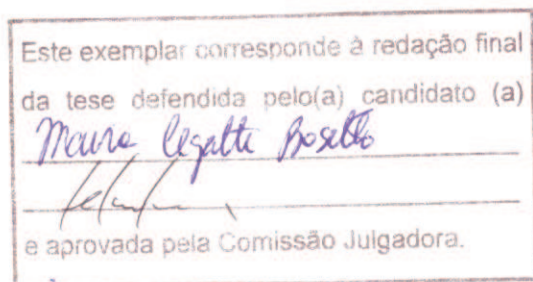

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MAIRA CEGATTI BOSETTO

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE MICROAMBIENTE
HIPÓXICO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS
INFECTADAS COM *Leishmania amazonensis*”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Doutor em Genética e
Biologia Molecular na área de Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Giorgio

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B651a

Bosetto, Maira Cegatti

Avaliação dos efeitos do microambiente hipóxico em células dendríticas humanas infectadas com *Leishmania amazonensis* / Maira Cegatti Bosetto. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Selma Giorgio.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Leishmania amazonensis*. 2. Células dendríticas.
3. Hipoxia celular. I. Giorgio, Selma. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Effect of hypoxia on human dendritic cells infection by *Leishmania amazonensis*.

Palavras-chave em inglês: *Leishmania amazonensis*; Dendritic cells; Cell hypoxia.

Área de concentração: Imunologia.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Selma Giorgio, Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, Marcelo Brocchi, Hiro Goto, Lourdes Isaac.

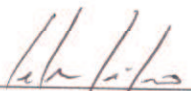
Data da defesa: 04/05/2007.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

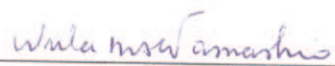
Campinas, 04 de maio de 2007.

BANCA EXAMINADORA

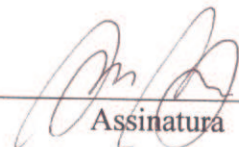
Profa. Dra. Selma Giorgio (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi


Assinatura

Profa. Dra. Hiro Goto


Assinatura

Profa. Dra. Lourdes Isaac


Assinatura

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

Assinatura

Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

Assinatura

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Leishmaniose do Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, com apoio financeiro do CNPq e da FAPESP (Processo # 03/12679-6).

Dedico este trabalho aos meus pais e meus heróis Lourdes e Vanderlei, sem os quais eu não seria o que sou e a quem devo mais esta etapa de minha vida.

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Ao meu querido Engº Civil Nailton Bueno Mota, por construir em minha vida um
mundo de felicidade, minha eterna gratidão pelo amor, carinho e compreensão
nesta caminhada a dois.

Aos meus queridos Juliana e Júnior pelo carinho, apoio e incentivos sempre
presentes em mais esta jornada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Selma Giorgio, pela inestimável orientação que possibilitou meu crescimento científico e, sobretudo pela paciência profissional e pessoal.

A todos os meus familiares: avós, tios e primos pelo carinho e incentivo constantes.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Leishmaniose Adriana, Diana, Marcelle e Wagner pelo apoio, carinho e amizade em todos os momentos profissionais e pessoais, alegres ou difíceis.

Aos demais colegas do Laboratório de Leishmaniose pela amizade e apoio técnico.

Aos professores, funcionários e demais colegas do Departamento de Parasitologia pela amizade e apoio técnico.

Às amigas Jacy e Paula, do Departamento de Imunologia, pela amizade, carinho e colaboração constantes.

Aos Drs Dimas T. Covas e Patrícia Palma, do Hemocentro do Hospital das Clínicas da USP/Ribeirão Preto, pela realização das análises de citometria de fluxo.

À Profa Dra. Clara Barbieri da Unifesp/EPM de São Paulo, pela gentil colaboração com soros de paciente com leishmaniose e com sugestões oferecidas ao longo deste trabalho.

Aos funcionários do setor de coleta de sangue do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pelo carinho e atenção dispensados em meu aprimoramento na coleta de sangue.

Aos professores, funcionários e colegas dos Departamentos de Imunologia, Microbiologia e Bioquímica, por toda colaboração ao longo deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Fábio T. M. Costa e Dagmar R. Stach-Machado pela participação na análise prévia desta tese.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a finalização deste trabalho.

O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos.

(Lao-Tsé)

Sábio é o homem que antes de tudo procura conhecer a si mesmo.

(Mokiti Okada)

A ciência fascina com sua liberdade. Somos livres...

para formular qualquer pergunta

para duvidar de qualquer afirmação

para procurar qualquer evidência

para corrigir qualquer erro

...enquanto livres, a ciência jamais regredirá!

(Maira Cegatti Bosetto)

RESUMO

As células dendríticas (DCs) são potentes células apresentadoras de antígeno envolvidas principalmente na iniciação da resposta imune primária. As DCs podem ser isoladas a partir do cultivo de monócitos do sangue periférico humano realizado na presença de GM-CSF e IL-4. Protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios de células do Sistema Fagocítico Mononuclear como os macrófagos e as DCs. A *L. amazonensis*, espécie utilizada em nossos estudos, causa principalmente lesões cutâneas que podem se cronificar resultando num processo infeccioso com conseqüente hipóxia tecidual.

Neste trabalho avaliamos o papel deletério/terapêutico da hipóxia em modelo *in vitro* de uma infecção intracelular, a leishmaniose, através da análise dos parâmetros comentados na seqüência. Culturas de DCs humanas infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* foram expostas à hipóxia de 6% de oxigênio. A avaliação fenotípica das culturas indicou que a hipóxia, apesar de não afetar a viabilidade das células, reduziu a expressão dos marcadores de superfície celular CD80, CD86 e CD1a. A hipóxia não afetou a entrada do parasita nas DCs, mas modulou a atividade funcional das DCs, com diminuição da infecção em cerca de 30%. Na presença de ativadores como LPS e INF- γ , as DCs foram capazes de reduzir a porcentagem de infecção em normóxia, sendo que a hipóxia não potencializou este efeito estimulador. No entanto, essas mesmas culturas ativadas e infectadas em hipóxia produziram menos IL-12 que as culturas controle em normóxia.

O efeito da hipóxia sobre drogas leishmanicidas Anfotericina B, Glucantime e Miltefosine foram também avaliados. As curvas dose-resposta e análise das IC₅₀s de Anfotericina B e Glucantime sugeriram que a hipóxia anulou ou diminuiu a ação das drogas nas culturas de DCs

infectadas durante 48 horas de tratamento, quando comparados ao controle em normóxia. Já o Miltefosine agiu de forma semelhante tanto em normóxia como em hipóxia.

Por fim, analisamos o processo de interação *Leishmania*-DC utilizando amastigotas isolados de lesões de camundongos C3H/nude (os quais não apresentam anticorpos na superfície). A porcentagem de infecção das DCs com amastigotas “nude” foi de 36%. A opsonização destes parasitas com soro humano elevou a porcentagem de infecção em torno de 40%. A inativação e a depleção de anticorpos destes soros diminuiu marcadamente a porcentagem de infecção proporcionada pela opsonização, indicando o envolvimento de receptores para Fc (FcR) e para Complemento (CRs) na fagocitose dos parasitas. A infecção das DCs também foi inibida em 50% após tratamento dos amastigotas com heparina. Nós não relacionamos os receptores de manose fucose com a entrada do amastigotas nas DCs. Nossos dados sugerem que o processo de infecção das DCs envolve a participação de pelo menos três interações receptor/ligante (FcR/anticorpos, CRs/complemento e proteoglicanas/proteína “ligadora” de heparina).

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are antigen-presenting cells involved in the initiation of primary immune response. Human DC were obtained from peripheral blood monocytes after culturing with GM-CSF and IL-4. *Leishmania* parasites are intracellular protozoan that replicate in Mononuclear Phagocytic System cells, mainly macrophages and DCs. *Leishmania amazonensis*, a species used in our studies is associated with cutaneous infection that can become chronic lesions with a inflammatory process and small regions of hypoxia.

In this work we evaluated the role of hypoxia in a in vitro model of intracellular infection, leishmaniasis. Human DCs infection with infected by *L. amazonensis* amastigotes were performed under normoxic (21% O₂) and hypoxic (6% O₂) conditions. The phenotypic analysis of DC cultured under hypoxic condition showed a reduced expression of CD80, CD86 and CD1a compared with normoxic control. In these cell cultures, viability was not affected. Hypoxia did not affect the amastigote entrance into DCs although it modulated their functional activity reducing 30% the percentage of infected DCs. Furthermore, hypoxia did not act synergistically with IFN- γ plus LPS in DCs to induce killing of parasites. DCs activated and infected with amastigotes under hypoxic condition produced low levels of IL-12 compared with normoxic control. Moreover, in the absence of stimulation, infected DCs did not produce IL-12.

We also evaluated the leishmanicidal activity of Amphotericin-B, Glucantime and Miltefosine under normoxic and hypoxic conditions during 48 h. Under hypoxic condition, Amphotericin-B and Glucantime were less effective in *L. amazonensis* infected DCs. None effect of hypoxia was observed in Miltefosine was observed against *L. amazonensis* infected DC.

Finally, we investigated in vitro mechanisms of entry into human DCs of *L. amazonensis* amastigotes isolated from lesions in nude mice (Am nude). The DC infection rate with Am nude was approximately 36%, while opsonization of Am nude with normal human serum and infected human serum increased the DC infection rates to 60% and 62%, respectively. Heat inactivation and depletion of antibodies in sera brought the DC infection rate down to 40%. The DC infection rate was inhibited after pre-treatment of Am nude with heparin. We were unable to implicate mannose-fucose receptors in the uptake of Am nude by DCs. Our data suggest that the ability of *L. amazonensis* amastigotes to infect human DCs involves the participation of at least three multiple receptor-ligand interactions, antibodies/FcR, complement components/CR and proteoglycans/heparin-binding protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Porcentagem de células “DC-like” obtidas após cultivo de monócitos humanos	40
Figura 2: Fotomicrografia de DCs humanas	41
Figura 3: Caracterização fenotípica de DCs cultivadas na presença de 250 ng de IL4 rh e 50 ng de GM-CSF rh	43/44
Figura 4: Infecção de DCs humanas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	46
Figura 5: Infecção de DCs humanas com promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	48
Figura 6: Fotomicrografia de DCs humanas infectadas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	49
Figura 7: Efeito de um período de hipóxia de 24 horas em DCs humanas infectadas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	52
Figura 8: Efeito de um período de hipóxia de 2,5 horas em DCs humanas infectadas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	54
Figura 9: Ativação de DCs humanas com LPS e IFN- γ infectadas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> em ambiente normóxico	57
Figura 10: Ativação de células DCs com LPS e IFN- γ , infectadas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> em ambiente normóxico e hipóxico.....	58
Figura 11: Efeito da hipóxia em DCs humanas	60
Figura 12: Análise fenotípica de DCs cultivadas sob condições normóxicas e hipóxicas.....	62/63
Figura 13: Produção de IL-12p70 por DCs humanas em normóxia e hipóxia	66

Figura 14: Efeitos de drogas leishmanicidas em DCs humanas infectadas com <i>L. amazonensis</i> e mantidas sob as condições de hipóxia e normóxia	70/71
Figura 15: Efeito de Anfotericina B, Glucantime (antimônio) e Miltefosine em DCs humanas sob condições de normóxia e hipóxia.....	72
Figura 16: Infecção de DCs humanas e macrófagos de diferentes linhagens celulares com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	74
Figura 17: Infecção de DCs e macrófagos humanos com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> retirados de camundongos C3H/nude.....	75
Figura 18: Infecção de DCs humanas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> retirados de camundongos C3H/nude.....	77
Figura 19: Infecção de DCs humanas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> retirados de camundongos BALB/ce C3H/nude.....	80
Figura 20: Infecção de DCs humanas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> retirados de camundongos BALB/c e C3H/nude.....	81
Figura 21: Infecção de DCs humanas com promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	82
Figura 22: Infecção de DCs humanas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> retirados de camundongos BALB/c.....	84
Figura 23: Infecção de DCs humanas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> retirados de camundongos C3H/nude.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de cultivo de monócitos do sangue periférico humano para diferenciação em células dendríticas.....	39
Tabela 2: Comparação dos valores obtidos nas imunofenotipagens das DCs por citometria de fluxo	64
Tabela 3: Sensibilidade de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> internalizados por DCs humanas aos agentes leishmanicidas em normóxia e em hipóxia.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

CRs	Receptores para Complemento
DC	Célula dendrítica (<i>Dendritic cell</i>)
FcRs	Receptores para porção Fc de imunoglobulinas
GM-CSF (rh)	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (recombinante humano) (<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
HIF	Fator induzível por hipóxia (<i>Hypoxia-inducible factor</i>)
IFN-γ	Interferon-gama
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-2	Interleucina 2
IL-4 (rh)	Interleucina 4 (recombinante humana)
LPS	Lipopolissacarídeo
MFRs	Receptores de manose-fucose
MTT	Dimetiltiazol-2-il difenil brometo de tetrazolio [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
Th	Linfócito T “helper”
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor alfa</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 As células dendríticas	2
1.2 A leishmaniose	3
1.3 Aspectos da patogenia das lesões cutâneas	7
1.4 Resposta imune do hospedeiro.....	8
1.5 A interação <i>Leishmania</i> -DC	10
1.6 Relevância fisiopatológica da hipóxia.....	12
1.7 A hipóxia e seus efeitos em células fagocíticas.....	15
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Obtenção e manutenção do parasita	25
3.2 Obtenção e cultivo de fagócitos	25
3.2.1 Obtenção e cultivo de macrófagos e DCs humanas a partir de monócitos do sangue periférico.....	25
3.2.2 Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais murinos e linhagem celular murina J774.....	27
3.3 Imunofenotipagem das culturas de DCs através de citometria de fluxo	28
3.4 Infecção das culturas celulares com <i>L. amazonensis</i>	29
3.5 Protocolo de ativação das culturas de DCs com LPS e IFN- γ	30
3.6 O microambiente hipóxico e o cultivo das culturas de DCs humanas em hipóxia.....	30
3.7 Avaliação da produção de IL-12 pelas culturas de DCs humanas	31
3.8 Avaliação <i>in vitro</i> dos efeitos de drogas leishmanicidas em DCs humanas infectadas com <i>L. amazonensis</i> e mantidas sob as condições de hipóxia e normóxia.....	31

3.9 Avaliação da viabilidade das DCs humanas expostas à hipóxia e às drogas leishmanicidas	32
3.10 Análise da interação <i>Leishmania</i> -DC	33
3.10.1 Soros utilizados nos ensaios de opsonização dos parasitas	33
3.10.2 Reações de imunofluorescência indireta (IFI) para obtenção do título de anticorpos dos soros utilizados	33
3.10.3 Tratamento de soros humanos para inativação do Complemento e depleção de anticorpos específicos e não específicos	34
3.10.4 Opsonização dos amastigotas com soros humanos	34
3.10.5 Bloqueio de receptores de manose-fucose das DCs utilizando manana	35
3.10.6 Tratamento dos amastigotas de <i>L. amazonensis</i> com heparina	36
3.11 Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1 O modelo experimental para o estudo da hipóxia	38
4.1.1 Padronização do cultivo de DCs humanas a partir de monócitos do sangue periférico	38
4.1.2 Imunofenotipagem das culturas de DCs e macrófagos humanos através de citometria de fluxo	42
4.1.3 Infecção de DCs e macrófagos humanos com <i>L. amazonensis</i>	45
4.1.4 Avaliação dos efeitos da hipóxia na infecção de DCs humanas com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	50
4.1.5 Avaliação dos efeitos ativadores de LPS e IFN- γ na infecção de DCs com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> em condições normóxicas e hipóxicas	55
4.1.6 Análise da viabilidade de DCs humanas em condições hipóxicas	59
4.1.7 Imunofenotipagem das culturas de DCs em condições hipóxicas	61
4.1.8 Avaliação da produção de IL-12 pelas culturas de DCs humanas	65

4.2 Avaliação dos efeitos de drogas leishmanicidas em DCs humanas infectadas com <i>L. amazonensis</i> e mantidas sob as condições de hipóxia e normóxia	67
4.3 Interação <i>Leishmania</i> -DC.....	73
4.3.1 Infecção de fagócitos por amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	73
4.3.2 Opsonização dos amastigotas de <i>L. amazonensis</i> com soros humanos	76
4.3.3 Bloqueio de receptores de manose-fucose das DCs utilizando manana.....	78
4.3.4 Tratamento dos amastigotas de <i>L. amazonensis</i> com heparina	83
5. DISCUSSÃO.....	86
5.1 As culturas de DCs humanas.....	88
5.2 A infecção das DCs humanas com <i>L. amazonensis</i>	90
5.3 A exposição das DCs ao microambiente hipóxico.....	91
5.4 Produção de IL-12 pelas DCs humanas.....	95
5.5 Efeito das drogas leishmanicidas em DCs infectadas com <i>L. amazonensis</i>	98
5.6 Análise da interação <i>Leishmania</i> -DC	103
6. CONCLUSÕES	109
7. REFERÊNCIAS.....	112
ANEXO	137

INTRODUÇÃO

1.1 As células dendríticas.

As células dendríticas (DCs) foram originalmente descritas em 1973 (STEINMAN & COHN, 1973) e representam uma população de células raras no sangue periférico humano (JERAS et al., 2005).

As DCs são potentes células apresentadoras de antígenos (APC) para linfócitos T, tanto *in vivo* como *in vitro*. Ao saírem da medula óssea, as DCs migram para o sangue e tecidos periféricos, onde residem em estado imaturo, associado com a alta capacidade fagocítica (fagocitose, endocitose e pinocitose). Em contato com antígenos (componentes microbianos) e sinais estimuladores (citocinas), adquirem um fenótipo maduro e migram para os linfonodos regionais iniciando a apresentação antigênica (JERAS et al., 2005; MALDONADO-LÓPEZ & MOSER, 2001; REIS e SOUSA et al., 1999). Embora as DCs estejam presentes na maioria dos tecidos, seu número absoluto é relativamente pequeno. Dentre as células mononucleares do sangue periférico, as DCs perfazem menos de 1% deste total (ELJAAFARI et al., 1998; JERAS et al., 2005), podendo ser isoladas em pequenas quantidades. O isolamento de DCs depende de suas características físicas, tais como baixa densidade celular e morfologia dendrítica, e não apenas da expressão de marcadores específicos da linhagem celular (THOMAS et al., 1993). As DCs geradas a partir de precursores do sangue periférico e cultivadas em meio com IL4 e GM-CSF foram primeiramente descritas por Sallusto & Lanzavecchia (1994) e têm se tornado um modelo amplamente usado para estudo das DCs humanas (JERAS et al., 2005; PICKL et al., 1996; RUTAUULT et al., 1999). Após 3 a 5 dias de cultura na presença de GM-CSF e IL-4, os monócitos se diferenciam em DCs imaturas. Fatores de maturação podem ser empregados para mimetizar *in vivo* infecções ou processos inflamatórios. Compostos microbianos, como LPS,

compostos sintéticos análogos ao RNA viral, como poli I:C e citocinas como TNF- α , são exemplos de potentes estímulos de maturação das DCs (JERAS et al., 2005).

As características morfológicas das DCs cultivadas podem ser averiguadas por microscopia óptica: as células aderidas apresentam prolongamentos citoplasmáticos finos e longos e núcleo excêntrico. O fenótipo das DCs, durante o processo de diferenciação *in vitro*, pode ser determinado por citometria de fluxo (JERAS et al., 2005). DCs expressam altos níveis de moléculas do MHC de classe I e II, além de moléculas de adesão e co-estimulação como CD1a, CD11c, CD40, CD29, CD58, CD80 e CD86 e marcadores seletivos para a linhagem de DCs, como o CD83 e CD209 (ABBAS, 2003; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; JERAS et al., 2005; THOMAS et al., 1993; ZHOU & TEDDER, 1996). Assim como os linfócitos B, T, macrófagos e células NK (*natural killer*) ativados, as DCs expressam receptores para IL-2 e membros da família de receptores recentemente identificados como Toll-like (TLR) (revisto por MOLL, 2003). Foram observadas diferenças biológicas distintas entre DCs e monócitos; por exemplo, seu fenótipo de superfície, a potente capacidade de apresentar antígenos e a reduzida atividade fagocitária, indicando assim que as DCs são funcionalmente distintas dos monócitos (THOMAS et al., 1993). Todas estas observações sugerem que DCs e monócitos apresentam origem mielóide mas caminhos alternativos de diferenciação.

1.2 A leishmaniose.

A doença é conhecida desde a Antiguidade, particularmente pelos médicos árabes. Mohammad e Muna Al-Taqui citam a ocorrência da úlcera oriental por volta do século X. Mais tarde, missionários espanhóis, no século XVI, escreveram sobre o “mal do nariz” que acometia os povos situados no Peru (MEDEIROS & ROSELINO, 1999). A importância desta doença era

tamanha, que as deformações provocadas chegaram a ser registradas em peças cerâmicas por artistas da época (RATH et al., 2003). Em outros países a doença também era conhecida e recebia denominações conforme a região, por exemplo, na Síria, a leishmaniose ficou conhecida como botão d'Álepo e na Índia, a leishmaniose visceral era chamada de Kala-azar (calazar).

Cunningham, em 1885, foi quem primeiro observou os parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* em casos de calazar na Índia. Posteriormente, em 1898, Borovisky descreveu esses parasitas em casos de leishmaniose cutânea, sem, contudo, tê-los nomeado. A descrição “oficial” do parasita é atribuída a James Homer Wright que, em 1903, isolou o parasita de amostras retiradas das úlceras de uma criança armênia. Ainda em 1903, o pesquisador Willian Leishman reconheceu a semelhança do parasita com a forma arredondada observada nas infecções pelo *Trypanosoma*, e no mesmo ano o pesquisador Charles Donovan descreveu o parasita no calazar. É criado o nome *Leishmania*, por Ronald Ross em 1903, recebendo a denominação de *Leishmania donovani* o parasita causador do calazar, em homenagem aos estudos realizados por Leishman e Donovan. No Brasil, os primeiros relatos são de Moreira e Cerqueira, que, em 1885, descreveram lesões cutâneas idênticas ao botão do oriente em um foco endêmico. Em 1909, Lindenberg descreveu os primeiros casos de leishmaniose cutânea em pacientes de Bauru/SP e em 1910, Miranda descreveu o primeiro caso da forma mucosa, também no estado de São Paulo. E em 1911, Gaspar Vianna, estudando as características morfológicas do parasita, descobriu que os parasitas encontrados na América do Sul diferiam daqueles da África e Índia e descreveu uma nova espécie, a *Leishmania braziliensis* (MEDEIROS & ROSELINO, 1999).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam duas formas em seu ciclo de vida: promastigotas, que se desenvolvem no hospedeiro invertebrado, e amastigotas que vivem em fagolisossomos de fagócitos do hospedeiro vertebrado, os mamíferos. Todas as espécies do gênero são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da família Psychodidae,

subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo.

No flebotomíneo, os protozoários vivem no meio extracelular sob a forma flagelada (promastigota) e são inoculados na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. No hospedeiro vertebrado, os promastigotas são prontamente fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) como os macrófagos e as DCs. No interior da célula, o parasita se diferencia na forma amastigota que se reproduz por divisão binária até o rompimento celular, infectando novas células. Durante o repasto sanguíneo o inseto vetor pode ingerir células infectadas com amastigotas, que no seu intestino vão se transformar em formas promastigotas fechando o ciclo de vida da *Leishmania* (HANDMAN, 2001). Há aproximadamente 21 espécies de *Leishmania* patogênicas para os humanos, transmitidas por cerca de 30 espécies de dípteros (DESJEUX, 2001).

As leishmanioses são caracterizadas por um amplo espectro de manifestações clínicas sendo que estas variações dependem grandemente da espécie infectante e do estado imune do hospedeiro (HERWALDT, 1999; MELBY, 2002). No homem, a doença apresenta-se, pelo menos, com quatro manifestações clínicas: lesões cutâneas limitadas, lesões cutâneas difusas, lesões mucocutâneas e lesões viscerais que se não tratadas são fatais (DESJEUX, 2004). A *Leishmania amazonensis*, espécie utilizada em nossos estudos, causa geralmente lesões cutâneas que respondem bem ao tratamento e podem curar espontaneamente (WEIGLE & SARAIVA, 1996). No entanto esta espécie também pode provocar a forma cutânea difusa da doença caracterizada por lesões nodulares disseminadas nos membros e no rosto (GRIMALDI & TESH, 1993). O curso clínico da leishmaniose cutânea é complexo devido à variabilidade do período de incubação, da infecção subclínica, cura espontânea, propagação metastática, reativação, reinfecções e lesões crônicas (WEIGLE & SARAIVA, 1996). A *L. amazonensis* foi recentemente

isolada de pacientes com diversas formas de leishmanioses incluindo cutânea, mucosa, difusa e visceral (BARRAL et al., 1991; BARRAL et al., 1986; SAMPAIO et al., 1985).

A leishmaniose humana está distribuída no mundo todo, mas principalmente nas regiões dos trópicos e subtropicais com uma prevalência de doze milhões de casos e uma incidência de aproximadamente meio milhão de casos de leishmaniose visceral e um milhão e meio de casos de leishmaniose cutânea (World Health Organization). É importante enfatizar que a leishmaniose prevalece nos quatro continentes, sendo considerada endêmica em 88 países, dos quais 72 são países considerados em desenvolvimento (RATH et al., 2003). No Brasil, a leishmaniose é doença de notificação compulsória e 24.291 casos de leishmaniose tegumentar americana e 3.203 casos de leishmaniose visceral foram relatados em 2005. Entre 2004 e 2005, foram informadas 525 mortes (Ministério da Saúde).

Apesar do uso medicinal de compostos de antimônio já ser conhecido desde a Antiguidade para fins terapêuticos, somente em 1912, Gaspar Vianna observou que os antimoniais trivalentes eram eficazes na terapêutica da leishmaniose tegumentar americana. Atualmente, o medicamento utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes, como o Glucantime (antimoniato de metilglucamina) (RATH et al., 2003). Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e conseqüente aumento das formas resistentes de parasitas. A Organização Mundial da Saúde preconiza que as doses dos antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia, devido à sua elevada toxicidade. Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardíológicos são efeitos colaterais freqüentemente associados ao uso destas drogas (BALAÑA-FOUCE et al., 1998; RATH et al., 2003). Além dos antimoniais, outras drogas, têm sido empregadas no tratamento das diversas formas de leishmaniose, entre as quais se destacam a Anfotericina B, pentamidina, paromicina e o Miltefosine (CROFT & COOMBS, 2003).

O controle das leishmanioses esbarra no fato da doença ser uma zoonose, sendo os animais silvestres e domésticos potenciais reservatórios do parasita. O crescimento urbano desordenado tem gerado muitas dificuldades no combate aos flebotomíneos (HANDMAN, 1999). A resistência às drogas utilizadas tradicionalmente no tratamento, aliada aos efeitos colaterais destes compostos, fazem com que alternativas ao tratamento sejam estudadas (HERWALDT, 1999). Para isso, tanto o modelo *in vitro* (células cultivadas e infectadas com as formas amastigotas ou promastigotas) como o sistema *in vivo* (linhagens murinas isogênicas) têm se mostrado ferramentas úteis para estudos imunológicos, patológicos e bioquímicos (ALEXANDER et al., 1999; HANDMAN, 1999 e SOLBACH & LASKAY, 2000).

1.3 Aspectos da patogenia das lesões cutâneas.

A patogenia inicial de qualquer das leishmanioses humanas é sempre representada por um quadro inflamatório, com comprometimento de células do Sistema Monocítico Fagocitário, formando um nódulo na porta de entrada do parasita (NEVES, 2003). Os promastigotas inoculados são fagocitados por macrófagos teciduais (histiócitos) e se diferenciam em amastigotas que se multiplicam no interior do vacúolo parasitóforo, culminando na primeira manifestação clínica, o nódulo papular (WEIGLE & SARAVIA, 1996). Este nódulo é produzido por uma massa dérmica contendo macrófagos parasitados e infiltrado linfocítico (GHERSETICH et al., 1999). Esse nódulo pode regredir e curar-se dentro de poucos dias, permanecer estacionário por semanas ou evoluir rapidamente para úlceras. Essas variações dependem de fatores imunológicos, genéticos e da espécie de *Leishmania* envolvida (MURRAY et al., 2005; NEVES, 2003). Na incapacidade da célula hospedeira destruir os amastigotas, a infecção tende a se cronicar e devido à persistência e aumento da carga parasitária, o infiltrado linfocítico inicial é substituído por um denso infiltrado de macrófagos altamente parasitados levando a formação de

um granuloma macrofágico (MORAES & SILVEIRA, 1994). As lesões ulceradas geralmente se curam espontaneamente e são suscetíveis ao tratamento, como é caso das lesões provocadas por *L. amazonensis*.

Nas lesões cutâneas difusas provocadas por *L. amazonensis*, caracterizadas pelo aparecimento de nódulos, pápulas e tubérculos no rosto e membros e que raramente ulceram, também se observa abundância de macrófagos infectados, raros linfócitos e aspecto de granuloma macrofágico (GHERSETICH et al., 1999; GRIMALDI & TESH, 1993; WEIGLE & SARAVIA, 1996). Em lesões crônicas de cura mais lenta, macrófagos contendo amastigotas e o infiltrado inflamatório levam à formação de nódulos dérmicos com manifestações clínicas diversas facilmente confundidas com doenças crônicas de pele como a psoríase, varicela e carcinomas de pele (SILVEIRA et al., 2004; WEIGLE & SARAVIA, 1996).

O processo de infecção e multiplicação intracelular do parasita, frente à incapacidade do hospedeiro em diminuir a carga parasitária, pode levar à formação de um infiltrado de células mononucleares e à formação de granuloma. Este processo infeccioso deve resultar em áreas de perfusão inadequada e conseqüente hipóxia tecidual.

1.4 Resposta imune do hospedeiro.

Como *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório, não é surpresa que o controle da infecção dependa de mecanismos efetores promovidos pelos fagócitos para matar o parasita (ALEXANDER & RUSSEL, 1992).

Imediatamente após a inoculação dos parasitas no hospedeiro vertebrado, um processo inflamatório local é iniciado, envolvendo acúmulo local de células para impedir o dano tecidual e cura da lesão. Inicialmente, a lesão é infiltrada por granulócitos (neutrófilos e eosinófilos), seguido por macrófagos inflamatórios (AWASTHI et al., 2004).

Os linfócitos T “helper” (Th) têm um importante papel na resposta imune. Duas subpopulações funcionalmente distintas de linfócitos T CD4⁺, Th1 e Th2, têm sido identificadas baseado no perfil de citocinas promovido pelo próprio estímulo antigênico. A presença de IL-12 promove a diferenciação de linfócitos Th em Th1, os quais produzem grandes quantidades de IFN- γ e IL-2, e estão associadas à resposta imune mediada por células conferindo proteção durante a infecção por *Leishmania* (GHERSETICH et al., 1999). A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória produzida por fagócitos e células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos, neutrófilos, microglias e DCs) (TRINCHIERI, 2003). Por outro lado, a presença de IL-4 e IL-10, regula a diferenciação de linfócitos Th2, que por sua vez, produzem IL-4, IL-5 e IL-10 e que associadas com a imunidade humoral conferem susceptibilidade a *Leishmania* através da inibição da produção de IL-12 e de IFN- γ pelas DCs e linfócitos, respectivamente (CUNNINGHAM, 2002; GHERSETICH et al., 1999). Os dois mediadores mais bem descritos e envolvidos na morte do parasita por macrófagos ativados com IFN- γ e TNF- α são os intermediários reativos de nitrogênio como o óxido nítrico e o peroxinitrito (KANE & MOSSER, 2000; LINARES et al., 2001). Nos modelos experimentais de leishmaniose cutânea, linhagens de camundongos BALB/c são susceptíveis à infecção por *L. amazonensis* desenvolvendo resposta de tipo Th2 e alta produção de IL-10 e IL-4 enquanto a linhagem resistente C3H/HeJ apresenta resposta Th2 muito reduzida (QI et al., 2001).

Vários estudos avaliaram o papel das DCs no desencadeamento da resposta imune a protozoários intracelulares, como *Leishmania* e *Toxoplasma* (SCOTT & HUNTER, 2002). DCs esplênicas murinas e DCs derivadas de monócitos humanos produzem IL-12 após infecção com *Leishmania* (GHOSH & BANDYOPADHYAY, 2004). Complementando tais observações, foi verificado *in vitro* que DCs de linhagens resistentes C57BL/6 (e que apresentam resposta do tipo

Th1) infectadas com *L. major* liberam grandes quantidades de IL-12, levando à conclusão de que esta citocina deve ter um papel importante na cura da doença (HENRI et al., 2002). Em contraste, macrófagos murinos (tanto de linhagens resistentes como susceptíveis) que fagocitaram promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* não produziram IL-12 em resposta a estímulos pró-inflamatórios (CARRERA et al., 1996), concluindo-se que esta citocina é produzida pelas DCs durante a resposta imune às infecções. Porém, há uma certa ligação dessa produção de IL-12 com a espécie de *Leishmania* em questão. DCs humanas produziram IL-12 após infecção com *L. major* e co-estimulação com ligante de CD40 (CD40L), mas não se verificou presença de IL-12 com *L. tropica* e *L. donovani* (McDOWELL et al., 2002). De forma semelhante, *L. mexicana* também não induziu produção de IL-12 por DCs murinas (BENNETT et al., 2001). Por outro lado, infecção de DCs murinas com *L. amazonensis* co-estimuladas com CD40L induziram produção de IL-12 (QI et al., 2001). Esses estudos sugeriram que a produção de IL-12 requer dois sinais, um de origem microbiana e outro vindo do hospedeiro. Em alguns casos requer citocinas que trabalham em conjunto ao CD40L, como o IFN- γ . A necessidade de um sinal microbiano garante um controle da produção de IL-12 pelas DCs apenas no momento apropriado (GHOSH & BANDYOPADHYAY, 2004). Estes estudos indicam que há um comportamento diferente das DCs frente a espécies diferentes de *Leishmania*. Dados comparativos como estes inexistem para DCs humanas e *L. amazonensis*.

1.5 A interação *Leishmania*-fagócitos mononucleares.

***Leishmania*-macrófagos**

Sabe-se que promastigotas de *Leishmania* podem infectar macrófagos via receptor para domínio Fc de imunoglobulinas (FcR), para o Complemento (CR) e receptor de manose-fucose (MFRs) (BLACKWELL et al., 1985; CHAKRABORTY et al., 2001; MOSSER & EDELSON, 1985; WILSON & PERSON, 1986). Pouco se sabe sobre as moléculas que participam da entrada de amastigotas na célula hospedeira. Os receptores de macrófagos sugeridos são FcRs, CRs e proteoglicanas ricas em sulfato de heparana (GUY & BELOSEVIC, 1993; KIMA et al., 2000; LOVE et al., 1993; PETERS et al., 1995). Assim, a entrada de *Leishmania* no macrófago envolve a deposição de componentes do Complemento e anticorpos e a presença de manose e proteínas ligadoras de heparina na superfície do parasita (BLACKWELL et al., 1985; GUY & BELOSEVIC, 1993; KIMA et al., 2000; LOVE et al., 1993; PETERS et al., 1995).

***Leishmania*-DC**

Embora macrófagos sejam os principais alvos de todas as espécies de *Leishmania*, inúmeros estudos demonstraram a infecção de DCs por este parasita (AWASTHI et al., 2004; BRANDONISIO et al., 2004; GHOSH & BANDYOPADHYAY, 2004; SCOTT & HUNTER, 2002). Como comentado anteriormente, a interação entre as DCs e os linfócitos T é essencial para a geração de imunidade mediada por célula e assim as DCs desempenham um papel importante na iniciação desta resposta imune contra *Leishmania*. Recentemente, as opsoninas requeridas para a fagocitose da *Leishmania* pelas DCs têm sido estudadas. Embora Blank et al. (1993) tenham sugerido que a fagocitose de *L. major* por células de Langerhans murinas ocorra através de receptores para o Complemento, estudos mais recentes indicam que a infecção das DCs murinas ocorre predominantemente via FcRs (WOELBING et al., 2006). Colmenares et al. (2004) demonstrou que a lectina tipo C (DC-SIGN) é o receptor em DCs humanas para promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e *L. pifanoi*, mas não para *L. major* (CAPARRÓS et al., 2005;

WOELBING et al., 2006). Além disso, amastigotas de *L. pifanoi* opsonizados com soro de pacientes com leishmaniose apresentaram baixa capacidade de se ligar às DCs (COLMENARES et al., 2004). No caso de *L. amazonensis*, apenas um estudo foi realizado e mostrou que a opsonização de amastigotas retirados de lesões de camundongos “nude” com soro imune aumentaram a taxa de infecção de DCs murinas (PRINA et al., 2004). Estes dados aparentemente conflitantes sugerem que a interação entre DCs e *Leishmania* é espécie-específica e que a infecção da célula hospedeira pela *Leishmania* envolve a participação de vários sistemas receptor-ligante.

1.6 Relevância fisiopatológica da hipóxia.

Em condições fisiológicas as células em organismos pluricelulares necessitam de oxigênio para obtenção de energia. Em tecidos normais, a tensão de oxigênio (ou pressão parcial de oxigênio, pO_2) varia de 20 a 70 mmHg (2,5% a 9% de O_2). Em tecido cutâneo, por exemplo, a pO_2 é de 50-60 mmHg, no fígado a pO_2 venosa está entre 30-35 mmHg e em tecido muscular é aproximadamente 25 mmHg (LEWIS et al., 1999; ZHOU et al., 2000). Diante desta ampla faixa de tensão de oxigênio em tecidos saudáveis, torna-se difícil estabelecer um valor universal que defina a hipóxia. Assim, uma definição mais funcional incluiria o conceito de que a hipóxia ocorre quando o fornecimento de oxigênio é insuficiente para a demanda do tecido, ou ainda, a hipóxia é uma diminuição local na tensão de oxigênio (PAPANDREOU et al., 2005; QU et al., 2005). Enfim, a hipóxia celular pode surgir de circunstâncias fisiológicas tais como exercícios físicos ou viagens para locais mais elevados, bem como de condições patofisiológicas. A diferença é que enquanto as circunstâncias fisiológicas resultam frequentemente em uma hipóxia branda e transitória, a condição patológica resulta num déficit de oxigênio mais severo e por um longo período de tempo (PAPANDREOU et al., 2005).

Em várias patologias observam-se períodos prolongados de reduzido fluxo sanguíneo, vasoconstrição e proliferação celular, resultando em queda acentuada de pO_2 tecidual. A perfusão deficiente causa a formação de microambientes hipóxicos, característicos de neoplasias, arteriosclerose, fraturas ósseas, artrite reumatóide e reações inflamatórias em geral (HUNT, 1984; LEWIS et al., 1999; NIINIKOSKI & HUNT, 1972). Em tecido dérmico lesado experimentalmente, a pO_2 apresentou-se entre 5-28 mmHg com a área central da lesão composta de fibrina, plasma, infiltrado leucocitário e tecido conectivo apresentando os níveis mais baixos de pO_2 (REMENSNYDER & MAJNO, 1968). A presença da hipóxia nessas lesões tem sido relacionada à indução de citocinas angiogênicas e a síntese de proteínas da matriz extracelular (SHWEIKI et al., 1992). Recentemente Lokmic et al. (2006), utilizando um modelo de lesão cutânea induzida em ratos, mostrou que hipóxia tem papel importante no processo de formação de tecido de granulação, crescimento vascular e tecidual, remodelamento e cicatrização da lesão. De maneira similar, em condições patológicas crônicas, a insuficiência no suprimento de oxigênio tissular, freqüentemente devido à obstrução vascular (trombos), compressão vascular por elevação da pressão hidrostática ou aumento da densidade celular tecidual (granulomas e tumores), leva à alteração do perfil fenotípico das células (IKEDA, 2005). Desse modo, o tecido hipóxico tem um papel importante no curso clínico de diversas doenças. A contribuição do microambiente tissular na progressão da doença é freqüentemente mediada pelo remodelamento vascular (angiogênese) e pela perda de estruturas vasculares específicas (IKEDA, 2005).

Sabe-se, ainda, que a hipóxia, verificada numa série de tumores malignos, pode limitar a ação de drogas quimioterápicas favorecendo assim a sobrevivência de tumores. Koch et al. (2003) investigaram a eficiência de agentes quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação em linhagem de células tumorais TGCT. Os resultados mostraram que, sob condições hipóxicas (1% de O_2) todas as drogas foram menos efetivas. No entanto, o impacto da hipóxia na

quimiosensibilidade depende fortemente da linhagem celular estudada. Exemplos de classes de drogas funcionalmente afetadas pela hipóxia incluem os agentes alquilantes tais como melfalan e antibióticos como a bleomicina (YUN et al., 2004). A hipóxia também afeta a eficiência de drogas cuja ação depende do dano oxidativo, como por exemplo, a Anfotericina B. Segundo Sokol-Anderson et al. (1986) a evidência para este papel do oxigênio na toxicidade da Anfotericina B foi comprovada pela drástica redução na lise de protoplastos de *Candida albicans* vista sob condições de hipóxia. Os efeitos da hipóxia nas drogas e conseqüentemente na progressão de tumores fizeram com que testes *in vitro* fossem desenvolvidos para prever as concentrações terapêuticas dos agentes quimioterápicos em condições de hipóxia fisiológica (GRIGORYAN et al., 2005).

Apesar da hipóxia ter sido, por muito tempo, relacionada a efeitos deletérios como inibição da proliferação e morte celular (JACOBSON & RAFF, 1995; YUN et al., 1997a), vários estudos recentes sugerem que as alterações na pO_2 são fisiologicamente importantes. Alterações na pO_2 levam o organismo a um processo adaptativo circunstancial, pelo aumento do volume respiratório, do débito cardíaco ou da hematopoiese e da glicólise anaeróbica, com a finalidade de restaurar os níveis fisiológicos de oxigênio. As respostas celulares a hipóxia variam de mudança no fluxo de íons na membrana plasmática e alterações na proliferação a indução de genes específicos e apoptose (HELFMAN & FALANGA, 1993; LEWIS et al., 1999; YUN et al., 1997a). A produção de TGF- β (*transforming growth factor-beta*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*) e VEGF (*vascular endothelial cell growth factor*) por células expostas à hipóxia estão relacionadas ao processo de angiogênese durante o desenvolvimento de tumores e a cura de lesões teciduais (FALANGA et al., 1991; YUN et al., 1997a).

Muitos genes que são regulados e/ou transcritos durante a hipóxia devem estar envolvidos no processo de adaptação celular a este microambiente. A hipóxia pode influenciar a expressão

gênica de aproximadamente 1% dos genes num genoma (PAPANDREOU et al., 2005). Mudanças ocorrem na expressão de uma variedade de citocinas, fatores de crescimento como o hormônio eritropoietina (EPO) e o já citado VEGF, além de enzimas glicolíticas e os reguladores do estado redox celular como o NADPH. Mudanças ocorrem também na expressão de vários fatores de transcrição como AP-1 (*activator-protein 1*), NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) e HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) (SEMENZA & WANG, 1992). O HIF-1 é o fator de transcrição mais bem estudado na resposta a hipóxia, já que ele é o mediador da ativação transcricional de genes induzidos por hipóxia em tumores (YUN et al., 2004).

Vários estudos demonstraram a ativação do HIF-1, em resposta a um estresse hipóxico, em doenças crônicas. Por exemplo, Schultz et al. (2006), demonstraram ativação de HIF-1 em células musculares lisas em condições hipóxicas durante a evolução de doenças vasculares (obstrução vascular). Outros trabalhos mostraram que o HIF-1 tem papel central na progressão de tumores sólidos (ZAGZAG et al., 2000; YUN et al., 2004). E mais recentemente, nosso grupo verificou a presença de HIF-1 em processos inflamatórios durante a leishmaniose murina (ARRAIS-SILVA et al., 2005). A expressão de HIF-1 foi avaliada em lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Análises por imunohistoquímica das lesões evidenciaram pela primeira vez que macrófagos no microambiente lesional causado por um parasita produzem HIF, sugerindo a presença de hipóxia nas lesões.

1.7 A hipóxia e seus efeitos em células fagocíticas.

Em reações inflamatórias observa-se o acúmulo de células com capacidade fagocítica como os neutrófilos, os macrófagos e as DCs. Nesses focos teciduais a pO_2 é reduzida devido ao

rompimento de vasos sanguíneos, perfusão deficiente e proliferação celular (LEWIS et al., 1999; SHWEIKI et al., 1992).

Neutrófilos

Os neutrófilos são células pré-adaptadas a hipóxia porque possuem um número reduzido de mitocôndrias e grande parte de sua energia é obtida por anaerobiose (BABIOR, 1984). Além disso, observou-se que em cultura, neutrófilos mantidos em hipóxia sobrevivem por mais tempo que as mesmas células em normóxia (LEWIS et al., 1999).

Macrófagos

Os macrófagos, dependendo do estado de ativação e da sua localização, apresentam antígenos, secretam uma variedade de fatores regulatórios, enzimas e citocinas, e tem atividades anti-tumoral e microbicida (AYALA et al., 1996; McCORMICK et al., 2000). Estas células que se acumulam no centro ou nas adjacências de áreas hipóxicas e pouco vascularizadas de tecidos lesados (LEWIS et al., 1999), são capazes de funcionar sob condições de hipóxia. Há vários efeitos da hipóxia no fenótipo e nas funções de macrófagos. Experimentos com células murinas da linhagem RAW 264.7 ou com macrófagos humanos expostos a baixas concentrações de oxigênio mostraram que estas células sobrevivem e se adaptam quando expostas a hipóxia *in vitro* (TSUKAMOTO et al., 1996; YUN et al., 1997b). A exposição de macrófagos alveolares a um período crônico de hipóxia (96 horas), por exemplo, reduziu a atividade da citocromo oxidase, uma enzima envolvida na fosforilação oxidativa, e aumentou a atividade da piruvato quinase e de outras enzimas glicolíticas (BUTTERICK et al., 1981). Estas observações sugerem que os macrófagos se adaptam à falta de oxigênio, alterando seu metabolismo para vias glicolíticas anaeróbias para produção de ATP, semelhantes às células tumorais sob condições de

pO₂ reduzida (LEWIS et al., 1999). Apesar dos macrófagos se adaptarem a hipóxia obtendo energia para algumas funções, estas células necessitam de oxigênio para o “burst” respiratório e para a regulação do pH intravacuolar a níveis ótimos para a atividade das enzimas lisossomais (BABIOR, 1984; DU et al., 1998). Assim, a falta de oxigênio para a realização destas atividades pode explicar, em parte, os estudos relacionando hipóxia à inibição de fagocitose. Além disso, vários autores sugerem que os efeitos dos baixos níveis de pO₂ são os responsáveis pela exocitose que ocorre durante a hipóxia (CHAUDRY, 1983; CHEUNG et al., 1986; LEEPER-WOODFORD et al., 1993).

A resposta de macrófagos a pO₂ reduzida também envolve a produção de várias citocinas pró-inflamatórias e de fatores quimiotáticos, como IL1, TNF, IL6, IL8 e MIP (*macrophage inflammatory protein 1 alpha*). Os dados foram obtidos com culturas primárias de monócitos humanos, macrófagos murinos e linhagens celulares (THP-1, RAW264.7, J774, P388D), na maioria pré ou pós-tratadas com LPS (ALBINA et al., 1995; LEEPER-WOODFORD & DETMER, 1999; SCANELL et al., 1993; VANOTTEREN et al., 1995; WEST et al., 1994).

A atividade fagocítica dos macrófagos também pode ser alterada sob baixas concentrações de oxigênio. Leeper-Woodford & Mills (1992) mostraram que a hipóxia aguda (1,7% de O₂) diminuiu a entrada de hemácias em macrófagos alveolares de coelho, sem alterar a viabilidade e a aderência destas células. Porém os primeiros trabalhos mostrando os efeitos *in vitro* da hipóxia durante infecções provêm do nosso grupo, nos quais avaliamos o efeito da hipóxia (6% de O₂) em culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Nosso grupo observou que nestas culturas mantidas em hipóxia por 24 horas houve redução significativa na porcentagem de células infectadas, bem como no número de amastigotas intracelulares, quando comparado à normóxia (COLHONE et al., 2004). Em outro estudo, a baixa tensão de oxigênio diminuiu em 50% a expressão de HSP70 (*heat shock protein 70 kDa*) em culturas de macrófagos

expostas a hipóxia quando comparadas com a expressão desta proteína em condições normóxicas (DEGROSSOLI et al., 2004). Sequencialmente, surgiram trabalhos mostrando os efeitos da hipóxia no processo infeccioso por outros patógenos intracelulares. Peyssonnaud et al. (2005) demonstraram expressão aumentada de HIF-1 α por macrófagos murinos infectados em normóxia com bactérias piogênicas tais como *Streptococcus* do grupo A, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Tais bactérias são causadoras de infecções invasivas com conseqüente isquemia tecidual e queda da pO₂. O HIF produzido regulou a capacidade bactericida destes macrófagos. A incubação dos macrófagos com a bactéria viva ou inativada em normóxia estimulou a transcrição gênica de HIF a níveis comparáveis ou maiores que os níveis vistos no controle hipóxico. Spear et al. (2006) também mostraram que a expressão de HIF pode ser ativada pelo protozoário intracelular *Toxoplasma gondii* que requer a presença deste fator para seu crescimento e sobrevivência a concentrações de 3% de O₂.

Células dendríticas

São escassos os dados da literatura sobre o comportamento das DCs em ambiente hipóxico. Murata et al., (2002) verificaram que DCs e MØs murinos produziram mais IFN- γ sob hipóxia e na presença de IL-18. Segundo estes autores, o ambiente hipóxico ajudaria a modificar a resposta de MØs e DCs em tecidos inflamados e assim modular as funções destas células durante a resposta imune/inflamatória através do perfil de citocinas produzido, especialmente IFN- γ . Considerando a produção aumentada de IFN- γ pelas APCs (MØs e DCs) sob hipóxia, esta condição funcionaria como um “co-fator” na ativação de APCs em tecidos inflamados (MURATA et al., 2002). Sabe-se ainda que a hipóxia é um estímulo capaz de modular a expressão de genes específicos envolvidos no recrutamento leucocitário, como genes para

metaloproteinases de matriz (MMP) e seus inibidores teciduais (TIMP) (QU et al., 2005). Neste contexto, Qu et al. (2005) mostraram que DCs humanas derivadas de monócitos sob condições hipóxicas (1% de O₂) tiveram a capacidade migratória reduzida quando comparada com o controle em normóxia. Além disso, o grupo verificou mudanças fenotípicas moderadas nestas culturas expostas a hipóxia, como a diminuição nos níveis de expressão de HLA-DR e moderado aumento de CD83. Já Goth et al. (2006) adaptaram o protocolo de obtenção de DCs murinas derivadas da medula óssea para um ambiente de baixa tensão de oxigênio (2%, 5% e 10% de O₂). Estes pesquisadores observaram que culturas a 5% ou 10% de oxigênio geraram uma porcentagem maior de DCs maduras e imaturas e que estas células eram fenotipicamente e funcionalmente equivalentes àsquelas geradas em condições convencionais usando oxigênio ambiente. Concluiu-se desse modo, que a tensão de oxigênio *in vitro* pode influenciar significativamente o processo de maturação das DCs.

Os dados aqui resumidos permitem concluir que a hipóxia é uma situação a que os macrófagos e DCs se adaptam alterando o seu metabolismo, funções e fenótipo. Sendo assim, a análise do comportamento de DCs e macrófagos à hipóxia durante infecções é importante para avaliar a relevância dos mecanismos aqui discutidos na progressão de patologias e no desenvolvimento de terapias.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho relacionam-se à compreensão do papel deletério e/ou terapêutico da hipóxia em modelos *in vitro* de uma infecção intracelular, como a leishmaniose e à análise da ligação *Leishmania*-célula dendrítica. Especificamente, nossos objetivos foram:

- Avaliar mudanças fenotípicas e funcionais de DCs humanas submetidas a ambiente com reduzida pO_2 tais como: resistência/susceptibilidade a infecção com *L. amazonensis*, resposta a LPS e a citocina IFN- γ , produção de citocina IL-12.
- Analisar o efeito de drogas leishmanicidas em culturas de DCs humanas infectadas com *L. amazonensis* e mantidas sob condições de hipóxia e normóxia.
- Investigar o processo de infecção, ou seja, os ligantes necessários para a infecção de DCs por *L. amazonensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Lista de compostos utilizados e procedências:

Anfotericina B	Sigma ¹
Anti-IgG humana conjugada com FITC	Sigma
Azul de Evans	Allkimia ²
Bicarbonato de sódio	Sigma
GM-CSF recombinante humano	Sigma
Gentamicina	Sigma
Giemsa	Sigma
Glucantime	Aventis ³
Heparina	Cristália ⁴
Hepes (Ácido hidroeti lpiperazina etanosulfúrico)	Sigma
Histopaque	Sigma
IFN- γ recombinante humano	R&Dsystems ⁵
IL4 recombinante humana	Sigma
Lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i>	Sigma
Manana	Sigma
Meio ISCOVE'S	Sigma
Meio RPMI 1640	Nutricell ⁶
Miltefosine	Cayman ⁷
Soro fetal bovino	Nutricell
Tampão de dissociação	Sigma
Trypan Blue	Sigma

¹ Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri, USA.

² Allkimia, Campinas, São Paulo, Brasil.

³ Sanofi-Aventis, São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁴ Lab. Cristália, Campinas, São Paulo, Brasil.

⁵ R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA.

⁶ Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil.

⁷ Cayman, Ann Arbor, Michigan, USA.

3.1 Obtenção e manutenção do parasita.

O parasita utilizado em nosso trabalho foi a *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269). Formas amastigotas foram mantidas em camundongos BALB/c através da inoculação subcutânea de 2×10^6 parasitas no coxim plantar da pata do animal. Os amastigotas foram retirados de lesões desenvolvidas nas patas, através de raspagem com bisturi estéril em solução salina contendo Gentamicina (25 mg/l). A suspensão obtida foi filtrada em gaze estéril para a retirada de resíduos teciduais (CANTOS et al., 1993). O mesmo procedimento foi utilizado para a retirada de amastigotas das lesões de camundongos C3H/nude. O número de amastigotas foi contado em câmara de Neubauer. Para a diferenciação em promastigotas, frascos de cultura com amastigotas foram mantidos em meio RPMI 1640 (suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10mM de HEPES e 25 mg/l Gentamicina) em estufa seca a temperatura de 26°C a 28°C.

Foram utilizados camundongos isogênicos das linhagens BALB/c e C3H/nude com 4 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multi-Institucional de Bioterismo – CEMIB/UNICAMP sob condição SPF (*Specific Patogen Free*) e mantidos sob as mesmas condições no Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia – UNICAMP (trabalho autorizado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia/UNICAMP, protocolo nº 770-1, de 17 de fevereiro de 2005).

3.2 Obtenção e cultivo de fagócitos.

3.2.1 Obtenção e cultivo de macrófagos e DCs humanas a partir de monócitos do sangue periférico.

Tanto para as culturas de DCs como para macrófagos, sangue periférico de voluntários saudáveis foi coletado em tubos a vácuo contendo heparina sódica como anticoagulante

(Vacuette). As alíquotas foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,5 para a separação da camada de células brancas por gradiente de Histopaque, segundo protocolo do fabricante. A camada de leucócitos coletada (na qual se encontram também os monócitos) foi lavada em PBS e ressuspensas em meio ISCOVE'S suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado a 56°C por 1 hora, 20 mM de Bicarbonato de sódio e 25 µg/ml de Gentamicina. O número de células e viabilidade foram determinados por Tripán Blue em câmara de Neubauer. O cálculo do número de monócitos foi feito multiplicando-se o número total de células pela porcentagem de monócitos e pela diluição. Para posterior análise microscópica, utilizamos $0,5 \times 10^6$ monócitos por lamínula de 13 mm de diâmetro colocadas em placa de 24 poços (TRP) ou $0,1 \times 10^6$ monócitos/poço em lâminas de culturas (Nunc). Para as análises fenotípicas, utilizou-se garrafas de cultura (TRP) de 25 cm² contendo $0,5 \times 10^6$ células/ml.

O cultivo de macrófagos humanos já havia sido padronizado em nosso laboratório (protocolo adaptado de BOSQUE et al., 1998 e DORTA, 1997). A diferenciação ocorreu ao longo de 7 dias de cultura em estufa incubadora (37°C, 21% O₂, 5% CO₂). A troca de meio ISCOVE'S nas culturas contendo células aderentes foi realizada às 24 horas e 96 horas do início do cultivo (BOSQUE et al., 1998; DORTA, 1997).

Para as DCs, os monócitos distribuídos em placas, lâminas ou garrafas de cultura foram incubados a 37°C, 21% O₂, 5% CO₂ por 2 horas para aderência. Após este período, as culturas foram lavadas e as células aderentes cultivadas em meio ISCOVE'S suplementado com 10% de soro fetal bovino, GM-CSF e IL-4 durante 7 ou 10 dias (NAIR et al., 1998), não havendo mais troca de meio de cultura. Durante a padronização de nosso protocolo foram utilizados GM-CSF e IL-4 recombinante humanos e sobrenadantes de culturas celulares humanas produtoras de tais

citocinas: H28 (produção de IL-4 – ATCC: HTB9) e 5637 (produção de GM-CSF – ATCC: CCL-2). As condições testadas estão descritas no item Resultados (Tabela 1).

Após o período de cultura, os sobrenadantes foram colhidos e armazenados a -70°C e as lamínulas com as células foram fixadas em Metanol P.A. (15 minutos) e coradas com Giemsa por 10 minutos (GIORGIO et al., 1998). A análise morfológica das culturas e a contagem de células foram realizadas em microscópio óptico (Nikon modelo 50i, Melville, New York, USA) e fotografadas através do sistema Image Pro Plus 2000 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). As imagens confirmaram a morfologia condizente a macrófagos e DCs humanas.

3.2.2 Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais murinos e linhagem celular murina J774.

Camundongos BALB/c foram sacrificados por deslocamento cervical e com o auxílio de seringa estéril, injetou-se 15 ml de solução salina estéril acrescida de Gentamicina no peritônio do animal. O abdômen foi massageado cuidadosamente e a pele rebatida; novamente introduziu-se a seringa na cavidade peritoneal para a retirada do exsudato, armazenando-o em frasco imerso em banho de gelo. O número de células foi contado em câmara de Neubauer, considerando que 50% a 60% das células obtidas constituíam-se de macrófagos (BARBIERI et al., 1993). As células foram então distribuídas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm de diâmetro a uma concentração de 5×10^5 macrófagos/lamínula e deixadas por 2 horas à temperatura ambiente para aderência dos mesmos. Após a adesão, as células não aderentes foram retiradas e adicionou-se meio RPMI 1640. A cultura foi mantida em estufa incubadora a 37°C , 5% CO_2 , O_2 atmosférico durante 24 horas.

Os macrófagos da linhagem J774 foram obtidos da American Type Culture Collection – ATCC (Rockville, Maryland, USA) e mantidos em nosso laboratório nas condições descritas por Linares et al. (2000). As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado 10% de soro fetal bovino em garrafas de cultura plásticas de 25 cm² e mantidas em estufa incubadora a 37°C, 5% CO₂, O₂ atmosférico e repicadas a cada 7 dias.

3.3 Imunofenotipagem das culturas de DCs através de citometria de fluxo.

A análise morfológica das culturas foi complementada através de ensaio por imunofenotipagem das culturas por citometria de fluxo para um grupo pré-determinado de marcadores de superfície celular (MAROVICH et al., 2000; McDOWELL et al., 2002; PICKL et al., 1996; THOMAS et al., 1993). Para a análise fenotípica, as DCs foram cultivadas em garrafas de 25 cm² segundo metodologia descrita no subitem 3.2 de Materiais e Métodos. A análise das DCs foi gentilmente realizada pela Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, com colaboração dos Drs. Dimas T. Covas e Patrícia Palma. As células foram coletadas através do Tampão de Dissociação (Sigma), lavadas em meio ISCOVE'S e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente com os seguintes anticorpos marcados com fluorocromos Ficoeritrina (PE) ou Isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ainda Proteína clorofila peridinina (PerCP) (BD Biosciences, San Jose, California, USA): anti-HLA-DR, anti-CD40, anti-CD80, anti-CD123, anti-CD86, anti-CD83, anti-CD1a, anti-CD11c, anti-CD14, anti-CD3, anti-CD19, anti-CD16, anti-CD56. Os últimos quatro anticorpos foram agrupados na análise e descritos como “Lineage”. Os isotipos utilizados foram IgG2a+PE ou PerCP e IgG1+FITC. Foi utilizado aparelho FACsort Cytometer (BD Biosciences) e os resultados analisados pelo programa CellQuest Software (BD Biosciences). Os resultados foram avaliados quanto à porcentagem de células positivas para tais

marcadores de superfície e apresentados em forma de número (porcentagem) e histogramas (intensidade média de fluorescência emitida para cada marcador).

3.4 Infecção das culturas celulares com *L. amazonensis*.

Os protocolos para infecção das linhagens humanas foram baseados nos trabalhos de Marovich et al. (2000), McDowell et al. (2002) e Norsworthy et al. (2004).

DCs humanas foram infectadas com *L. amazonensis* no dia 7 de cultura e mantidos em condições de normóxia (estufa incubadora a 37°C, 21% O₂, 5% CO₂) por 24, 48 ou 72 horas ou em condições de hipóxia (descrição no subitem 3.6 de Materiais e Métodos). As DCs foram infectadas com formas amastigotas e promastigotas na proporção de 3 parasitas e 10 parasitas para cada célula, respectivamente. Foram utilizados também promastigotas opsonizados com 5% de soro normal humano (MAROVICH et al., 2000).

A infecção de macrófagos humanos com amastigotas de *L. amazonensis* retirados de camundongos BALB/c já havia sido padronizada em nosso laboratório (ALBUQUERQUE, 2005).

Macrófagos peritoneais murinos e a linhagem murina de macrófagos J774 também foram infectados com objetivo comparativo (proporção de 3 e 10 amastigotas para cada macrófago peritoneal e macrófago J774, respectivamente, durante 24 horas). Foram utilizados também amastigotas retirados de camundongos C3H/nude para os ensaios de opsonização dos parasitas e bloqueio da infecção das DCs (descrito no subitem 3.10 de Materiais e Métodos).

Para avaliar o número de células, de parasitas e a porcentagem de infecção as lamínulas com células aderidas foram coradas por Giemsa, como descrito no subitem 3.2 de Materiais e Métodos, e avaliados em microscopia óptica. Os sobrenadantes das culturas infectadas também foram colhidos e armazenados a -70°C.

3.5 Protocolo de ativação das culturas de DCs com LPS e IFN- γ .

Inicialmente foram testados alguns períodos de ativação baseados em dados já publicados (McDOWELL et al., 2002; MOSCA et al., 2000; SNIJDERS et al., 1998). No dia 6 de cultura, as DCs (5×10^5 células/ml) foram incubadas com a linfocina recombinante humana IFN- γ a 10 ng/ml e LPS a 100 ng/ml durante 8 ou 24 horas antes da infecção ou ainda junto com o parasita, ou seja, no momento da infecção. Esta padronização foi realizada apenas em condições normóxicas. Com os resultados obtidos, os experimentos foram repetidos e padronizados com LPS e IFN- γ ambos a 100 ng/ml por um período de 24 horas. Em seguida as culturas foram infectadas com amastigotas de BALB/c e submetidas ao microambiente hipóxico (subitem 3.6 de Materiais e Métodos). Os sobrenadantes destas culturas foram colhidos e armazenados a -70°C .

3.6 O microambiente hipóxico e o cultivo das culturas de DCs humanas em hipóxia.

Para estabelecer o ambiente hipóxico utilizou-se uma câmara incubadora modular (Billups-Rothenberg, modelo MIC 101, Del Mar, California, USA). A câmara foi preenchida durante 15 minutos com uma mistura gasosa contendo 2% de O_2 , 5% de CO_2 , balanceada com Nitrogênio (N_2) (White-Martins, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, as mangueiras de entrada e saída de gás foram fechadas e a câmara contendo as placas de cultura foi mantida em estufa a 37°C , 5% de CO_2 , O_2 atmosférico. Para aferir o grau de hipóxia dentro da câmara utilizou-se analisador de gás com uma solução absorvente de oxigênio (Fyrite – Bacharach Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). A concentração de O_2 dentro da câmara foi de 6%. A tensão de oxigênio no meio de cultura foi de 37 mmHg para a condição de hipóxia e de 150 mmHg para normóxia (O_2 Analyzer YSI/53, Yellow Springs Instruments Inc., Yellow Springs, Ohio, USA) conforme analisado em nosso laboratório e descrito por Colhone et al. (2004). O pH do meio de cultura foi

de 7.4 e não apresentou alterações significativas durante o curso dos experimentos. Assim, as células expostas à condição de 6% de O₂, 5% de CO₂, balanceado com N₂ foi referida como hipóxia e a exposição a 21% O₂, 5% CO₂, balanceado com N₂ referida como normóxia.

Diferentes tempos e intervalos de exposição a hipóxia foram testados, conforme será exposto em Resultados. Culturas controles de DCs foram mantidas em ambiente normóxico (estufa incubadora a 37°C, 21% O₂, 5% CO₂) durante todo o decorrer do experimento.

3.7 Avaliação da produção de IL-12 pelas culturas de DCs humanas.

A pesquisa de IL-12 foi feita no sobrenadante das culturas de DCs humanas obtidas de acordo com os subitens 3.2, 3.4 e 3.5 de Materiais e Métodos. A quantificação de IL-12 foi determinada através do “kit” para ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) BD OptEIA Set Human IL-12 (p70) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California, USA) conforme descrição do fabricante. A densidade óptica foi medida a 450 nm no leitor de microplacas de ELISA Synergy HT Multi-Detector Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, Vermont, USA). Os valores de absorbância foram convertidos em pg/ml através do programa KC4 (Bio-Tek). As amostras foram analisadas em triplicata em 4 dosagens separadas.

3.8 Avaliação *in vitro* dos efeitos de drogas leishmanicidas em DCs humanas infectadas com *L. amazonensis* e mantidas sob as condições de hipóxia e normóxia.

Os ensaios foram adaptados dos protocolos de Callahan et al. (1997), Escobar et al. (2002), Verma & Dey (2004) e Azzouz et al. (2005) e realizados com as drogas Anfotericina B, Glucantime (Antimoniato de meglumina) e Miltefosine. No momento do uso, as drogas foram preparadas em solução PBS estéril (para Anfotericina B e Miltefosine) ou meio ISCOVE’S (para Glucantime) nas diferentes concentrações testadas. Culturas de DCs humanas foram preparadas e infectadas com

amastigotas de *L. amazonensis* como descrito nos subitens 3.2 e 3.4 de Materiais e Métodos. Após 24 horas de infecção em normóxia, as culturas foram lavadas e incubadas com meio fresco contendo as citocinas recombinantes GM-CSF e IL-4 e diferentes concentrações das drogas (Anfotericina B, Glucantime e Miltefosine). As culturas foram mantidas sob condições de normóxia e hipóxia durante 48 horas. Após este período, as lamínulas foram coradas por Giemsa e avaliadas em microscopia óptica, como descrito no subitem 3.2 de Materiais e Métodos. A atividade de cada composto foi determinada através do índice de infecção que é a porcentagem de DCs infectadas multiplicada pelo número médio de amastigotas por DC infectada (PEREIRA et al., 2005).

Através dos índices de infecção, o valor correspondente a IC₅₀ (a concentração da droga que diminuiu o índice de infecção em 50%) de cada droga pode ser calculado. Os dados sob ambas as condições, normóxia e hipóxia, foram submetidos à análise de regressão Probit utilizando-se o programa POLO-PC (LeOra Software 1987, Berkeley, Califórnia, USA) para se estabelecer o valor da IC₅₀.

3.9 Avaliação da viabilidade das DCs humanas expostas à hipóxia e às drogas leishmanicidas.

A viabilidade das DCs humanas foi determinada através do teste de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MOSMANN, 1983). As DCs humanas foram cultivadas em placas de 96 poços (TRP) a 3×10^4 células/poço e mantidas em hipóxia ou normóxia por 24 horas ou 48 horas na presença ou não das drogas Anfotericina B (0,3 µg/ml), Glucantime (25 µg/ml) e Miltefosine (5 µM). Em cada poço, foi adicionado 10% de solução de MTT e as placas foram incubadas a 37°C por 4 horas. Após este período, foi retirado todo o meio de cultura e adicionado 100µL de isopropanol por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. A

viabilidade celular foi medida em 490 nm e 650 nm. Foi utilizado como controle positivo DCs cultivadas em normóxia e lisadas com H₂O₂ 30% (60 mM, 24 horas).

3.10 Análise da interação *Leishmania*-DC.

3.10.1 Soros utilizados nos ensaios de opsonização dos parasitas.

Utilizamos soro normal humano (SNH) obtido de indivíduos saudáveis e soros de pacientes com leishmaniose (SIH) gentilmente cedido pela Dra Clara Barbieri (Unifesp/EPM-São Paulo). Os soros foram diluídos de acordo com o título obtido através de reações de imunofluorescência indireta (ver subitem 3.10.2 de Materiais e Métodos), sendo de 1:10 para SNH e 1:80.000 para os soros SIH.

3.10.2 Reações de imunofluorescência indireta (IFI) para obtenção do título de anticorpos dos soros utilizados.

Lâminas de microscopia para IFI (Glasstécnica) foram preparadas contendo promastigotas de cultura e amastigotas retirados de lesão de camundongos C3H/nude. Os parasitas foram lavados 2 vezes com tampão PBS (650 g/10 minutos) e fixados com formalina 2% sob agitação durante 10 minutos. Após 2 lavagens com PBS, cerca de 10⁵ parasitas foram adicionados às lâminas. Após secagem, as lâminas foram acondicionadas em papel laminado e armazenadas a -20°C.

Para a reação de IFI, foram utilizados os soros descritos no subitem 3.10.1 de Materiais e Métodos e as diluições (1:10 até 1:5.120 e quando necessário, até 1:160.000) foram feitas em tampão PBS. Adicionou-se 10 µl dos soros diluídos em cada poço da lâmina contendo os

parasitas e incubou-se a reação durante 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Em seguida, a lâmina foi lavada por imersão com tampão PBS, 3 vezes durante 5 minutos. Após secagem, foi adicionado 10µl do conjugado (anti-imunoglobulina marcada com FITC) diluído 1:20 em solução de Azul de Evans 0,001% e novamente incubou-se durante 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Em seguida, a lâmina foi lavada com tampão PBS, 3 vezes durante 5 minutos. Sobre a lâmina seca colocou-se algumas gotas de glicerina tamponada (90% em PBS) e vedou-se com uma lamínula para observação em microscópio de fluorescência (Nikon modelo 50i, Melville, New York, USA).

3.10.3 Tratamento de soros humanos para inativação do Complemento e depleção de anticorpos específicos e não específicos.

Para a inativação do Complemento (Δ), os soros já diluídos foram incubados por 1 hora a 56°C e em seguida armazenados a -20°C (KELLY et al., 2005). Para a retirada de anticorpos específicos e não específicos (ads), 10^7 promastigotas foram adicionados a 1 ml de soro já diluído e incubados por 2 horas a 4°C. Após centrifugação de 10 minutos a 650 g, colheu-se o sobrenadante (soro sem anticorpos) e armazenou-se a -20°C. Para a depleção de ambos (Δ /ads), primeiramente fez-se a incubação a 56°C e em seguida a incubação com os promastigotas, como descrito acima. Para confirmar a retirada dos anticorpos, os soros foram testados quanto à sua positividade através de reações de imunofluorescência.

3.10.4 Opsonização dos amastigotas com soros humanos.

Os amastigotas “nude” foram opsonizados com soro normal humano (SNH) diluído 1:10, SNH 1:10 inativado (Δ SNH), SNH 1:10 depletado de anticorpos (adsSNH), e SNH 1:10

inativado e depletado de Ac (Δ /adsSNH), soro infectado humano (SIH) diluído 1:80.000, SIH 1:80.000 inativado (Δ SIH), SIH 1:80.000 depletado de Ac (adsSIH) e SIH 1:80.000 inativado e depletado de Ac (Δ /adsSIH). Cerca de 10^6 amastigotas foram ressuspensos em 500 μ l dos respectivos soros e incubados a 4°C durante 1 hora. Os parasitas foram centrifugados a 4°C/650 g/10 minutos, o soro descartado e o sedimento ressuspensos em meio ISCOVE'S e então adicionado às culturas de DCs na proporção 3:1 (parasita:célula) por 24 horas em estufa a 37°C, 5% CO₂. Para avaliar o número de células, de parasitas e a porcentagem de infecção as lamínulas de tais culturas foram coradas por Giemsa, como descrito no subitem 3.2 de Materiais e Métodos, e avaliados em microscopia óptica.

3.10.5 Bloqueio de receptores de manose-fucose das DCs utilizando manana.

O receptor do tipo lectina manose-fucose presente nos macrófagos foi avaliado em relação à sua importância na entrada do parasita nas DCs. Para tanto, foram realizados ensaios utilizando manana solúvel de *S. cerevisiae*. Os ensaios foram baseados nos protocolos de Cantos et al (1993), Colmenares et al (2002) e Campos et al. (2006). No dia 7 de cultura, as DCs foram tratadas com 5, 100 e 750 μ g/ml de manana solúvel (diluída em PBS) durante 30 minutos a 37°C. Em seguida, foi feita a infecção com amastigotas retirados de lesões de camundongos BALB/c e C3H/nude durante 2,5 horas e 24 horas. Para avaliar o número de células, de parasitas e a porcentagem de infecção as lamínulas de tais culturas foram coradas por Giemsa, como descrito no subitem 3.2 de Materiais e Métodos, e avaliados em microscopia óptica.

3.10.6 Tratamento dos amastigotas de *L. amazonensis* com heparina.

Amastigotas retirados de lesões de camundongos BALB/c foram pré-tratados com heparina a 10 µg/ml (10^6 amastigotas/500 µl da heparina). Após a incubação dos parasitas com heparina por 20 minutos em gelo, estes foram lavados 2 vezes com meio de cultura (10 minutos a 650 g), adicionados à monocamada de DCs na proporção 3:1 (parasita:célula) e as culturas incubadas por 2,5 horas e 24 horas (LOVE et al., 1993). Para avaliar o número de células, de parasitas e a porcentagem de infecção as lamínulas de tais culturas foram coradas por Giemsa, como descrito no subitem 3.2 de Materiais e Métodos, e avaliados em microscopia óptica.

3.11 Análise estatística.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (com cerca de 600 células contadas em microscópio óptico) e repetidos no mínimo duas vezes para garantir a reprodutibilidade. As médias e desvios padrão foram comparados pelo teste *t*-Student para duas amostras independentes utilizando o programa Microcal Origin 6,0 para Windows. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,01$ e em alguns casos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4.1 O modelo experimental para o estudo da hipóxia.

A primeira parte de apresentação dos resultados envolve a avaliação dos efeitos da hipóxia *in vitro* em DCs infectadas com *L. amazonensis*.

4.1.1 Padronização do cultivo de DCs humanas a partir de monócitos do sangue periférico.

Para se estabelecer um protocolo de obtenção e cultivo de DCs humanas em nosso laboratório foram testadas algumas condições de cultivo baseadas em dados da literatura (BENDER et al., 1996; KODAIRA et al., 2000; McDOWELL et al., 2002; MAROVICH et al., 2000; NAIR et al., 1998; PICKL et al., 1996;). As condições testadas estão descritas na Tabela 1 e os resultados apresentados na Figura 1. De acordo com a Tabela 1, as células foram cultivadas com GM-CSF e IL-4 recombinantes em diferentes proporções durante 7 ou 10 dias (condições 1, 2 e 3). Nas condições 4 e 5, o uso dos sobrenadantes das linhagens H28 e 5637 foi alternado com as proteínas recombinantes. Na condição 6, utilizou-se apenas os sobrenadantes como fonte das citocinas IL4 e GM-CSF a fim de verificar se as células H28 e 5637 poderiam ser fonte alternativa das citocinas. As porcentagens de células “DC-like” representam a população de células presente na cultura com morfologia característica de DCs, analisadas sob microscopia óptica (Figura 1). Pode-se observar que, as condições 4, 5 e 6, as quais envolvem uso dos sobrenadantes de H28 e 5637, não foram eficientes na diferenciação dos monócitos. Já as condições 1, 2 e 3 foram eficientes neste processo de diferenciação, sendo a condição 1 (250 ng/ml IL4 rh + 50 ng/ml GM-CSF rh) a mais eficiente durante um período de 7 dias (70% das células em cultura apresentaram morfologia condizente à DCs). Vale salientar que monócitos cultivados durante 7 dias sem a adição de qualquer citocina ou sobrenadante das culturas celulares citadas diferenciaram-se em macrófagos. Na Figura 2 observamos as projeções finas e longas da membrana citoplasmática, característica da qual surgiu o termo célula “dendrítica”.

Para confirmar que estas células eram DCs, foi realizada uma imunofenotipagem das células obtidas sob a condição 1.

Tabela 1 - Condições de cultivo de monócitos do sangue periférico humano para diferenciação em células dendríticas. A cultura foi feita utilizando-se meio ISCOVE'S com 10% de soro fetal bovino.

Condições	Dias de cultura
1. 250 ng/ml IL4 rh + 50 ng/ml GM-CSF rh	7
2. 250 ng/ml IL4 rh + 50 ng/ml GM-CSF rh	10
3. 500 ng/ml IL4 rh + 1000 ng/ml GM-CSF rh	7
4. Sobrenadante de H28 (IL-4) (250 µl) + 50 ng/ml GM-CSF rh	7
5. Sobrenadante de 5637 (GM-CSF) (250 µl) + 250 ng/ml IL4 rh	7
6. Sobrenadante de H28 (250 µl) + Sobrenadante de 5637 (250 µl)	7

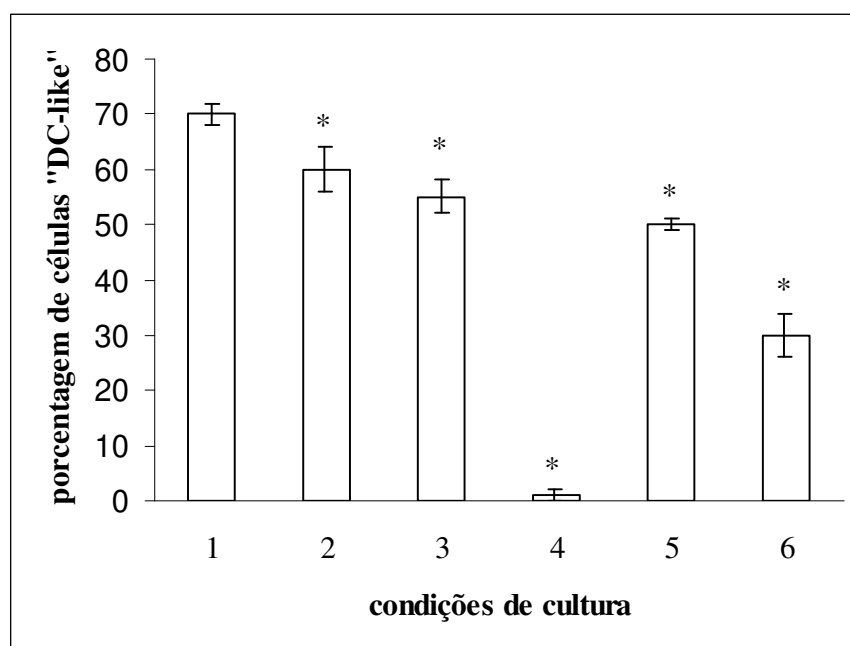


Figura 1. Porcentagem de células “DC-like” obtidas após cultivo de monócitos humanos.

Cerca de $0,5 \times 10^6$ células/ml cultivadas nas condições descritas na Tabela 1 foram analisadas quanto à morfologia sob microscopia óptica e definidas como “DC-like”. Os números referentes às condições de cultura citadas são semelhantes àquelas da Tabela 1. Os valores representam a porcentagem média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes (* $p < 0,01$).

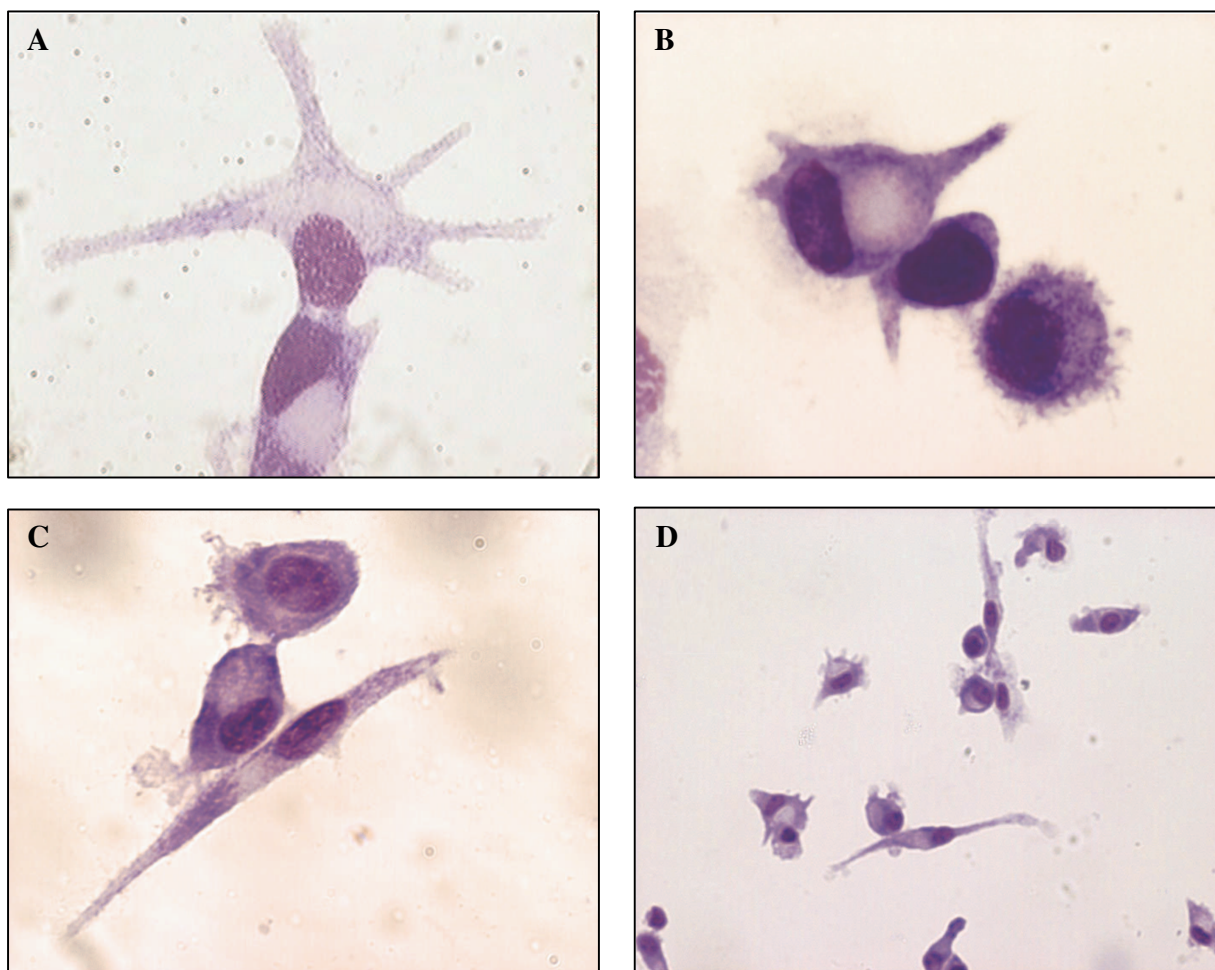
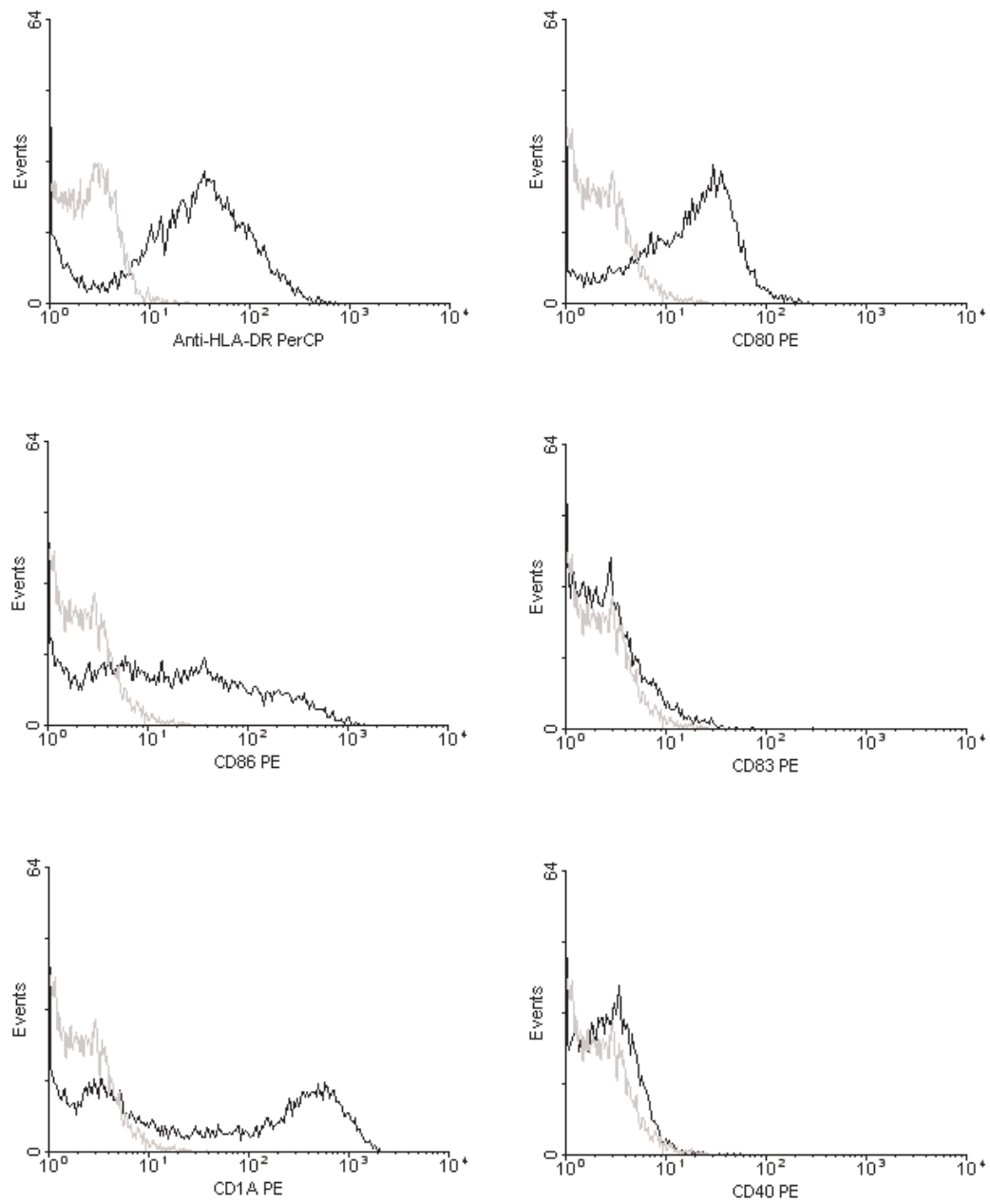


Figura 2. Fotomicrografia de DCs humanas. As DCs foram obtidas a partir de monócitos do sangue periférico humano e cultivadas durante 7 dias em estufa incubadora (37°C, 21% O₂, 5% CO₂) em meio ISCOVE'S suplementado com 50 ng/ml de GM-CSF rh e 250 ng/ml de IL4 rh. No dia 7 de cultura as lamínulas contendo as culturas foram coradas por Giemsa e analisadas em microscópio óptico. Aumentos de 1000x (A, B, C) e 200x (D).

4.1.2 Imunofenotipagem das culturas de DCs e macrófagos humanos através de citometria de fluxo.

Para confirmar a presença de DCs em culturas cultivadas durante 7 dias na presença de 50 ng/ml de GM-CSF rh e 250 ng/ml de IL4 rh foi realizada imunofenotipagem por citometria de fluxo para um grupo pré-determinado de marcadores de superfície celular (anti-HLA-DR, anti-CD40, anti-CD80, anti-CD123, anti-CD86, anti-CD83, anti-CD1a, anti-CD11c, anti-CD14, anti-CD3, anti-CD19, anti-CD16, anti-CD56). Os resultados obtidos, apresentados na Figura 3, foram avaliados quanto à porcentagem de células positivas para os marcadores de superfície e expressos em forma de número (porcentagem) e histogramas. Nas análises, o anticorpo anti HLA-DR foi marcado com PerCP e os demais com PE ou FITC. Os isotipos utilizados foram IgG2a+PE, IgG2a+PerCP e IgG1+FITC, mostrados nos histogramas em cinza. Observamos que as células são positivas para HLA-DR (93%), CD80 (60%), CD86 (51%), CD83 (1,3%), CD11c (46%), CD123 (3,1%) e CD1a (56%) e negativas para CD3, CD14, CD19, CD56, CD16 e CD40, indicando ausência de linfócitos B, linfócitos T, monócitos e células NK. Diante destes resultados, nos certificamos de que as células cultivadas sob a condição 1 da Tabela 1 (50 ng/ml de GM-CSF rh e 250 ng/ml de IL4 rh) desenvolveram perfil de DCs e não são macrófagos humanos.

Paralelamente, foi realizada também a imunofenotipagem de culturas de macrófagos humanos. A análise confirmou a presença de macrófagos, sendo positivos para HLA-DR (99%), CD14 (92%), CD11c (97%) e CD25 (15%) e negativos para CD3, CD19 e CD56.



(legenda a seguir)

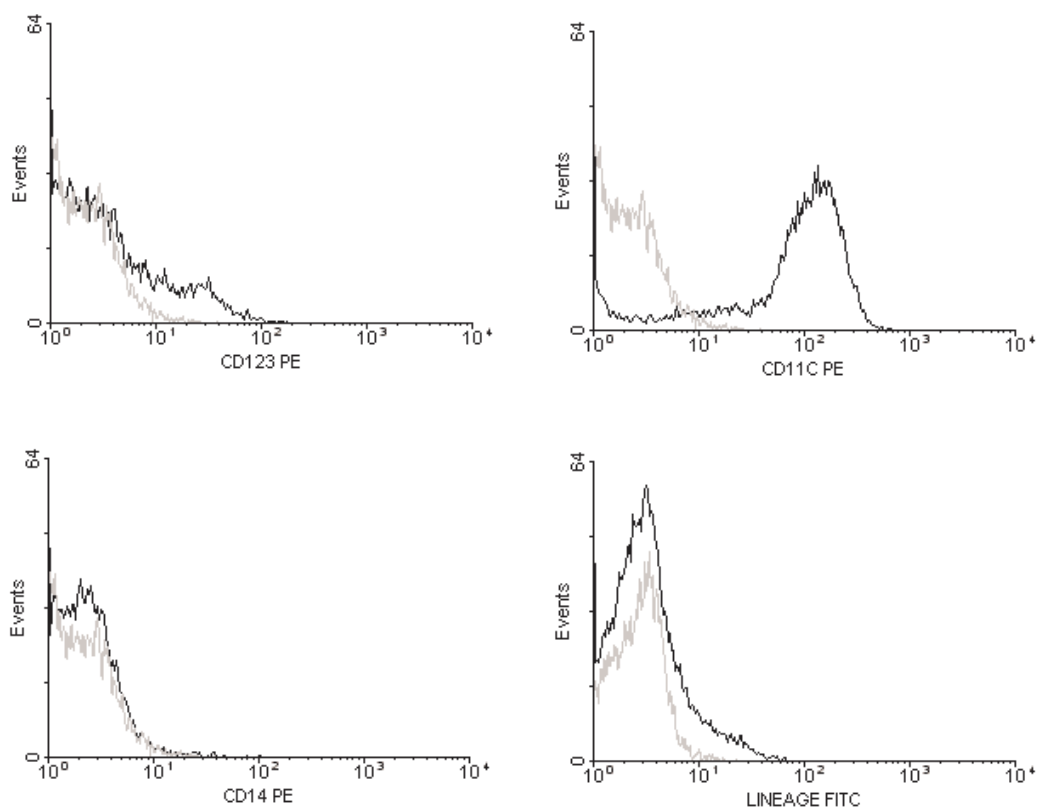


Figura 3. Caracterização fenotípica de DCs cultivadas na presença de 250 ng de IL4 rh e 50 ng de GM-CSF rh. As células cultivadas durante 7 dias na presença das citocinas recombinantes, foram colhidas e analisadas por citometria de fluxo. As células foram marcadas com um painel de anticorpos: anti-HLA-DR, anti-CD40, anti-CD80, anti-CD123, anti-CD86, anti-CD83, anti-CD1a, anti-CD11c, anti-CD14, anti-CD3, anti-CD19, anti-CD16, anti-CD56. Os isotipos controles são mostrados em cinza. Os resultados são de um experimento representativo. A abscissa representa a intensidade de fluorescência (escala $\log_{10}$) e a ordenada o respectivo número de células.

4.1.3 Infecção de DCs e macrófagos humanos com *L. amazonensis*.

Após seleção do protocolo de obtenção e cultivo das DCs (condição 1: 50 ng/ml de GM-CSF rh e 250 ng/ml de IL4 rh durante 7 dias), avaliou-se o curso de infecção das DCs com amastigotas retirados das lesões de camundongos infectados BALB/c na proporção 3:1 (parasita:célula) durante diferentes tempos e promastigotas em fase estacionária na proporção 10:1 (parasita:célula) opsonizados ou não com 5% de soro normal humano. A infecção com amastigotas retirados de C3H/nude serão descritas em item separado (subitem 4.3 de Resultados).

Na Figura 4A estão apresentadas as porcentagens de DCs infectadas com amastigotas, retirados de BALB/c, durante os períodos de 2,5, 24, 48 e 72 horas e na Figura 4B, o número de amastigotas por DC infectada. Nós observamos que amastigotas infectaram as DCs eficientemente após 2,5 horas (60% de DCs infectadas e 4,5 amastigotas/DC), 24 horas (67% de DCs infectadas e 5,1 amastigotas/DC), 48 horas (69% de DCs infectadas e 6 amastigotas/DC) e 72 horas (63% de DCs infectadas e 5,8 amastigotas/DC). Dados do período de 96 horas foram excluídos, pois a porcentagem de infecção caiu e as culturas estavam deterioradas. As DCs não sobreviveram após este período porque nestas culturas não ocorreu troca de meio e nem adição de meio fresco e/ou citocinas. Concluimos então, que as DCs são capazes de manter a infecção durante períodos de até 72 horas e optamos como tempo de infecção padrão o período de 24 horas.

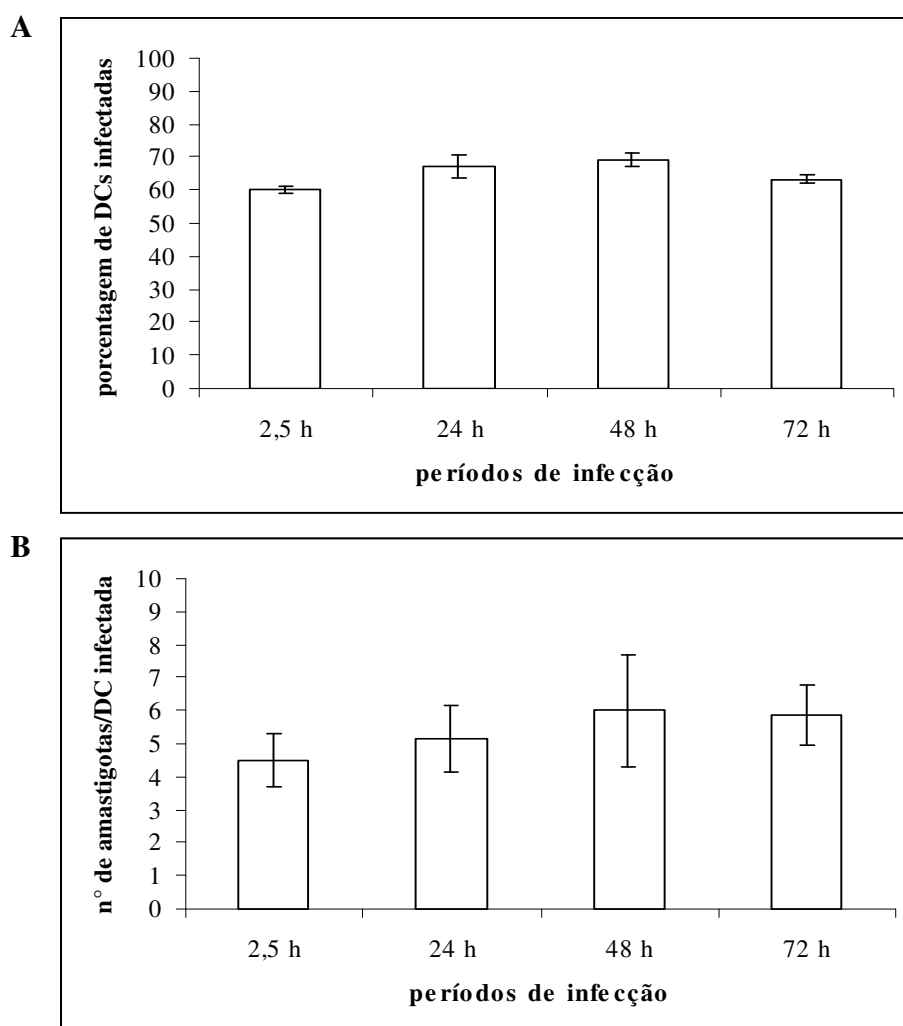


Figura 4. Infecção de DCs humanas com amastigotas de *L. amazonensis*. Células cultivadas segundo a condição 1 (50 ng/ml de GM-CSF rh e 250 ng/ml de IL4 rh, em estufa incubadora a 37°C, 21% O₂, 5% CO₂) foram infectadas com amastigotas (3 parasitas: 1 célula) retirados de lesões de camundongos BALB/c, durante períodos de 2,5 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas. Após estes períodos, as lamínulas foram lavadas, coradas por Giemsa e analisadas em microscópio óptico. A) porcentagem de DCs infectadas e B) número de amastigotas por DC infectada. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes.

Nas Figuras 5A e 5B, estão representados os dados de infecção de DCs com promastigotas (fase estacionária) de *L. amazonensis*. A infecção foi realizada durante um período de 24 horas. Os promastigotas infectaram cerca de 30% das DCs com uma média de 3,5 promastigotas/DC infectada. Quando os promastigotas passaram por uma opsonização prévia com 5% de soro normal humano, a porcentagem de DCs infectadas aumentou para 40%. De acordo com estes resultados, concluímos que as formas amastigotas foram mais infectantes que as formas promastigotas, sendo as primeiras escolhidas para os experimentos seguintes. A Figura 6 apresenta as DCs infectadas com os amastigotas localizados no vacúolo parasitóforo da célula.

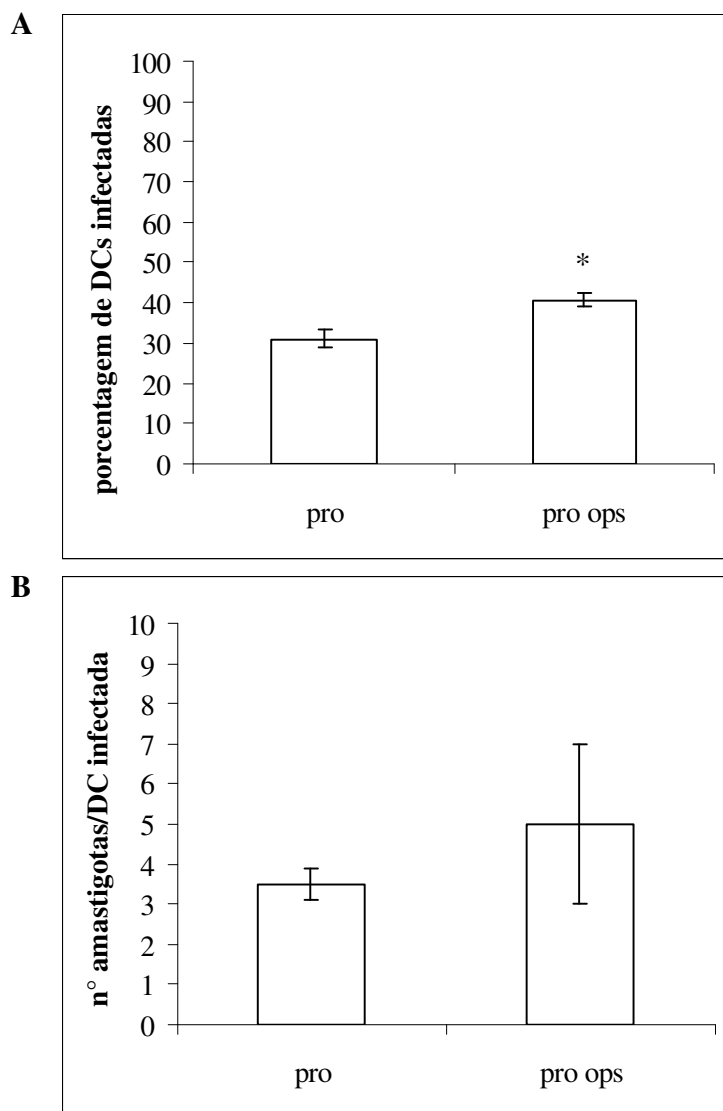


Figura 5. Infecção de DCs humanas com promastigotas de *L. amazonensis*. Células cultivadas segundo a condição 1 (50 ng/ml de GM-CSF rh e 250 ng/ml de IL4 rh, em estufa incubadora a 37°C, 21% O₂, 5% CO₂) foram infectadas com promastigotas opsonizados (pro ops) ou não (pro) com soro normal humano na proporção 10:1 (parasita:célula). Após 24 horas as lamínulas foram lavadas, coradas por Giemsa e analisadas em microscópio óptico. A) porcentagem de DCs infectadas e B) número de amastigotas por DC infectada. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes (*p<0,01).

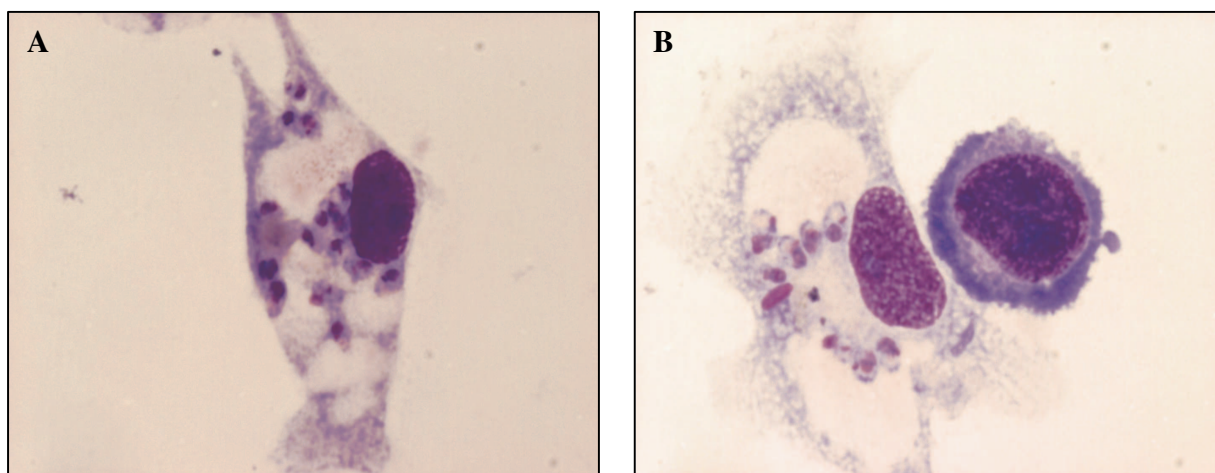


Figura 6. Fotomicrografia de DCs humanas infectadas com amastigotas de *L. amazonensis*.

DCs foram obtidas a partir de monócitos do sangue periférico humano e cultivadas durante 7 dias em estufa incubadora (37°C, 21% O₂, 5% CO₂) em meio ISCOVE'S suplementado com 50 ng/ml de GM-CSF rh e 250 ng/ml de IL4 rh. A e B: no dia 7 de cultura, as células foram infectadas durante 24 horas com amastigotas. As lamínulas com as DCs aderidas foram depois coradas por Giemsa e analisadas em microscópio óptico. Aumentos de 1000x (A e B).

4.1.4 Avaliação dos efeitos da hipóxia na infecção de DCs humanas com amastigotas de *L. amazonensis*.

Com o objetivo de avaliar o efeito do microambiente hipóxico na infecção de DCs com *L. amazonensis*, as células foram infectadas durante 24 horas em ambiente hipóxico (6% de O₂) ou normóxico (21% de O₂). Foram avaliados três protocolos de infecção com *L. amazonensis* em DCs humanas em hipóxia, baseados nos trabalhos já publicados pelo grupo (COLHONE et al., 2004; DEGROSSOLI et al., 2004): condição I) hipóxia de 24 horas seguida de infecção durante 24 horas em normóxia; condição II) infecção de 24 horas em hipóxia e condição III) hipóxia de 24 horas seguida de infecção durante 24 horas também em hipóxia. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 7. Observou-se que as porcentagens de infecção das DCs mantidas em hipóxia segundo as condições II e III foram significativamente menores (cerca de 48% e 43%, respectivamente) quando comparado à porcentagem de infecção de DCs mantidas em ambiente normóxico (cerca de 70%). Houve assim uma redução das células infectadas de aproximadamente 22% e 27%, respectivamente, quando as DCs foram mantidas em hipóxia (Figura 7A). Quanto ao número de amastigotas, também se observou uma redução nas culturas de DCs infectadas em hipóxia (4,2 e 5,6 amastigotas por DC infectada em ambiente hipóxico e normóxico, respectivamente) (Figura 7B). Estes resultados sugerem que DCs pré-expostas durante 24 horas à hipóxia e em seguida infectadas durante 24 horas em hipóxia reduzem a porcentagem de infecção e devem destruir os amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Também se observou que as condições II e III apresentaram resultados similares, sendo que a condição II deve se aproximar mais das condições observadas em uma situação *in vivo*, isto é, somente após a infecção o indivíduo desenvolverá lesões que levarão à hipóxia tercidual e assim suas células entrarão em contato com o ambiente de baixa oxigenação. Diante destes resultados e

dados já obtidos pelo grupo (COLHONE et al., 2004; DEGROSSOLI et al., 2004), a condição II foi escolhida para o desenvolvimento dos demais experimentos que utilizarão hipóxia.

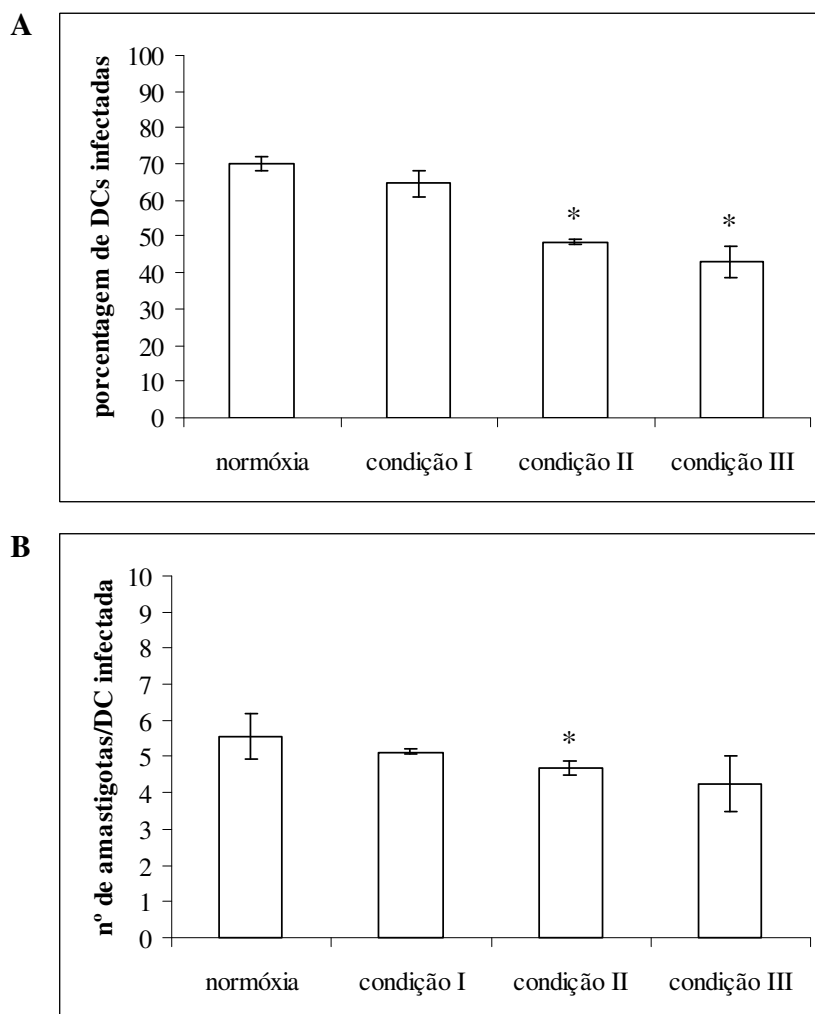


Figura 7. Efeito de um período de hipóxia de 24 horas em DCs humanas infectadas com amastigotas de *L. amazonensis*. As DCs ($0,5 \times 10^6/\text{ml}$) foram infectadas com amastigotas na proporção de 3:1 (parasita:célula) e mantidas em ambiente hipóxico ou normóxico segundo as condições testadas. Condição I: hipóxia de 24 horas seguida de infecção durante 24 horas em normóxia; condição II: infecção de 24 horas em hipóxia e condição III: hipóxia de 24 horas seguida de infecção durante 24 horas também em hipóxia. A porcentagem de células infectadas foi determinada em lamínulas coradas com Giemsa. Os números referentes às condições de cultura citadas são semelhantes àsquelas descritas no subitem 4.1.4 de Resultados. A)

porcentagem de DCs infectadas e B) número de amastigotas por DC infectada. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão de 3 experimentos independentes (* $p < 0,01$).

Tendo sido a condição II a escolhida para os experimentos seguintes, avaliamos se a diminuição na infecção estava relacionada com a diminuição da entrada do parasita nas DCs. As Figuras 8A e 8B mostram que após um curto período de infecção (2,5 horas) em hipóxia, a porcentagem de células infectadas é praticamente igual (cerca de 59%) à condição de normóxia (cerca de 60%), ou seja, os parasitas conseguiram penetrar nas células normalmente. Concluimos então que a hipóxia não afeta a entrada do parasita nas DCs mas deve exercer algum efeito nas células parasitadas.

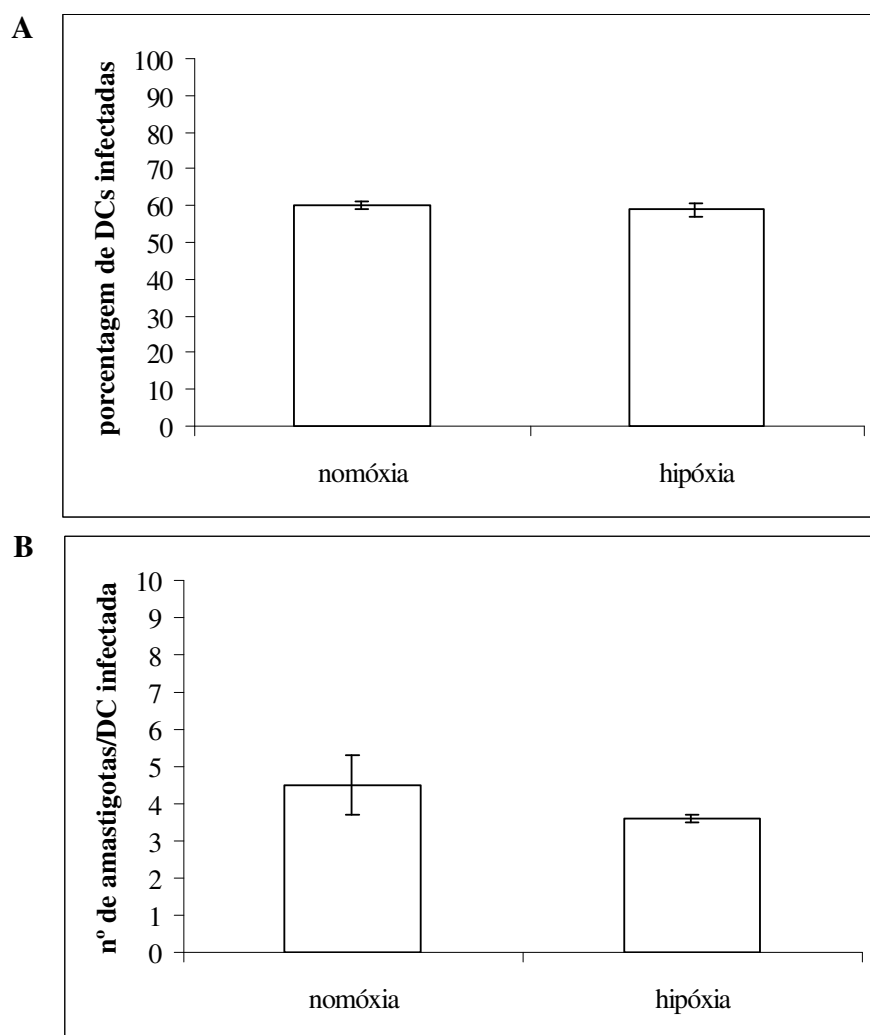


Figura 8. Efeito de um período de hipóxia de 2,5 horas em DCs humanas infectadas com amastigotas de *L. amazonensis*. As DCs ($0,5 \times 10^6/\text{ml}$) foram infectadas com amastigotas na proporção de 3:1 (parasita:célula) e mantidas em ambiente hipóxico ou normóxico durante 2,5 horas. A porcentagem de células infectadas foi determinada em lâminulas coradas com Giemsa. A) porcentagem de DCs infectadas e B) número de amastigotas por DC infectada. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão de 3 experimentos independentes ($p < 0,01$).

4.1.5 Avaliação dos efeitos ativadores de LPS e IFN- γ na infecção de DCs com amastigotas de *L. amazonensis* em condições normóxicas e hipóxicas.

Sabe-se que LPS e IFN- γ ativam macrófagos e conseqüentemente diminuem a infecção destas células por amastigotas de *L. amazonensis* tanto em condições normóxicas quanto hipóxicas, como já publicado pelo grupo (COLHONE et al., 2004). Nós também analisamos a infecção de DCs humanas previamente ativadas com LPS e IFN- γ e expostas ou não à hipóxia. Para tal ativação foram utilizados protocolos previamente descritos na literatura (McDOWELL et al., 2002; MOSCA et al., 2000; SNIJDERS et al., 1998) e testadas as seguintes condições: variação no tempo de ativação e na concentração de IFN- γ . Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 9 e 10. Na Figura 9 estão apresentados os resultados com diferentes tempos de ativação de culturas de DCs. Estas variações de tempo (ativação prévia de 24 horas, 8 horas ou ativação junto com a adição do parasita) foram realizadas somente em condições normóxicas utilizando LPS a 100 ng/ml e IFN- γ a 10 ng/ml. Como pode ser visto na Figura 9A, no período de 24 horas de ativação, a porcentagem de infecção das DCs foi reduzida (cerca de 30%). O número de amastigotas por DC infectada, no entanto, diminuiu nos períodos testados quando comparados ao controle (células não ativadas) (Figura 9B).

Outros experimentos utilizando um período de 24 horas de ativação com LPS e IFN- γ , ambos na concentração de 100 ng/ml (MOSCA et al., 2000; SNIJDERS et al., 1998) foram realizadas nas condições de hipóxia e normóxia. Os resultados estão apresentados na Figura 10. DCs previamente ativadas com LPS (100 ng/ml) e IFN- γ (100 ng/ml) durante 24 horas são capazes de reduzir a porcentagem de infecção em ambiente normóxico (redução de cerca de 32%) (Figura 10A). A exposição das culturas ao microambiente hipóxico também levou à redução da porcentagem de infecção das DCs (cerca de 30%), mas a hipóxia não foi capaz de

potencializar o efeito leishmanicida observado nas DCs ativadas (Figura 10A). Observamos que DCs ativadas com LPS e IFN- γ em hipóxia reduzem a porcentagem de células infectadas tão efetivamente quanto DCs ativadas com LPS e IFN- γ em normóxia. Em relação ao número de amastigotas por célula infectada observou-se que DCs sob condições hipóxicas mostraram significativa diminuição no número de parasitas por célula quando comparado às culturas de DCs sob condições normóxicas (Figura 10B). Pode-se observar ainda que o número de parasitas por célula é semelhante em DCs ativadas com LPS e IFN- γ e não ativadas em hipóxia (Figura 10B). Concluimos que a hipóxia não potencializa o efeito dos ativadores LPS e IFN- γ em DCs infectadas com o parasita.

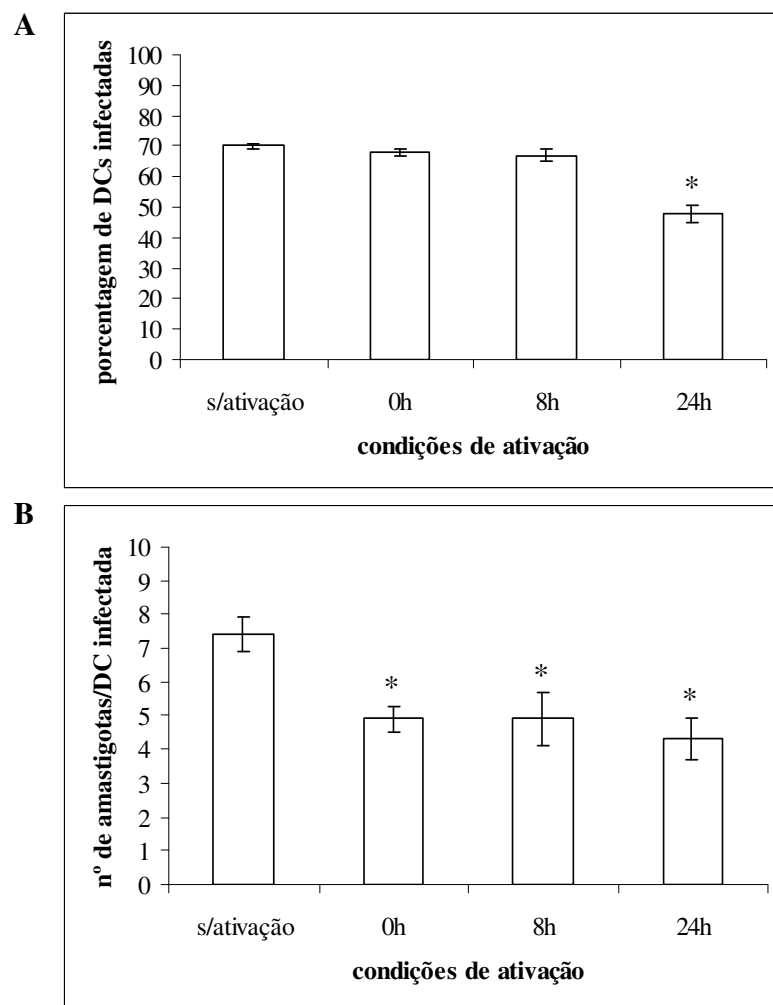


Figura 9. Ativação de DCs humanas com LPS e IFN- γ infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* em ambiente normóxico. As DCs (5×10^5 /ml) foram tratadas ou não (s/ativação) com IFN- γ (10 ng/ml) e LPS (100 ng/ml) durante 24 horas (24h), 8 horas (8h) ou no momento da infecção (0h). Em seguida, as culturas foram infectadas com amastigotas na proporção de 3:1 (parasita:célula) e mantidas em normóxia por 24 horas. A porcentagem de células infectadas foi determinada em lamínulas coradas por Giemsa. A) porcentagem de DCs infectadas e B) número de amastigotas por DC infectada. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes (* $p < 0,01$).

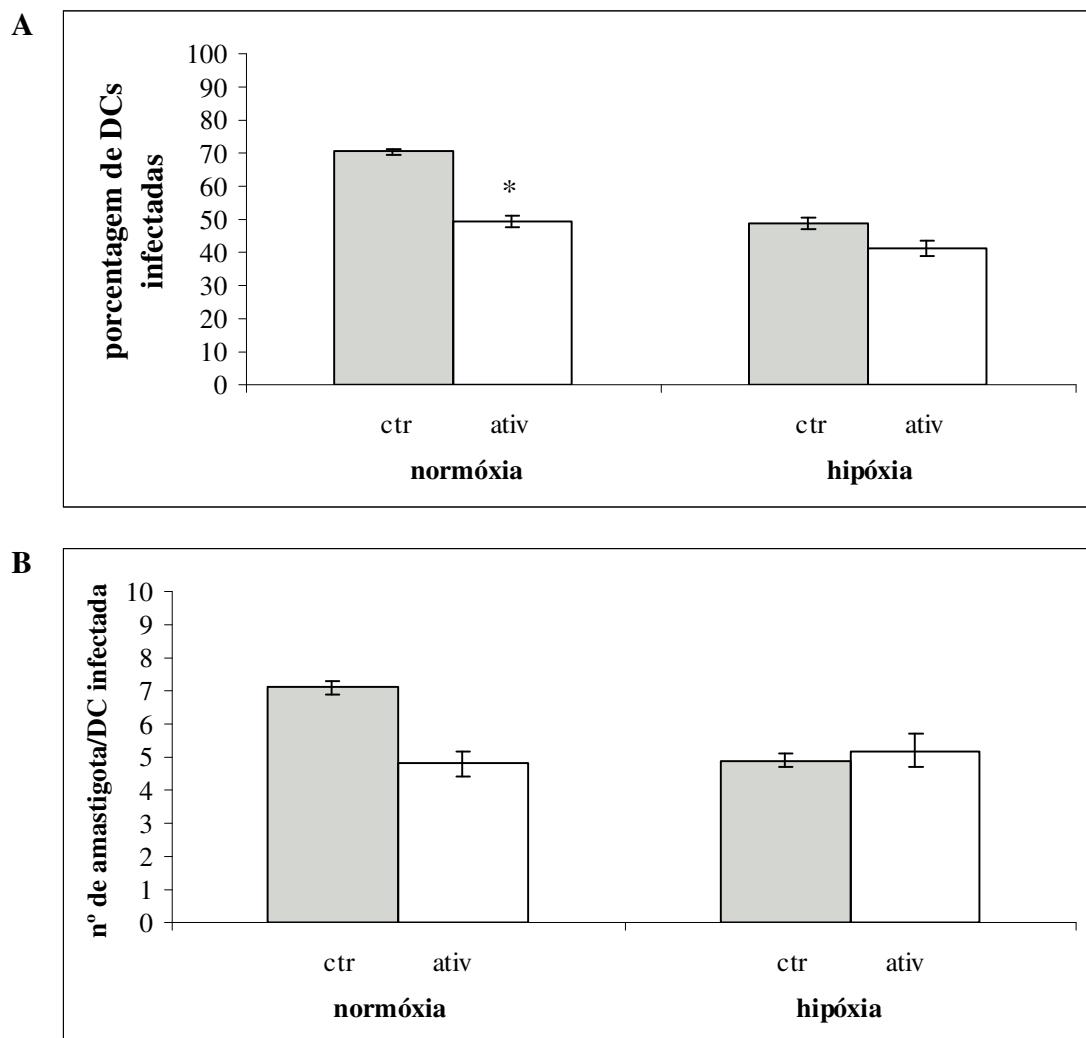


Figura 10. Ativação de células DCs com LPS e IFN- γ , infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* em ambiente normóxico e hipóxico. As DCs ($5 \times 10^5/\text{ml}$) foram tratadas com IFN- γ (100 ng/ml) e LPS (100 ng/ml) durante 24 horas (ativ) ou mantidas sem estímulo (ctr). Após este período, as culturas foram infectadas com amastigotas na proporção de 3:1 (parasita:célula) e mantidas em normóxia ou hipóxia durante 24 horas. A porcentagem de células infectadas foi determinada em lamínulas coradas por Giemsa. A) porcentagem de DCs infectadas e B) número de amastigotas por DC infectada. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes (* $p < 0,01$).

4.1.6 Análise da viabilidade de DCs humanas em condições hipóxicas.

Considerando que o número de DCs infectadas foi reduzido em hipóxia (Figura 7 e Figura 10), avaliamos se este fenômeno devia-se a alterações na viabilidade das DCs sob hipóxia, e sem nenhum efeito do microambiente nos mecanismos leishmanicidas das DCs. Para isso, utilizou-se o ensaio do MTT para analisar a viabilidade das DCs mantidas em normóxia ou hipóxia. Foi utilizado como controle DCs cultivadas em normóxia e mortas por peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A Figura 11 apresenta os resultados em forma de densidade óptica das culturas; quanto menor a densidade óptica, menor o número de células viáveis. Nestes experimentos não se observou diferença significativa na viabilidade das células cultivadas em normóxia ou hipóxia durante 24 horas (condição II), indicando que as DCs não sofrem efeitos tóxicos relacionados a baixa concentração de oxigênio testada.

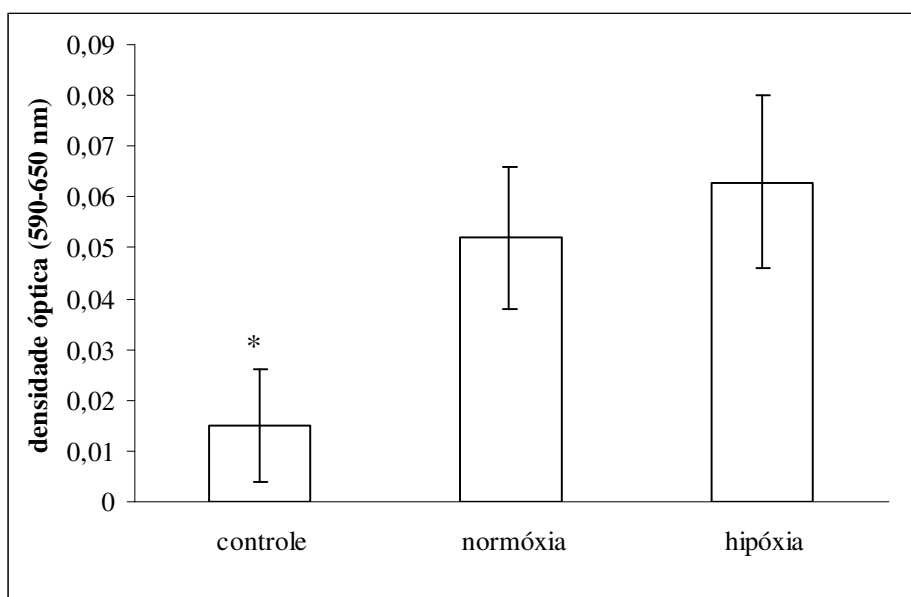
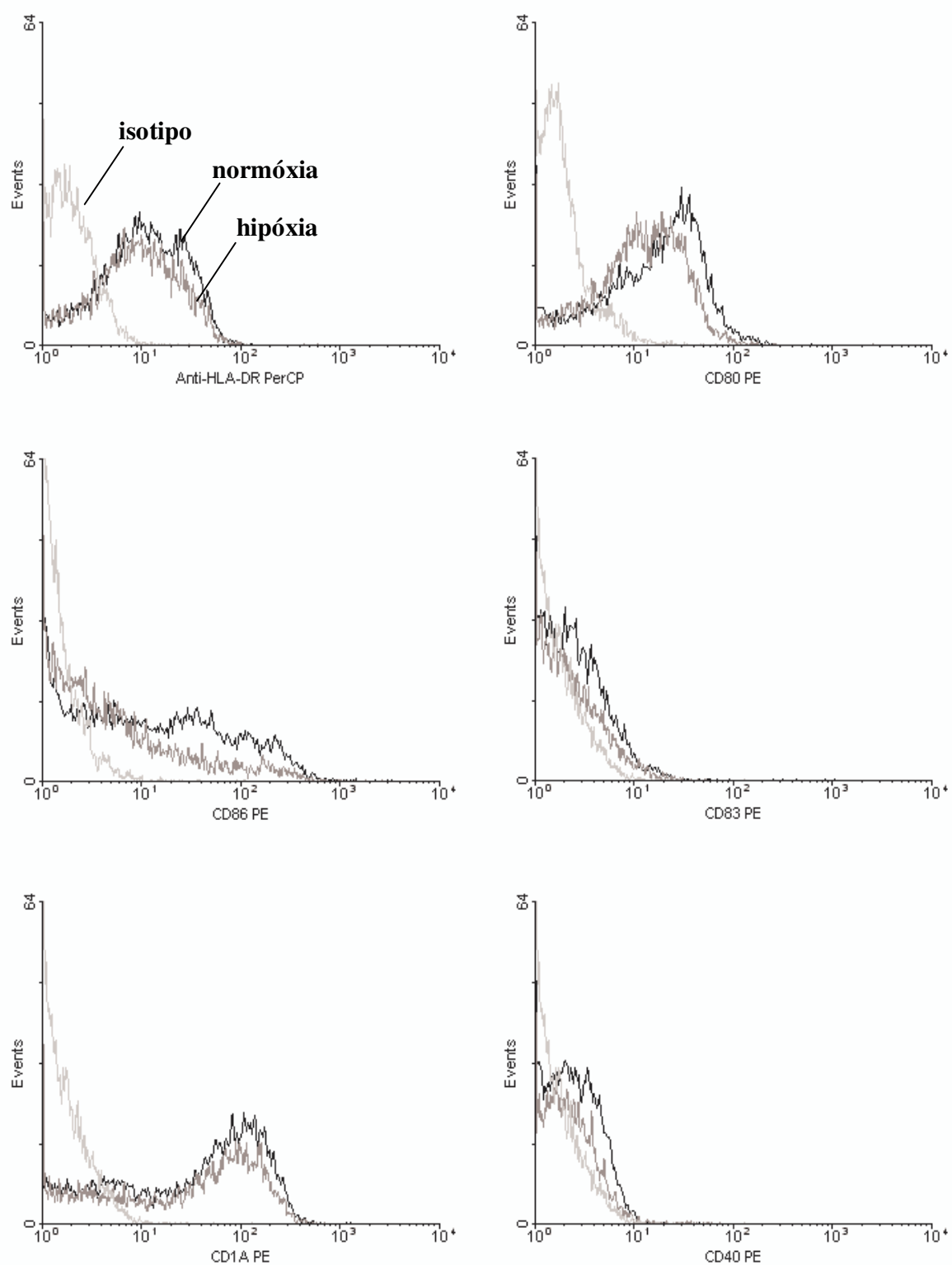


Figura 11. Efeito da hipóxia na viabilidade das DCs humanas. As DCs (3×10^4 /poço) foram submetidas à hipóxia ou normóxia durante 24 horas. A viabilidade foi avaliada pelo teste do MTT. O controle representa DCs que sofreram ação oxidativa prévia de H_2O_2 (60 mM) durante 24 horas. Os valores representam a média $\pm$ o desvio padrão de 3 experimentos independentes (* $p < 0,01$).

4.1.7 Imunofenotipagem das culturas de DCs em condições hipóxicas.

Estes testes foram realizados com o objetivo de avaliar se DCs cultivadas sob hipóxia sofrem mudanças fenotípicas. Nestas análises foram utilizados os fluorocromos PerCP para HLA e PE ou FITC para os demais marcadores. Os isotipos utilizados foram IgG2a+PE, IgG2a+PerCP e IgG1+FITC, mostrados nos histogramas em cinza claro (Figura 12). Os marcadores de superfície escolhidos para a imunofenotipagem das DCs foram HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CD1a, CD11c, CD40, CD14, CD56, CD16, CD3, CD19. As imunofenotipagens foram realizadas com DCs mantidas em hipóxia (6% de O₂ por 24 horas) tendo como controle as células mantidas em normóxia (21% de O₂) e os resultados estão apresentados através de histogramas sobrepostos (Figura 12). Novamente pudemos observar que as DCs (cultivadas em normóxia) são positivas para HLA, CD80, CD86, CD83, CD11c e CD1a e negativas para CD3, CD14, CD19, CD56, CD16 e CD40, conforme já demonstrado na Figura 3.

Para uma melhor visualização e comparação dos resultados obtidos em normóxia e hipóxia, estes foram apresentados também através da porcentagem de células positivas para cada marcador, onde os números representam a porcentagem média de três imunofenotipagens representativas em condições hipóxicas e normóxicas (Tabela 2). Os resultados mostram que as culturas que passaram pela condição de hipóxia apresentaram alterações em relação a alguns marcadores. Nós observamos uma redução na intensidade de fluorescência das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 nas culturas submetidas a hipóxia (Figura 12). A Tabela 2 mostra uma redução nos níveis de expressão celular de cerca de 26% e 51% para CD80 e CD86, respectivamente. A hipóxia também afetou os níveis de expressão da molécula CD1a. Uma redução significativa de 17% (Tabela 2) pode ser observada também no histograma da Figura 12. Diante destes resultados, pudemos concluir que a hipóxia altera a expressão dos seguintes marcadores de superfície celular: CD80, CD86 e CD1a.



(legenda a seguir)

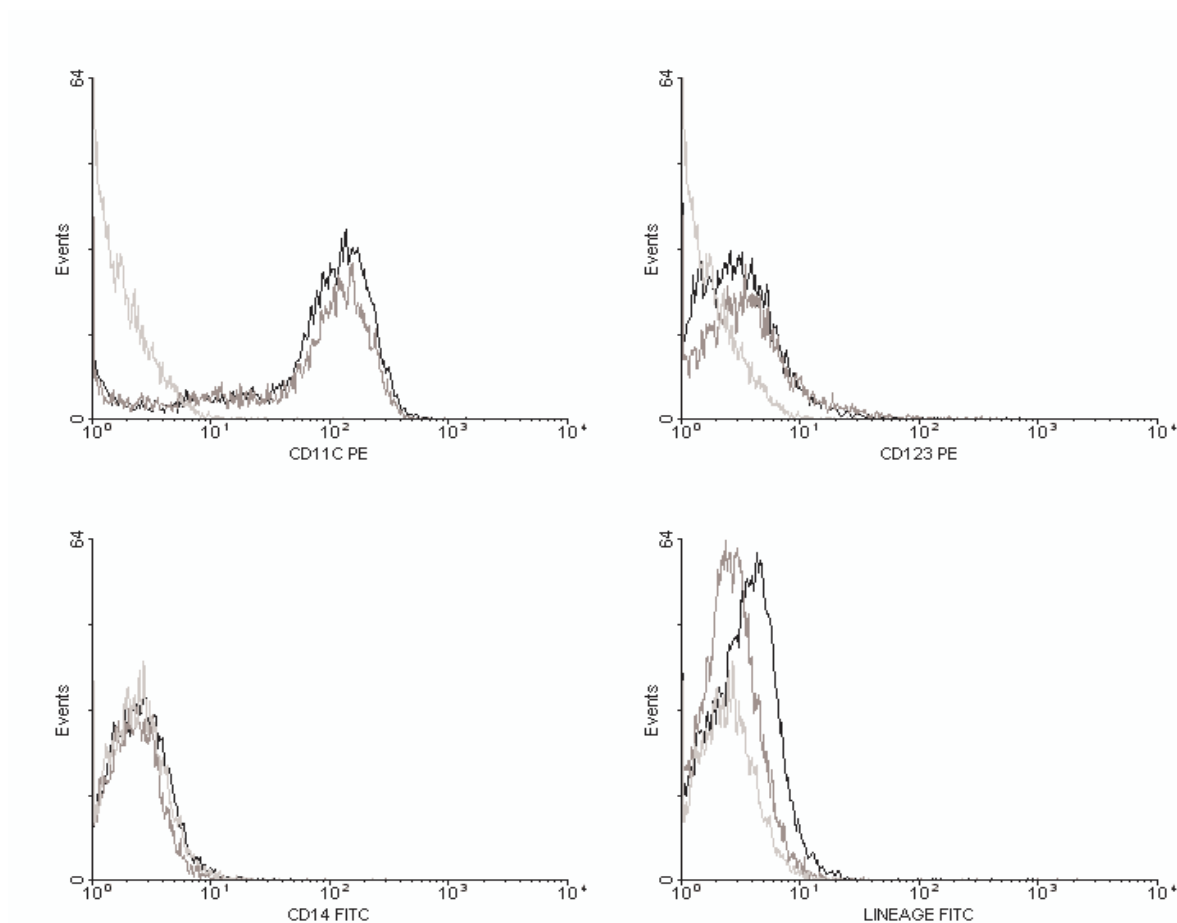


Figura 12. Análise fenotípica de DCs cultivadas sob condições normóxicas e hipóxicas. As células foram cultivadas por 7 dias na presença de GM-CSF e IL4 quando então foram expostas ao microambiente hipóxico (6% O₂) ou normóxico (21% O₂) por 24 horas; em seguida foram colhidas e analisadas por citometria de fluxo. As células foram marcadas com um painel de anticorpos descritos no subitem 3.3 de Materiais e Métodos. Nos histogramas estão apresentados os isotipos controles (cinza claro) e os marcadores de superfície em DCs mantidas em normóxia (negrito) e expostas à hipóxia (cinza escuro). “Lineage” refere-se aos anticorpos anti-CD3, anti-C19, anti-CD16 e anti-CD56. Resultados de um experimento representativo. A abscissa representa a intensidade de fluorescência (escala log₁₀) e a ordenada o respectivo número de células.

Tabela 2 - Comparação dos valores obtidos nas imunofenotipagens das DCs por citometria de fluxo. Os números correspondem às porcentagens médias de células positivas para cada marcador mencionado. As células foram cultivadas por 7 dias na presença de GM-CSF e IL4 e então foram expostas ao microambiente hipóxico (6% O₂ durante 24 horas) ou normóxico (21% O₂). Estão apresentadas as médias de 3 experimentos representativos de 5 realizados (*p<0,05).

	<i>Valores em porcentagem (%)</i>	
	normóxia	hipóxia
Ac anti		
HLA	93	91
CD80	50	37*
CD86	64	31*
CD83	1,7	2,0
CD1a	56	46*
CD11c	63	61
CD123	3	3,3
CD14	0,6	1,1
CD40	0,3	0,4
Lineage (CD3, CD16, CD19, CD56)	0,9	1,1

4.1.8 Avaliação da produção de IL-12 pelas culturas de DCs humanas.

Vários estudos têm documentado que DCs humanas e murinas são capazes de produzir IL-12. Sabe-se também que a produção desta citocina pelas DCs é maior na presença de estímulos como LPS, IFN- γ , CD40L e parasitas intracelulares (SARTORI et al., 1997; VON STEBUT et al., 1998). Além desses fatores/estímulos, a produção de IL-12 pelas DCs murinas pode também ser modulada pela tensão de oxigênio local (MURATA et al., 2002).

Inicialmente avaliamos se as DCs humanas cultivadas de acordo com nosso protocolo seriam capazes de produzir IL-12 p70, a molécula bioativa de IL-12. Nossas análises por ELISA não detectaram produção de IL-12 p70 tanto em normóxia como em hipóxia (Figura 13). Não descartamos a possibilidade de produção abaixo dos níveis de detecção do kit utilizado (7,8 pg/ml). Em seguida, investigamos se as culturas de DCs humanas produziram IL-12 diante de estímulo com LPS e IFN- γ (item 3.5 de Materiais e Métodos). Na Figura 13 observa-se produção de IL-12 em normóxia e um aumento significativo desta quando as culturas foram submetidas à hipóxia.

De acordo com os dados da Figura 13, somente a presença do parasita não foi suficiente para a produção de níveis detectáveis de IL-12 em microambiente hipóxico ou normóxico. No entanto, quando as culturas infectadas foram previamente estimuladas com LPS e IFN- γ , ocorreu produção de IL-12 p70. Tal produção foi maior do que em culturas não infectadas apenas estimuladas com LPS e IFN- γ . Nesta situação ativação/infecção, a hipóxia diminuiu o nível de IL-12 produzido quando comparado à situação ativação/infecção em normóxia. Estes resultados sugerem que a hipóxia influencia a produção de IL-12 diante da ativação e infecção das DCs.

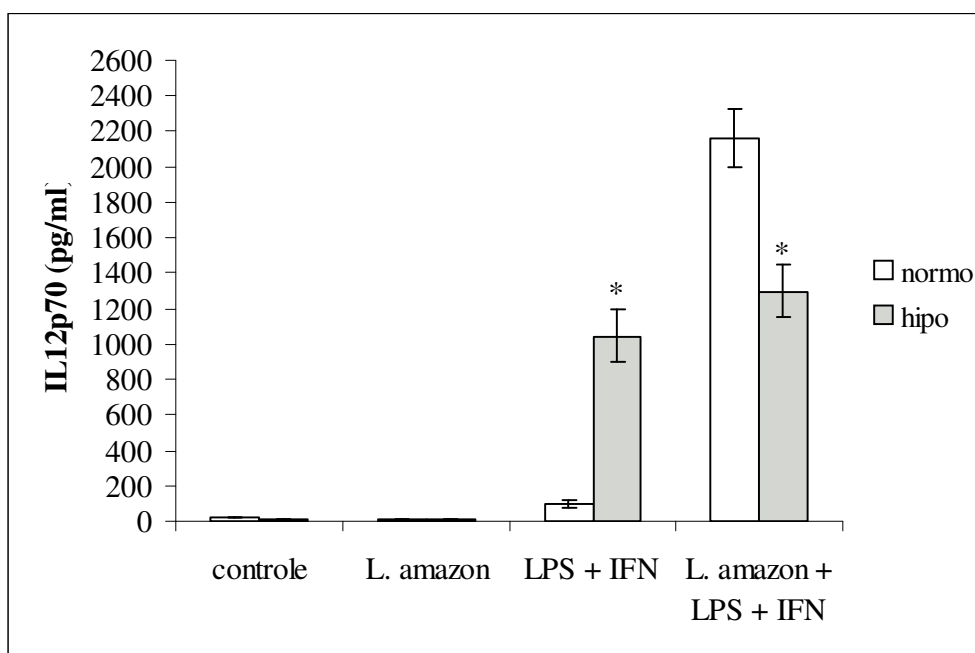


Figura 13. Produção de IL-12p70 por DCs humanas em normóxia e hipóxia. As DCs (5×10^5 /ml) foram tratadas com IFN- γ (100 ng/ml) e LPS (100 ng/ml) (LPS+IFN) durante 24 horas ou mantidas sem estímulo (controle). Após este período, as culturas foram infectadas ou não com amastigotas de *L. amazonensis* (*L. amazon*) na proporção de 3:1 (parasita:célula) e mantidas em normóxia ou hipóxia durante 24 horas. Após este período o sobrenadante das culturas foi colhido e IL-12 p70 foi quantificada através de ELISA. Resultados de uma análise representativa em triplicata de 4 realizadas. Comparação realizada entre normóxia vs hipóxia (* $p < 0,01$).

4.2 Avaliação dos efeitos de drogas leishmanicidas em DCs humanas infectadas com *L. amazonensis* e mantidas sob as condições de hipóxia ou normóxia.

Nesta segunda parte do nosso trabalho estão apresentados os resultados da avaliação dos efeitos das drogas leishmanicidas em DCs humanas infectadas com *L. amazonensis* e mantidas sob condições de hipóxia ou normóxia.

As principais drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral são os antimoniais pentavalentes, os antibióticos como a Anfotericina B e mais recentemente, o Miltefosine, inicialmente descrito como droga anticâncer. Os alvos dessas drogas são os amastigotas intracelulares que se dividem e sobrevivem em células do sistema fagocitário (CROFT & COOMBS, 2003). Não há dados na literatura mostrando os efeitos dessas drogas leishmanicidas sobre DCs e *Leishmania*. Além disso, alguns trabalhos mostraram que baixas tensões de O₂ podem afetar a eficácia de drogas antitumorais (KOCH et al., 2003; YUN et al., 2004). Avaliamos, então, o efeito das drogas Anfotericina B, Glucantime (antimoniato de meglumina) e Miltefosine em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em DCs sob condições de normóxia ou hipóxia. Os resultados obtidos são apresentados como índice de infecção (ver subitem 3.8 de Materiais e Métodos). O tratamento durante 48 horas com as diferentes drogas em ambiente normóxico resultou em um efeito leishmanicida dose-dependente (Figura 14). A sensibilidade às drogas foi baseada na inibição do crescimento do parasita dentro da célula e na porcentagem de células infectadas, resultando em índices de infecção menores quanto maior a dose utilizada de cada droga. A Anfotericina B foi tóxica para os amastigotas de *L. amazonensis* nas concentrações de 0,015 µg/ml, 0,15 µg/ml e 0,3 µg/ml em normóxia e não apresentou ação leishmanicida em hipóxia (Figura 14A). O Glucantime foi tóxico para *Leishmania* nas concentrações de 1,5 µg/ml, 5 µg/ml e 25 µg/ml em normóxia e em hipóxia

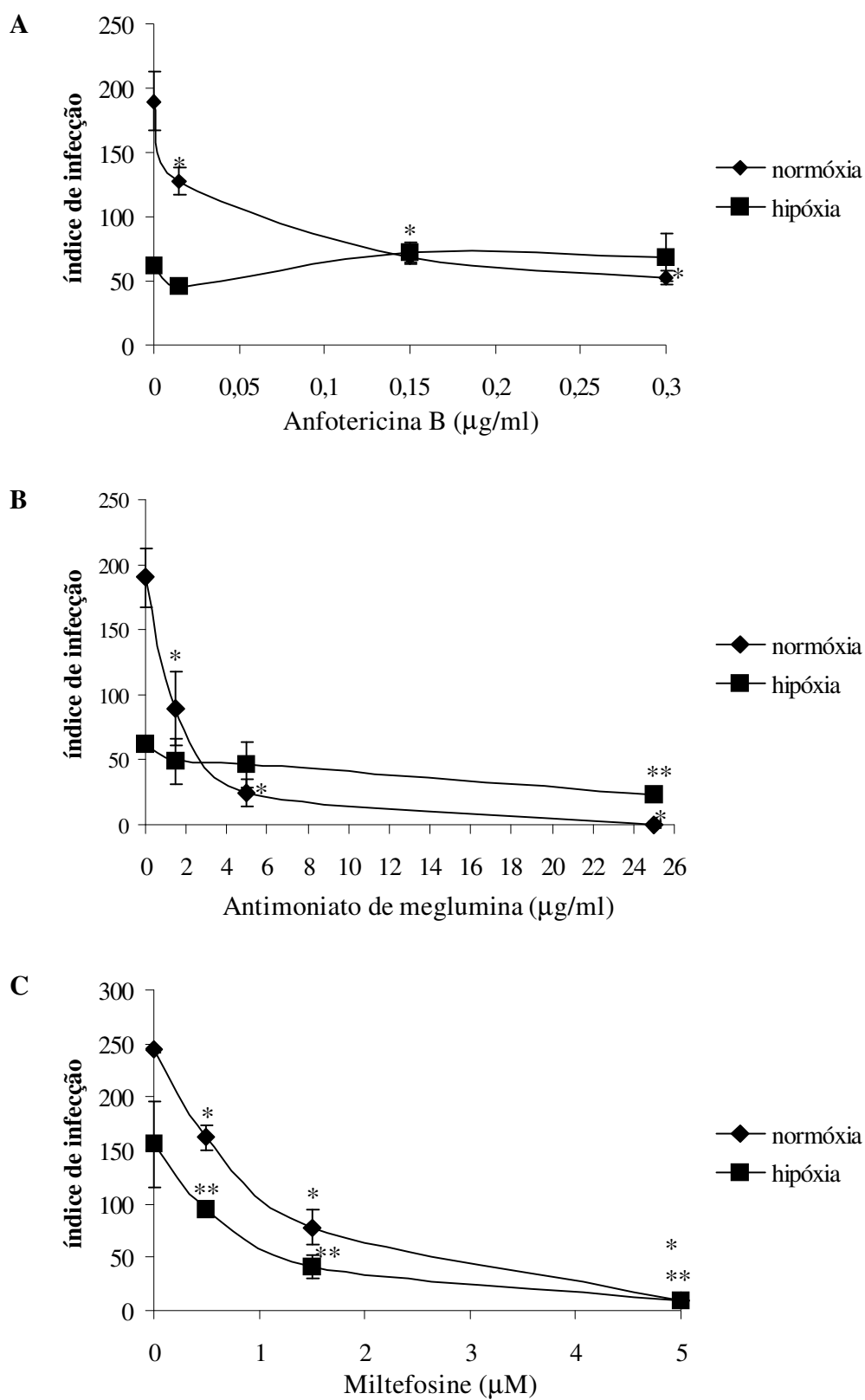
somente a concentração de 25 µg/ml apresentou ação leishmanicida (Figura 14B). O Miltefosine foi tóxico para o parasita nas concentrações de 0,5 µM, 1,5 µM e 5 µM, tanto em normóxia como em hipóxia (Figura 14C).

Baseado nos gráficos de dose-resposta das drogas, a IC_{50} de cada composto pôde ser determinada pela análise de regressão através do programa Probit (subitem 3.8 de Materiais e Métodos). Os resultados são expressos em microgramas por mililitro ou em micromolar de 1 experimento representativo (Tabela 3). O tratamento com as diferentes drogas resultou em uma inibição da proliferação de amastigotas internalizados pelas DCs em normóxia com IC_{50} de 0,05 µg/ml para Anfotericina B, 0,69 µg/ml para Glucantime e 0,83 µM para Miltefosine. Sob condições hipóxicas, a droga Glucantime foi menos efetiva, a IC_{50} aumentou para 10,87 µg/ml quando comparada ao valor obtido em normóxia (0,69 µg/ml). No caso do Miltefosine, a hipóxia potencializou sua ação diminuindo sua IC_{50} para 0,69 µM quando comparada ao valor obtido em normóxia (0,83 µg/ml). Como a hipóxia anulou a ação de Anfotericina B, sua IC_{50} nesta condição não pode ser calculada.

As doses escolhidas para nossos experimentos foram baseadas em trabalhos de Santa-Rita et al. (2004), Escobar et al. (2002) e Callahan et al. (1997). Alguns ajustes foram necessários já que existem diferenças na sensibilidade das espécies de *Leishmania* e entre as células utilizadas (CALLAHAN et al., 1997; ESCOBAR et al., 2002). As concentrações de 0,3 µg/ml, 25 µg/ml e 5 µM de Anfotericina B, Antimônio e Miltefosine, respectivamente, não causaram danos às DCs, como avaliado pelo teste de MTT (Figura 15). A Figura 15 apresenta os resultados expressos através de densidade óptica, sendo que quanto menor a densidade óptica, menor o número de células viáveis. Foi utilizado como controle positivo, DCs cultivadas em normóxia e tratadas com H_2O_2 . Observou-se que não há diferença significativa na viabilidade das células cultivadas em

normóxia ou hipóxia durante 48 horas na presença das drogas em concentrações onde se observou efeito para o parasita e aparentemente nenhum efeito tóxico nas células (0,3 µg/ml, 25 µg/ml e 5 µM de Anfotericina B, Antimônio e Miltefosine, respectivamente). Assim, valores mais altos destas drogas, foram rejeitados para os ensaios de infecção.

Nossos resultados com Anfotericina B, Glucantime e Miltefosine aplicados a culturas de DCs humanas infectadas com *L. amazonensis* são inéditos e contribuem para estudos sobre interação droga/parasita tanto *in vitro* como *in vivo* e para o desenvolvimento de terapias mais potentes e alternativas para a leishmaniose.



(legenda a seguir)

Figura 14. Efeitos de drogas leishmanicidas em DCs humanas infectadas com *L. amazonensis* e mantidas sob as condições de hipóxia e normóxia. As DCs ($0,5 \times 10^6/\text{ml}$) foram infectadas com amastigotas na proporção 3:1 (parasita:célula) por 24 horas. Após este período as culturas foram lavadas e submetidas a hipóxia ou normóxia durante 48 horas na presença de Anfotericina B, antimoniato de meglumina (Glucantime) e Miltefosine ou apenas meio de cultura (concentração zero). Os resultados de um experimento representativo de 4 realizados estão apresentados. Comparação entre tratado vs não tratado em normóxia (*) e hipóxia (**) ($p < 0,01$).

Tabela 3 – Sensibilidade de amastigotas de *L. amazonensis* internalizados por DCs humanas aos agentes leishmanicidas em normóxia e em hipóxia. Estão apresentados os valores de uma análise representativa das IC_{50} s das drogas após 48 horas em cultura de DCs infectadas.

	IC_{50}^a	
	normóxia	hipóxia
Anfotericina B ($\mu\text{g/ml}$)	0,05	— ^c
Glucantime ^b ($\mu\text{g/ml}$)	0,69	10,87
Miltefosine (μM)	0,83	0,69

^a ensaio descrito no subitem 3.8 de Materiais e Métodos.

^b valores de antimoniato de meglumina.

^c não foi observado efeito de Anfotericina B em hipóxia.

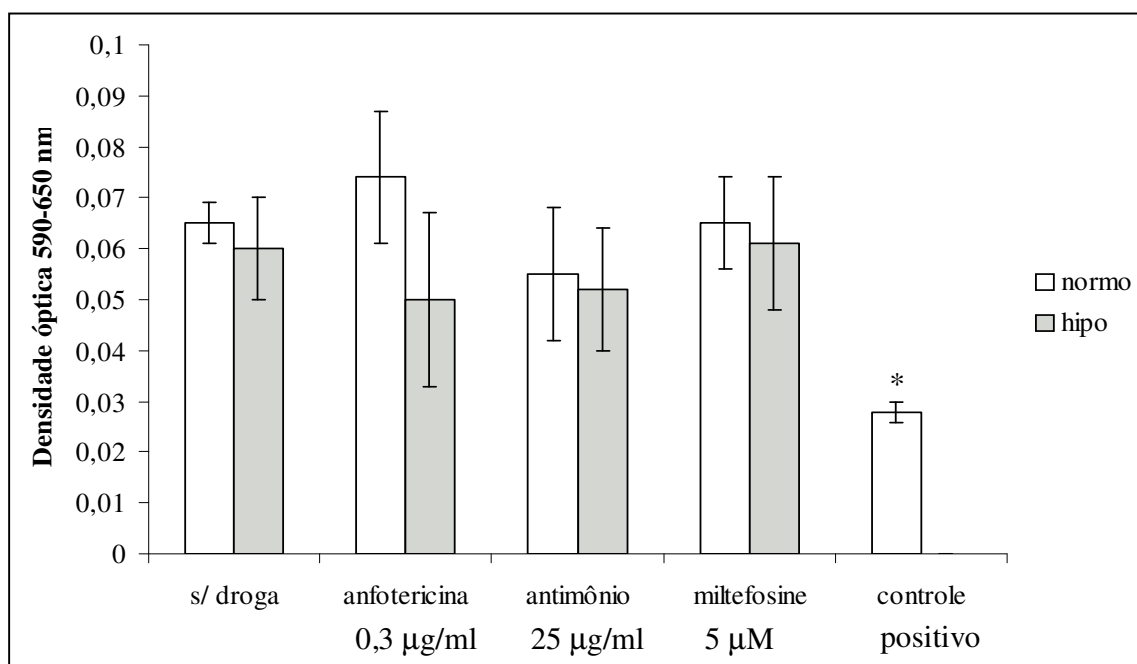


Figura 15. Efeito de Anfotericina B, Glucantime (antimônio) e Miltefosine em DCs humanas sob condições de normóxia e hipóxia. As DCs (3×10^4 /poço) foram submetidas à hipóxia ou normóxia durante 48 horas na presença de 0,3 µg/ml de Anfotericina B, 25 µg/ml de antimonioato de meglumina (Glucantime) e 5 µM de Miltefosine ou apenas meio de cultura (s/ droga). A viabilidade foi avaliada pelo teste do MTT. O controle positivo representa DCs previamente incubadas com 60 mM de H_2O_2 . Os valores representam a média de um experimento representativo realizado em triplicata $\pm$ o desvio padrão (* $p < 0,01$).

4.3 Interação *Leishmania*-DC.

Nesta terceira e última parte de nosso trabalho estão apresentados os resultados sobre a análise do processo de infecção, ou seja, avaliamos os ligantes necessários para a infecção *in vitro* de DCs humanas por amastigotas de *L. amazonensis*. Artigo com estes dados foi aceito para publicação no periódico *Experimental Parasitology* (ver Anexo). Para este estudo foram utilizados amastigotas retirados de lesões de camundongos C3H/nude. Parasitas originados destas lesões apresentam-se pouco opsonizados (PRINA et al., 2004).

4.3.1 Infecção de fagócitos por amastigotas de *L. amazonensis*.

Para avaliarmos se a entrada de amastigotas em DCs está relacionada à opsonização desta forma parasitária, foram realizados experimentos com amastigotas de C3H/nude (não apresentam anticorpos em sua superfície) comparando-se com amastigotas de BALB/c (naturalmente opsonizados) (TERABE, 1999). Observamos que amastigotas de BALB/c são mais infectantes (Figura 16). Dados semelhantes, isto é, maior infectividade de amastigotas de BALB/c também foram observados em macrófagos humanos, macrófagos peritoniais murinos e linhagem J774 (aproximadamente 30%, 54% e 14% de redução na infecção quando usados amastigotas nude, respectivamente) (Figura 16).

Avaliamos também se diferentes tipos de opsonização alteram a infectividade dos amastigotas testados frente a DCs e macrófagos humanos. Na Figura 17A, estão apresentados os dados comparativos de infecção de DCs e macrófagos humanos com amastigotas retirados de lesões de camundongos C3H/ nude que foram ou não opsonizados com soro imune murino (SIM), soro normal humano (SNH) e soro de paciente com leishmaniose (SIH). A Figura 17B apresenta o número de parasitas por célula infectada. Nós concluímos que a opsonização com

soro humano, tanto SHN quanto SIH, foi bastante efetiva para aumentar a entrada de amastigotas nude tanto em DCs como em macrófagos humanos.

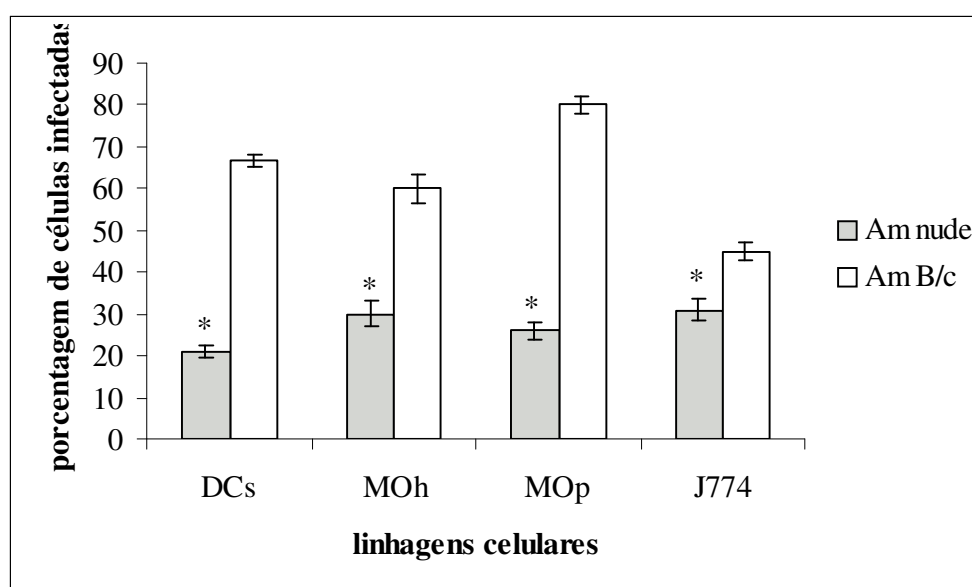


Figura 16. Infecção de DCs humanas e macrófagos de diferentes linhagens celulares com amastigotas de *L. amazonensis*. As DCs humanas (DCs), macrófagos humanos (MOh), macrófagos peritoniais (MOp) e macrófagos J774 (J774) foram infectados na proporção 3:1 (parasita:célula) durante 24 horas em estufa incubadora com amastigotas retirados de lesões de camundongos BALB/c (Am B/c) ou de C3H/nude (Am nude). Após 24 horas de incubação, as lamínulas contendo as células foram lavadas, coradas por Giemsa e analisadas em microscópio óptico. Os dados representam a média de 3 experimentos representativos $\pm$ o desvio padrão (* $p < 0,01$).

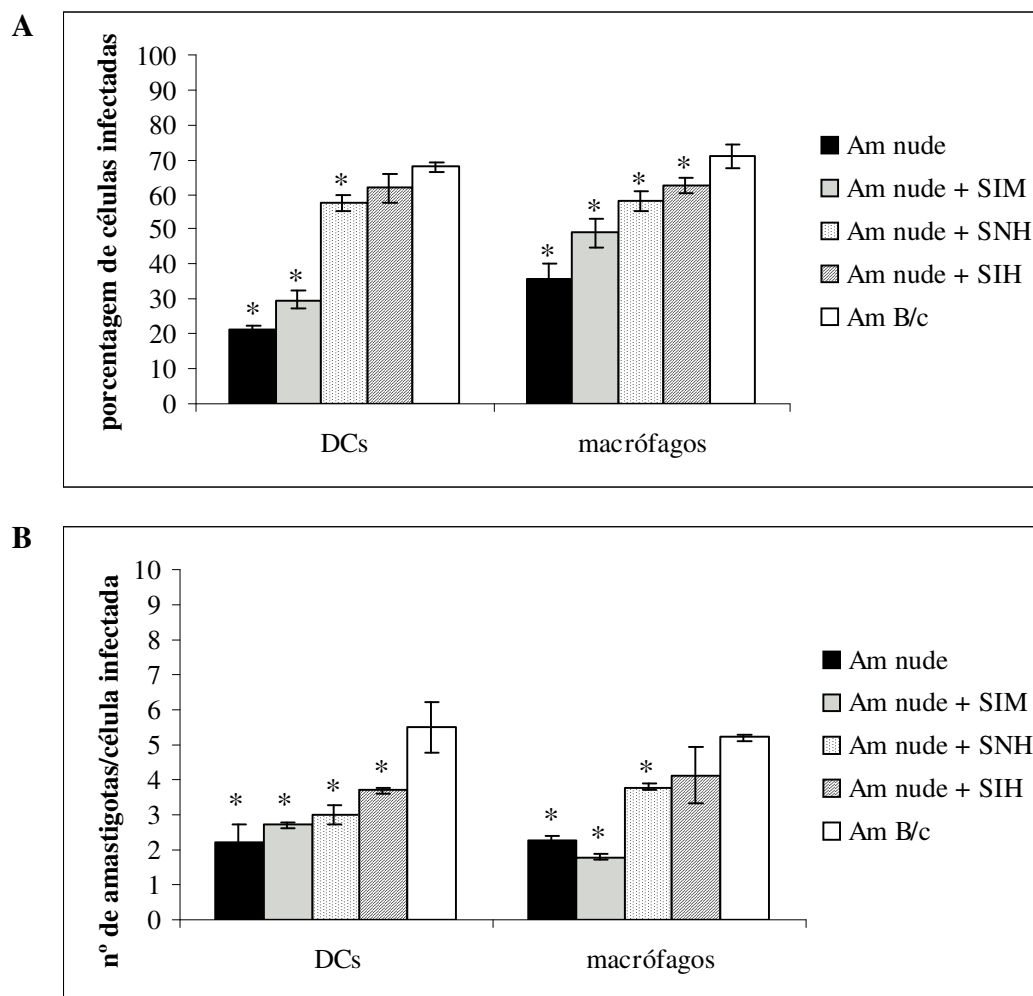


Figura 17. Infecção de DCs e macrófagos humanos com amastigotas de *L. amazonensis* retirados de camundongos C3H/nude. As células foram infectadas na proporção 3:1 (parasita:célula) durante 24 horas em estufa incubadora. Os amastigotas foram ou não (Am nude) opsonizados previamente com soro de camundongo infectado com *L. amazonensis* (SIM), soro normal humano (SNH) e soro de paciente com leishmaniose (SIH). Após a incubação, as lamínulas contendo as células foram lavadas, coradas por Giemsa e analisadas em microscópio óptico. Como controle, foi realizada infecção com amastigotas retirados de BALB/c (Am B/c). A) porcentagem de células infectadas e B) número de amastigotas por célula infectada. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão de 3 experimentos independentes (* $p < 0,01$).

4.3.2 Opsonização dos amastigotas de *L. amazonensis* com soros humanos.

De acordo com as reações de imunofluorescência utilizando lâminas com amastigotas de C3H/nude (Am nude), foram determinados os títulos de anticorpos dos soros (1:10 para o soro normal humano e 1:80000 para o soro de paciente com leishmaniose). Na Figura 18, estão apresentados os dados comparativos de infecção das DCs com amastigotas retirados de lesões de camundongos C3H/nude que foram ou não opsonizados com SNH, SNH inativado, SNH depletado de anticorpos (Ac), SNH inativado e depletado de Ac, SIH, SIH inativado, SIH depletado de Ac e SIH inativado e depletado de Ac. Nós concluímos que a opsonização com soro humano normal ou infectado, foi efetiva para aumentar a entrada de amastigotas “nude” nas DCs. Resultados semelhantes foram obtidos com diferentes soros humanos normais e de outros pacientes com leishmaniose (dados não mostrados). Observamos que a inativação do soro e/ou depleção de anticorpos, diminuem a entrada do parasita na célula (cerca de 25%). Entretanto, quando se retira simultaneamente complemento e anticorpos, a diminuição na porcentagem de infecção é significativa (redução de cerca de 42%) (Figura 18). Assim, a retirada de um ou outro componente provocou redução não significativa da porcentagem de infecção das células. O número de amastigotas por DC infectada foi menor que o controle (Am nude) apenas com SIH inativado e depletado (dados não mostrados).

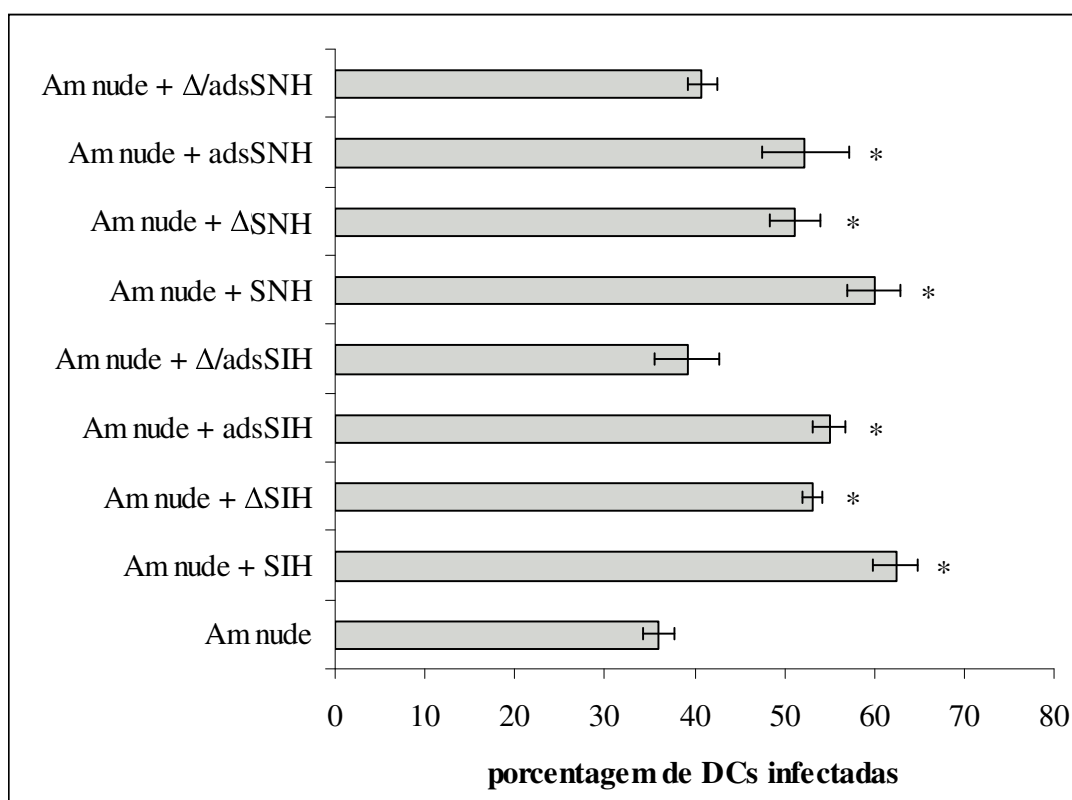


Figura 18. Infecção de DCs humanas com amastigotas de *L. amazonensis* retirados de camundongos C3H/nude. As DCs foram infectadas na proporção 3:1 (parasita:célula) durante 24 horas em estufa incubadora. Os amastigotas nude foram ou não (Am nude) opsonizados previamente com soro normal humano (SNH) e soro infectado humano (SIH), SNH inativado (Δ SNH), SNH sem anticorpos (adsSNH), SNH inativado e sem anticorpos (Δ /adsSNH, SIH inativado (Δ SIH), SIH sem anticorpos (adsSIH) e SIH inativado e sem anticorpos (Δ /adsSIH). Após a incubação, as lamínula foram coradas por Giemsa e analisadas em microscópio óptico. O SNH foi diluído 1:10 e o SIH 1: 80.000. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos representativos (* $p<0,01$).

4.3.3 Bloqueio de receptores de manose-fucose das DCs utilizando manana.

Considerando que as DCs apresentam receptores do tipo lectina na superfície celular e que estes estão envolvidos com a entrada de amastigotas de *Leishmania* na célula hospedeira (COLMENARES et al., 2002), foram realizados ensaios com manana solúvel de *Saccharomyces cerevisiae*. O objetivo foi avaliar se ocorre bloqueio de receptores de manose-fucose supostamente envolvidos na entrada do parasita na DCs humanas e conseqüente redução na porcentagem de infecção destas células. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figura 19 e 20. Inicialmente analisamos a infecção por 24 horas das DCs previamente tratadas com manana, como apresentados na Figura 19. Como pode ser visto, não houve alteração na porcentagem de infecção das DCs tanto com amastigotas retirados de camundongos BALB/c quanto com amastigotas “nude”, independente da dose utilizada da manana (Figura 19A). Também não foi verificada nenhuma alteração no número de amastigotas por célula infectada (Figura 19B). Baseados nos protocolos e resultados de Campos et al. (2006) e Colmenares et al. (2002) com macrófagos, o tempo de infecção das DCs foi reduzido de 24 para 2,5 horas de infecção e a concentração de manana usada foi de 750 µg/ml. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 20. Pode-se observar uma redução significativa (diminuição de cerca de 50%) na porcentagem de infecção das DCs tratadas com manana e infectadas com amastigotas retirados de camundongos BALB/c (Figura 20A). Porém, não houve alteração na porcentagem de infecção das DCs tratadas quando utilizamos amastigotas “nude”. O número de amastigotas por célula infectada não se alterou em nenhuma das situações, sugerindo que o tratamento com manana não afetou a capacidade de multiplicação dos amastigotas que conseguiram ser internalizados pelas DCs (Figura 20B).

Diante destes resultados, investigamos se os receptores de manose-fucose seriam utilizados para a entrada de formas promastigotas do parasita, forma menos opsonizada que os amastigotas retirados da lesão e semelhantes aos amastigotas “nude”. As culturas foram tratadas com 750 µg/ml de manana e infectadas com promastigotas em fase estacionária durante 24 horas. Na Figura 21A, observamos diminuição da porcentagem de DCs infectadas (cerca de 26%), indicando que a manana bloqueou os receptores de manose-fucose reduzindo a entrada do parasita. Houve também redução do número de parasitas intracelulares, reflexo da fagocitose retardada pela manana (Figura 21B).

Estes dados indicam que as formas promastigotas de *L. amazonensis* utilizam os receptores de manose-fucose para invadirem DCs humanas.

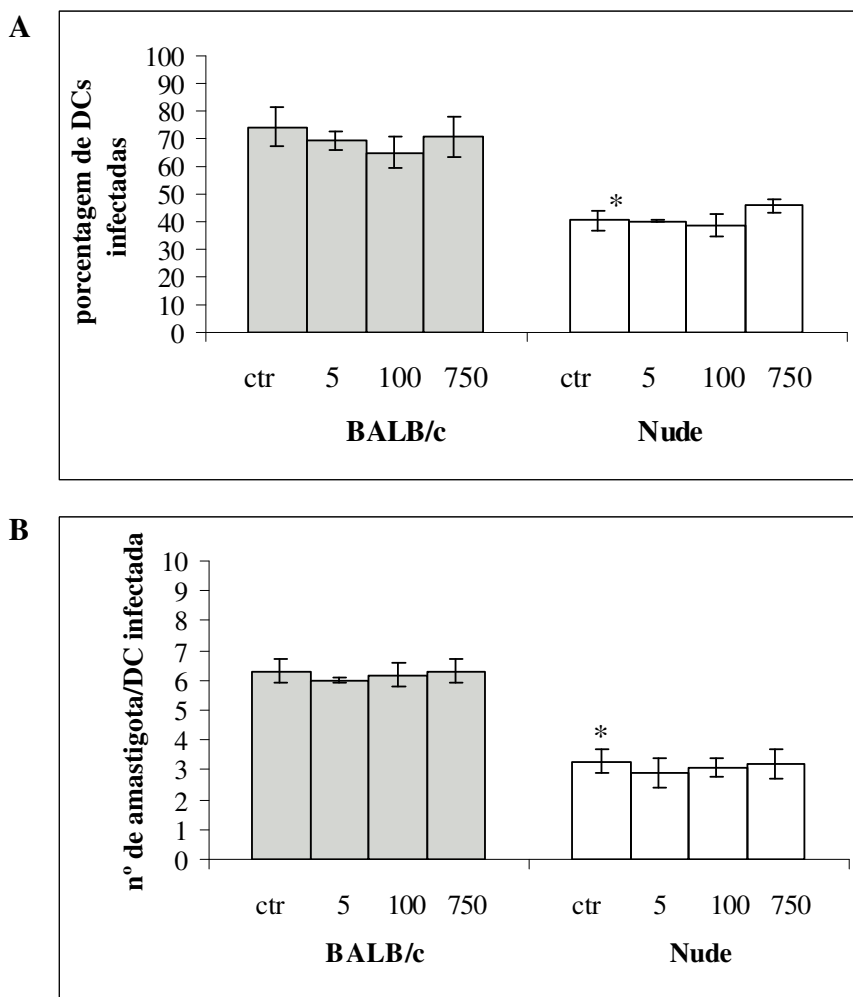


Figura 19. Infecção de DCs humanas com amastigotas de *L. amazonensis* retirados de camundongos BALB/c e C3H/nude. As culturas foram pré-tratadas com 5, 100 ou 750 µg/ml de manana durante 30 minutos e em seguida as células foram infectadas na proporção 3:1 (parasita:célula) durante 24 horas em estufa incubadora. Após a incubação, as lamínulas foram coradas por Giemsa e analisadas em microscópio óptico. Culturas não tratadas com manana foram utilizadas como controle (ctr). A) porcentagem de DCs infectadas e B) número de amastigotas por DC infectada. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes (* $p < 0,01$).

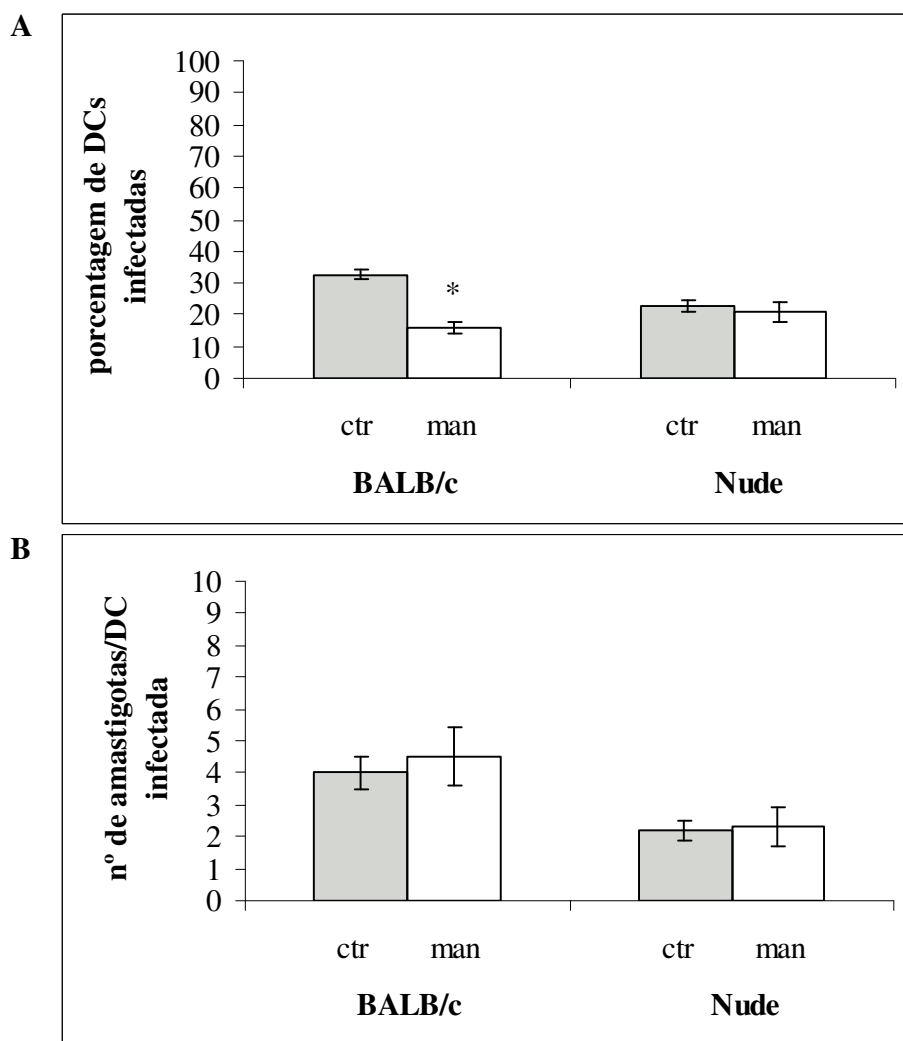


Figura 20. Infecção de DCs humanas com amastigotas de *L. amazonensis* retirados de camundongos BALB/c e C3H/nude. As culturas foram pré-tratadas com 750 µg/ml de manana durante 30 minutos e em seguida as células foram infectadas na proporção 3:1 (parasita:célula) durante 2,5 horas em estufa incubadora. Após a incubação, as lamínulas foram coradas por Giemsa e analisadas em microscópio óptico. Culturas não tratadas com manana foram utilizadas como controle (ctr). A) porcentagem de DCs infectadas e B) número de amastigotas por DC infectada. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes (* $p < 0,01$).

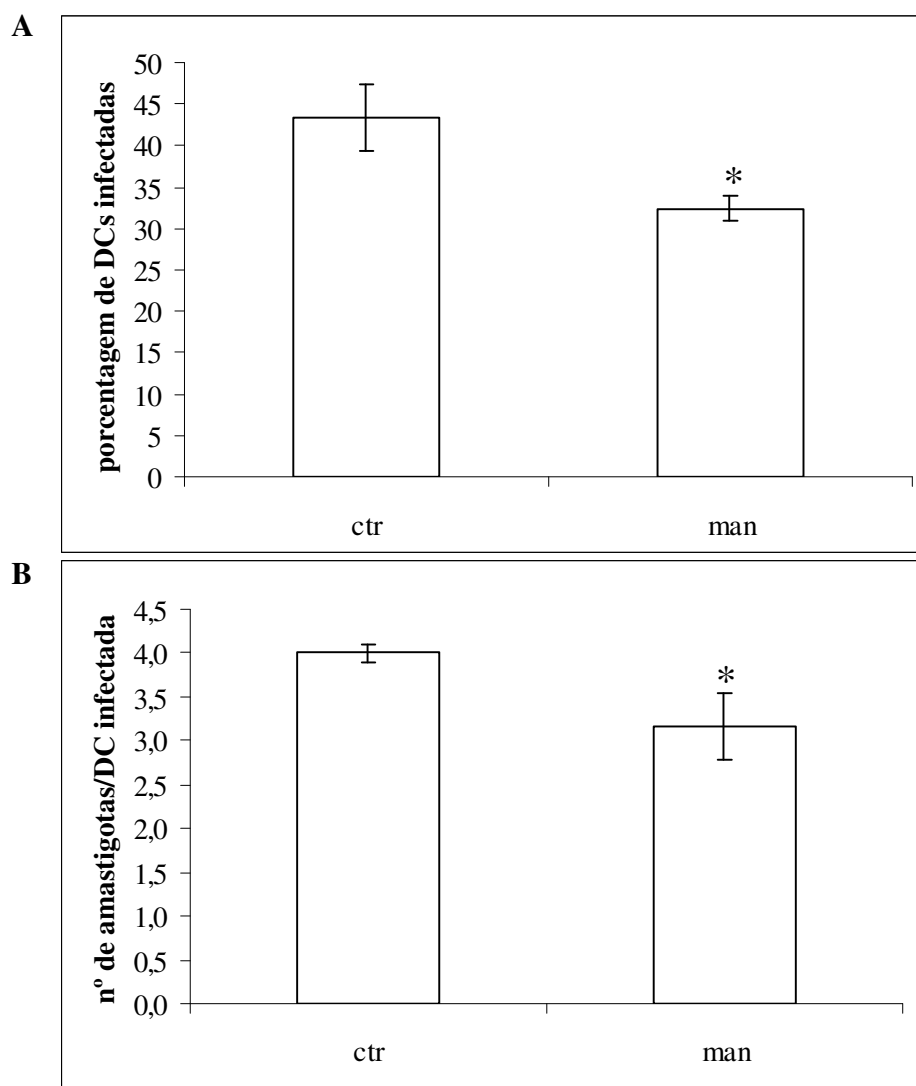


Figura 21. Infecção de DCs humanas com promastigotas de *L. amazonensis*. As culturas foram pré-tratadas com 750 µg/ml de manana (man) durante 30 minutos e em seguida as células foram infectadas na proporção 10:1 (parasita:célula) durante 24 horas em estufa incubadora. Após a incubação, as lamínulas foram coradas por Giemsa e analisadas em microscópio óptico. Culturas não tratadas com manana foram utilizadas como controle (ctr). A) porcentagem de DCs infectadas e B) número de amastigotas por DC infectada. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes (* $p < 0,01$).

4.3.4 Tratamento dos amastigotas de *L. amazonensis* com heparina.

Trabalhos de Love et al (1993) e Peters et al (1995), indicam que amastigotas de *Leishmania* são capazes de se ligar em heparina, o que afetaria a sua ligação nas células fagocitárias no momento da co-cultura. Assim, analisamos infecções por períodos de 2,5 horas e 24 horas com amastigotas tratados com heparina, isolados de camundongos BALB/c e C3H/nude (Figuras 22 e 23, respectivamente). Na Figura 22A, observamos redução significativa de 65% na porcentagem de infecção das DCs quando os amastigotas de BALB/c foram tratados com 100 µg/ml de heparina durante 24 horas, resultado semelhante ao obtido com o tempo de infecção de 2,5 horas. Uma diminuição foi observada no número de amastigotas por célula infectada no período de 24 horas, inexistente no período de 2,5 horas, sugerindo que é necessário um período maior de infecção para se observar o reflexo do bloqueio na fagocitose (Figura 22B).

Baseados nos dados obtidos com amastigotas de BALB/c, nós investigamos se amastigotas “nude” teriam atividade “ligadora” de heparina que facilitariam sua entrada na célula hospedeira (LOVE et al., 1993). Uma redução significativa de 50% na porcentagem de DCs infectadas foi observada quando os amastigotas “nude” foram pré-tratados com 100 µg/ml de heparina (Figura 23A). Como visto com os amastigotas de BALB/c, apenas no período de 24 horas de infecção observamos redução significativa também no número de amastigotas por DC infectada (Figura 23B).

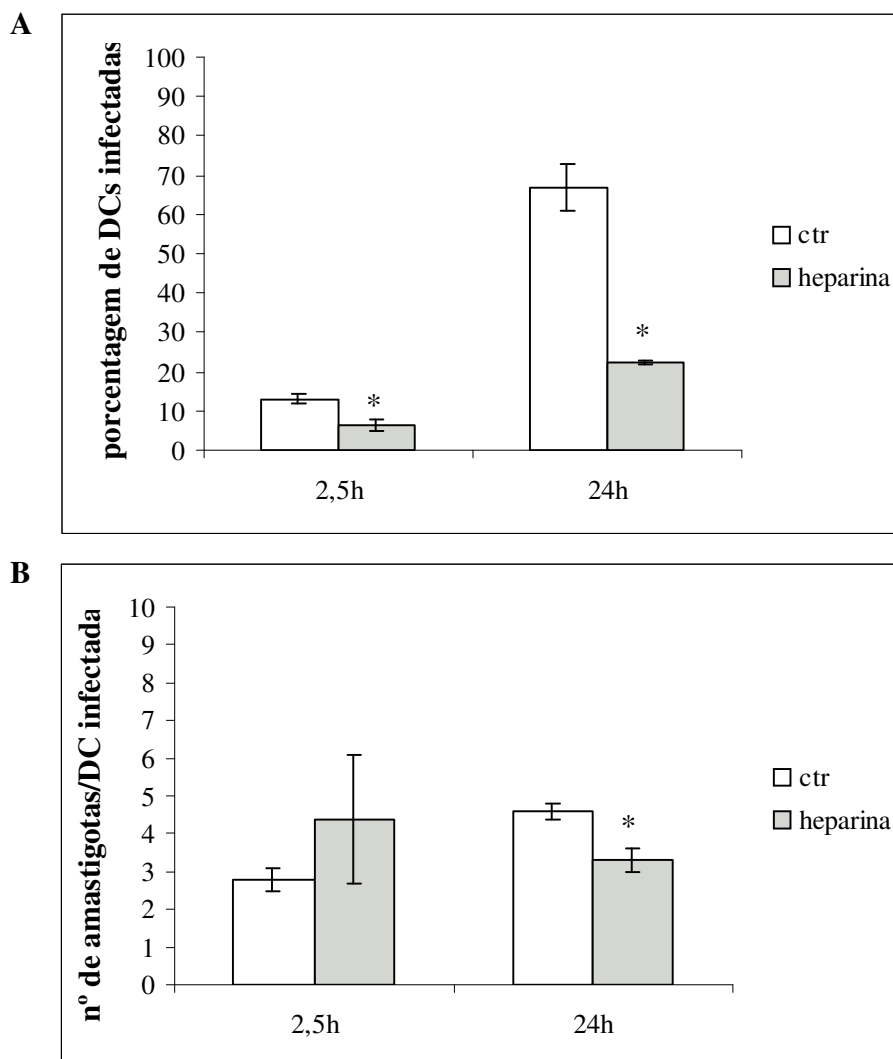


Figura 22. Infecção de DCs humanas com amastigotas de *L. amazonensis* retirados de camundongos BALB/c. Os amastigotas foram pré-tratados com heparina (100 µg/ml) e adicionados à monocamada de DCs na proporção 3:1 (parasita:célula) durante 2,5 e 24 horas. Após a incubação, as lamínulas foram coradas por Giemsa e analisadas em microscópio óptico. Como controle, foram utilizados amastigotas não tratados com heparina (ctr). A) porcentagem de DCs infectadas e B) número de amastigotas por DC infectada. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes (* $p < 0,01$).

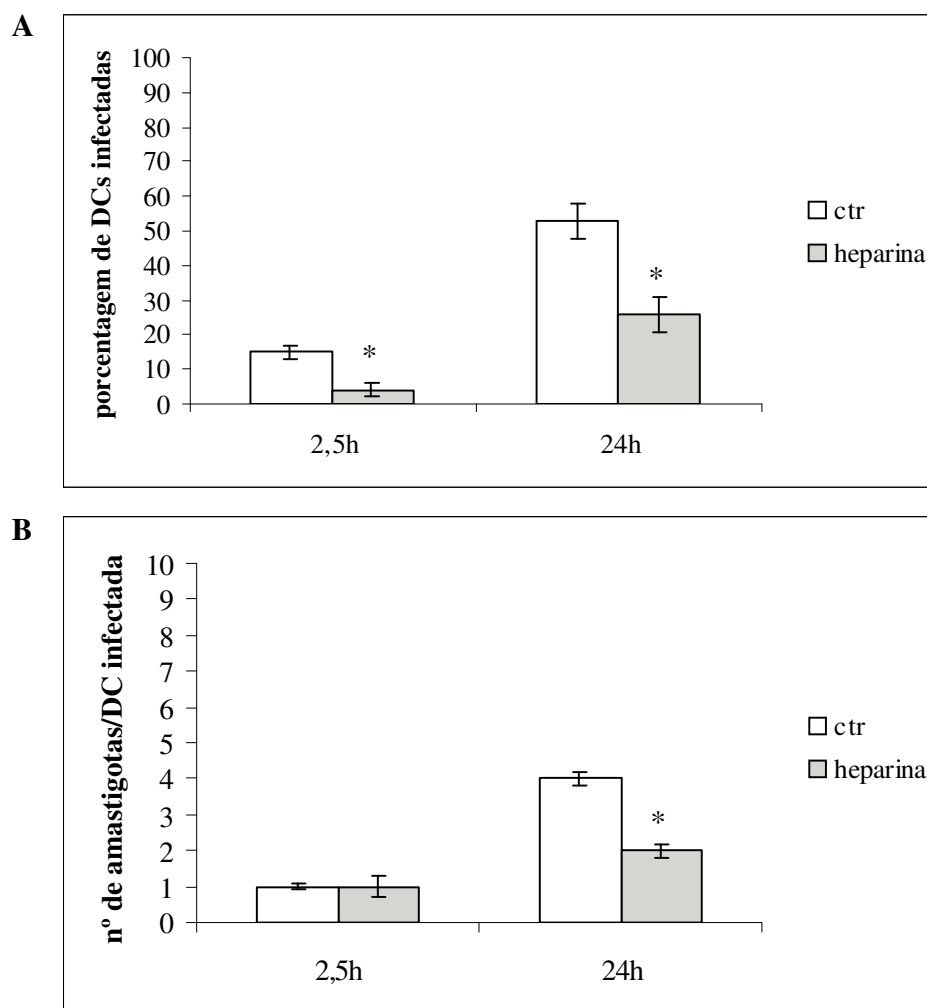


Figura 23. Infecção de DCs humanas com amastigotas de *L. amazonensis* retirados de camundongos C3H/nude. Os amastigotas “nude” foram pré-tratados com heparina (100 µg/ml) e adicionados à monocamada de DCs na proporção 3:1 (parasita:célula) durante 2,5 e 24 horas. Após a incubação, as lamínulas foram coradas por Giemsa e analisadas em microscópio óptico. Como controle, foram utilizados amastigotas não tratados com heparina (ctr). A) porcentagem de DCs infectadas e B) número de amastigotas por DC infectada. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes (* $p < 0,01$).

DISCUSSÃO

As DCs são elementos chaves do sistema imune funcionando como células apresentadoras de antígenos profissionais para linfócitos T, tanto *in vivo* como *in vitro* (BRANDONISIO et al., 2004). A habilidade das DCs de agirem como apresentadoras profissionais na indução da resposta de linfócitos T a uma variedade de antígenos pode ser atribuída à sua capacidade de expressar altos níveis de moléculas co-estimulatórias e/ou acessórias. Recentemente, têm se dado ênfase ao estudo deste tipo celular, principalmente no contexto das infecções. DCs ativadas podem produzir IL-12 regulando a resposta imune celular, um processo crítico para conter infecções por patógenos intracelulares como é o caso da *Leishmania* (AWASTHI et al., 2004; BRANDONISIO et al., 2004).

O estado redox da célula mostrou ser um importante mediador da comunicação bi-direcional DC-célula T (GOTH et al., 2006), a qual envolve moléculas de superfície como CD80, CD86 e HLA. Trabalhos como o de Qu et al. (2005) mostraram que a hipóxia pode afetar o processo de maturação e a capacidade migratória das DCs humanas. Lahat et al. (2003) também verificaram que a hipóxia reduzia a expressão de CD80 em monócitos humanos e estimulava a produção de TNF- α pelos mesmos. Além disso, a tensão de O₂ ambiente ou a concentração de moléculas redutoras no meio de cultura pode influenciar a secreção de citocinas como INF- γ e IL-12 (MURATA et al., 2002) e aumentar a expressão de FCR1 (NOVAK et al., 2002) pelas DCs. Mais recentemente, Goth et al. (2006) descreveram um protocolo no qual DCs derivadas da medula óssea murina cultivadas em ambiente com 5% de oxigênio geraram significativamente mais DCs imaturas e maduras do que as condições convencionais usando oxigênio ambiente (21% de O₂). Estes dados sugerem que a hipóxia pode afetar o fenótipo e funções celulares e conseqüentemente a resposta inflamatória. Assim, neste trabalho analisamos os efeitos da hipóxia

na resistência/susceptibilidade de DCs humanas a *L. amazonensis* e também a interação DC/parasita.

5.1 As culturas de DCs humanas.

As DCs podem ser isoladas a partir de culturas de sangue periférico humano e conduzidas na presença das citocinas IL-4 e GM-CSF para estudos de DCs humanas (BENDER et al., 1996; KODAIRA et al., 2000; MAROVICH et al., 2000; McDOWELL et al., 2002; NAIR et al., 1998; PICKL et al., 1996; SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994). Em nosso trabalho, foram avaliados alguns protocolos de obtenção de DCs humanas a partir de monócitos do sangue periférico obtido de indivíduos saudáveis. Dentre os protocolos avaliados (Tabela 1), o cultivo dos monócitos sanguíneos com 50 ng/ml de GM-CSF rh e 250 ng/ml de IL-4 rh durante 7 dias, sem troca de meio de cultura e/ou adição das citocinas, foi o que se mostrou mais eficiente na diferenciação dos monócitos com 70% das células em cultura apresentando morfologia condizente à DCs humanas (Figuras 1 e 2). As condições que empregaram os sobrenadantes das culturas H28 e 5637 como fonte alternativa de IL-4 e GM-CSF, respectivamente (Tabela 1), não foram eficientes no processo de diferenciação (Figura 1). As linhagens humanas H28 e 5637 produzem e secretam IL-4 e GM-CSF, respectivamente (QUENTMEIER et al., 1997; SEVERINSON et al., 1987). As razões para a baixa diferenciação em DCs nas culturas com estes sobrenadantes não são conhecidas, mas podemos supor uma baixa produção ou concentração das citocinas nos sobrenadantes das culturas dessas linhagens celulares. Quanto à estabilidade das culturas de DCs cultivadas com IL-4 e GM-CSF recombinantes, esta diminuiu após 10 dias de cultivo, visto que a expressão dos principais marcadores de superfície celular para DCs (HLA, CD80, CD86, CD1a, CD83) decaiu significativamente nestas células (dados não mostrados).

A análise fenotípica das DCs obtidas de acordo com a condição 1 (250 ng/ml de IL-4 e 50 ng/ml de GM-CSF) mostraram perfil comprobatório deste tipo celular (Figura 3). As células expressaram altos níveis de moléculas de HLA-DR (93%) bem como de moléculas acessórias como CD80 (60%), CD86 (51%) e CD1a (56%). A imunofenotipagem também indicou ausência de células como linfócitos, monócitos e células NK, avaliada pela baixa porcentagem dos marcadores CD14, CD3, CD19 e CD54. O marcador CD83, específico da linhagem de DCs, teve uma expressão baixíssima (1,3%). Dados da literatura indicam que DCs humanas cultivadas a partir de monócitos do sangue periférico na presença de GM-CSF e IL-4 por 6 a 7 dias podem ser consideradas DCs imaturas (ROMANI et al., 1996). Embora elas tenham adquirido níveis relativamente altos de HLA e de moléculas co-estimulatórias e de adesão elas ainda apresentam baixa expressão de marcadores da diferenciação final, como a molécula CD83 (BENDER et al., 1996; ROMANI et al., 1996). A maioria dos protocolos de obtenção de DCs humanas disponíveis na literatura envolve a troca de meio de cultura e das citocinas GM-CSF e IL-4 recombinantes a cada dois dias (BENDER et al., 1996; MAROVICH et al., 2000; McDOWELL et al., 2002; ROMANI et al., 1996; ZHOU & TEDDER, 1996). Outros protocolos utilizam plasma humano ao invés de soro fetal bovino como suplemento do meio de cultura (BENDER et al., 1996). Roy et al. (2004) verificaram ainda que somente a presença de IL-4, sem o envolvimento de GM-CSF endógeno, foi capaz de induzir a diferenciação dos monócitos em DCs CD83⁺. No entanto, a expressão de CD1a (cerca de 10%) foi menor quando comparada com culturas suplementadas com IL-4 e GM-CSF (53% das células expressando CD1a), um resultado que se assemelha aos nossos dados apresentados na Figura 3. Nossos resultados (Figura 3 e Tabela 1) também foram semelhantes àqueles nos quais as DCs foram obtidas mediante troca de meio ao longo do período de cultura. Segundo o trabalho de Marovich et al. (2000), as culturas em que as citocinas eram

adicionadas em dias intercalados, as DCs foram rotineiramente positivas para HLA (95%), CD80 (20%) e CD1a (90%).

Sendo assim, o protocolo escolhido e padronizado neste trabalho, para obtenção de DCs humanas, gerou células com fenótipo, morfologia e capacidade infectiva característicos de DC. Além de eficiente, o protocolo pode ser considerado prático e menos dispendioso para obtenção das DCs humanas a partir de monócitos do sangue periférico.

5.2 A infecção das DCs humanas com *L. amazonensis*.

As DCs apresentam capacidade fagocítica e macropinocítica desenvolvida (BRANDONISIO et al., 2004). Padronizado o método de obtenção das DCs, as culturas foram infectadas com amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*. As DCs fagocitaram ambas as formas do parasita (Figuras 4 e 5). A média de infecção das DCs humanas foi em torno de 60-70% para amastigotas, com a média de 5-6 parasitas por célula infectada (Figura 4). As culturas de DCs são capazes de manter a infecção por até 72 horas. A Figura 6 ilustrou DCs humanas com as formas amastigotas de *L. amazonensis* localizados no vacúolo parasitóforo da célula. Muitas das células infectadas contêm mais de um parasita, e a maioria destas formas estão localizadas perifericamente dentro da célula. Às 96 horas, as DCs foram perdendo a viabilidade. Bender et al. (1996) também observaram deterioração semelhante de DCs humanas cultivadas por mais de 10 dias sem adição ou troca de meio fresco e/ou citocinas. Assim, a razão pela qual não conseguimos avaliar a infecção neste período deve-se a morte de DCs.

As infecções de DCs com formas promastigotas obtidas de culturas em fase estacionária apresentaram porcentagem de infecção em torno de 30% com uma média de 3,5 parasitas por célula, e no caso de parasitas opsonizados com soro normal humano a infecção subiu para 40% com média de 5 parasitas por célula infectada, mostrando que a opsonização com anticorpos

presentes normalmente no soro facilita a fagocitose (Figura 5). Estes dados são semelhantes àqueles obtidos com macrófagos humanos em que amastigotas também são mais infectivos que promastigotas (ALBUQUERQUE, 2005).

5.3 A exposição das DCs ao microambiente hipóxico.

Considerando que, nossos dados demonstraram que monócitos do sangue periférico cultivados na presença de 50 ng/ml de GM-CSF rh e 250 g/ml de IL-4 rh durante 7 dias desenvolveram morfologia de células dendríticas (“DC-like”) e expressaram marcadores de superfície preferencialmente expressos em DCs e que estas células apresentaram capacidade infectiva para ambos os estágios de *L. amazonensis* (promastigotas e amastigotas), investigamos então os efeitos da hipóxia na resistência/suscetibilidade de DCs humanas a *L. amazonensis*.

Nas leishmanioses cutâneas causadas por *L. braziliensis* ou por *L. amazonensis*, a inflamação ativa (migração de células mononucleares), a destruição tecidual (induzida por células inflamatórias), as infecções secundárias e as tentativas de reparo tecidual ocorrem simultaneamente e tem características que levam a hipóxia tecidual (ARRAIS-SILVA et al., 2005; GIORGIO et al., 1998; WEIGLE & SARAVIA, 1996). Sob a condição de hipóxia escolhida (infecção de 24 horas em hipóxia), fornecemos evidências de que as culturas de DCs expostas à hipóxia e infectadas com *L. amazonensis* têm redução na porcentagem de células infectadas (Figura 7A) e no número de parasitas intracelulares (Figura 7B). Dentre as condições de hipóxia testadas (Figura 7), as condições II e III apresentaram efeitos similares na infecção das células, isto é, redução de 22% e 27% da infecção, respectivamente. Mas a condição II (infecção de 24 horas em hipóxia) é a que deve se aproximar mais da situação *in vivo*, isto é, somente após a infecção o indivíduo desenvolverá lesões que levarão a uma hipóxia tecidual com suas células entrando em contato com ambientes de baixa oxigenação.

Na literatura, informações relacionadas aos efeitos da hipóxia na infecção de DCs por microrganismos não estão disponíveis ou são insuficientes para comparação com os resultados obtidos. Recentemente, Colhone et al. (2004) forneceram as primeiras evidências de que a hipóxia (6% O₂) poderia alterar a suscetibilidade de macrófagos à infecção por *L. amazonensis*. De fato, macrófagos de diferentes linhagens expostos a hipóxia e infectados com *L. amazonensis* mostraram redução na porcentagem de células infectadas. Os autores também mostraram que macrófagos e parasitas, isoladamente não perdem a viabilidade em hipóxia (COLHONE et al., 2004). Degrossoli et al. (2004) também mostraram que macrófagos primários murinos e linhagem J774 expostos a hipóxia foram eficientemente infectados com *L. amazonensis*, mas após 24 horas em hipóxia ocorreu redução na porcentagem de células infectadas e no número de parasitas intracelulares, indicando que a hipóxia induziu macrófagos a matarem os parasitas. Os mecanismos leishmanicidas dos macrófagos em hipóxia não são conhecidos. Em nossos estudos, mostramos que a redução nas porcentagens de infecção não é devido ao fato de que o parasita não penetra nas DCs em microambiente hipóxico. A Figura 8 confirmou que a infecção ocorreu de forma eficiente e após 2,5 horas de infecção em hipóxia a porcentagem de infecção era igual à de normóxia (59% x 70%, respectivamente) sugerindo que os parasitas conseguiram penetrar nas células igualmente em normóxia e hipóxia. Concluímos então que a hipóxia não afeta a entrada do parasita na DC o que sugere que a hipóxia está exercendo algum efeito nas DCs. Uma série de experimentos foram realizados com o objetivo de estudar os mecanismos leishmanicidas de DCs em hipóxia: a possível ativação e sinergia com LPS + IFN- γ e a produção de IL-12.

Sabe-se que monócitos do sangue periférico dão origem a DCs imaturas após cultura de 7 dias com GM-CSF e IL-4. Estas células imaturas tornam-se maduras após estimulação com componentes microbianos como o LPS, citocinas como TNF- α , IL1 e IFN- γ ou ainda induzido

pela ligação de receptores como o CD40 (ROY et al., 2004). LPS e IFN- γ também ativam macrófagos que conseqüentemente têm a infecção reduzida com amastigotas de *L. amazonensis*, tanto em condições normóxicas quanto hipóxicas, como já publicado pelo grupo (COLHONE et al., 2004). Assim, avaliamos a capacidade de ativação das DCs com LPS e IFN- γ frente infecção com amastigotas de em hipóxia e normóxia. Inicialmente foi feita uma padronização do tempo de ativação como descrito no subitem 3.5 de Materiais e Métodos. A Figura 9 mostrou que apenas 24 horas de ativação prévia foi capaz de reduzir a porcentagem de infecção das DCs com amastigotas em cerca de 70% (controle) para 47%. O mesmo período de ativação já havia sido selecionado pelo grupo para experimentos com linhagens de macrófagos (COLHONE et al., 2004; DEGROSSOLI et al., 2004). Passamos a testar uma concentração de 100 ng/ml de IFN- γ baseado em trabalhos já publicados com DCs humanas (MOSCA et al., 2000; SNIJDERS et al., 1998) e a utilizar também culturas ativadas e expostas ao microambiente hipóxico.

Células dendríticas previamente ativadas com LPS (100 ng/ml) e INF- γ (100 ng/ml) durante 24 horas são capazes de reduzir a porcentagem de infecção em ambiente normóxico (de 70% para 49%) (Figura 10) assim como DCs expostas à hipóxia (de 70% para 48%). Sabendo que as duas condições, ativação celular e exposição à hipóxia, diminuiriam a infecção das DCs, investigamos se a aplicação concomitante destas duas condições geraria um efeito sinérgico, potencializando a capacidade leishmanicida observada em DCs ativadas em normóxia. A Figura 10A mostrou que a hipóxia não foi capaz de potencializar o efeito leishmanicida observado em DCs não ativadas e submetidas à hipóxia. Observamos que DCs ativadas com LPS e INF- γ em hipóxia reduzem a porcentagem de células infectadas tão efetivamente quanto DCs ativadas com LPS e INF- γ em normóxia. Nossos resultados condizem com os resultados já obtidos pelo nosso grupo com linhagens de macrófagos tumorais U937 e macrófagos peritoniais murinos

(COLHONE et al., 2004). No presente, não podemos explicar o porquê deste efeito não sinérgico, mas sugerimos que os parasitas intracelulares apresentam mecanismos de defesa contra a célula hospedeira; mesmo quando ativados, com LPS + INF- γ ou hipóxia, parte destes parasitas resiste e sobrevive.

Nós precisávamos avaliar se a redução na infecção observada durante a hipóxia não estaria relacionada a uma menor viabilidade das DCs, o que explicaria a baixa porcentagem de infecção, e para este fim utilizamos o teste de MTT. Segundo Mosmann (1983), através deste teste é possível diferenciar células vivas de células mortas sendo de ampla aplicabilidade para medidas de sobrevivência e proliferação de vários tipos celulares via atividade mitocondrial encontrada apenas nas células vivas. Em nossos experimentos (Figura 11) observamos que as DCs não apresentaram diferenças significativas na viabilidade quando cultivadas em ambiente hipóxico e normóxico.

Dado que as culturas de DCs expostas à hipóxia permaneceram viáveis, avaliamos também o seu perfil fenotípico. Assim, para analisarmos os efeitos da hipóxia no fenótipo e, portanto, no processo de maturação das DCs, as células foram cultivadas sob condições hipóxicas ou normóxicas. De acordo com os dados da Figura 12 e Tabela 2 as DCs expostas ao microambiente hipóxico apresentaram mudanças fenotípicas. Algumas moléculas como HLA e CD83, indicadores de maturação, não sofreram alterações. Além disso, a exposição ao microambiente hipóxico levou a redução nos níveis de expressão dos marcadores CD80 e CD86 (segundo a Tabela 2: 50% vs 37% e 64% vs 31%, respectivamente). Nas análises pudemos observar também redução da expressão de CD1a, molécula envolvida na apresentação de antígenos lipídicos pelas DCs (56% vs 46%). Goth et al. (2006) mostraram que DCs murinas cultivadas em 5% de O₂ expressavam mais MHC classe II do que DCs cultivadas a 20% de O₂.

Além disso, eles não observaram diferenças na expressão de CD80 e CD86 entre as culturas cultivadas em 5% ou 20% de O₂. Segundo Qu et al. (2005), a hipóxia de 1% de O₂ (o período de hipóxia utilizado não foi mencionado no artigo) levou à redução dos níveis de HLA e um aumento moderado nos níveis de CD83 nas culturas de DCs humanas, não havendo alterações para marcadores como o CD80 e CD86. Comparando nossos dados com os de Qu et al. (2005), podemos sugerir que as diferenças observadas podem estar relacionadas ao grau de hipóxia (1% de O₂ no trabalho de Qu et al. e 6% de O₂ neste trabalho) e a possível diferença nos tempos de incubação em hipóxia (não citado por QU et al., e 24 horas neste trabalho). Outros trabalhos indicam queda nos níveis de expressão de CD80 em monócitos humanos após exposição a 0,3% de O₂ por 24 horas (LAHAT et al., 2003).

Como pode ser observado, nossos resultados são únicos dentro das condições testadas (6% de O₂ por 24 horas) e sugerem que a hipóxia, como fator microambiental, pode modular o fenótipo das DCs.

5.4 Produção de IL-12 pelas DCs humanas.

Nos últimos 10 anos, a citocina IL-12 têm sido alvo de estudos dentro do campo da imunidade mediada por células, já que apresentam papel fundamental no desenvolvimento de células Th1 conferindo resistência a infecções parasitárias (OLIVEIRA et al., 2005; PARK et al., 2002). Esta citocina tem papel importante na imunofisiologia da leishmaniose experimental e é requerida para o desenvolvimento de imunidade protetora Th1. A IL-12 é uma citocina heterodimérica composta por duas subunidades, a p35 e p40, as quais associadas formam a molécula IL-12p70 ativa (OLIVEIRA et al., 2005). Nós investigamos primeiramente quais as condições necessárias para a produção da molécula bioativa IL-12p70 pelas DCs derivadas de monócitos do sangue periférico. Nossos resultados sugerem que as DCs humanas necessitam de

estímulos como LPS e IFN- γ , para produzirem quantidades detectáveis de IL-12 (Figura 13). Este fato corrobora com dados da literatura nos quais a produção de IL-12 pelas DCs é dependente de estímulos de maturação/ativação como LPS, IFN- γ , e ligante de CD40 (CD40L) (CELLA et al., 1996; MOSCA et al., 2000; SNIJDERS et al., 1998).

A literatura nos mostra que o modelo *in vitro* da interação DC/parasita pode ser adaptado a qualquer espécie de *Leishmania* (MAROVICH et al., 2000; McDOWELL et al., 2002). De acordo com a Figura 13, culturas de DCs infectadas não produziram IL-12p70 detectável pelo método realizado (ELISA). No entanto, as culturas infectadas que receberam estímulos de ativação (LPS e IFN- γ) foram capazes de produzir a citocina. McDowell et al. (2002) mostraram que DCs infectadas com *L. major* produziram IL-12p70 somente na presença de LPS e IFN- γ ou CD40L. Infecções de DCs com *L. tropica* ou *L. donovani* na presença dos estímulos citados não induziram secreção de IL-12. Henri et al. (2002) também observaram que DCs murinas infectadas com *L. major* produziram pequenas quantidades de IL-12 comparado às quantidades obtidas pelas culturas estimuladas com CpG, IFN- γ e IL-4. Além disso, a adição de amastigotas ao coquetel de CpG, IFN- γ e IL-4, não teve efeito nos níveis de IL-12p70. Von Stebut et al. (1998) já haviam mostrado que a liberação de IL-12p70 induzida por *L. major* pelas DCs murinas requer a presença de IFN- γ e períodos prolongados de incubação (72 horas). Marovich et al. (2000) verificaram também que tanto as formas amastigotas quanto as promastigotas de *L. major* necessitam de co-estimulação para a produção de IL-12 pelas DCs humanas. Resultados como estes também foram observados por Sartori et al. (1997) com monócitos humanos e promastigotas de *L. major*. De modo geral, os nossos resultados e os dados da literatura sugerem que tanto as formas amastigotas quanto promastigotas de certas espécies de *Leishmania* pertencem ao grupo de patógenos cuja habilidade em induzir IL-12 depende do ambiente de

citocinas. Tais espécies podem ter habilidades intrínsecas na sua capacidade em induzir elementos cruciais da resposta imune inata. Sendo assim, supomos que a produção de IL-12 pelas DCs possa ser regulada de acordo com as condições microambientais.

A hipóxia local é comum nas inflamações teciduais, podendo ocorrer numa variedade de tecidos sendo um mecanismo de defesa do hospedeiro contra as infecções. Sugere-se então que o ambiente hipóxico pode ajudar a modificar a resposta de macrófagos e DCs nos tecidos inflamados, modulando suas funções a fim de direcionar a resposta imune através do perfil de citocinas produzido, especialmente IL-12 e IFN- γ . Diante dos resultados obtidos em normóxia, isto é, produção de IL-12 somente na presença dos ativadores, avaliamos os efeitos da hipóxia na produção desta citocina pelas DCs. Não detectamos produção de IL-12 pelas culturas de DCs infectadas ou não com *L. amazonensis* em condições de hipóxia (6% de O₂ por 24 horas). Já as culturas ativadas com LPS e IFN- γ produziram IL-12 p70 em hipóxia, inclusive, em quantidades maiores quando comparado a normóxia (100 pg/ml em normóxia vs 1047 pg/ml em hipóxia). Culturas ativadas e infectadas com *L. amazonensis* em hipóxia também produziram IL-12, porém, a baixa tensão de O₂ reduziu a quantidade de IL-12 produzida quando comparado a normóxia. Até o presente, há somente um trabalho na literatura avaliando a produção de IL-12 pelas DCs diante de baixas concentrações de O₂ (MURATA et al., 2002). Murata et al. (2002) conseguiram detectar IL-12 nos sobrenadantes de culturas de DCs murinas sem co-estimulação, ou seja, apenas com meio de cultura. Eles mostraram também que a hipóxia (1,5% de O₂) aumentou a produção de IL-12 e IFN- γ pelas DCs murinas.

Apesar da inexistência de dados na literatura para comparação direta com nossos resultados, concluímos que a condição de hipóxia utilizada (6% de O₂) aumenta a produção de IL-12 bioativa por DCs humanas ativadas com LPS e IFN- γ , assim como observado por Murata

et al. (2002) para DCs murinas, e que a adição de *Leishmania* a estas culturas não altera significativamente os níveis de IL-12 produzidos (1047 ± 152 pg/ml vs 1300 ± 160 pg/ml). No entanto, esta situação de ativação e infecção sob hipóxia produziu quantidades de IL-12p70 menores quando comparadas a normóxia (1300 pg/ml em hipóxia vs 2160 pg/ml em normóxia). Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na regulação da produção de IL-12 pelas DCs sob hipóxia (MURATA et al., 2002). Nossos resultados sugerem que a hipóxia deve ter um papel crítico como um co-fator na ativação de DCs em tecidos inflamados. A presença de *Leishmania* parece modular/regular negativamente a produção de IL-12 em hipóxia, talvez refletindo um mecanismo de controle por parte do parasita (BRANDONISIO et al., 2004).

5.5 Efeito de drogas leishmanicidas em DCs infectadas com *L. amazonensis*.

A leishmaniose humana está distribuída no mundo todo, mas principalmente nas regiões dos trópicos e subtropicais com uma prevalência de doze milhões de casos e uma incidência de aproximadamente meio milhão de casos de leishmaniose visceral e um milhão e meio de casos de leishmaniose cutânea (<http://www.who.int/tdr/disease/leish/diseaseinfo.htm>) (AWASTHI et al., 2004). A resistência às drogas utilizadas tradicionalmente na terapia (antimoniais pentavalentes, como o Glucantime), aliada aos efeitos colaterais destes compostos, fazem com que alternativas ao tratamento sejam estudadas (MURRAY et al., 2005). No Brasil, o medicamento à base de antimônio utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose é o antimoniato de metilglucamina, comercialmente disponível como Glucantime (antimoniato de meglumina). Além dos antimoniais, outras drogas têm sido empregadas no tratamento de diversas formas da leishmaniose, entre as quais se destacam a pentamidina, Anfotericina B, paromicina e mais recentemente, o Miltefosine (RATH et al., 2003).

O antimoniato de metilglucamina é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e conseqüente aumento de formas resistentes do parasita (RATH et al., 2003). Pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desta droga e sugere-se que o antimônio pentavalente possa ser uma pró-droga, sendo convertido à forma letal trivalente dentro do amastigota intracelular, interferindo no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando à depleção dos níveis de ATP intracelular (RATH et al., 2003). Além disso, existe na forma amastigota uma metaloprotease zinco dependente, que poderia ser inativada se o antimônio substituísse o zinco nesta enzima, essencial para o desenvolvimento do parasita (CROFT & COOMBS, 2003; RATH et al., 2003).

A Anfotericina B é um antibiótico antifúngico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, sendo indicada para o tratamento da leishmaniose mucocutânea americana, embora não se considere fármaco de primeira escolha. Ela se complexa com esteróis da membrana celular, tais como o ergosterol, causando poros os quais alteram o balanço de íons resultando em morte celular (CROFT & COOMBS, 2003). A Anfotericina B pode ser incorporada em lipossomas carregadores sendo absorvida pelo sistema retículo endotelial onde o parasita reside, e é assim pouco absorvida pelos rins, o maior órgão alvo de toxicidade da Anfotericina (RATH et al., 2003).

O Miltefosine, inicialmente desenvolvido como droga anticâncer, mostrou ser ativo contra *Leishmania spp*, *in vivo* e *in vitro*, e até o momento é o primeiro tratamento oral para a leishmaniose visceral (RATH et al., 2003). A principal limitação do Miltefosine é sua teratogenicidade, além disso, Miltefosine tem meia vida longa o que pode levar ao surgimento de cepas resistentes como foi já observado por Seifert et al. (2003) com *L. donovani*. O

mecanismo específico de ação do Miltefosine dentro da *Leishmania* permanece incerto. Alterações da biossíntese de glicoproteínas e fosfolípidos, transdução de sinais, homeostase de cálcio e danos na membrana flagelar tem sido relatados (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006).

Os alvos da quimioterapia são os amastigotas intracelulares que sobrevivem dentro da célula hospedeira. Os amastigotas residem dentro dos vacúolos parasitóforos, os quais se parecem com lisossomos secundários com pH de 4,5 a 5,0. O ambiente ácido influencia as estratégias dos amastigotas em adquirir nutrientes e homeostase de íons. Estas estratégias poderiam mediar a entrada da droga ou a saída dela, tendo um papel na determinação da suscetibilidade do parasita ao quimioterápico. Existem evidências também de que as espécies de *Leishmania* podem residir em diferentes tipos celulares, como as DCs, e também tem adaptações que facilitam a sobrevivência intracelular. Estas adaptações podem também ser levadas em consideração nas diferenças vistas na suscetibilidade tornando necessário remodelamento dos modelos laboratoriais utilizados para estudar a eficácia de uma droga (CROFT & COOMBS, 2003).

O modelo de estudo escolhido, fagócito-amastigota, é o modelo mais amplamente utilizado para testar drogas contra espécies de *Leishmania* e tem envolvido, além dos macrófagos peritoneais murinos, os macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humano (CROFT et al., 2006). Este modelo permite mostrar variações da diferentes espécies/cepas na sensibilidade às drogas. A atividade da droga é medida através da contagem em microscopia óptica da porcentagem de células infectadas ou o número de amastigotas intracelulares ou ainda por métodos colorimétricos/fluorimétricos.

Nossos resultados mostraram que as 3 drogas testadas têm efeito semelhantes sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, isto é, os tratamentos das culturas infectadas por 48 horas a 21% de O₂ na presença das drogas resultou num efeito leishmanicida dose-dependente (Figura 14). A sensibilidade às drogas foi baseada na inibição do crescimento do parasita dentro

da célula e na porcentagem de células infectadas, resultando em índices de infecção menores quanto maior a dose utilizada de cada droga. Com base nos gráficos dose-resposta das drogas (Figura 14), a sensibilidade dos amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* foi determinada através da IC₅₀ (Tabela 3). De acordo com a FDA (*Food and Drug Administration*) a IC₅₀ representa a concentração de uma droga que é requerida para se observar 50% de inibição em ensaios *in vitro*. De modo geral a *L. amazonensis* foi sensível às drogas testadas no modelo DC humana-*Leishmania* (Figura 14). Segundo a Tabela 3, a IC₅₀ de Anfotericina B, Glucantime e Miltefosine neste modelo foi de 0,05 µg/ml, 0,69 µg/ml e 0,83 µM, respectivamente, em normóxia. Callahan et al. (1997) utilizando o modelo macrófago peritonal-*L. mexicana* encontrou IC₅₀ de 0,25 µg/ml e 29 µg/ml para Anfotericina B e Glucantime, respectivamente durante 72 horas de tratamento. Já Escobar et al. (2002), utilizando o modelo do macrófago peritonal murino e o tratamento durante 72 horas, encontraram ED₅₀ de 0,14 µM, 0,08 µM e 0,5 µM de Anfotericina B para *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. tropica*, respectivamente. O grupo ainda determinou a ED₅₀ para Miltefosine, 6,83 µM, 10,63 µM e 5,82 µM para *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. tropica*, respectivamente. Azzouz et al. (2005) determinou uma ED₅₀ de 17 µM para Miltefosine durante 72 horas de tratamento no modelo macrófago J774 e *L. donovani*. Santa-Rita et al. (2004) encontrou IC₅₀ de 9 µM para Miltefosine em 3 dias de tratamento de culturas de macrófagos peritoniais infectados com *L. amazonensis*. Como visto, a concentração ou dose de cada droga onde se observa 50% de inibição da proliferação do parasita varia bastante e depende principalmente da espécie de *Leishmania* em questão, do modelo celular de estudo utilizado e do tempo de tratamento. Mas baseado em nossos resultados e nos trabalhos citados, podemos concluir que as culturas de DCs humanas são mais sensíveis às drogas que os macrófagos, dado

que as IC_{50} s encontradas para as drogas testadas foram baixas quando comparadas com a literatura, mesmo considerando a espécie e o tempo de tratamento envolvido.

As drogas utilizadas neste estudo apresentam toxicidade conforme a dose utilizada (doses maiores que 0,3 μ g/ml de Anfotericina B, 25 μ g/ml de Glucantime e 5 μ M de Miltefosine). Para nos certificarmos que nas doses usadas (Figura 14) a redução da infecção das DCs não se devia aos danos provocados pelas drogas e/ou hipóxia, usamos o teste de MTT. A Figura 15 apresenta os resultados do ensaio, indicando que as culturas de DCs permanecem viáveis após 48 horas de tratamento com as drogas nas maiores concentrações usadas na Figura 14, tanto em normóxia como em hipóxia.

Sabe-se que a hipóxia pode afetar a ação de drogas quimioterápicas como a cisplatina e mitomicina C, favorecendo a sobrevivência de tumores (KOCH et al., 2003). Sokol-Anderson et al. (1986) mostraram que a lise de protoplastos de *Candida albicans* pela Anfotericina B foi marcadamente reduzida em baixas concentrações de oxigênio. Assim, investigamos *in vitro* a eficácia de drogas leishmanicidas atualmente empregadas no tratamento da leishmaniose sob condições de hipóxia e normóxia, isto é, se há um impacto da hipóxia na eficácia das drogas. Como vimos na Figura 14, a hipóxia diminuiu bastante a eficácia da Anfotericina B e Glucantime. Este fato foi confirmado pela IC_{50} encontrada sob condições de hipóxia. No caso da Anfotericina B, não observamos efeito leishmanicida em hipóxia. Já no caso do Glucantime, a IC_{50} aumentou de 0,69 μ g/ml para 10,87 μ g/ml, indicando que a hipóxia diminuiu consideravelmente a eficácia desta droga. No entanto, para Miltefosine, a condição de hipóxia diminuiu a IC_{50} para 0,69 μ M, quando comparado a normóxia (0,83 μ M). Neste caso a hipóxia tem uma tendência de não alterar a ação de Miltefosine ou até mesmo de potencializar sua ação (Figura 14).

Nosso estudo sugere que a hipóxia local, ou seja, no ambiente lesional, estaria diminuindo a eficácia de Anfotericina B e Glucantime. Entretanto, o composto recentemente utilizado na leishmaniose, o Miltefosine, manteve sua ação diante das baixas tensões de O₂. O presente dado (Figura 14) permite-nos algumas sugestões a respeito dos mecanismos envolvidos na resistência a Anfotericina B e ao antimônio induzida por hipóxia. Considerando os diferentes modos de ação – por exemplo, para Anfotericina B, a alteração do balanço de íons e para o antimônio, a alteração da β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita – assim mesmo a resistência dessas drogas em hipóxia foi observada. Situações onde: substâncias diferentes com modos de ação não relacionados e apresentando o mesmo comportamento sob hipóxia, leva-nos a sugerir que devem existir mecanismos que conferem resistência aos parasitas sob condições de hipóxia. No caso do Miltefosine, onde a hipóxia não influenciou a ação leishmanicida do composto, pode-se sugerir que estes mecanismos de resistência não atuaram.

5.6 Análise da interação *Leishmania*-DC.

As DCs em seu estado imaturo apresentam capacidade de fagocitar e processar antígenos. Assim como os macrófagos, as DCs podem servir como hospedeiras para a *Leishmania*, tendo um papel decisivo na indução da resposta imune T-dependente (PRINA et al., 2004). As diferentes espécies de *Leishmania* podem subverter a função efetora das DCs, e os receptores envolvidos na interação *Leishmania*-DC estão sendo pesquisados, como é o caso dos receptores do tipo lectina (COLMENARES et al., 2002). Nosso objetivo foi avaliar as biomoléculas importantes para a interação e entrada de *L. amazonensis* em DCs humanas. Para isso utilizamos amastigotas retirados de lesões de camundongos C3H/nude, que não apresentam anticorpos ligados em sua superfície e, portanto são menos infectantes (PRINA et al., 2004).

Para confirmar as informações sobre a baixa infectividade dos amastigotas “nude” (PRINA et al., 2004), realizamos infecções de culturas de DCs e macrófagos humanos, macrófagos peritoniais murinos e linhagem murina J774. A porcentagem de infecção para cada tipo celular foi comparada na Figura 16. Todas as linhagens apresentaram uma baixa porcentagem de infecção com amastigota “nude” quando comparadas às infecções com amastigotas de BALB/c, dados semelhantes aos de Prina et al. (2004) com linhagens de DCs murinas.

Em nossos estudos, as DCs e macrófagos humanos apresentaram baixa porcentagem de infecção com amastigotas “nude” (21 e 36%, respectivamente) quando comparados com as infecções realizadas com amastigotas de BALB/c (68 e 71%, respectivamente). Porém, amastigotas “nude” opsonizados levaram a um aumento significativo da porcentagem de infecção, chegando próximo à porcentagem atingida pelos amastigotas de BALB/c (Figura 17). Além disso, este aumento na porcentagem de infecção seguiu uma certa lógica referente à procedência de cada soro utilizado: soro de paciente com leishmaniose foi mais efetivo para a entrada do parasita na célula do que soros murinos infectados, o que era esperado já que estamos trabalhando com células humanas que expressam marcadores para moléculas humanas (anticorpos, complemento, etc). Infecções como estas ainda não tinham sido realizadas para DCs e macrófagos humanos. Prina et al. (2004), infectaram DCs murinas com promastigotas e amastigotas de BALB/c e BALB/c nude infectados com *L. amazonensis*, opsonizados ou não.

Sabe-se que as DCs expressam uma variedade de receptores fagocíticos incluindo os receptores para o Complemento (CRs) e receptores para a porção Fc das imunoglobulinas (FcRs) (KELLY et al., 2005). Diante do aumento da infecção de DCs após a opsonização dos amastigotas “nude”, investigamos, inicialmente, se os dois principais fatores presentes no soro, anticorpos e Complemento, estariam envolvidos no reconhecimento e na fagocitose desta forma

parasitária. Para isso, fizemos a depleção de anticorpos (Ac) ou do Complemento (C) dos soros normais e de paciente com leishmaniose no intuito de observar se esse procedimento afetaria a entrada dos amastigotas “nude” nas células, ou seja, reduziria a porcentagem de infecção obtida com a opsonização. Nossos resultados demonstraram que a depleção de um ou outro componente opsonizante do soro (Ac ou C) não alterou a porcentagem de infecção das células pelos amastigotas (Figura 18). Diminuições significativas na porcentagem de infecção das DCs ocorreram com a retirada simultânea de Ac e C. As porcentagens de infecção utilizando SNH depletado de Ac e C (39%) e SIH depletado de Ac e C (38%) foram semelhantes à porcentagem de infecção obtida com amastigotas “nude” não opsonizados (36%) (Figura 18).

Nosso próximo passo foi avaliar se a entrada do amastigota em DCs é facilitada também por outros componentes do soro. De fato, Guy & Belosevic et al. (1993) mostraram que os CRs e FcRs são utilizados para a entrada de *Leishmania* em macrófagos murinos, mas que estes receptores não são as vias preferenciais para a entrada do parasita na célula, haja visto que amastigotas “nude” também conseguem entrar na célula hospedeira. Além dos receptores para Fc das imunoglobulinas e Complemento, as DCs apresentam os recém-descobertos receptores DC-SIGN, um tipo de lectina transmembrânica envolvido também na adesão e internalização de *Leishmania* (COLMENARES et al., 2002; REIS e SOUSA et al., 1999), porém sem um ligante definido em amastigotas de *Leishmania* (CAPARRÓS et al., 2005). Os autores sugerem que os lipofosfoglicanos (LPG), moléculas com alto conteúdo de manose presentes na *Leishmania* seriam capazes de se ligar a receptores como o DC-SIGN, além de outros como CR3, manose-fucose e fibronectina (CAPARRÓS et al., 2005). Em nossos ensaios de inibição utilizamos culturas de DCs previamente tratadas com manana solúvel de *S. cerevisiae*, seguido de infecção com amastigotas de BALB/c e C3H/nude, para avaliar se ocorreu bloqueio dos receptores DC-SIGN ou manose-fucose. O uso de 5, 100 ou 750 µg/ml de manana seguido de infecção de 24

horas não alterou a porcentagem de infecção das DCs (Figura 19). O tratamento com 750 µg/ml de manana seguido de 2,5 horas de infecção causou uma redução de 50% na infecção das DCs com amastigotas de BALB/c (Figura 20). Colmenares et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes com amastigotas de *L. pifanoi* e DCs humanas. Os pesquisadores observaram redução de mais de 50% na porcentagem de infecção de DCs humanas tratadas com 500 µg/ml de manana seguido de infecção de 1 hora e nenhuma alteração no número de parasitas por DC infectada quando comparado às DCs não tratadas com manana (controle).

Como já descrito na literatura, promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* utilizam receptores de manose-fucose para infectar a célula (SARAIVA et al., 1987, WILSON & PERSON, 1986). Assim, incluímos também as infecções com promastigotas de *L. amazonensis* buscando avaliar o uso dos receptores de manose-fucose pelas formas promastigotas. Nossos resultados mostraram que o uso de 750 µg/ml de manana seguida de 24 horas de infecção com promastigotas de *L. amazonensis* causou uma redução na porcentagem de infecção das DCs (Figura 21A). Saraiva et al. (1987) mostraram que os receptores de manose-fucose de macrófagos estão envolvidos na entrada de promastigotas, mas não de amastigotas de *L. amazonensis*. Wilson & Person (1986) também mostraram que promastigotas de *L. donovani* utilizam estes receptores para infectar macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humano. Nossos resultados corroboram com o fato de que as formas promastigotas utilizam os receptores de manose-fucose para a infecção de DCs.

Nossos dados indicam que a entrada do amastigota em DCs pode ser orientada pelos receptores do Complemento e receptores para Fc, não descartando a possibilidade da entrada do amastigota em DCs ser facilitada também pelos demais componentes do soro. De fato, Guy & Belosevic (1993) mostraram que os CRs e FcRs são utilizados para a entrada de *Leishmania* em

macrófagos murinos, mas que estes receptores não são as vias preferenciais para a entrada do parasita na célula, haja visto que amastigotas “nude” também conseguem entrar na célula hospedeira. Segundo Love et al. (1993), amastigotas de *L. amazonensis* são capazes de se ligar em heparina. O grupo demonstrou uma alta capacidade de ligação da heparina na superfície dos amastigotas, o que poderia mediar a ligação dos parasitas às células de mamíferos através de proteoglicanas celulares que contém sulfato de heparana, uma molécula muito semelhante à heparina. Analisamos infecções por períodos de 2,5 horas e 24 horas com amastigotas retirados de BALB/c e C3H/nude tratados com heparina (Figuras 22 e 23, respectivamente). Como apresentado na Figura 22A, obtivemos uma redução significativa de 65% na porcentagem de infecção das DCs quando os amastigotas foram tratados com 100 µg/ml de heparina por 24 horas, muito semelhante aos resultados reproduzidos com infecção de 2,5 horas. Apenas para este mesmo período (24 horas) foi observada uma diminuição (queda de 20%) no número de amastigotas por célula infectada, sugerindo que é necessário período maior de infecção para se observar o reflexo do bloqueio da fagocitose (Figura 22B). Baseados nos dados obtidos com amastigotas de BALB/c, nós investigamos se amastigotas “nude” teriam atividade “ligadora” de heparina, que facilitariam sua entrada na célula hospedeira (LOVE et al., 1993). Uma redução significativa de 50% na porcentagem de DCs infectadas foi observada quando os amastigotas “nude” foram pré-tratados com 100 µg/ml de heparina (Figura 23A). Como visto com os amastigotas de BALB/c, apenas o período de 24 horas de infecção permitiu observação de redução significativa também no número de amastigotas por DC infectada (Figura 23B). Desta forma, concluímos que a ligação dos amastigotas de *L. amazonensis* a heparina é um mecanismo importante na infecção de DCs humanas.

Em resumo, nossos resultados sugerem que a infecção de DCs humanas por amastigotas de *L. amazonensis* envolve a participação de múltiplas interações receptor-ligante, pelo menos três, como mostrado pelos resultados: anticorpos/receptor Fc, Complemento/ receptor de Complemento e proteoglicanas/proteína “ligadora” de heparina. Estes dados foram utilizados para a confecção do manuscrito recentemente aceito para publicação (ver item Anexo).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- Monócitos do sangue periférico humano cultivados por 7 dias na presença de 50 ng/ml de GM-CSF e 250 ng/ml de IL-4 desenvolvem morfologia e perfil fenotípico característicos de DCs humanas. Estas células apresentam capacidade fagocítica para ambas as formas parasitárias de *L. amazonensis*.
- A exposição das culturas de DCs à hipóxia (6% de O₂) não altera a viabilidade das células porém afeta a expressão dos marcadores de superfície celular CD80, CD86 e CD1a.
- Em culturas de DCs infectadas, a hipóxia não afeta a entrada do parasita na célula, mas diminui significativamente a porcentagem de DCs infectadas, sugerindo então que a hipóxia exerce algum efeito nas células, modulando a atividade funcional das DCs.
- DCs ativadas previamente com LPS e IFN- γ são capazes de reduzir a infecção em ambiente normóxico, porém não há potencialização deste efeito leishmanicida em culturas ativadas e expostas a hipóxia.
- Culturas de DCs ativadas produzem IL-12 em normóxia e em quantidades maiores, em hipóxia. A infecção destas culturas ativadas eleva os níveis de IL-12 produzidos sob normóxia, e mantém os níveis produzidos sob hipóxia.
- Sob condições normóxicas *in vitro* os compostos Anfotericina B, Glucantime e Miltefosine apresentam ação leishmanicida dose-dependente. A exposição a hipóxia anula o efeito dose-dependente da Anfotericina B e de algumas doses de Glucantime, porém não altera a ação do Miltefosine.
- Quanto ao processo de infecção das DCs, a entrada dos amastigotas “nude” parece ocorrer primariamente através dos receptores para a porção Fc das imunoglobulinas e componentes do Complemento. Receptores de manose-fucose não são utilizados para a entrada dos amastigotas

“nude” nas DCs, mas proteoglicanas ricas em moléculas de heparana presentes na superfície das DCs parecem mediar a fagocitose através da atividade “ligadora” de heparina na superfície do amastigota.

Neste trabalho nós mostramos que a infecção de DCs humanas por amastigotas de *L. amazonensis* envolve a participação de múltiplas interações receptor-ligante. Este trabalho foi o primeiro a avaliar os parâmetros de infecção de DCs com parasita e a ação de drogas leishmanicidas em hipóxia. Esta tese abre novos caminhos para explorar os mecanismos envolvidos na resistência de DCs à *L. amazonensis* em hipóxia e nas alterações bioquímicas dos efeitos de drogas em hipóxia.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5 ed. Philadelphia: Saunders, 2003. p. 506-521.

ALBINA, J. E.; HENRY, W. L. Jr.; MASTROFRANCESCO, B.; MARTIN, B. A.; REICHNER, J. S. Macrophage activation by culture in an anoxic environment. **J. Immunol.**, v. 155, n. 9, p. 4391-4396, 1995.

ALBUQUERQUE, M. E. L. **Infecção de macrófagos originados de monócitos primários humanos com o parasita *Leishmania amazonensis* em microambiente normóxico e hipóxico**. 2005. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Adv. Parasitol.**, v. 31, p. 175-254, 1992.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **J. Cell Sci.**, v. 18, p. 2993-3002, 1999.

ARRAIS-SILVA, W. W.; PAFFARO, V. A. Jr; YAMADA, A. T.; GIORGIO, S. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 78, n. 1, p. 49-54, 2005.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res.**, v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.

AYALA, A.; ERTEL, W.; CHAUDRY, I. H. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes.

Shock, v. 5, n. 2, p. 79-90, 1996.

AZZOUZ, S.; MAACHE, M.; GARCIA, R. G.; ASUNA, A. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 96, n. 1, p. 60-65, 2005.

BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 73, n. 3, p. 599-601, 1984.

BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRIA, J. C.; ORDONEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.

BARBIERI, C. L.; GIORGIO, S.; MERJAN, A. J.; FIGUEIREDO, E. N. Glycosphingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 5, p. 2131-2137, 1993.

BARRAL, A.; CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M. Suppression of lymphocyte proliferative responses by sera from patients with American visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 35, n. 4, p. 735-742, 1986.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.

BENDER, A.; SAPP, M.; SCHULER, G.; STEINMAN R. M.; BHARDWAJ, N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. **J. Immunol. Methods**, v. 196, n. 2, p. 121-135, 1996.

BENNETT, C. L.; MISSLITZ, A.; COLLEDGE, L.; AEBISCHER, T.; BLACKBURN, C. C. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 3, p. 876-883, 2001.

BLACKWELL, J. M.; EZEKOWITZ, R. A.; ROBERTS, M. B.; CHANNON, J. Y.; SIM, R. B.; GOEDON, S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **J. Exp. Med.**, v. 162, p. 324–331, 1985.

BLANK, C.; FUCHS, H.; RAPPERSBERGER, K.; ROLLINGHOFF, M.; MOLL, H. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p. 418–425, 1993.

BOSQUE, F.; MILON, G.; VALDERRAMA, L.; SARAVIA, N. G. Permissiveness of human monocytes and monocyte-derived macrophages to infection by promastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis*. **J. Parasitol.**, v. 84, n. 6, p. 1250-1256, 1998.

BRANDONISIO, O.; SPINELLI R.; PEPE, M. Dendritic cells in *Leishmania* infection. **Microbes Infect.**, v. 6, n. 15, p. 1402-1409, 2004.

BUTTERICK, C. J.; WILLIAMS, D. A.; BOXER, L. A.; BAEHNER, R. L. Changes in energy metabolism, structure and function in alveolar macrophages under anaerobic conditions. **Br. J. Haematol.**, v. 48, p. 523-432, 1981.

CALLAHAN, H. L.; PORTAL, A. C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 4, p. 818-822, 1997.

CANTOS, G.; BARBIERI, C. L.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A.; TRAVASSOS, L. R. Synthesis of antimony complexes of yeast mannan and mannan derivatives and their effect on *Leishmania*-infected macrophages. **Biochem. J.**, v. 289, p. 155–160, 1993.

CAMPOS, M. R.; RUSSO, M.; GOMES, E.; ALMEIDA, S. R. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 372-379, 2006.

CAPARROS, E.; SERRANO, D.; PUIG-KROGER, A.; RIOL, L.; LASALA, F.; MARTINEZ, I.; VIDAL-VANACLOCHA, F.; DELGADO, R.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. L.; RIVAS, L.;

CORBI, A. L.; COLMENARES, M. Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. **Immunobiology**, v. 210, p. 185-193, 2005.

CARRERA, L.; GAZZINELLI, R. T.; BADOLATO, R.; HIENY, S.; MULLER, W.; KUHN, R.; SACKS, D. L. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 2, p. 515-526, 1996.

CELLA, M.; SCHEIDEGGER, D.; PALMER-LEHMANN, K.; LANE, P.; LANZAVECCHIA, A.; ALBER, G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 2, p. 747-752, 1996.

CHAKRABORTY, P.; GHOSH, D.; BASU, M. K. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Parasitol.**, v. 87, p. 1023–1027, 2001.

CHAUDRY, I. H. Cellular mechanisms in shock and ischemia and their correction. **Am. J. Physiol.**, v. 245, n. 2, p. R117-R134, 1983.

CHEUNG, J. Y.; BONVENTRE, J. V.; MALIS, C. D.; LEAF, A. Calcium and ischemic injury. **N. Engl. J. Med.**, v. 314, n. 26, p. 1670-1676, 1986.

COLHONE, M. C.; ARRAIS-SILVA, W. W.; PICOLI, C.; GIORGIO, S. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. **J. Parasitol.**, v. 90, n. 3, p. 510-515, 2004.

COLMENARES, M.; CORBI, A. L.; TURCO, S. J.; RIVAS, L. The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. **J. Immunol.**, v. 172, p. 1186–1190, 2004.

COLMENARES, M.; PUIG-KROGER, A.; PELLO, O. M.; CORBI, A. L.; RIVAS, L. Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 36766–36769, 2002.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 399-410, 2006.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

DEGROSSOLI, A.; COLHONE, M. C.; ARRAIS-SILVA, W. W.; GIORGIO, S. Hypoxia modulates expression of the 70-kD heat shock protein and reduces *Leishmania* infection in macrophages. **J. Biomed. Sci.**, v. 11, p. 847-854, 2004.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DORTA, M. L. **Aspectos moleculares da infectividade de formas tripomastigotas metacíclicos de *Trypanosoma cruzi***. 1997. Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

DU, G.; MOUITHYS-MICKALAD, A.; SLUSE, F. E. Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 25, n. 9, p. 1066-1074, 1998.

ELJAAFARI, A.; DUPERRIER, K.; MAZET, S.; BARDIN, C.; BERNAUD, J.; DURAND, B.; GEBUHRER, L.; BETUEL, H.; RIGAL, D. Generation of stable monocyte-derived dendritic cells in the presence of high concentrations of homologous or autologous serum: influence of extra-cellular pH. **Hum. Immunol.**, v. 59, p. 625-634, 1998.

ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES C.; CROFT, S. L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Trop.**, v. 81, n. 2, p. 151-157, 2002.

FALANGA, V.; QIAN, S. W.; DANIELPOUR, D.; KATZ, M. H.; ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Hypoxia upregulates the synthesis of TGF-beta 1 by human dermal fibroblasts. **J. Invest. Dermatol.**, v. 97, n. 4, p. 634-637, 1991.

GHERSETICH, I.; MENCHINI, G.; TEOFOLI, P.; LOTTI, T. Immune response to *Leishmania* infection in human skin. **Clin. Dermatol.**, v. 17, n. 3, p. 333-338, 1999.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, S. Interaction of *Leishmania* parasites with dendritic cells and its functional consequences. **Immunobiology**, v. 209, p. 173-177, 2004.

GIORGIO, S.; LINARES, E.; ISCHIRPOULOS, H.; VON ZUBEN, F. J.; YAMADA, A.; AUGUSTO, O. In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 807-814, 1998.

GOTH, S. R.; CHU, R. A.; PESSAH, I. N. Oxygen tension regulates the in vitro maturation of GM-CSF expanded murine bone marrow dendritic cells by modulating class II MHC expression. **J. Immunol. Methods**, v. 308, p. 179-191, 2006.

GRIGORYAN R.; KESHELAVA, N.; ANDERSON, C.; REYNOLDS, C. P. In vitro testing of chemosensitivity in physiological hypoxia. **Methods Mol. Med.**, v. 110, p. 87-100, 2005.

GRIMALDI, G. R.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 230-250, 1993.

GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 4, p. 1553-1558, 1993.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Adv. Parasitol.**, v. 44, p. 1-39, 1999.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 14, n. 2, p. 229-243, 2001.

HELFMAN, T.; FALANGA, V. Gene expression in low oxygen tension. **Am. J. Med. Sci.**, v. 306, p. 37-41, 1993.

HENRI, S.; CURTIS, J.; HOCHREIN, H.; VREMEC, D.; SHORTMAN, K.; HANDMAN, E. Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 7, p. 3874-3880, 2002.

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

HUNT, T. K.; KNIGHTON, D. R.; THAKRAL, K. K.; GOODSON, W. H.; ANDREWS, W. S. Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated macrophages. **Surgery**, v. 96, p. 48-54, 1984.

IKEDA, E. Cellular response to tissue hypoxia and its involvement in disease progression. **Pathol. Int.**, v. 55, n. 10, p. 603-610, 2005.

JACOBSON, M. D.; RAFF, M. C. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. **Nature**, v. 374, n. 6525, p. 814-816, 1995.

JERAS, M.; BERGANT, M.; REPNIK, U. In vitro preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses. **Transpl. Immunol.**, v. 14, p. 231-244, 2005.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 7, p. 26-31, 2000.

KELLY, R. M.; CHEN, J.; YAUCH, L. E.; LEVITZ, S. M. Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 1, p. 592-598, 2005.

KIMA, P. E.; CONSTANT, S. L.; HANNU, L.; COLMENARES, M.; LEE, K. S.; HABERMAN, A. M.; SHLOMCHIK, M. J.; McMAHON-PRATT, D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 1063–1067, 2000.

KOCH, S.; MAYER, F.; HONECKER, F.; SCHITTENHELM, M.; BOKEMEYER, C. Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions in vitro. **Br. J. Cancer.**, v. 89, n. 11, p. 2133-2139, 2003.

KODAIRA, Y.; NAIR, S. K.; WRENSHALL, L. E.; GILBOA, E.; PLATT, J. L. Phenotypic and functional maturation of dendritic cells mediated by heparan sulfate. **J. Immunol.**, v. 165, n. 3, p. 1599-1604, 2000.

LAHAT, N.; RAHAT, M. A.; BALLAN, M.; WEISS-CEREM, L.; ENGELMAYER, M.; BITTERMAN, H. Hypoxia reduces CD80 expression on monocytes but enhances their LPS-stimulated TNF- α secretion. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, p. 197-205, 2003.

LEEPER-WOODFORD, S. K.; DETMER, K. Acute hypoxia increases alveolar macrophage tumor necrosis factor activity and alters NF-kappaB expression. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. L909-L916, 1999.

LEEPER-WOODFORD, S. K.; FISCHER, B. J.; SUGERMAN, H. J.; FOWLER, A. A. Pharmacologic reduction in tumor necrosis factor activity of pulmonary alveolar macrophages. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 8, n. 2, p. 169-175, 1993.

LEEPER-WOODFORD, S. K.; MILLS, J. W. Phagocytosis and ATP levels in alveolar macrophages during acute hypoxia. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 6, p. 326-334, 1992.

LEWIS, J. S.; LEE, J. A.; UNDERWOOD, J. C.; HARRIS, A. L.; LEWIS, C. E. Macrophage response to hypoxia: relevance to disease mechanisms. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66, p. 889-900, 1999.

LINARES, E.; AUGUSTO, O.; BARÃO, S. C.; GIORGIO, S. *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide in vivo. **J. Parasitol.**, v. 86, p. 78-82, 2000.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; MORTARA, R. A.; SANTOS, C. X. C.; YAMADA, A. T.; AUGUSTO, O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30, n. 11, p. 1234-1242, 2001.

LOKMIC, Z.; DARBY, I. A.; THOMPSON, E. W.; MITCHELL, G. M. Time course analysis of hypoxia, granulation tissue and blood vessel growth, and remodeling in healing rat cutaneous incisional primary intention wounds. **Wound Repair. Regen.**, v. 14, n. 3, p.277-288, 2006.

LOVE, D. C.; ESKO, J. D.; MOSSER, D. M. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. **J. Cell Biol.**, v. 123, p. 759-766, 1993.

MALDONADO-LOPEZ, R.; MOSER, M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. **Semin. Immunol.**, v. 13, n. 5, p. 275-282, 2001.

MAROVICH, M. A.; McDOWELL, M. A.; THOMAS, E. K.; NUTMAN, T. B. IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. **J. Immunol.**, v. 164, p. 5858-5865, 2000.

McCORMICK, T. S.; STEVENS, S. R.; KANG, K. Macrophages and cutaneous inflammation. **Nat. Biotechnol.**, v. 18, n. 1, p. 25-26, 2000.

McDOWELL, M. A.; MAROVICH, M. A.; LIRA, R.; BRAUN, M.; SACKS, D. *Leishmania* priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 3994-4001, 2002.

MEDEIROS, A. C. R.; ROSELINO, A. M. F. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. **An. Bras. Dermatol.**, v. 74, n. 4, p. 329-336, 1999.

MELBY, P. C. Recent developments in leishmaniasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 15, n. 5, p. 485-490, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em < <http://portal.saude.gov.br/portal/saude> >. Acesso em: 20 março 2007.

MOLL, H. Dendritic cells as a tool to combat infectious diseases. **Immunol. Lett.**, v. 85, n. 2, p. 153-157, 2003.

MORAES, M. A.; SILVEIRA, F. T. Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 36, n. 5, p. 459-463, 1994.

MOSCA, P. J.; HOBEIKA, A. C.; CLAY, T. M.; NAIR, S. K.; THOMAS, E. K.; MORSE, M. A.; LYERLY, H. K. A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon- γ treatment. **Blood**, v. 96, p. 3499-3504, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **J. Immunol.**, v. 135, p. 2785-2789, 1985.

MURATA, Y.; OHTEKI, T.; KOYASU, S.; HAMURO, J. IFN- α and pro-inflammatory cytokine production by antigen-presenting cells is dictated by intracellular thiol redox status regulated by oxygen tension. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, p. 2866-2873, 2002.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NAIR, S. K.; BOCZKOWSKI, D.; MORSE, M.; CUMMING, R. I.; LYERLY, H. K.; GILBOA, E. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. **Nat. Biotechnol.**, v. 16, n. 4, p. 364-369, 1998.

NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

NIINIKOSKI, J.; HUNT, T. K. Oxygen tensions in healing bone. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 134, p. 746-750, 1972.

NORSWORTHY, N. B.; SUN, J.; ELNAIEM, D.; LANZARO, G.; SOONG, L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 3, p. 1240-1247, 2004.

NOVAK, N.; KRAFT, S.; HABERSTOCK, J.; GEIGER, E.; ALLAM, P.; BIEBER, T. A reducing microenvironment leads to the generation of Fc epsilon RI high inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC). **J. Invest. Dermatol.**, v. 119, n. 4, p. 842-849, 2002.

OLIVEIRA, M. A.; TADOKORO, C. E.; LIMA, G. M.; MOSCA, T.; VIEIRA, L. Q.; LEENEN, P. J.; ABRAHAMSOHN, I. A. Macrophages at intermediate stage of maturation produce high levels of IL-12 p40 upon stimulation with *Leishmania*. **Microbes Infect.**, v. 7, p. 213-223, 2005.

PAPANDREOU, I.; POWELL, A.; LIM, A. L.; DENKO, N. Cellular reaction to hypoxia: sensing and responding to an adverse environment. **Mutat. Res.**, v. 569, p. 87-100, 2005.

PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B.; KOPF, M.; SCOTT, P. The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 168, p. 5771-5777, 2002.

PEREIRA, W. K.; LONARDONI, M. V.; GRESPAN, R.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; CUMAN, R. K.; BERSANI-AMADO, C. A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **J. Infect.**, v. 51, n. 2, p. 157-164, 2005.

PEREZ-VICTORIA, F. J.; SANCHEZ-CANETE, M. P.; SEIFERT, K.; CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resist. Updat.**, v. 9, p. 26-39, 2006.

PETERS, C.; AEBISCHER, T.; STIERHOF, Y. D.; FUCHS, M.; OVERATH, P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **J. Cell Sci.**, v. 108, p. 3715–3724, 1995.

PEYSSONNAUX, C.; DATTA, V.; CRAMER, T.; DOEDENS, A.; THEODORAKIS, E. A.; GALLO, R. L.; HUTARDO-ZIOLA, N.; NIZET, V.; JOHNSON, R. S. HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 1806–1815, 2005.

PICKL, W. F.; MAJDIC, O.; KOHL, P.; STÖCKL, J.; RIEDL, E.; SCHEINECKER, C.; BELLO-FERNANDEZ, C.; KNAPP, W. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14⁺ peripheral blood monocytes. **J. Immunol.**, v. 157, n. 9, p. 3850-3859, 1996.

PRINA, E.; ABDI, S. Z.; LEBASTARD, M.; PERRET, E.; WINTER, N.; ANTOINE, J. C. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. **J. Cell Sci.**, v. 117, p. 315-325, 2004.

QI, H.; POPOV, V.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. **J. Immunol.**, v. 167, n. 8, p. 4534-4542, 2001.

QU, X.; YANG, M. X.; KONG, B. H.; QI, L.; LAM, Q. L.; YAN, S.; LI, P.; ZHANG, M.; LU, L. Hypoxia inhibits the migratory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. **Immunol. Cell Biol.**, v. 83, n. 6, p. 668-673, 2005.

QUENTMEIER, H.; KABORSKI, M.; DREXLER, H. G. The human bladder carcinoma cell line 5637 constitutively secretes functional cytokines. **Leuk. Res.**, v. 21, n. 4, 343-350, 1997.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REIS e SOUSA, C.; SHER, A.; KAYE, P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, n. 4, p. 392-399, 1999.

REMENSNYDER, J. P.; MAJNO, G. Oxygen gradients in healing wounds. **Am. J. Pathol.**, v. 52, p. 301-319, 1968.

ROMANI, N.; REIDER, D.; HEUER, M.; EBNER, S.; KÄMPGEN, E.; EIBL, B.; NIEDERWIESER, D.; SCHULER, G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. **J. Immunol. Methods**, v. 196, n. 2, p. 137-151, 1996.

ROY, K. C.; BANDYOPADHYAY, G.; RAKSHIT, S.; RAY, M.; BANDYOPADHYAY, S. IL-4 alone without the involvement of GM-CSF transforms human peripheral blood monocytes to a CD1a(dim), CD83(+) myeloid dendritic cell subset. **J. Cell Sci.**, v. 117, p. 3435-3445, 2004.

RUTAUULT, K.; ALDERMAN, C.; CHAIN, B. M.; KATZ, D. R. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 232-238, 1999.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.**, v. 179, n. 4, p. 1109-1118, 1994.

SAMPAIO, R. N.; MARSDEN, P. D.; LLANOS-CUENTAS, E. A. *Leishmania mexicana amazonensis* isolated from a patient with fatal mucosal leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, p. 273-274, 1985.

SANTA-RITA, R. M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, n. 4, p. 704-710, 2004.

SARAIVA, E. M.; ANDRADE, A. F.; de SOUSA, W. Involvement of the macrophage mannose-6-phosphate receptor in the recognition of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Parasitol. Res.**, v. 73, n. 4, p. 411-416, 1987.

SARTORI, A.; OLIVEIRA, M. A. P.; SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. Metacyclogenesis modulates the ability of *Leishmania* promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells. **J. Immunol.**, v. 159, p. 2849-2857, 1997.

SCANNELL, G.; WAXMAN, K.; KAML, G. J.; IOLI, G.; GATANAGA, T.; YAMAMOTO, R.; GRANGER, G. A. Hypoxia induces a human macrophage cell line to release tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in vitro. **J. Surg. Res.**, v. 54, n. 4, p. 281-285, 1993.

SCHULTZ, K.; FANBURG, B. L.; BEASLEY, D. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha promote growth factor-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 290, p. H2528-H2534, 2006.

SCOTT, P.; HUNTER, C. A. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, p. 466-470, 2002.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 1, p. 73-79, 2006.

SEMENZA, G. L.; WANG, G. L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. **Mol. Cell Biol.**, v. 12, n. 12, p. 5447-5454, 1992.

SEVERINSON, E.; NAITO, T.; TOKUMOTO, H.; FUKUSHIMA, D.; HIRANO, A.; HAMA, K.; HONJO, T. Interleukin 4 (IgG1 induction factor): a multifunctional lymphokine acting also on T cells. *Eur. J. Immunol.*, v. 17, n. 1, p. 67-72, 1987.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; SOFFER, D.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, v. 359, n. 6398, p. 843-845, 1992.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SNIJDERS, A.; KALINSKI, P.; HILKENS, C. M. U.; KAPSENBERG, M. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. **Int. Immunol.**, v. 10, n. 11, p. 1593-1598, 1998.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **J. Infect. Dis.**, v. 154, n. 1, p. 76-83, 1986.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to *Leishmania major*. **Adv. Immunol.**, v. 74, p. 275-317, 2000.

SPEAR, W.; CHAN, D.; COPPENS, I.; JOHNSON, R. S.; GIACCIA A.; BLADER, I. J. The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for *Toxoplasma gondii* growth and survival at physiological oxygen levels. **Cell. Microbiol.**, v. 8, n. 2, p. 339-352, 2006.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J. Exp. Med.**, v. 137, n. 5, p. 1142-1162, 1973.

TERABE, M.; HATABU, T.; TAKAHASHI, H.; ITO, M.; ONODERA, T.; MATSUMOTO, Y. *Leishmania amazonensis* infection in nude mice. **Exp. Anim.**, v. 48, n. 2, p. 119-123, 1999.

THOMAS, R.; DAVIS, L. S.; LIPSKY, P. E. Isolation and characterization of human peripheral blood dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 150, n. 3, p. 821-834, 1993.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 133-146, 2003.

TSUKAMOTO, Y.; KUWABARA, K.; HIROTA, S.; IKEDA, J.; STERN, D.; YANAGI, H.; MATSUMOTO, M.; OGAWA, S.; KITAMURA, Y. 150-kD oxygen-regulated protein is expressed in human atherosclerotic plaques and allows mononuclear phagocytes to withstand cellular stress on exposure to hypoxia and modified low density lipoprotein. **J. Clin. Invest.**, v. 98, n. 8, p. 1930-1941, 1996.

VanOTTEREN, G. M.; STANDIFORD, T. J.; KUNKEL, S. L.; DANFORTH, J. M.; STRIETER, R. M. Alterations of ambient oxygen tension modulate the expression of tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein-1 alpha from murine alveolar macrophages. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 13, n. 4, p. 399-409, 1995.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.

VON STEBUT, E.; BELKAID, Y.; JAKOB, T.; SACKS, D. L.; UDEY, M. C. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 8, p. 1547-1552, 1998.

WEIGLE, K.; SARAIVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v. 14, n. 5, p. 433-450, 1996.

WEST, M. A.; LI, M. H.; SEATTER, S. C.; BUBRICK, M. P. Pre-exposure to hypoxia or septic stimuli differentially regulates endotoxin release of tumor necrosis factor, interleukin-6, interleukin-1, prostaglandin E2, nitric oxide, and superoxide by macrophages. **J. Trauma**, v. 37, n. 1, p. 82-89, 1994.

WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. **J. Immunol.**, v. 136, n. 12, p. 4681-4688, 1986.

WOELBING, F.; KOSTKA, S. L.; MOELLE, K.; BELKAID, Y.; SUNDERKOETTER, C.; VERBEEK, S.; WAISMAN, A.; NIGG, A. P.; KNOP, J.; UDEY, M. C.; VON STEBUT, E. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 1, p. 177-188, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em < <http://www.who.int/leishmaniasis/> > Acesso em: 23 fevereiro 2007.

YUN, A. J.; BAZAR, K. A.; LEE, P. Y. Tumors may modulate host immunity partly hypoxia-induced sympathetic bias. **Med. Hypotheses**, v. 63, p. 352-356, 2004.

YUN, J. K.; McCORMICK, T. S.; JUDWARE, R. R.; LAPETINA, E. G. Cellular adaptive responses to low oxygen tension: apoptosis and resistance. **Neurochem. Res.**, v. 22, p. 517-521, 1999a.

YUN, J. K.; McCORMICK, T. S.; VILLABONA, C.; JUDWARE, R. R.; ESPINOSA, M. B.; LAPETINA, E. G. Inflammatory mediators are perpetuated in macrophages resistant to apoptosis induced by hypoxia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 13903-13908, 1997b.

ZAGZAG, D.; ZHONG, H.; SCALZITTI, J. M.; LAUGHNER, E.; SIMONS, J. W.; SEMENZA, G. L. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. **Cancer**, v. 88, n. 11, p. 2606-2618, 2000.

ZHOU, L.; DOSANJH, A.; CHEN, H.; KARASEK, M. Divergent effects of extracellular oxygen on the growth, morphology, and function of human skin microvascular endothelial cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 182, p. 134-140, 2000.

ZHOU, L.; TEDDER, T. F. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 93, n. 6, p. 2588-2592, 1996.

ANEXO



Research briefs

Leishmania amazonensis: Multiple receptor–ligand interactions are involved in amastigote infection of human dendritic cells

Maira Cegatti Bosetto, Selma Giorgio *

Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, Cep 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil

Received 11 August 2006; received in revised form 4 January 2007; accepted 5 January 2007

Abstract

In their mammalian hosts, *Leishmania* are obligate intracellular parasites that reside in macrophages and dendritic cells (DCs). In the present study, we have investigated in vitro the mechanisms of entry into human DCs of *Leishmania amazonensis* amastigotes isolated from lesions in nude mice (Am nude). The DC infection rate with Am nude was approximately 36%, while opsonization of Am nude with normal human serum and infected human serum increased the DC infection rates to 60% and 62%, respectively. Heat inactivation and depletion of antibodies in sera brought the DC infection rate down to 40%. The DC infection rate was inhibited after pre-treatment of Am nude with heparin. We were unable to implicate mannose–fucose receptors in the uptake of Am nude by DCs. Our data suggest that the ability of *L. amazonensis* amastigotes to infect human DCs involves the participation of at least three multiple receptor–ligand interactions, antibodies/FcR, complement components/CR and proteoglycans/heparin-binding protein.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Index Descriptors and Abbreviations: *Leishmania amazonensis*; Human dendritic cells; Amastigotes nude; Receptors; Mannan; Heparin; CR, complement receptor; FcR, Fc receptor; MFR, mannose–fucose receptor; DC, dendritic cell; IHS, infected human serum; NHS, normal human serum

1. Introduction

Leishmania are protozoan parasites with two developmental forms, promastigotes that develop in the phlebotomine insect vectors, and amastigotes that replicate in host mammalian cells, mainly macrophages and dendritic cells (DCs) (Handman, 1999). Numerous studies have identified that the uptake of *Leishmania* promastigotes by macrophages is mainly mediated by complement receptors (CRs), while are the receptors for Fc domain of immunoglobulins (FcRs) and for mannose–fucose (MFRs) are also of importance (Blackwell et al., 1985; Chakraborty et al., 2001; Mosser and Edelson, 1985; Wilson and Pearson, 1986). Less is known of the molecules that mediate entry of the amastigote form into host cells, even though amastigotes are

responsible for sustaining the infection within the host (Kima et al., 2000). The suggested macrophage receptors are FcR, CR and a cellular proteoglycan containing heparan sulfate (Guy and Belosevic, 1993; Kima et al., 2000; Love et al., 1993; Peters et al., 1995). Thus, the entry of *Leishmania* into macrophages involves deposition of complement components and antibodies, and the presence of mannose and heparin-binding protein on parasite surface (Blackwell et al., 1985; Butcher et al., 1992; Guy and Belosevic, 1993; Kima et al., 2000; Love et al., 1993; Mosser and Edelson, 1985; Peters et al., 1995; Wilson and Pearson, 1986).

Dendritic cells efficiently ingest *Leishmania* and become involved in the induction and shaping of T-cell dependent immune responses (Brandonisio et al., 2004; Prina et al., 2004). Recently, considerable efforts have been made to define the opsonic requirements for *Leishmania* ingestion by DCs. Although Blank et al. (1993) suggested that the uptake of *Leishmania major* amastigotes by murine Langer-

* Corresponding author. Fax: +55 19 35213124.

E-mail address: sgiorgio@unicamp.br (S. Giorgio).

hans cells was mediated by CR, more recent studies have shown that CR-mediated uptake is not relevant for infection, and that *L. major* is predominantly phagocytosed by murine DCs via FcR (Woelbing et al., 2006). Colmenares and co-workers (2004) demonstrated that mannan-binding C-type lectin is a receptor in human DCs for promastigote and amastigote forms of *L. infantum* and *L. pifanoi*, but not for *L. major* promastigotes (Colmenares et al., 2002, 2004; Woelbing et al., 2006). In addition, opsonization of *L. pifanoi* amastigotes with serum from patients with leishmaniasis has exhibited a low capacity to bind to DCs (Colmenares et al., 2004). These apparently conflicting results reflect species-specific interactions between *Leishmania* and DCs.

Leishmania amazonensis, a species transmitted mainly in the Brazilian Amazon is associated with benign cutaneous lesions and diffuse cutaneous disease (Grimaldi and Tesh, 1993). A single report has demonstrated that *L. amazonensis* amastigotes, purified from nude mouse lesions, opsonized with immune serum enhances the infection rate of murine bone marrow-derived dendritic cell cultures; the effect of other ligand–receptor systems on the infectivity of amastigotes was not evaluated (Prina et al., 2004). In the present study, we examined the ligands required for in vitro infection of human monocyte-derived dendritic cells by *L. amazonensis* amastigotes isolated from nude mouse lesions (Am nude).

2. Materials and methods

2.1. Parasites and generation of dendritic cells

Leishmania amazonensis (MHOM/BR/73/M2269) amastigotes were isolated from footpad lesions from C3H nude/Uni mice (Cemib—Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, Unicamp, Campinas SP, Brazil) as described previously (Barbieri et al., 1993), and used immediately after isolation. Promastigotes were cultured as described by Arrais-Silva et al. (2005). The generation of dendritic cells from peripheral blood monocytes from healthy donors was as previously described (Nair et al., 1998). DCs were cultured in 24 well plates with coverslips for 7 days in Iscove's medium (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with interleukin 4 (250 ng/ml) and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (50 ng/ml) (Sigma, St. Louis, MO). The DCs were routinely CD14^{low}, CD83^{low}, CD80⁺, CD1a⁺, HLA-DR⁺, CD86⁺, and CD40⁺ as determined by flow cytometry.

2.2. Parasite opsonization conditions

Serum samples were obtained from healthy Brazilian individuals with no history of exposure to *Leishmania* (normal human serum—NHS) and individuals with visceral leishmaniasis (infected human serum—IHS), generous gifts from Dr. C. L. Barbieri (Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil) and Dr. E. Deberaldini (Superintendên-

cia de Controle de Endemias, SP, Brazil). These sera were used in the experiments at dilution determined by titration obtained in immunofluorescence reactions, i.e., 1:10 for NHS and 1:80,000 or 1:160,000 for IHS. For complement inactivation, sera were treated at 56 °C for 1 h (Mosser and Edelson, 1985; Navin et al., 1989). For antibody depletion, sera were adsorbed against *L. amazonensis* promastigotes (10⁷ parasites/ml) for 2 h at 4 °C (Kolb-Maurer et al., 2001). To confirm antibody removal, an immunofluorescence reaction was performed. For complement inactivation and antibody depletion, sera were first inactivated at 56 °C for 1 h, and then incubated with promastigotes for 2 h at 4 °C. The opsonization of the amastigotes was achieved by incubation at 4 °C for 1 h, and two washes in PBS (Prina et al., 2004). The parasites were counted using a hemocytometer, then added to dendritic cell cultures.

2.3. Heparin and mannan treatments

Amastigotes (10⁶/ml) were pre-treated with soluble heparin (100 µg/ml) (Cristália, Campinas, SP, Brazil) for 20 min on ice, washed twice in PBS (Love et al., 1993) and added to DC cultures. In other experiments DC cultures (5 × 10⁵ cells/ml) were pre-incubated for 30 min at 37 °C with soluble mannan of *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, St. Louis, MO) (5, 100, or 750 µg/ml) (Cantos et al., 1993; Colmenares et al., 2002), before parasite infection.

2.4. Infection of DCs with *L. amazonensis*

DCs were infected with *L. amazonensis* Am nude at a parasite-DC ratio of 3:1 at 37 °C in 5% CO₂/95% humidified air. After 24 h, the cultures were washed with PBS to remove extra-cellular parasites, fixed with methanol and stained with Giemsa. The percentage of infected DCs and the number of intracellular parasites were determined by light microscopy examination of at least 600 cells on triplicate coverslips.

2.5. Statistics

All experiments were repeated at least twice in triplicate wells, and the results are expressed as the mean ± standard deviation. Statistical analyses were performed using the two-tailed Student's *t* test and Microcal Origin 6.0 (Microcal Software, Northampton, MA).

3. Results and discussion

In our experiments we examined the opsonic requirements for entry of *L. amazonensis* amastigotes isolated from nude mouse lesions in human DCs. These amastigotes did not have antibodies bound in their surface (Prina et al., 2004) and in our study, the antibody isotypes IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 were not detectable on the parasite surface by immunofluorescence (data not shown).

Previously, *L. amazonensis* was found to be able to infect dendritic cells of murine bone marrow (Prina et al., 2004). Our data have extended this finding to human monocyte-derived DCs. Twenty-four hours after adding Am nude, the percentage of infected cells was $36 \pm 1.7\%$ (Fig. 1). The number of intracellular amastigotes in DCs was $3.8 \pm 0.2\%$ amastigotes per cell, and infection could be maintained for at least 72 h. The effect of human sera on the entry of Am nude into human DCs was then assessed. As shown in Fig. 1, the percentage of infected DCs increases significantly when Am nude are opsonized with IHS ($62.3 \pm 2.5\%$ of infected DCs). Interestingly, the entry of Am nude opsonized with NHS in DCs was also significantly enhanced as compared with unopsonized Am nude ($60 \pm 2.9\%$ versus $36 \pm 1.7\%$) (Fig. 1). The opsonization of Am nude with IHS or NHS did not change the number of intracellular parasites in DC cultures, when compared to DC cultures infected with unopsonized Am nude (data not shown). Next, we examined which of the two major factors present in sera might be responsible for enhancement of the *L. amazonensis* Am nude uptake by human DCs. As shown in Fig. 1, the heat treatment of IHS and NHS did not reduce the percentage of infected DCs to the level observed in DCs infected with unopsonized parasites. To establish the importance of serum antibodies to promote DCs infection by Am nude, IHS and NHS were depleted of antibodies, i.e., pre-adsorbed against promastigotes and then used for Am nude opsonization. The drastic reduction in antibodies (for IHS: IF 1:80,000 and IF 1:10 before and after adsorption, respectively; for NHS: IF 1:80 and 0 before and after adsorption, respectively) did not alter the ability of the sera to opsonize Am nude for DC infection (Fig. 1). However, the opsonization of Am nude with IHS or NHS, heat inactivated and depleted of antibodies, reduced the infection rate to the levels observed in DC cultures infected with unopsonized Am nude (Fig. 1).

We also assessed the involvement of other two ligands involved in *Leishmania* infection, namely mannan and heparan sulfate (Blackwell et al., 1985; Love et al., 1993; Wilson and Pearson, 1986). Yeast mannan from *S. cerevisiae*, a molecule that displays mannose residues, and is known to bind to the MFRs (Wilson and Pearson, 1986). We found no inhibition in the uptake of Am nude when DCs were treated with mannan, irrespective of the concentration used (Fig. 2). Human DCs cultures pre-treated with 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of mannan and infected with *L. amazonensis* promastigotes (10:1 parasites/cell ratio) were used as a positive control and showed 34% inhibition of parasite uptake.

A heparin-binding activity on *L. amazonensis* amastigotes surface has been implicated with the attachment to macrophages (Love et al., 1993). To determine whether Am nude heparin-binding activity is involved in the infection of human DCs, assays were performed in the presence of heparin. A significant 50% reduction in the percentage of infected DCs was observed when Am nude were pre-treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of heparin (Fig. 2). Our results are consistent with the findings of Prina et al. (2004) who were able to detect a significant rise of the percentage of murine DCs when Am nude were pre-incubated with *Leishmania*-specific immune serum. The authors suggested that the opsonization with antibodies is involved in the uptake of parasites by DCs. In addition, we have found that opsonization of Am nude with NHS also enhanced the percentage of infected DCs (Fig. 1). In contrast to these results, Woelbing et al. (2006) have reported the inability of normal mouse serum-opsonized *L. major* amastigotes isolated from SCID mice to enhance the infection of murine DCs. Explanations for this discrepancy could be differences in DCs and origins of the serum (murine versus human), *Leishmania* species (*L. major* versus *L. amazonensis*) and opsonization conditions (10 min at 37 °C in Woelbing's protocol, compared to 1 h at 4 °C in our protocol). Indeed, natural antibodies recogniz-

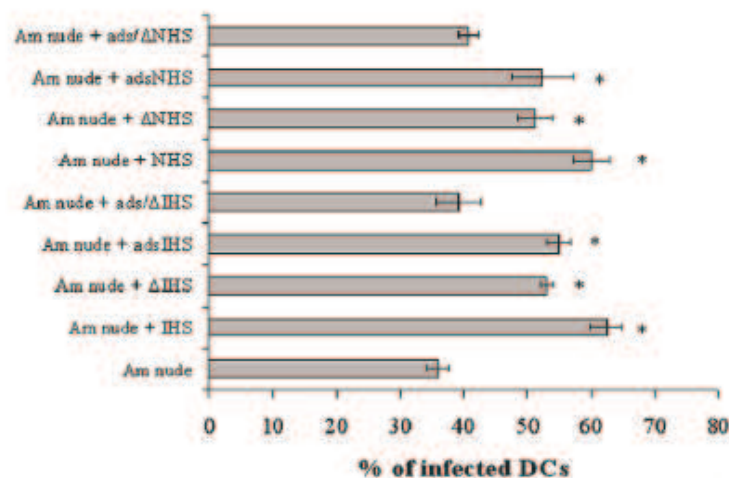


Fig. 1. Infection of DCs with *L. amazonensis* Am nude. Am nude were unopsonized or previously opsonized with infected human serum (IHS), heat inactivated IHS (Δ IHS), a serum (NHS), heat inactivated NHS (Δ NHS), adsorbed NHS (adsNHS) or heat inactivated and adsorbed NHS (ads/ Δ NHS). The NHS and IHS were used at dilution of 1:10 and 1:80,000, respectively. Data are averages of three representative experiments, bars indicate SD. *, statistically significant difference relative to unopsonized Am nude ($P < 0.01$).

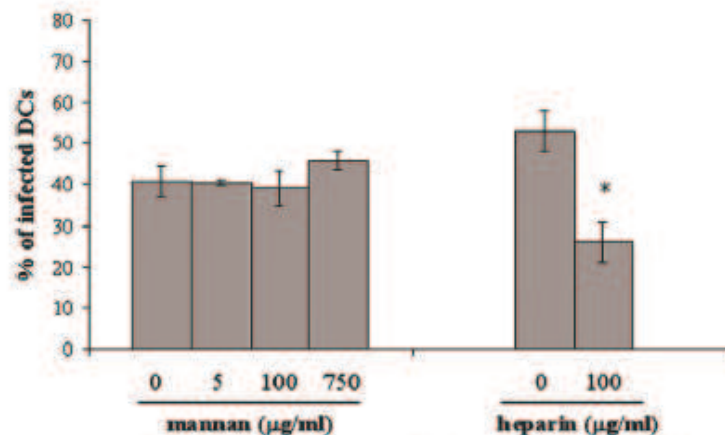


Fig. 2. Infection of DCs with *L. amazonensis* Am nude. DC cultures were untreated (0) or pre-treated with soluble mannann (5, 100, or 750 µg/ml) for 30 min before parasite addition. In other experiments, Am nude were untreated (0) or pre-treated with soluble heparin (100 µg/ml) for 20 min on ice before parasite addition. One out of two independent experiments with similar results and performed in triplicate is shown, bar indicate SD. *, statistically significant difference relative to untreated ($P < 0.01$).

ing *Leishmania* have been found in sera of people with no history of exposure to the parasite, and they can enhance parasite phagocytosis by human monocytes and human peripheral blood neutrophils (Laufs et al., 2002; Navin et al., 1989). In addition to these studies with human blood leukocytes, *L. donovani* and *L. amazonensis* promastigotes and amastigotes opsonized with human non-immune serum containing IgG and IgM that recognize parasite epitopes, bind to human erythrocytes (Dominguez and Torano, 1999; Avila et al., 1989). The opsonization of Am nude with NHS or IHS depleted of antibodies did not reduce the percentage of infected DCs (Fig. 1), suggesting that complement components are involved in the infection of *L. amazonensis* amastigotes to human DCs. However, the opsonization of Am nude with heat inactivated NHS or IHS did not reduce the percentage of infected DCs (Fig. 1). The results also showed that opsonization of Am nude with IHS or NHS which had been heat inactivated and depleted of antibodies, significantly reduced the infection rate of DCs (Fig. 1). These data suggest that the presence of one of two serum components (i.e., complement or antibodies that recognize the parasite) is necessary and sufficient to enhance the entry of Am nude in human DCs. It is possible, however, that the presence of unknown heat-labile molecules other than the complement components would fix to the amastigote surface ligands and would be involved in parasite uptake by human DCs. On the other hand, it has been proposed that the attachment of *L. pifanoi*, *L. amazonensis* and *L. major* amastigotes to macrophage occur through both FcR and CR3 receptors (Guy and Belosevic, 1993; Kima et al., 2000; Prina et al., 2004). Thus, in the tissue microenvironment, complement components and antibodies facilitate the infection of human DCs by *L. amazonensis*, and in the absence of one of these opsonins, the other would compensate.

We also recognized the possibility that other mechanisms might contribute to serum-independent infection of DCs. In fact, a 36% infection rate was observed in DC cultures

infected with unopsonized Am nude (Fig. 1). Recently, C-type lectin receptors have also been implicated in the uptake of *L. pifanoi* and *L. infantum* amastigotes by human DCs, but not in the uptake of *L. major* (Colmenares et al., 2004; Woelbing et al., 2006). Our results did not, however, support a role of mannann-binding C-type lectins in the phagocytosis of *L. amazonensis* Am nude by human DCs (Fig. 2).

Interestingly, we found that DC infection was inhibited after pre-treatment of Am nude with heparin (Fig. 2). This would suggest that DCs such as macrophages have an additional mechanism for recognition of amastigotes. Love et al. (1993) reported heparin-binding activity on the surface of *L. amazonensis*. The authors suggested that *L. amazonensis* amastigotes interact with non-myeloid cells and macrophages, which express in their surface proteoglycans containing heparan sulfate (Love et al., 1993). We can speculate that binding of *L. amazonensis* amastigotes to heparin is an important mechanism in the infection of human DCs.

In summary, our data suggest that the ability of *L. amazonensis* amastigotes to infect human DCs involves the participation of multiple receptor–ligand interactions, at least the three shown in this report, namely antibodies/FcR, complement components/CR, and proteoglycans/heparin-binding protein. This mechanism of *L. amazonensis* invasion into DCs seems to be similar to that described for the infection of macrophages (Guy and Belosevic, 1993; Love et al., 1993) and represent advantages for the parasite. One benefit to the parasite is that, in the absence of one or two opsonins, other receptor–ligand interactions could be used. Another functional advantage is that parasites can enter different leukocyte populations, including macrophages and DCs, allowing the establishment and the persistence of infection.

Acknowledgments

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for their support.

References

- Arrais-Silva, W.W., Colhone, M.C., Ayres, D.C., Souto, P.C.S., Giorgio, S., 2005. Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *Parasitology International* 54, 1–7.
- Avila, J.L., Rojas, M., Galili, U., 1989. Immunogenic Gal alpha 1–3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American *Trypanosoma* and *Leishmania*. *The Journal of Immunology* 142, 2828–2834.
- Barbieri, C.L., Giorgio, S., Merjan, A.J., Figueiredo, E.N., 1993. Glycosphingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. *Infection and Immunity* 61, 2131–2137.
- Blackwell, J.M., Ezekowitz, R.A., Roberts, M.B., Channon, J.Y., Sim, R.B., Gordon, S., 1985. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *The Journal of Experimental Medicine* 162, 324–331.
- Blank, C., Fuchs, H., Rappersberger, K., Rollinghoff, M., Moll, H., 1993. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *The Journal of Infectious Diseases* 167, 418–425.
- Brandonisio, O., Spinelli, R., Pepe, M., 2004. Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes and Infection* 6, 1402–1409.
- Butcher, B.A., Sklar, L.A., Seamer, L.C., Glew, R.H., 1992. Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal macrophages. A fluorescence flow cytometric analysis. *The Journal of Immunology* 148, 2879–2886.
- Cantos, G., Barbieri, C.L., Iacomini, M., Gorin, P.A., Travassos, L.R., 1993. Synthesis of antimony complexes of yeast mannan and mannan derivatives and their effect on *Leishmania*-infected macrophages. *The Biochemical Journal* 289, 155–160.
- Chakraborty, P., Ghosh, D., Basu, M.K., 2001. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes. *The Journal of Parasitology* 87, 1023–1027.
- Colmenares, M., Corbi, A.L., Turco, S.J., Rivas, L., 2004. The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *The Journal of Immunology* 172, 1186–1190.
- Colmenares, M., Puig-Kroger, A., Pello, O.M., Corbi, A.L., Rivas, L., 2002. Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 36766–36769.
- Dominguez, M., Torano, A., 1999. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *The Journal of Experimental Medicine* 189, 25–35.
- Grimaldi, G.R., Tesh, R.B., 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews* 6, 230–250.
- Guy, R.A., Belosevic, M., 1993. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infection and Immunity* 61, 1553–1558.
- Handman, E., 1999. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology* 44, 1–39.
- Kima, P.E., Constant, S.L., Hannum, L., Colmenares, M., Lee, K.S., Haberman, A.M., Shlomchik, M.J., McMahon-Pratt, D., 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Experimental Medicine* 191, 1063–1067.
- Kolb-Maurer, A., Pilgrim, S., Kampgen, E., McLellan, A.D., Brocker, E.B., Goebel, W., Gentschev, I., 2001. Antibodies against listerial protein 60 act as an opsonin for phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by human dendritic cells. *Infection and Immunity* 69, 3100–3109.
- Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J.C., Solbach, W., Laskay, T., 2002. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection and Immunity* 70, 826–835.
- Love, D.C., Esko, J.D., Mosser, D.M., 1993. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. *The Journal of Cell Biology* 123, 759–766.
- Mosser, D.M., Edelson, P.J., 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *The Journal of Immunology* 135, 2785–2789.
- Nair, S.K., Boczkowski, D., Morse, M., Cumming, R.I., Lyster, H.K., Gilboa, E., 1998. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nature Biotechnology* 16, 364–369.
- Navin, T.R., Krug, E.C., Pearson, R.D., 1989. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infection and Immunity* 57, 1343–1346.
- Peters, C., Aebischer, T., Stierhof, Y.D., Fuchs, M., Overath, P., 1995. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *Journal of Cell Science* 108, 3715–3724.
- Prina, E., Abdi, S.Z., Lebastard, M., Perret, E., Winter, N., Antoine, J.C., 2004. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *Journal of Cell Science* 117, 315–325.
- Wilson, M.E., Pearson, R.D., 1986. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *The Journal of Immunology* 136, 4681–4688.
- Woelbing, F., Kostka, S.L., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., Waisman, A., Nigg, A.P., Knop, J., Udey, M.C., von Stebut, E., 2006. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc gamma receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 177–188.

DECLARAÇÃO

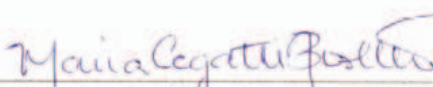
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de doutorado intitulada
 “Avaliação dos efeitos de microambiente hipóxico em células dendríticas humanas
 infectadas com *Leishmania amazonensis*”:

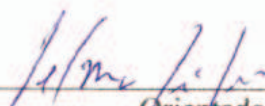
() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 770-1, de 17 de fevereiro de 2005, Instituto de Biologia, Unicamp).

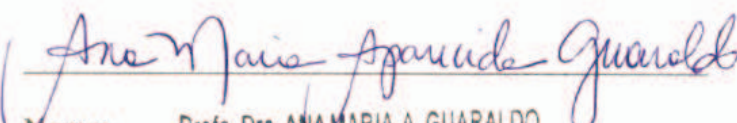
() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº _____).


 Aluno


 Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


 Nome: Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO
 Função: Presidente
 Comissão de Ética na Experimentação Animal
 CEEA/IB - UNICAMP