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol.* **17**, 292-296.
- BRODIE T.M., SMITH M.C., MORRIS R.V. & TITUS R.G. (2007) Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect.Immun.* **75**, 2359-2365.
- CHANG H.K., THALHOFER C., DUERKOP B.A., MEHLING J.S., VERMA S., GOLLOB K.J., ALMEIDA R. & WILSON M.E. (2007) Oxidant generation by single infected monocytes after short-term fluorescence labeling of a protozoan parasite. *Infect.Immun.* **75**, 1017-1024.
- COHN C.S. & GOTTLIEB M. (1997) The acquisition of purines by trypanosomatids. *Parasitol.Today* **13**, 231-235.
- COIMBRA E.S., GONCALVES-DA-COSTA S.C., CORTE-REAL S., DE FREITAS F.G., DURAO A.C., SOUZA C.S., SILVA-SANTOS M.I. & VASCONCELOS E.G. (2002) Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology* **124**, 137-143.
- CORRADIN S.B. & MAUEL J. (1991) Phagocytosis of *Leishmania* enhances macrophage activation by IFN-gamma and lipopolysaccharide. *J Immunol.* **146**, 279-285.
- COUPER K.N., BLOUNT D.G. & RILEY E.M. (2008) IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* **180**, 5771-5777.
- CUNNICK J., KAUR P., CHO Y., GROFFEN J. & HEISTERKAMP N. (2006) Use of bone marrow-derived macrophages to model murine innate immune responses. *J Immunol.Methods* **311**, 96-105.
- CYSNE-FINKELSTEIN L., TEMPORAL R.M., ALVES F.A. & LEON L.L. (1998) *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp.Parasitol.* **89**, 58-62.

- DA SILVA R. & SACKS D.L. (1987) Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect.Immun.* **55**, 2802-2806.
- DALE D.C., BOXER L. & LILES W.C. (2008) The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* **112**, 935-945.
- DE ALMEIDA M.C., VILHENA V., BARRAL A. & BARRAL-NETTO M. (2003) Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **98**, 861-870.
- DEAGLIO S., DWYER K.M., GAO W., FRIEDMAN D., USHEVA A., ERAT A., CHEN J.F., ENJOJI K., LINDEN J., OUKKA M., KUCHROO V.K., STROM T.B. & ROBSON S.C. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J.Exp.Med.* **204**, 1257-1265.
- DESJEUX P. (2004) Leishmaniasis. *Nat.Rev Microbiol.* **2**, 692
- DOGRA N., WARBURTON C. & MCMASTER W.R. (2007) *Leishmania major* abrogates gamma interferon-induced gene expression in human macrophages from a global perspective. *Infect.Immun.* **75**, 3506-3515.
- DOMBROWSKI K.E., KE Y., BREWER K.A. & KAPP J.A. (1998) Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol.Rev* **161**, 111-118.
- DUFOUR J.H., DZIEJMAN M., LIU M.T., LEUNG J.H., LANE T.E. & LUSTER A.D. (2002) IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol.* **168**, 3195-3204.
- FARAH F.S., SAMRA S.A. & NUWAYRI-SALTI N. (1975) The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis. *Immunology* **29**, 755-764.
- FARBER J.M. (1997) Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc.Biol.* **61**, 246-257.
- FAVALI C., TAVARES N., CLARENCIO J., BARRAL A., BARRAL-NETTO M. & BRODSKYN C. (2007) *Leishmania amazonensis* infection impairs

differentiation and function of human dendritic cells. *J.Leukoc.Biol.* **82**, 1401-1406.

- FELIZARDO T.C., TOMA L.S., BORGES N.B., LIMA G.M. & ABRAHAMSOHN I.A. (2007) Leishmania (Leishmania) amazonensis infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. *Parasitology* **134**, 1699-1707.
- FONTENOT J.D., GAVIN M.A. & RUDENSKY A.Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* **4**, 330-336.
- FORTEA J., PRINA E., DE LA L.E., LECOEUR H., LANG T. & MILON G. (2007) Unveiling pathways used by Leishmania amazonensis amastigotes to subvert macrophage function. *Immunol.Rev.* **219**, 66-74.
- GARCIA X. & STEIN F. (2006) Nitric oxide. *Semin.Pediatr Infect.Dis.* **17**, 55-57.
- GREEN S.J., CRAWFORD R.M., HOCKMEYER J.T., MELTZER M.S. & NACY C.A. (1990) Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* **145**, 4290-4297.
- GU L., TSENG S., HORNER R.M., TAM C., LODA M. & ROLLINS B.J. (2000) Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* **404**, 407-411.
- HASKO G., DEITCH E.A., SZABO C., NEMETH Z.H. & VIZI E.S. (2002) Adenosine: a potential mediator of immunosuppression in multiple organ failure. *Curr.Opin.Pharmacol.* **2**, 440-444.
- HUME D.A. (2006) The mononuclear phagocyte system. *Curr.Opin.Immunol.* **18**, 49-53.
- INDIANI DE OLIVEIRA C., TEIXEIRA M.J., TEIXEIRA C.R., RAMOS DE J.J., BOMURA R.A., SANTA DA S.J., BRODSKYN C., BARRAL-NETTO M. & BARRAL A. (2004) Leishmania braziliensis isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes.Infect.* **6**, 977-984.

- JI J., MASTERSON J., SUN J. & SOONG L. (2005) CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J.Immunol.* **174**, 7147-7153.
- JI J., SUN J., QI H. & SOONG L. (2002) Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop.Med Hyg.* **66**, 338-345.
- JI J., SUN J. & SOONG L. (2003) Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect.Immun.* **71**, 4278-4288.
- JONES D.E., ACKERMANN M.R., WILLE U., HUNTER C.A. & SCOTT P. (2002) Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect.Immun.* **70**, 2151-2158.
- KOMOSZYNSKI M. & WOJTCZAK A. (1996) Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim.Biophys.Acta* **1310**, 233-241.
- KOZIAK K., SEVIGNY J., ROBSON S.C., SIEGEL J.B. & KACZMAREK E. (1999) Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb.Haemost.* **82**, 1538-1544.
- KRECKLER L.M., WAN T.C., GE Z.D. & AUCHAMPACH J.A. (2006) Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp.Ther.* **317**, 172-180.
- LA SALA A., FERRARI D., CORINTI S., CAVANI A., DI V.F. & GIROLOMONI G. (2001) Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J Immunol.* **166**, 1611-1617.
- LA SALA A., FERRARI D., DI V.F., IDZKO M., NORGAUER J. & GIROLOMONI G. (2003) Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J.Leukoc.Biol.* **73**, 339-343.

- LANGSTON H.P., KE Y., GEWIRTZ A.T., DOMBROWSKI K.E. & KAPP J.A. (2003) Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J.Immunol.* **170**, 2962-2970.
- LATTIME E.C., STOPPACCIARO A. & STUTMAN O. (1988) Limiting dilution analysis of TNF producing cells in C3H/HeJ mice. *J Immunol.* **141**, 3422-3428.
- LIESE J., SCHLEICHER U. & BOGDAN C. (2008) The innate immune response against Leishmania parasites. *Immunobiology* **213**, 377-387.
- LIEW F.Y., LI Y. & MILLOTT S. (1990) Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology* **71**, 556-559.
- MAIA C., ROLÃO N., NUNES M., GONCALVES L. & CAMPINO L. (2007) Infectivity of five different types of macrophages by Leishmania infantum. *Acta Trop.* **103**, 150-155.
- MAIOLI T.U., TAKANE E., ARANTES R.M., FIETTO J.L. & AFONSO L.C. (2004) Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice. *Parasitol.Res.* **94**, 207-212.
- Marques-da-Silva, E. A. Influência do metabolismo extracelular de ATP em infecções por parasitos do gênero *Leishmania*. 2008. Universidade Federal de Ouro Preto. (GENERIC)
Ref Type: Thesis/Dissertation
- MARQUES-DA-SILVA E.A., DE OLIVEIRA J.C., FIGUEIREDO A.B., DE SOUZA LIMA J.D., CARNEIRO C.M., RANGEL FIETTO J.L. & CROCCO AFONSO L.C. (2008) Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes.Infect.* **10**, 850-857.
- MAUEL J. (1990) Macrophage-parasite interactions in Leishmania infections. *J Leukoc.Biol.* **47**, 187-193.
- MCMAHON-PRATT D. & ALEXANDER J. (2004) Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol.Rev* **201**, 206-224.

- MELGAREJO E., MEDINA M.A., SANCHEZ-JIMENEZ F. & URDIALES J.L. (2008) Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem. Cell Biol.*
- MENDEZ S., RECKLING S.K., PICCIRILLO C.A., SACKS D. & BELKAID Y. (2004) Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp. Med* **200**, 201-210.
- MEYER-FERNANDES J.R. (2002) Ecto-ATPases in protozoa parasites: looking for a function. *Parasitol. Int* **51**, 299-303.
- MEYER-FERNANDES J.R., DUTRA P.M., RODRIGUES C.O., SAAD-NEHME J. & LOPES A.H. (1997) Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. *Arch Biochem. Biophys.* **341**, 40-46.
- MILLS C.D., KINCAID K., ALT J.M., HEILMAN M.J. & HILL A.M. (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* **164**, 6166-6173.
- MILLS K.H. (2004) Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev Immunol.* **4**, 841-855.
- MOSER B. & LOETSCHER P. (2001) Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.* **2**, 123-128.
- MOSER B., WOLF M., WALZ A. & LOETSCHER P. (2004) Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* **25**, 75-84.
- MOSSER D.M. & EDWARDS J.P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev Immunol.* **8**, 958-969.
- MUKBEL R.M., PATTEN C., Jr., GIBSON K., GHOSH M., PETERSEN C. & JONES D.E. (2007) Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop. Med Hyg.* **76**, 669-675.
- MULLER K., VAN Z.G., HANSEN B., LAUFS H., JAHNKE N., SOLBACH W. & LASKAY T. (2001) Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol. Immunol.* **190**, 73-76.

- NORTH R.J. (1978) The concept of the activated macrophage. *J Immunol.* **121**, 806-809.
- PANTHER E., CORINTI S., IDZKO M., HEROUY Y., NAPP M., LA S.A., GIROLOMONI G. & NORGAUER J. (2003) Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* **101**, 3985-3990.
- PEREIRA B.A. & ALVES C.R. (2008) Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet.Parasitol.* **158**, 239-255.
- PINHEIRO C.M., MARTINS-DUARTE E.S., FERRARO R.B., FONSECA DE SOUZA A.L., GOMES M.T., LOPES A.H., VANNIER-SANTOS M.A., SANTOS A.L. & MEYER-FERNANDES J.R. (2006) *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Exp.Parasitol.* **114**, 16-25.
- PULTE E.D., BROEKMAN M.J., OLSON K.E., DROSOPOULOS J.H., KIZER J.R., ISLAM N. & MARCUS A.J. (2007) CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thromb.Res.* **121**, 309-317.
- QI H., JI J., WANASEN N. & SOONG L. (2004) Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect.Immun.* **72**, 988-995.
- QI H., POPOV V. & SOONG L. (2001) *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. *J.Immunol.* **167**, 4534-4542.
- RACOOSIN E.L. & BEVERLEY S.M. (1997) *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp.Parasitol.* **85**, 283-295.
- REAL F., POUCHELET M. & RABINOVITCH M. (2008) *Leishmania (L.) amazonensis*: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages. *Exp.Parasitol.* **119**, 15-23.

- RIGHETTI P.G. (2005) Electrophoresis: the march of pennies, the march of dimes. *J Chromatogr.A* **1079**, 24-40.
- RITTER U. & KORNER H. (2002) Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **24**, 295-301.
- RITTER U., LECHNER A., SCHARL K., KIAFARD Z., ZWIRNER J. & KORNER H. (2008) TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of *Leishmania* major infection. *Med Microbiol.Immunol.* **197**, 29-37.
- ROACH T.I., KIDERLEN A.F. & BLACKWELL J.M. (1991) Role of inorganic nitrogen oxides and tumor necrosis factor alpha in killing *Leishmania donovani* amastigotes in gamma interferon-lipopolysaccharide-activated macrophages from Lshs and Lshr congenic mouse strains. *Infect.Immun.* **59**, 3935-3944.
- ROBSON S.C., SEVIGNY J. & ZIMMERMANN H. (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic.Signal.* **2**, 409-430.
- ROT A. & VON ANDRIAN U.H. (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu.Rev Immunol.* **22**, 891-928.
- ROYCHOUDHURY K., DASGUPTA B., SEN P., LASKAY T., SOLBACH W., DE T. & ROY S. (2006) Evidence of direct interactions between the CC-chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and *Leishmania* promastigotes. *Mol.Biochem.Parasitol.* **150**, 374-377.
- SACKS D. & NOBEN-TRAUTH N. (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania* major in mice. *Nat.Rev Immunol.* **2**, 845-858.
- SALLUSTO F. & BAGGIOLINI M. (2008) Chemokines and leukocyte traffic. *Nat.Immunol.* **9**, 949-952.
- SANSOM F.M., ROBSON S.C. & HARTLAND E.L. (2008) Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiol.Mol.Biol.Rev* **72**, 765-81, Table.
- SANTIAGO H.C., OLIVEIRA C.F., SANTIAGO L., FERRAZ F.O., DE SOUZA D.G., DE-FREITAS L.A., AFONSO L.C., TEIXEIRA M.M., GAZZINELLI R.T. &

- VIEIRA L.Q. (2004) Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. *Infect.Immun.* **72**, 4918-4923.
- SCHNURR M., TOY T., SHIN A., HARTMANN G., ROTHENFUSSER S., SOELLNER J., DAVIS I.D., CEBON J. & MARASKOVSKY E. (2004) Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **103**, 1391-1397.
- SPATH G.F. & BEVERLEY S.M. (2001) A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp.Parasitol.* **99**, 97-103.
- STEIGERWALD M. & MOLL H. (2005) *Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. *Infect.Immun.* **73**, 2564-2567.
- STRIETER R.M., STANDIFORD T.J., HUFFNAGLE G.B., COLLETTI L.M., LUKACS N.W. & KUNKEL S.L. (1996) "The good, the bad, and the ugly." The role of chemokines in models of human disease. *J Immunol.* **156**, 3583-3586.
- SUFFIA I.J., RECKLING S.K., PICCIRILLO C.A., GOLDSZMID R.S. & BELKAID Y. (2006) Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp.Med* **203**, 777-788.
- TAKEDACHI M., QU D., EBISUNO Y., OOHARA H., JOACHIMS M.L., MCGEE S.T., MAEDA E., MCEVER R.P., TANAKA T., MIYASAKA M., MURAKAMI S., KRAHN T., BLACKBURN M.R. & THOMPSON L.F. (2008) CD73-generated adenosine restricts lymphocyte migration into draining lymph nodes. *J Immunol.* **180**, 6288-6296.
- TAUSSKY H.H. & SHORR E. (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol.Chem.* **202**, 675-685.
- TAVARES D., DA CONCEIÇÃO R.R. & DA SILVA AC. (2006) Inflammatory lesion and parasite load are inversely associated in *Leishmania amazonensis* infected mice genetically selected according to oral tolerance susceptibility. *Microbes.Infect.* **8**, 957-964.

- TEIXEIRA M.J., FERNANDES J.D., TEIXEIRA C.R., ANDRADE B.B., POMPEU M.L., SANTANA DA S.J., BRODSKYN C.I., BARRAL-NETTO M. & BARRAL A. (2005) Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect.Immun.* **73**, 1191-1195.
- TEIXEIRA M.J., TEIXEIRA C.R., ANDRADE B.B., BARRAL-NETTO M. & BARRAL A. (2006) Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* **22**, 32-40.
- THORNTON A.M. & SHEVACH E.M. (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp.Med* **188**, 287-296.
- TIEMESSEN M.M., JAGGER A.L., EVANS H.G., VAN HERWIJNEN M.J., JOHN S. & TAAMS L.S. (2007) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc.Natl.Acad Sci.U.S.A* **104**, 19446-19451.
- TITUS R.G., KELSO A. & LOUIS J.A. (1984) Intracellular destruction of *Leishmania tropica* by macrophages activated with macrophage activating factor/interferon. *Clin Exp.Immunol.* **55**, 157-165.
- TOLEZANO J.E., ULIANA S.R., TANIGUCHI H.H., ARAUJO M.F., BARBOSA J.A., BARBOSA J.E., FLOETER-WINTER L.M. & SHAW J.J. (2007) The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Aracatuba County, Sao Paulo State, Brazil. *Vet.Parasitol.* **149**, 280-284.
- TRAGER W. (1974) Some aspects of intracellular parasitism. *Science* **183**, 269-273.
- TRIPATHI P., TRIPATHI P., KASHYAP L. & SINGH V. (2007) The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol.Med Microbiol.* **51**, 443-452.
- VAN ZANDBERGEN G., HERMANN N., LAUFS H., SOLBACH W. & LASKAY T. (2002) *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect.Immun.* **70**, 4177-4184.

- VASQUEZ R.E. & SOONG L. (2006) CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. *Infect.Immun.* **74**, 6769-6777.
- VESTER B., MULLER K., SOLBACH W. & LASKAY T. (1999) Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect.Immun.* **67**, 3155-3159.
- VIOLA A. & LUSTER A.D. (2008) Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu.Rev Pharmacol Toxicol.* **48**, 171-197.
- VON STEBUT E. (2007) Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol.* **17**, 115-122.
- WANASEN N., XIN L. & SOONG L. (2008) Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int J Parasitol.* **38**, 417-429.
- WANG T.F. & GUIDOTTI G. (1996) CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. *J Biol.Chem.* **271**, 9898-9901.
- WHO. World Health Organization. <http://who.int/emc/diseases/leish/index.html> . 23-12-2008. (GENERIC)
Ref Type: Electronic Citation
- WILLIAMS B.A., MANZER A., BLAY J. & HOSKIN D.W. (1997) Adenosine acts through a novel extracellular receptor to inhibit granule exocytosis by natural killer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **231**, 264-269.
- WOHLFERT E. & BELKAID Y. (2008) Role of endogenous and induced regulatory T cells during infections. *J Clin Immunol.* **28**, 707-715.
- XAUS J., MIRABET M., LLOBERAS J., SOLER C., LLUIS C., FRANCO R. & CELADA A. (1999) IFN-gamma up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J Immunol.* **162**, 3607-3614.
- YAGI H., NOMURA T., NAKAMURA K., YAMAZAKI S., KITAWAKI T., HORI S., MAEDA M., ONODERA M., UCHIYAMA T., FUJII S. & SAKAGUCHI S.

- (2004) Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* **16**, 1643-1656.
- ZAPH C. & SCOTT P. (2003) Interleukin-12 regulates chemokine gene expression during the early immune response to *Leishmania major*. *Infect.Immun.* **71**, 1587-1589.
- ZHANG S. & WANG Q. (2008) Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: regulatory mechanisms for IL-12p70 synthesis and inhibition. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **372**, 509-512.
- ZIMMERMANN H. (1999) Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci.* **20**, 231-236.
- ZLOTNIK A. & YOSHIE O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* **12**, 121-127.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)