NATÁLIA SOARES FERREIRA

Papel das células B-1 na infecção por *Leishmania (L.) amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

NATÁLIA SOARES FERREIRA

Papel das células B-1 na infecção por *Leishmania (L.) amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Mauro Javier Cortez Veliz

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ferreira, Natália Soares.
Papel das células B-1 na infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* / Natália Soares Ferreira. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Javier Cortez Veliz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Imunobiologia celular da interação Leishmania-célula hospedeira.

Versão do título para o inglês: Role of B-1 cells in the infection by *Leishmania (L.) amazonensis.*

1. *L (L.) amazonensis* 2. Células B-1 3. Macrófagos 4. Vacúolo parasitóforo I. Cortez Veliz, Prof. Dr. Mauro Javier II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB022/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Natália Soares Ferreira.

Título da Dissertação: Papel das células B-1 na infecção por *Leishmania (L.) amazonensis.*

Orientador(a): Prof. Dr. Mauro Javier Cortez Veliz.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **104** nas fls. **03** do livro **10** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Mauro Javier Cortez Veliz** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Papel de células B-1 na infecção por Leishmania(L.) amazonensis*" do qual participam o(s) aluno(s) **Natalia Soares Ferreira,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **13.08.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 19 de agosto de 2013.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

À minha família e aos amigos que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Mauro Cortez por ter me concedido a oportunidade de realizar meu mestrado em seu laboratório, compartilhando seu conhecimento e suas experiências que alimentaram meu crescimento profissional.

A todo pessoal do “Cortez Lab”, os que passaram e os que lá estão, pela troca de experiências e apoio no meu estudo. Viviane, que me ensinou a fazer “IF” e a contar lâminas. Albert, que me deu muitas dicas para os experimentos, além das caronas ao supermercado! Lina, pela ajuda, orientações nos experimentos mais complexos, dicas na reta final e pelo apoio! Ismael, pela paciência em me ensinar os primeiros passos, me dar suporte nos últimos e por me fazer rir nos momentos em que eu queria chorar! Natália Fiesco, minha chará versão colombiana, que tentou me ensinar espanhol mas percebeu que eu já dominava (mentira!), mas também que me acompanhava no biotério, em alguns experimentos e até na leitura dos artigos! Junior, por me acompanhar nos últimos experimentos e por torcer junto pelo Palmeiras (Campeão! Uhul!). Juliana (Ju), que sempre teve paciência em me ensinar algumas fórmulas de química, por me atualizar sobre o que acontecia no mundo e principalmente por me dar forças e apoio, me mostrando que ser capaz e confiar em si mesmo não é tão difícil assim.

À professora Tânia, aos professores Carlos Winter e Daniel, por aceitarem dividir espaço conosco nos momentos que precisamos. Ao professor Winter, principalmente pelas conversas que tivemos em que me explicou coisas que eu dificilmente descobriria sozinha!

Aos laboratórios das professoras Silvia Uliana, Sirlei Daffre e Andrea Fogaça, pelo uso de materiais e equipamentos fundamentais para a realização do estudo.

À professora Ana Flavia e à Vivian, da UNIFESP, por me receberem no laboratório muitas vezes para a realização dos experimentos de citometria.

A toda equipe do ICB II, como o pessoal do biotério, segurança, manutenção, limpeza e administração, fundamentais para a realização do nosso trabalho.

À Marta Campaner e ao Manoel, pelas excelentes dicas profissionais, auxílio em alguns experimentos e pelo apoio sempre!

Ao Oscar, pela ajuda nos experimentos de citometria e principalmente pela paciência ao responder milhões de dúvidas.

À Mariana Galuppo, que me deu várias dicas sobre a obtenção das células peritoneais e na análise de dados.

À Oneida, Paola e ao Gustavo, por todo apoio profissional, pelos momentos de reflexão em conjunto com diversão e por serem meus amigos!

À Gabi, Thainá e aos seus pais, Elias e Delma, por terem me recebido em sua casa no início do meu mestrado, pelo apoio e por serem minha família durante este tempo!

À Milena, que pelo pouco tempo que passamos juntas conseguimos aproveitar muitos momentos de distração, como também os papos profissionais cheios de dicas e sugestões.

Às “meninas” Diane e Fernanda, que dividiram comigo o mesmo “teto”, sendo minhas amigas e irmãs, que mesmo cursando Letras estavam dispostas a me ouvir quando eu tentava explicar o que eu fazia. Agradeço muito por tudo!

À Carla, como eu poderia esquecer! Que foi uma pessoa maravilhosa presente nesta fase da minha vida. Agradeço muito por ter me recebido de braços abertos quando cheguei. Por todo suporte material e emocional. Por ter aguentado, durante dois anos, me ver tanto no ICB quanto em casa (risos)! Agradeço pelos momentos divertidos, pelo seu apoio e, principalmente, pela sua amizade!

Ao CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro para a bolsa de estudo e para a compra do material necessário para a realização deste trabalho.

E, finalmente, a toda minha família! Com destaque para minha mãe “Dona Kika”, que mesmo não entendendo o que eu fazia, sempre estava disposta a me ouvir, sempre questionava se estava tudo bem, sempre arrumava algumas horas para conversar e me tirar da rotina... Sempre estava ali, me apoiando, me incentivando! Muito obrigada mãe! Por apostar em mim... por acreditar em mim!

"Prepara grandes muralhas para grandes reinos e
não temas o longo trabalho da viagem."

Homero

RESUMO

Ferreira NS. Papel das células B-1 na infecção por *Leishmania (L.) amazonensis*. [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Parasitos do gênero *Leishmania* causam um espectro de doenças chamadas de leishmaniose devido às diversas manifestações clínicas que podem surgir com a infecção. As formas da doença podem variar de lesões que se curam espontaneamente até para uma forma grave que se não tratada leva à morte. Estas diferentes manifestações clínicas estão relacionadas com a espécie do parasito e o estado imunológico do hospedeiro. A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é uma das principais espécies encontradas no Brasil capaz de causar a forma cutânea da doença, mas em alguns casos pode se manifestar de forma mais grave denominada leishmaniose cutânea difusa. Apesar da *Leishmania* ser capaz de infectar vários tipos celulares, o macrófago é considerado a principal célula hospedeira no qual o parasito consegue sobreviver e se multiplicar utilizando mecanismos de evasão da resposta imune, o que garante a manutenção da doença. Para compreender de melhor forma a imunobiologia da *Leishmania*, o estudo de outras células envolvidas no processo de infecção do parasito se torna importante. As células B-1 fazem parte de um subconjunto de células B, encontradas principalmente nas cavidades peritoneal e pleural, tendo como principais características a grande produção de anticorpos polirreativos naturais, interleucina-10 (IL-10) e a capacidade de se diferenciar em células fagocíticas. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o papel das células B-1 na infecção por *L. (L.) amazonensis*. Nos ensaios *in vitro*, fagócitos derivados de células B-1 (B-1CDPs) e macrófagos foram infectados com promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* para a avaliação da capacidade de infecção e multiplicação dos parasitos. Genisteína e latrunculina A, drogas que interferem no processo de fagocitose, foram utilizadas para verificar o modo de entrada dos parasitos nos B-1CDPs. Os resultados mostraram que, assim como os macrófagos, os B-1CDPs são infectados pelo mecanismo de fagocitose e permitem a multiplicação da *Leishmania* no seu interior. Além disso, os vacúolos parasitóforos formados nos B-1CDPs apresentaram ser maiores do que dos macrófagos. Estes resultados mostram que os B-1CDPs podem manter *L. (L.) amazonensis* no seu interior, apresentando características semelhantes às dos macrófagos, principalmente em relação ao tamanho dos vacúolos, fator importante para a proteção dos parasitos desta espécie. Portanto, os dados com B-1CDPs sugerem que estas células podem possuir um papel relevante na infecção por *L. (L.) amazonensis*, podendo ser considerados células hospedeiras importantes durante a infecção devido à incapacidade de responder de maneira eficaz para a eliminação dos parasitos.

Palavras-chave: *L. (L.) amazonensis*. Células B-1. Macrófagos. Vacúolo parasitóforo.

ABSTRACT

Ferreira NS. Role of B-1 cells in the infection by *Leishmania (L.) amazonensis.* [Masters thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The genus *Leishmania* parasites cause a spectrum of diseases called leishmaniasis due to various clinical manifestations that may arise with the infection. The forms of the disease can range from lesions that heal spontaneously to a severe form, which is usually fatal if left untreated. These several clinical manifestations relate to the species of parasite and immune status of the host. The *Leishmania (Leishmania) amazonensis* is one of the main species found in Brazil capable of causing the cutaneous form of the disease, nevertheless in some cases may present a more severe form called diffuse cutaneous leishmaniasis. Although *Leishmania* is capable of infecting many cell types, the macrophage is considered to be the main host cell in which the parasite can survive and multiply using evasion mechanisms from immune response, which allow the maintenance of the disease. To better understand the immunobiology of *Leishmania*, the study of other cells involved in parasite infection process becomes important. The B-1 cells are part of a subset of B cells found predominantly in the peritoneal and pleural cavities, whose main features consist on a large production of natural polyreactive antibodies, interleukin-10 (IL-10) and the ability to differentiate into phagocytic cells. Thus, this study aimed to evaluate the role of B-1 cells in the infection by *L. (L.) amazonensis*. B-1 cell-derived phagocytes (B-1CDPs) and macrophages were infected with stationary-phase promastigotes of *L. (L.) amazonensis in vitro* to evaluate the infectivity and multiplication of parasites. Genistein and latrunculin A, drugs that interfere with the process of phagocytosis, were used to assess the entry mode of the parasites into B-1CDPs. The results showed that, like macrophages, B-1CDPs are infected by a mechanism of phagocytosis and allow the multiplication of *Leishmania* within. Furthermore, the parasitophorous vacuoles in the B-1CDPs showed to be larger than those formed in the macrophages. These results show that B-1CDPs can keep *L. (L.) amazonensis* whitin, with characteristics similar to those observed in macrophages, especially when it comes to the size of the vacuoles, an important factor for the protection of the parasites of this species. Therefore, the data suggest that the B-1CDPs have an important role in infection by *L. (L.) amazonensis* and can be considered important host cells during infection due to inability to respond effectively to the elimination of parasites.

Keywords: *L. (L.) amazonensis*. B-1 cells. Macrophages. Parasitophorous vacuole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Manifestações clínicas das diferentes formas da leishmaniose. 22

Figura 2 - Mapa da distribuição da leishmaniose visceral, 2012. 24

Figura 3 - Mapa da distribuição da leishmaniose cutânea, 2012 24

Figura 4 - Ciclo biológico da *Leishmania* 27

Figura 5 - Obtenção e cultivo de células B-1 e PMO 44

Figura 6 - Estratégia da análise utilizada para avaliar populações celulares do sobrenadante de 5º dia de cultura das células peritoneais 46

Figura 7 - Curva de crescimento de promastigotas 48

Figura 8 - Citometria do sobrenadante de 5º dia das células peritoneais de camundongos C57BL/6, marcação de CD19 e CD23 55

Figura 9 - Citometria do sobrenadante de 5º dia de células peritoneais de camundongos C57BL/6, marcação de F4/80 56

Figura 10 - Comparação da multiplicação de *Leishmania* em B-1CDP, PMO e MMO 58

Figura 11 - Imagens de imunofluorescência representativas do ensaio de infecção dos B-1CDPs, PMOs e MMOs com *Leishmania (L.) amazonensis* 59

Figura 12 - Comparação da multiplicação de *L. (L.) amazonensis* em B-1CDPs WT e deficientes de MyD88 e TRIF 60

Figura 13 - Comparação da multiplicação de *L. (L.) amazonensis* em MMOs WT e deficientes de MyD88 e TRIF. 61

Figura 14 - Porcentagem de parasitos internalizados e aderidos em B-1CDPs e MMOs previamente tratados com drogas inibidoras de fagocitose 63

Figura 15 - Porcentagem de B-1CDPs e MMOs infectados com *L (L.) amazonensis* previamente tratados com drogas inibidoras de fagocitose. 64

Figura 16 - Multiplicação de *L (L.) amazonensis* em B-1CDPs e MMOs previamente tratados com vacuolina-1.....66

Figura 17 - Porcentagem e índice de infecção dos B-1CDPs previamente tratados com vacuolina-1 67

Figura 18 - Porcentagem e índice de infecção dos MMOs previamente tratados com vacuolina-1.. 68

Figura 19 - Imagens de imunofluorescência representativas do ensaio de infecção dos B-1CDPs e MMOs com *Leishmania (L.) amazonensis*, previamente tratados com vacuolina-1 69

Figura 20 - Comparação do comprimento do vacúolo parasitóforo entre B-1CDPs e MMOs previamente tratados ou não com vacuolina-1. 70

Figura 21 - Imagens de contraste de fase dos vacúolos parasitóforos de B-1CDPs previamente tratados ou não com vacuolina-1.....71

Figura 22 - Imagens de contraste de fase dos vacúolos parasitóforos de MMOs previamente tratados ou não com vacuolina-1**.**.....72

Figura 23 - Expressão de *Lyst* em B-1CDPs e MMOs infectados com *L. (L.) amazonensis* previamente tratados ou não com vacuolina-1.....73

Figura 24 - Expressão de *Cd200* em B-1CDPs e MMOs infectados com *L. (L.) amazonensis* previamente tratados ou não com vacuolina-1.....74

Figura 25 - Produção de citocinas pelos B-1CDPs e MMOs em 24 horas pós-infecção com *L. (L.) amazonensis*.....76

Figura 26 - Produção de óxido nítrico em 2 e 24 horas de infecção dos B-1CDPs e MMOs WT e deficientes de MyD88 e TRIF.....77

Figura 27 - Produção de óxido nítrico em 24 horas pós-infecção dos B-1CDPs e MMOs tratados ou não com vacuolina-1.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais marcadores de superfície das células B-1a, B-1b e B-2.....34

Tabela 2 – Primers utilizados nos experimentos de PCR em tempo real 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B-1CDP	Fagócitos derivados de células B-1
BSA	Albumina sérica bovina
C3bi	Forma inativa do C3b
CBA	*Cytometric Bead Array*
CD	*Cluster of differentiation*
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO_2	Dióxido de carbono
CR	Receptor do complemento
DAPI	4’,6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FcγR	Receptor Fc gama
FITC	*Fluorescein isothiocyanate*
FMO	*Fluorescence Minus One*
FSC	Parâmetro de tamanho (*Forward Scatter*)
gp63	Glicoproteína 63
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
L.	*Leishmania*
LAMP-1	Proteína 1 de membrana associada ao lisossomo
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
Lyst	Gene regulador do tráfego lisossomal
MAC	Complexo de ataque à membrana
MACS	Tampão com 0,5% de BSA e EDTA 2 mM em PBS
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMO	Macrófagos de medula óssea
MyD88	Proteína de diferenciação mielóide 88

NADPH	*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NH_4Cl	Cloreto de amônio
NK	Células exterminadoras naturais
NO	Óxido nítrico
ns	Não significativo
P	valor p
PB	*Pacific Blue*
PBS	Tampão fosfato salino
PE	*Phycoerythrin*
PFA	Paraformaldeído
PMO	Macrófagos peritoneais
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
R10	Meio RPMI mais 10% de SFB
R20	Meio RMPI mais 20% de SFB e 20% de sobrenadante de L929
RCF	Força centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
spp.	Espécies
SSC	Parâmetro de complexidade (*Side Scatter*)
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	Resposta celular de linfócitos T auxiliares
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TRIF	Proteína adaptadora que contém o domínio TIR indutor de IFN
V.	*Viannia*
VP	Vacúolo parasitóforo
WT	*Wild type*
XID	Imunodeficiência ligada ao cromossomo X

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	milímetro
%	porcentagem
µm	micrômetro
pH	potencial Hidrogeniônico
°C	grau Celsius
mL	mililitro
cm^2	centímetro quadrado
M	molar
g	grama
L	litro
mM	milimolar
x g	vezes gravidade
nº	número
µL	microlitro
µM	micromolar
nm	nanômetro
pg	picograma
ng	nanograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

1.1 Leishmaniose 21

1.2 O parasito e seu vetor 23

1.3 Epidemiologia 23

1.4 Imunobiologia da *Leishmania* 25

1.4.1 Ciclo biológico 26

***1.4.2 Células envolvidas na resposta à infecção por Leishmania* spp.** 27

1.4.3 Interação Leishmania-célula hospedeira 30

1.4.4 Mecanismos de evasão e resistência à resposta imune 31

1.5 A célula B-1 33

1.5.1 Funções e características das células B-1 34

1.5.2 Envolvimento das células B-1 em infecções por diferentes patógenos 36

1.5.3 Célula B-1 e Leishmania 37

2 OBJETIVOS 39

2.1 Objetivo geral 40

2.2 Objetivos específicos 40

3 MATERIAL E MÉTODOS 41

3.1 Cultura de *Leishmania* 42

3.2 Animais 42

3.3 Cultivo de células L929 e obtenção do sobrenadante 42

3.4 Obtenção de macrófagos peritoneais e células B-1 43

3.5 Análise do sobrenadante de 5º dia por citometria de fluxo 45

3.6 Obtenção e cultura de macrófagos derivados de medula óssea 46

3.7 Avaliação da viabilidade celular 47

3.8 Infecção de B-1CDP, PMO e MMO *in vitro* 47

3.8.1 Infecção para avaliação da multiplicação intracelular 48

3.8.2 Infecção para avaliação da capacidade fagocítica de B-1CDP e MMO ..49

3.9 Imunofluorescência.....50

3.9.1 Marcação de CD19.....50

3.9.2 Quantificação de parasitos intracelulares.....50

3.9.3 Avaliação da capacidade fagocítica.....51

3.9.4 Análise microscópica.....51

3.10 Avaliação da produção de óxido nítrico.....51

3.11 Quantificação de citocinas 52

3.12 PCR quantitativo em tempo real (qPCR) 52

3.13 Análise estatística 53

4 RESULTADOS.....54

4.1 Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células recuperadas do sobrenadante de 5º dia de cultura do lavado peritoneal 55

4.2 Comparação da capacidade de infecção e de multiplicação da *Leishmania (L.) amazonensis* em B-1CDP, PMO e MMO 57

4.2.1 Participação das vias dos receptores do tipo Toll na infecção dos B-1CDPs e MMOs por L. (L.) amazonensis 59

4.3 Avaliação da infecção dos B-1CDPs e MMOs tratados com drogas inibidoras de fagocitose 61

4.4 Efeito da vacuolina-1 na infeçcão de B-1CDP e MMO por *L. (L.) amazonensis*.....65

4.5 Comparação do tamanho do vacúolo parasitóforo dos B-1CDPs e MMOs infectados com *L. (L.) amazonensis* previamente tratados com vacuolina-1.....69

4.6 Expressão de *Lyst* e *Cd200* nos B-1CDPs e MMOs infectados tratados ou não com vacuolina-1 72

4.7 Produção de citocinas e óxido nítrico pelos B-1CDPs e MMOs infectados com *L. (L.) amazonensis* em diferentes tempos de infecção 75

5 DISCUSSÃO 78

6 CONCLUSÕES 88

REFERÊNCIAS 90

APÊNDICES 101

APÊNDICE A – Marcação de CD19 das células peritoneias do sobrenadante de 5º dia e de macrófagos de medula de camundongos C57BL/6. 102

APÊNDICE B – Citometria do sobrenadante de 3º dia de células peritoneais de camundongos BALB/c, marcação de CD19, CD23 e F4/80. 103

APÊNDICE C – Imagens de imunofluorescência representativas do experimento de B-1CDPs WT, MyD88$^{-/-}$ e TRIF$^{-/-}$ infectados com *L. (L.) amazonensis* ilustrando sua multiplicação 104

APÊNDICE D – Imagens de imunofluorescência representativas do experimento de MMOs WT, MyD88$^{-/-}$ e TRIF$^{-/-}$ infectados com *L. (L.) amazonensis* ilustrando sua multiplicação 105

APÊNDICE E – Imagens de imunofluorescência exemplificando a contagem dos parasitos aderidos e internalizados dos ensaios sobre a avaliação da capacidade fagocítica. 106

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

Doenças tropicais negligenciadas afetam mais de um bilhão de pessoas em 149 países de todo o mundo, sendo a leishmaniose uma das 17 doenças envolvidas neste grupo (1).

A leishmaniose é referida como um conjunto de doenças devido às diversas manifestações clínicas que apresenta, sendo causadas por parasitos protozoários que são transmitidos pela picada de flebotomíneos fêmeas infectados, atingindo os mamíferos, incluindo os seres humanos (2). Os fatores de risco envolvidos são as baixas condições socioeconômicas, malnutrição, mudanças climáticas e ambientais, deslocamento populacional, estado de imunossupressão e também a rápida urbanização ou criação de novos assentamentos (1).

As manifestações clínicas e as formas da doença podem variar de acordo com a espécie do parasito e o estado imunológico do hospedeiro (3). As principais formas da doença são: leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. A leishmaniose cutânea é a forma mais prevalente, podendo ser auto curável quando apresenta lesões ulcerativas no local da picada (**Figura 1A**), conhecida como leishmaniose cutânea localizada, ou se manifestar de modo mais severo como a cutânea difusa, que causa o aparecimento de múltiplos nódulos não ulcerativos (2,4) (**Figura 1B**). Já a forma disseminada da leishmaniose cutânea é caracterizada pelas múltiplas lesões ulceradas e papulares (**Figura 1C**) em diversas áreas do corpo, via disseminação hematogênica ou linfática (5). A leishmaniose mucocutânea é a forma da doença que atinge as mucosas do trato respiratório superior (**Figura 1D**), principalmente a cavidade nasal, podendo também afetar a cavidade oral, aparecendo geralmente meses ou anos após a resolução das lesões primárias (5,6). Essa forma da doença é uma das complicações mais sérias, podendo destruir tecidos e causar desfiguração e até mesmo a morte do paciente, devido às infecções secundárias (1,6). A forma visceral, também conhecida como calazar, ocorre devido à metástase dos parasitos e macrófagos infectados do local da picada aos órgãos viscerais como baço, fígado e medula óssea, resultando em hepatoesplenomegalia (**Figura 1E**) e supressão da medula óssea, que sem tratamento leva à morte do paciente (6). A leishmaniose dérmica pós-calazar é uma complicação que ocorre em pacientes curados da leishmaniose visceral, podendo aparecer até 20 anos após a infecção inicial (4). Esta complicação é caracterizada

por lesões nodulares, maculares ou papulares (**Figura 1F**), com desenvolvimento progressivo (6).

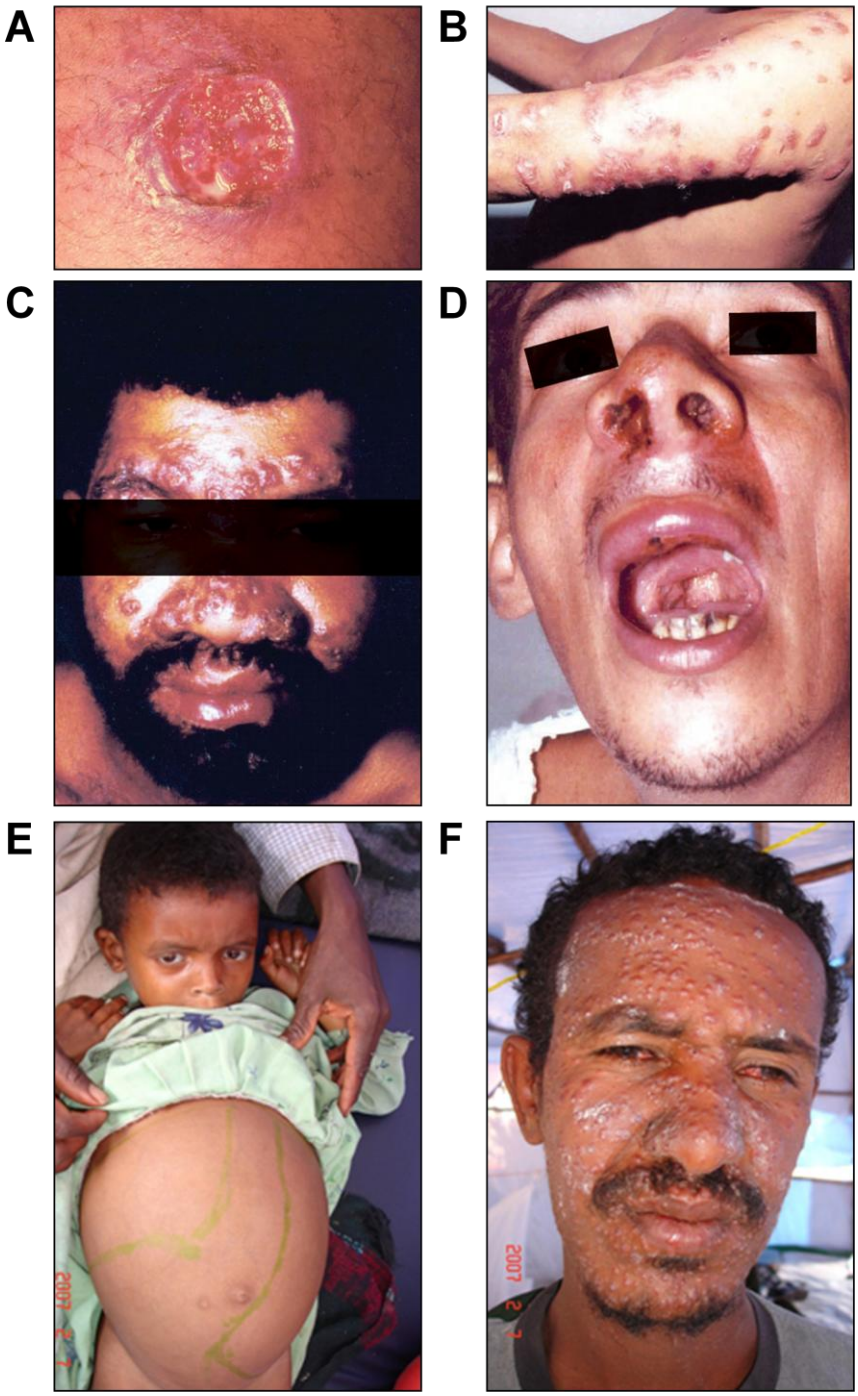


Figura 1 - Manifestações clínicas das diferentes formas da leishmaniose. (**A**) Leishmaniose cutânea localizada, (**B**) leishmaniose cutânea difusa, (**C**) forma disseminada, (**D**) forma mucocutânea, (**E**) leishmaniose visceral e (**F**) leishmaniose dérmica pós-calazar. Imagens **A**, **B**, **C** e **D** foram adquiridas do Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, 2006 (7) e as imagens **E** e **F** foram obtidas do site www.who.int.

1.2 O parasito e seu vetor

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* (7). Existem cerca de 21 espécies de *Leishmania* capazes de causar doença nos seres humanos (8). A localização dos parasitos no trato digestivo do vetor é o que diferencia os subgêneros *Leishmania* e *Viannia.* O subgênero *Viannia* está relacionado aos parasitos que se desenvolvem no intestino posterior do vetor, já os do subgênero *Leishmania* são desenvolvidos restritamente no intestino médio (9).

Os vetores responsáveis pela transmissão de todas as espécies de *Leishmania* pertencem à família Psychodidae, conhecidos como flebotomíneos, sendo os do gênero *Lutzomyia* predominantes nas florestas da América do Sul, e os do gênero *Phlebotomus* amplamente distribuídos nas zonas áridas e semiáridas do Velho Mundo (10). Estes insetos são pequenos, variando de 1,5 a 2 mm (9), e em algumas regiões do Brasil já estão adaptados às áreas peridomiciliares devido à destruição do habitat silvestre natural causada pelo homem (11).

1.3 Epidemiologia

A leishmaniose atinge 98 países, surgindo 1,3 milhões de novos casos anualmente, sendo 300.000 da forma visceral da doença, onde 90% ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão (**Figura 2**); e 1 milhão de casos da forma cutânea, ocorrendo principalmente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, República Árabe da Síria e Tunísia (**Figura 3**), ou mucocutânea em que Brasil, Peru, Arábia Saudita, República Árabe da Síria e Tunísia, são os países com maior prevalência (1). No mundo, 350 milhões de pessoas vivem em risco de infecção e de contrair a doença (2,6).

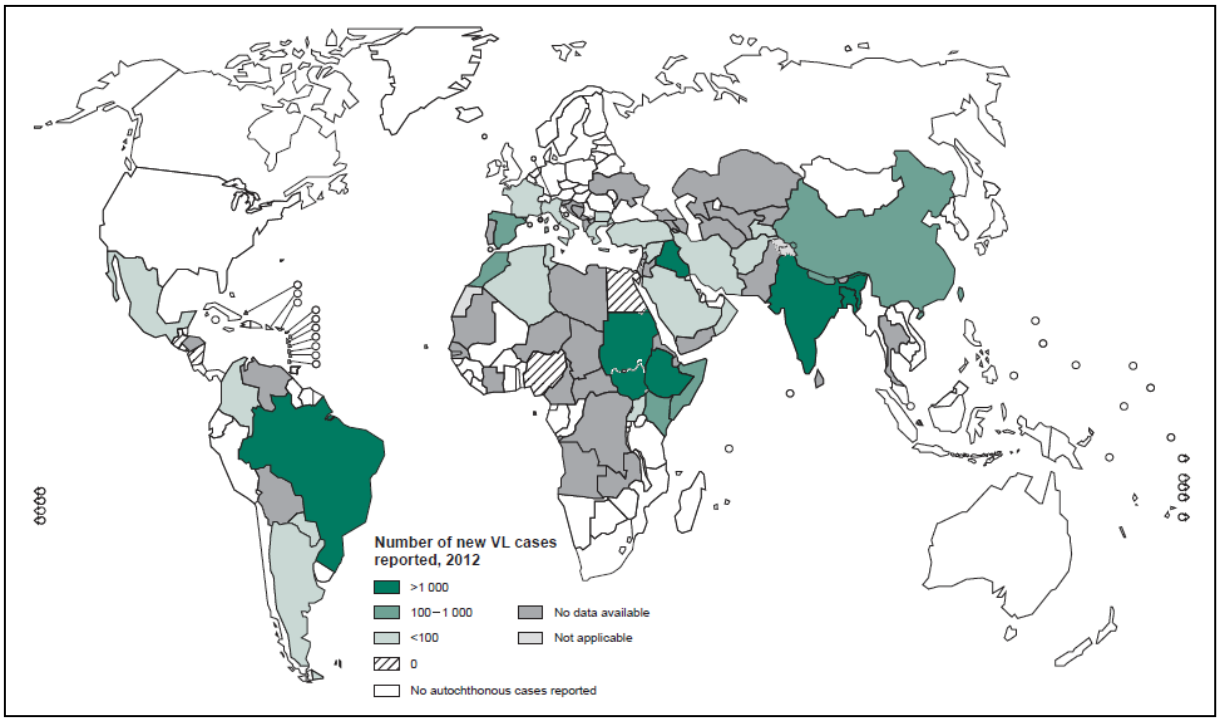


Figura 2 - **Mapa da distribuição da leishmaniose visceral, 2012.** Mapa adaptado da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015) (1).

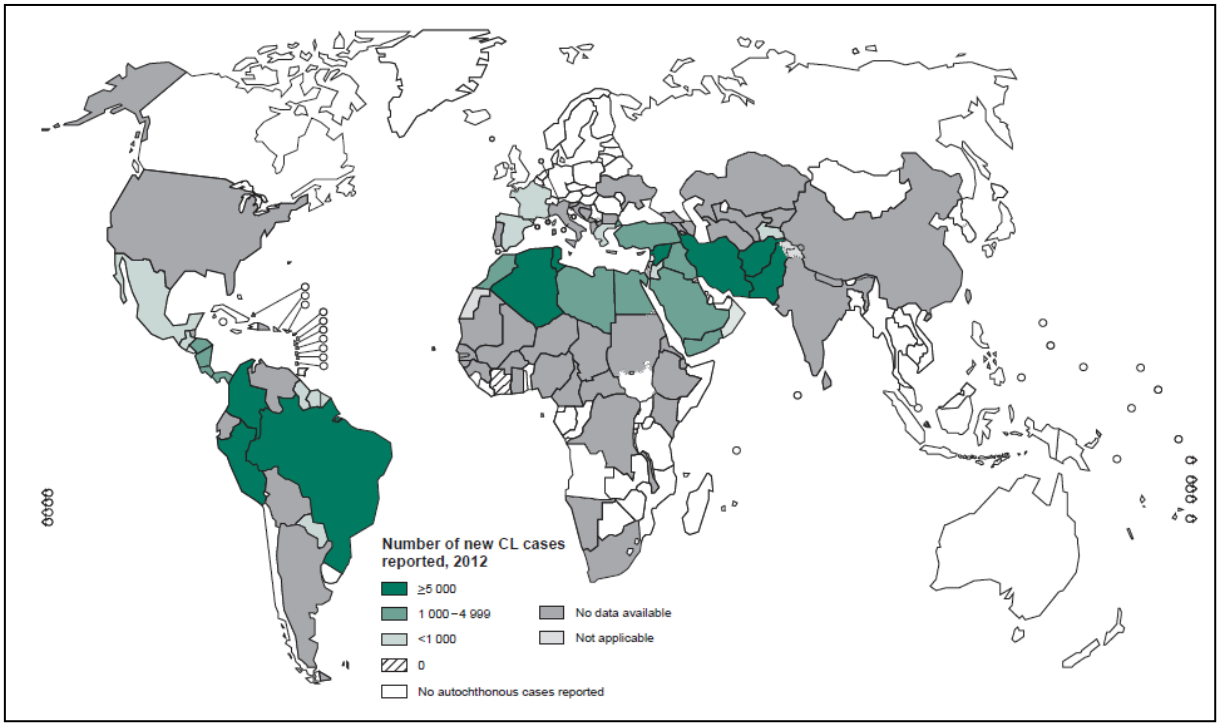


Figura 3 - **Mapa da distribuição da leishmaniose cutânea, 2012.** Mapa adaptado da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015) (1).

A leishmaniose cutânea é a forma menos severa, sendo causada principalmente pelas espécies *Leishmania (Leishmania) major* e *L. (L.) tropica* no Velho Mundo, e *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *Leishmania Viannia guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) braziliensis* em várias regiões da América do Sul e Central (6). No Brasil, as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais raramente a *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*, são responsáveis por causar a doença na forma tegumentar (7,12).

O desenvolvimento da leishmaniose mucocutânea ocorre em 3 a 5% dos pacientes com leishmaniose cutânea localizada, sendo os principais fatores de risco: a falta de tratamento ou tratamento inadequado e aquisição de alguma imunodeficiência (13). No Novo Mundo, a *L. (V.) braziliensis* é a principal espécie envolvida nesta complicação da doença, porém a *L. (V.) panamensis, L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* também podem estar envolvidas (5).

A leishmaniose visceral, a forma mais grave da doença, é responsável por 20.000 a 50.000 mortes anualmente (1), sendo causada pela espécie *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* no Velho Mundo e, no Novo Mundo, a *L. (L.) infantum* é também a espécie causadora, porém conhecida como *L. (L.) infantum chagasi* (6,12,14).

1.4 Imunobiologia da *Leishmania*

Leishmania spp. são parasitos intracelulares obrigatórios que infectam células fagocíticas do hospedeiro vertebrado (15). Estes parasitos são dimórficos pois durante seu ciclo de vida são encontrados em duas formas: as promastigotas extracelulares, que se multiplicam e se desenvolvem no trato digestivo do inseto vetor, tendo um comprimento de 10 a 20 µm (16,17); e as amastigotas intracelulares, formas arredondadas e imóveis que possuem um tamanho de 3 a 5 µm, que residem e se multiplicam dentro de vacúolos fagolisossomais dos macrófagos do hospedeiro (9,10,18).

1.4.1 Ciclo biológico

Quando um flebotomíneo fêmea pica um hospedeiro vertebrado infectado, causa lacerações na pele que resultam em acúmulo de sangue contendo amastigotas livres e macrófagos infectados, liberados do tecido devido à lesão (19,20). Este sangue é ingerido pelo vetor iniciando o desenvolvimento do parasito no mesmo, onde devido à baixa temperatura e pH aumentado, dentro de 12 a 18 horas as amastigotas se transformam em promastigotas pró-cíclicos, que possuem um flagelo curto e capacidade replicativa (10,20). Estes parasitos começam a se diferenciar após 48 a 72 horas em promastigotas nectomonas, que escapam da matriz peritrófica (revestimento composto por quitina e proteínas secretadas pelo epitélio do intestino para envolver o sangue digerido) se alojando no intestino anterior (9,20). As promastigotas nectomonas se desenvolvem em leptomonas, parasitos mais curtos, que também podem se proliferar (9). Após esta fase, os parasitos se transformam na forma infectiva, os metacíclicos, que possuem um flagelo no mínimo duas vezes maior que o corpo celular, sendo encontrados na válvula estomodeal, mas também no esôfago, faringe e probóscide devido à sua capacidade migratória (10).

Durante o repasto sanguíneo realizado pelo inseto vetor, são liberados em torno de 1000 parasitos enriquecidos em promastigotas metacíclicos na pele do indivíduo, que rapidamente são capturados por células fagocíticas (18), principalmente os macrófagos, e abrigados em vacúolos fagolisossomais onde se diferenciam em amastigota, a forma que não possui flagelo exteriorizado (21). Esta diferenciação ocorre principalmente devido à exposição ao pH ácido do fagolisossomo, que varia entre 4,5 a 6,0, e à temperatura do hospedeiro que varia de 33 a 37 °C (22). As amastigotas se multiplicam por divisão binária podendo ser liberadas para o espaço extracelular infectando outros macrófagos, bem como outros fagócitos, como as células dendríticas, e até mesmo fagócitos não profissionais, como por exemplo os fibroblastos (18,23). No caso de infecção por *L. (L.) amazonensis*, um estudo mostrou que as amastigotas são transferidas do macrófago com sinais de apoptose para outro macrófago, não ocorrendo a liberação dos parasitos para o espaço extracelular (24). Um esquema do ciclo biológico da *Leishmania* está representado na **figura 4**.

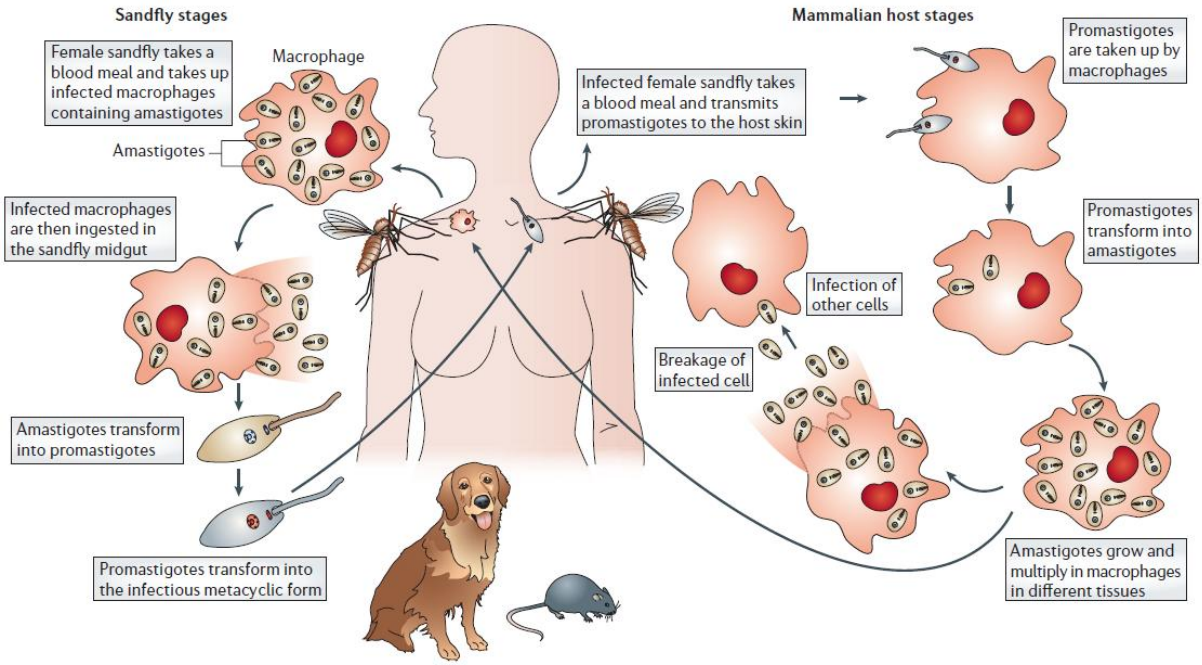


Figura 4 - **Ciclo biológico da *Leishmania*.** O estágio no flebotomíneo fêmea inicia-se com o respasto sanguíneo no hospedeiro mamífero em que macrófagos infectados com formas amastigotas do parasito são ingeridos. No intestino do inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas, que posteriormente se transformam na forma metacíclica. No momento em que estes flebotomíneos infectados realizam repasto sanguíneo, os metacíclicos são transmitidos na pele do indivíduo, infectando principalmente os macrófagos. As promastigotas se transformam em amastigotas que se multiplicam no interior dos macrófagos, e com a ruptura destas células as amastigotas podem infectar outras células. A leishmaniose pode ser antroponótica ou zoonótica a partir dos hospedeiros reservatórios como cães e roedores. Figura obtida da revisão de Lipoldová e Demant, 2006 (3).

1.4.2 Células envolvidas na resposta à infecção por Leishmania spp.

A picada do flebotomíneo gera lesão na pele e na microvasculatura, resultando em intensa resposta inflamatória local com eventual recrutamento de neutrófilos e monócitos (18). *Leishmania* spp. são capazes de infectar múltiplos tipos celulares, tanto células hematopoiéticas quanto não hematopoiéticas (21).

As primeiras células que interagem com os parasitos quando injetados na pele são as células residentes, como os macrófagos, queratinócitos, e células de Langerhans. Os queratinócitos além de fornecerem uma barreira de proteção entre o indivíduo e o ambiente, secretam moléculas que auxiliam na modulação da resposta imune, tais como interleucina (IL) -12, IL-1β, IL-4 e IL-6 (18).

As células de Langerhans são muito eficientes na captação de patógenos na pele, que em seguida se ativam, diferenciam e migram para linfonodos drenantes cutâneos (25). Estas células engolfam múltiplos parasitos logo após serem inoculados, mantendo-os em vacúolos citosólicos, auxiliando na resposta imune protetora inicial (18).

Os neutrófilos são as células responsáveis pela primeira linha de defesa contra agentes infecciosos, sendo capazes de controlar a carga parasitária e o desenvolvimento da lesão nos estágios iniciais da infecção (26). A rápida resposta dos neutrófilos ao dano local e ao agente infeccioso sugere um importante papel de célula alarmante (21). Após a infecção por *Leishmania*, o tempo de vida dos neutrófilos pode ser aumentado proporcionando um abrigo seguro, porém temporário, para os parasitos no primeiro dia de infecção, que em seguida a população dominante no infiltrado celular corresponde aos macrófagos (27).

O estabelecimento de um abrigo no interior dos macrófagos sem desencadear uma resposta antimicrobiana é um dos maiores desafios das promastigotas metacíclicas após a entrada no hospedeiro. Desta forma, os neutrófilos podem agir como “Cavalos de Tróia” ajudando a *Leishmania* a infectar macrófagos, pois ao induzir apoptose dos neutrófilos, os mesmos são fagocitados pelos macrófagos desencadeando vias que falham na ativação de uma resposta de defesa, permitindo que os parasitos se mantenham seguros no fagossomo (21).

Promastigotas e amastigotas de *L (L.) amazonensis* são capazes de induzir a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*), que são redes compostas por ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*), elastase e histonas com atividade leishmanicida (28).

Durante a leishmaniose latente é muito frequente o encontro de fibroblastos infectados com *Leishmania*, sugerindo que esta célula oferece um ambiente menos hostil para o parasito quando comparado ao macrófago, permitindo a persistência dos parasitos e proteção contra a ação de drogas leishmanicidas (29).

Os macrófagos residentes da derme são infectados rapidamente, se tornando a população infectada dominante depois de 24 horas. Na infecção com *L. (L.) major* foi verificado que muitos monócitos são recrutados para o local de infecção, se diferenciando em células dendríticas derivadas de monócitos (21), que em seguida

migram para o linfonodo drenante para ativar e induzir a diferenciação das células T $CD4^+$ (18,30).

Em resposta à infecção, as células dendríticas produzem citocinas e quimiocinas que determinam a resposta imune (25). O papel destas células não está restrito apenas ao processamento e apresentação de peptídeos dos parasitos às células T $CD4^+$, mas também na liberação de citocinas como a IL-12 e interferon (IFN) tipo 1, que induz a diferenciação das células T virgens em linfócitos T auxiliares do tipo 1 efetores (Th1, do inglês T *helper* 1) (18). No hospedeiro, a resistência ou susceptibilidade à infecção por *L. (L.) major* está relacionada à ativação da classe das células T auxiliares, em que a resposta do tipo Th1 confere resistência pela produção de IFN-γ, e a do tipo Th2 contribui para a progressão da doença com a produção de IL-4 (3).

Além das células apresentadoras de antígeno, principalmente as células dendríticas, as células exterminadoras naturais (NK, do inglês *Natural Killer cell*) também induzem a diferenciação das células T $CD4^+$, por serem fonte de IFN-γ (18,31). Por outro lado, as células mielóides infectadas, tais como os macrófagos, são resistentes à atividade citotóxica das células NK, evitando a lise celular (31).

O desenvolvimento de uma resposta multifuncional de células T é muito importante para a proteção contra infecções parasitárias, sendo capaz de eliminar células infectadas ou induzir a ativação dos fagócitos para destruir os parasitos intracelulares. Porém, a persistência do parasito prejudica a capacidade efetora das células T, resultando em perda gradativa da função, conhecida como exaustão das células T (32).

As células T $CD8^+$ mostraram ser importantes para o controle da leishmaniose visceral e nas infecções cutâneas de camundongos com baixa dose de parasitos (21). Por outro lado, a desregulação funcional das células T $CD8^+$ promove um aumento na patologia e das lesões metastáticas de camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis*, sendo causadas pela excessiva atividade citolítica dependente de perforina (33).

As células B estão envolvidas com a susceptibilidade de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major*, sendo fundamental para o desenvolvimento de uma resposta celular do tipo Th2 (34). Da mesma forma, na infecção por *L. (L.) amazonensis*, as células B e os anticorpos produzidos também aumentam a

severidade da doença, induzindo a ativação e migração das células T $CD4^+$ para o local de infecção (35).

Como citado anteriormente, o macrófago é uma célula hospedeira muito importante para o estabelecimento da infecção e persistência da *Leishmania* (17), uma vez que possui um ambiente favorável para a multiplicação do parasito intracelular. Estes parasitos podem atingir tecidos distantes via circulação sanguínea e causar danos funcionais em vários órgãos, pelo fato de os macrófagos estarem presentes em todos os tecidos do corpo (3).

1.4.3 Interação Leishmania*-célula hospedeira*

Para desencadear a fagocitose, após a infecção do hospedeiro as promastigotas se ligam aos receptores de superfície dos macrófagos, sendo o receptor 3 do complemento (CR3), o CR1, receptor de manose, receptores Fc gama (FcγR, do inglês *Fc gamma receptor*) e receptores de fibronectina, responsáveis por facilitar a internalização da *Leishmania* (36). Dependendo de quais receptores estiverem envolvidos na interação com o parasito, o rumo da infecção pode ser diferente (17).

O sistema complemento possui um importante papel na resposta imune inata pelo fato de estar presente nos fluidos teciduais e no sangue, o que facilita o encontro imediato do parasito logo após sua infecção. As principais moléculas da superfície da *Leishmania*, glicoproteína 63 (gp63) e lipofosfoglicano (LPG), agem como aceptoras de C3 (37). Porém, a fagocitose via CR3 e CR1 inibe a inflamação e a produção de espécies reativas de oxigênio, criando condições favoráveis para o parasito. Por outro lado, em conjunto com receptores de fibronectina as condições inflamatórias podem resultar na eliminação do parasito. Já a sinalização via receptores de manose aumenta a eficiência das enzimas hidrolíticas no fagolisossomo, enquanto a via FcγR melhora a ativação de NADPH oxidase (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) nos fagossomos recém-formados (17).

Após o processo de fagocitose, os parasitos ficam localizados em compartimentos chamados fagossomos, organelas imaturas que não possuem capacidade de degradar os patógenos, que com a maturação, a função microbicida

é adquirida. Devido à elevada temperatura e pH diminuído que a *Leishmania* encontra no interior da célula hospedeira, é desencadeado a diferenciação em amastigotas que expressam fatores de virulência fundamentais para a sobrevivência nos fagolisossomos (38).

As amastigotas utilizam diferentes estratégias para infectar os macrófagos. As de *L. (L.) major*, por exemplo, foram encontradas cobertas com imunoglobulina G subclasse 1 (IgG1) após serem isoladas das patas de camundongo BALB/c, indicando que a entrada dos parasitos ocorreu via FcγR (36).

Para o estabelecimento da infecção no interior dos macrófagos e multiplicação do parasito é necessária a obtenção de nutrientes que pode ser adquirida pela fusão do vacúolo parasitóforo com endossomos e vesículas do retículo endoplasmático (17).

1.4.4 Mecanismos de evasão e resistência à resposta imune

As promastigotas metacíclicas são mais resistentes à lise pelo complemento por possuirem uma modificação no LPG que bloqueia a ligação do complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês *membrane attack complex*). A gp63 atua como protease e por estar presente em grande quantidade na forma metacíclica, ela acelera a conversão de C3b para a forma inativa (C3bi), dificultando a formação do MAC (37).

A *Leishmania*, assim como outros patógenos intracelulares, possui mecanismos que evitam sua degradação no ambiente hostil do vacúolo parasitóforo (38). O parasito tem a capacidade de clivar componentes envolvidos na fusão de membranas, inibindo a apresentação de antígeno, sendo a gp63 a molécula responsável por este evento que ocorre apenas no estágio inicial da infecção (39). A fusão do fagossomo com organelas ricas em hidrolases é inibida pelas promastigotas, sendo este mecanismo dependente do LPG que impede a formação ou rompe os microdomínios lipídicos na membrana do fagossomo. Entretanto, proteínas de membrana associadas ao lisossomo (LAMP-1, do inglês *Lysosomal-associated membrane protein 1*) são recrutadas ao vacúolo parasitóforo, porém, numa cinética atrasada (17).

Muitas espécies de *Leishmania* são capazes de induzir a produção e secreção do fator de transformação do crescimento beta (TGF-β, do inglês *transforming growth factor*-β) pelos macrófagos, que conduz à regulação da inflamação favorecendo a susceptibilidade (18).

Para evitar o reconhecimento, amastigotas de *L. (L.) amazonensis* se aproveitam do momento em que a célula hospedeira entra em apoptose para infectar macrófagos vizinhos, já que estes fagocitam as células no estado de apoptose, evitando assim, a exposição dos parasitos ao sistema de reconhecimento extracelular (24).

Como outra estratégia para sobreviver no ambiente inóspito do vacúolo parasitóforo dos macrófagos, as amastigotas de *L. (L.) amazonensis* são capazes de induzir a expressão da glicoproteína CD200 no macrófago infectado. Este mecanismo permite o bloqueio da ativação do macrófago, resultando na diminuição da ação microbicida e aumento da sobrevivência e virulência (40). Ainda não foi investigado se a indução de CD200 por *Leishmania* acontece em outros fagócitos envolvidos na patogenia da infecção.

As leishmânias do complexo Mexicana, que inclui a *L. (L.) amazonensis*, são capazes de induzir a formação de grandes vacúolos parasitóforos devido à fusão dos fagossomos com lisossomos e outras estruturas vesiculares, o que resulta na diluição das moléculas microbicidas favorecendo sua proteção (21,41,42). Em contrapartida, *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* são encontradas em vacúolos pequenos e individuais que possuem baixa capacidade de se fusionar com outros compartimentos (43,44).

Um estudo realizado por Wilson e colaboradores (45) mostrou que mutações no gene regulador do tráfego lisossomal (*LYST*, do inglês *lysosomal trafficking regulator*) causam expansão dos vacúolos parasitóforos melhorando a multiplicação da *L. (L.) amazonensis in vitro*. Também foi demonstrado que a grande expressão de *LYST*, em células infectadas e complementadas com o gene funcional, gerou vacúolos pequenos que não foram capazes de sustentar a multiplicação dos parasitos.

Como mostrado anteriormente, *Leishmania* spp. são capazes de sobreviver muito bem no interior de fagócitos, e pelo fato da *L. (L.) amazonensis* induzir a formação de grandes vacúolos é pensado se outras células poderiam participar no favorecimento deste abrigo para o parasito. Em relação a isso, um estudo

demonstrou que células B-1 infectadas com a bactéria *Coxiella burnetii* formam vacúolos maiores do que os macrófagos infectados, e que a carga bacteriana também se encontrava maior (46). Assim, a célula B-1 pode ter um papel na manutenção da doença por favorecer a sobrevivência do parasito.

1.5 A célula B-1

As células B-1 fazem parte de um subtipo de célula B que difere das células B convencionais por suas características fenotípicas, de desenvolvimento e localização anatômica (47).

A primeira evidência da existência destas células apareceu durante a examinação de tecidos linfóides por imunofluorescência, onde foram encontradas células positivas para Ly-1 (CD5) nos centros germinativos e folículos primários de linfonodos e baço de camundongos. Pelo fato dos linfócitos B estarem concentrados nestas áreas, surgiu a ideia de que eles poderiam expressar CD5, uma das principais moléculas de superfície dos linfócitos T (48).

Em seguida, a expressão de CD5 foi observada em linfomas de células B de camundongos e em pacientes com leucemia linfocítica crônica de células B (49). Por citometria, foi confirmado a presença de IgM e CD5 em células esplênicas murinas (50), evidenciando a presença deste marcador em células normais também. Portando, esta população ficou definida como “subpopulação B Ly-1”, pois além de possuirem marcadores clássicos de célula B (IgM e IgD), expressavam CD5, o que as diferenciavam das células B convencionais (51).

Além das diferenças físicas, as células B Ly-1 possuem diferenças funcionais quando comparadas às clássicas células B, principalmente pelo fato de produzirem espontaneamente grandes quantidades de anticorpos IgM polirreativos (52). Em comparação com as células B clássicas, as células B Ly-1 expressam mais IgM e menos IgD, sendo encontradas principalmente nas cavidades peritoneal e pleural, com baixa frequência no baço, e raramente presentes nos linfonodos e medula óssea. Os progenitores das células B convencionais e células B Ly-1 também são diferentes. As células da medula óssua adulta são capazes de reconstituir a população de células B clássicas, mas não a de células B Ly-1; o fígado, baço e medula óssea de camundongo jovem conseguem reconstituir ambas populações, e a cavidade peritoneal de camundongos adultos reconstituem apenas as células B

Ly-1 (53). Porém, com a depleção das células B Ly-1 por irradiação ou tratamento químico, foi visto que a medula óssea destes animais adultos possui precursores que induzem a reintrodução de novas células B Ly-1 à periferia (54).

A partir de 1991, as células B Ly-1 passaram a ser chamadas de células B-1, sendo divididas em duas populações: as células B-1a, que expressam CD5, e células B-1b, que não expressam. As células B convencionais, foram denominadas células B-2 (55) por se desenvolverem mais tarde na ontogenia do que as células B-1 (56,57). Um grupo de células presentes na cavidade peritoneal apresentando os mesmos marcadores das células B-1a, exceto a molécula CD11b, foi denominado de células B-1c (58). Em contrapartida, um estudo mostrou que as células B-1 $CD11b^{-}$ (B-1c) não devem ser consideradas um novo subtipo, e sim, células que estão em um estágio de diferenciação (59).

Abaixo, na **tabela 1**, estão listados os principais marcadores de superfície encontrados nas células B-1a, B-1b e B-2.

Tabela 1 – Principais marcadores de superfície das células B-1a, B-1b e B-2.

Tipo celular	Marcadores de superfície
B-1a	IgM^{hi}, IgD^{low}, $CD5^{+}$, $CD11b^{+/-}$, $CD19^{+}$, $CD23^{-}$, $CD45^{low}$
B-1b	IgM^{hi}, IgD^{low}, $CD5^{-}$, $CD11b^{+/-}$, $CD19^{+}$, $CD23^{-}$, $CD45^{low}$
B-2	IgM^{low}, IgD^{hi}, $CD5^{-}$, $CD11b^{-}$, $CD19^{+}$, $CD23^{+}$, $CD45^{hi}$

Fonte: Kantor, 1991 (56); Baumgarth, 2011 (57).

1.5.1 Funções e características das células B-1

Em camundongos, as células B-1 são encontradas predominantemente nas cavidades peritoneal e pleural onde representam de 35 a 70% da população de células B (53). Estas células são a principal fonte de IL-10, que além de agir como uma molécula imunorreguladora, acredita-se ser também um fator de crescimento autócrino que estimula a autorreplicação e melhora a viabilidade das células B-1 (60).

A principal fonte de anticorpos naturais é a célula B-1. Os anticorpos IgM naturais são produzidos principalmente pelas células B-1a (61) sem a necessidade de exposição ao antígeno estranho, compondo desta forma um repertório de anticorpos que auxiliam na manutenção da homeostase tecidual e na proteção inicial contra patógenos invasores (47). Estes anticorpos IgM são polirreativos tanto para antígenos estranhos quanto para antígenos próprios. Já as células B convencionais produzem IgM somente após estímulo por antígeno (62).

As células B-1 também contribuem para a defesa imune da mucosa intestinal e do trato respiratório por produzirem anticorpos IgA poliespecíficos (57). Esta produção de IgA é dependente da exposição à estímulos exógenos, mas não necessita da ajuda das células T. Por outro lado, a produção de autoanticorpos pode contribuir para doenças autoimunes devido à apresentação de antígenos próprios para células T autorreativas (63).

Em humanos foram encontrados números elevados de células B-1 nos pacientes com artrite reumatóide (64). Também foi mostrado que as células B-1 migram da cavidade peritoneal para órgãos alvo como pulmão, rim e timo de camundongos que desenvolvem lúpus (65).

A identificação de células expressando características de linfócito B e de macrófago ocorreu quando células B do baço foram cultivadas com fibroblastos ou com meio condicionado de fibroblastos, induzindo a diferenciação em células B tipo macrófago. Estas células bifenotípicas expressam marcadores de célula B, CD45, IgM e IgD, e de macrófagos como o F4/80 e Mac-1 (66), sendo o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF, do inglês *macrophage colony-stimulating factor*) importante para a diferenciação destas células (67). Além disso, a expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) II, B7.2 e CD40, indicou que as células B/macrófagos são capazes de apresentar antígenos e ativar células T (66). A diferenciação destas células em fagócitos derivados de células B-1 (B-1CDPs, do inglês *B-1 cell-derived phagocytes*) é acompanhada por um aumento da expressão de F4/80 e diminuição da expressão de IgM. Porém, o gene da cadeia pesada variável, VH11 ou VH12, de imunoglobulina, continua sendo expresso pelos B-1CDPs após sua diferenciação, facilitando a distinção destas células dos macrófagos derivados de monócitos (68).

A diferenciação em cultura das células B-1 em fagócitos mostrou que estas células apresentam morfologia característica, se diferenciando em células bipolares

com alta capacidade de fagocitose via receptores Fc e de manose (69). A diferenciação em fagócito foi mostrada ocorrer *in vivo* por Popi e colaboradores (70) após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS). Estes dados sugerem que os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *toll-like receptors*) estariam participando das vias de sinalização na célula B-1, especificamente TLR4 (agonista de LPS). Um trabalho que aborda em maior detalhe a participação de TLRs na sinalização das células B-1 foi desenvolvido por Tumurkhuu e colaboradores (71). Neste estudo, vários agonistas de TLRs foram capazes de ativar células WEHI 231 (células de linhagem de linfócito B imaturo) para produzir óxido nítrico sintase induzível (iNOS, enzima essencial para a produção de óxido nítrico), sendo a sinalização via LPS a mais potente. Quando células B-1, derivadas do peritônio de camundongos BALB/c (principalmente a população B-1a), foram testadas unicamente com o agonista LPS, o efeito obtido foi semelhante quando comparado às células da linhagem WEHI 231 (71). Isto indica que a ativação de TLR4 (que pode ser via dependente do adaptador MyD88 ou independente quando utiliza a molécula adaptadora TRIF) é uma das vias importantes para a indução de iNOS (72,73). O papel dos adaptadores de TLRs em B-1CDPs na infecção por *Leishmania* ainda não foi estudado.

Além da capacidade de proliferação e diferenciação em um fagócito, foi mostrado que as células B-1 são capazes de migrar da cavidade peritoneal para um local inflamatório não específico (69). A migração das células B-1 da cavidade peritoneal está relacionada aos sinais diretamente fornecidos pelos TLRs que induz a diminuição da expressão de integrinas e CD9, que em resposta à quimiocinas as células B-1 se deslocam do compartimento (74).

1.5.2 Envolvimento das células B-1 em infecções por diferentes patógenos

Em infecções com o vírus influenza, anticorpos IgM produzidos pelas células B-1 participam na defesa inicial, enquanto os produzidos pelas células B-2, estimulados pelo vírus, fornecem uma proteção adicional que em conjunto com os anticorpos IgM naturais induzem uma resposta eficiente dos anticorpos IgG contra o vírus (75).

Na infecção por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, as células B-1 apresentaram capacidade fagocítica ativa eliminando os patógenos dentro do

fagolisossomo. Além disso, neste estudo também foi mostrado que as células B-1 apresentam antígenos às células T (76).

As células B-1 demonstraram ter um importante papel na proteção durante a infecção por *Toxoplasma gondii*. Neste trabalho, células B-1 previamente expostas ao *T. gondii* foram purificadas e transferidas para camundongos deficientes de células B infectados com o parasito, o que conferiu resistência (77). Em relação ao *Plasmodium chabaudi chabaudi*, as células B-1 também contribuem para a proteção e sobrevivência dos camundongos com malária (78).

Camundongos BALB/c com imunodeficiência ligada ao cromossomo X (XID), que resulta na falta de células B e células B-1, infectados com *Schistosoma mansoni* exibem maior grau de mortalidade quando comparados aos camundongos BALB/c, indicando que a presença das células B-1 auxilia no controle da infecção (79). Da mesma maneira, a resistência à infecção por *Brugia malayi* e *Brugia pahangi* (parasitos nematóides que causam filariose) é dada pelas células B-1 que exercem um importante papel podendo estar relacionado ao direcionamento para uma resposta Th2, essencial para a defesa do hospedeiro contra este tipo de parasitismo. Portanto, a produção de anticorpos pelas células B-1 parece ser fundamental para a resistência contra este patógeno (80).

Um estudo de Popi e colaboradores (46) mostrou que os B-1CDPs são mais permissivos à infecção por *Coxiella burnetti* quando comparados aos macrófagos, sugerindo que a IL-10 secretada está envolvida na susceptibilidade à infecção pelo fato dos B-1CDPs de camundongos deficientes para IL-10 serem capazes de controlar a infecção. As células B-1 também demonstraram facilitar a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* além de prejudicar a fagocitose dos fungos pelos macrófagos *in vitro,* principalmente devido à sua produção de IL-10 (81).

Minoprio e colaboradores (82) mostraram que camundongos BALB/XID são resistentes à infecção por *Trypanosoma cruzi*, tendo o IFN-γ um papel central no controle da parasitemia e, consequentemente, o desenvolvimento da doença.

1.5.3 Célula B-1 e Leishmania

Hoerauf e colaboradores (83) demonstraram que camundongos BALB/XID são resistentes à infecção por *L. (L.) major* e que esta resistência é conferida pelo desenvolvimento de células Th1 juntamente com a grande produção de IFN-γ, sendo

que a presença das células B-1 pode contribuir para a indução da resposta Th2, devido à grande produção de IL-10. Por outro lado, Babai e colaboradores (84) sugerem que as células B-1 não contribuem para a susceptibilidade do camundongo BALB/c à infecção por *L. (L.) major*, pois ao infectar camundongos irradiados, depletados de células B-1, o desenvolvimento da doença foi similar ou até mesmo mais severo quando comparado aos controles.

Arcanjo e colaboradores (85), em seus experimentos *in vitro*, demonstraram que os fagócitos derivados de células B-1 são mais susceptíveis à infecção por *L. (L.) major* do que os macrófagos peritoneais. Também mostrou a importância da IL-10 na infecção ao utilizar B-1CDPs de camundongos deficientes para esta citocina, que mostraram ser mais capazes em controlar a infecção. Estes dados são similares aos obtidos por Popi e colaboradores (46) em seus experimentos nos quais utilizou a bactéria *Coxiella burnetii.*

Um trabalho recente de Gonzaga e colaboradores (86) obteve como resultados que as células B-1 são importantes para a susceptibilidade à infecção por *L. (L.) chagasi*. Ao utilizar camundongos BALB/XID viram que estes eram mais resistentes do que o grupo controle, e que ao transferir células B-1 ao camundongo deficiente a susceptibilidade foi recuperada. Além disso, os níveis de IL-10 no soro dos camundongos BALB/XID infectados se encontraram baixos comparados ao controle.

O papel das células B-1 durante infecções por patógenos, sejam protozoários, bactérias, fungos e até mesmo helmintos, ainda parece ser controvérsio pelo fato destas células apresentarem diferentes funções em cada tipo de infecção. Em relação aos parasitos do gênero *Leishmania*, também é necessário mais estudos para desvendar seu verdadeiro papel.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi investigar as características biológicas da interação das células B-1 com formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

2.2 Objetivos específicos

1- Comparar a capacidade fagocítica das células B-1 e macrófagos infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis in vitro.*

2- Avaliar a multiplicação intracelular da *L. (L.) amazonensis* em células B-1 e macrófagos.

3- Determinar as diferenças e/ou semelhanças na formação do vacúolo parasitóforo em células B-1 e macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*.

4- Comparar a resposta imune das células B-1 e macrófagos infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis.*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de *Leishmania*

Culturas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram mantidas como promastigotas a 25 ^{o}C em 5 mL de meio Grace (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Gibco – *Life Technologies*), em garrafas de cultura de 25 cm^2. Repiques semanais foram feitos para a manutenção das culturas, adicionando aproximadamente 500.000 parasitos em 5 mL do meio citado acima, respeitando o número de no máximo oito passagens para o seu uso. A curva de crescimento foi realizada a partir da contagem dos parasitos em câmara de Neubauer durante todos os sete dias.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 8 a 12 semanas de idade. Para alguns experimentos, camundongos C57BL/6 deficientes para a proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e para a proteína adaptadora que contém o domínio TIR indutor de interferon (TRIF), e a linhagem BALB/c, foram utilizados. Os animais foram mantidos sem restrição hídrica ou dietética, em ciclos de claro/escuro sob temperatura de 22 a 25 °C, no Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia.

3.3 Cultivo de células L929 e obtenção do sobrenadante

A linhagem de fibroblastos L929, originados de camundongo, são células secretoras de M-CSF, fator importante para a diferenciação dos macrófagos derivados de medula óssea e de células B-1 em B-1CDP. As células L929 são mantidas criopreservadas em nosso laboratório, e para a obtenção do sobrenadante da cultura contendo o fator estimulador, estas células foram descongeladas em 10 mL de RPMI mais 10% de SFB (R10) e centrifugadas a 524 x g por 10 minutos a 4 °C. As células foram ressuspendidas em 15 mL de meio R10 e cultivadas em garrafa de 75 cm^2, a 37 °C com 5% de CO_2, por 7 dias ou até atingir confluência máxima. Após este período, a cultura foi lavada duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) e 3 mL de tripsina 0,05% foi adicionado, deixando agir por 5 minutos a 37 °C para

desaderir as células. A reação foi bloqueada adicionando 7 mL de meio R10, e a suspensão celular foi dividida em 20 garrafas de cultura de 175 cm^2 contendo 40 mL de meio R10 em cada uma. As culturas foram mantidas a 37 °C com 5% de CO_2 por 14 dias. Após este período, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 524 x g por 10 minutos, filtrado em filtro de 0,2 µm, aliquotado e conservado a -20 °C até o momento do uso.

3.4 Obtenção de macrófagos peritoneais e células B-1

Para os experimentos realizados com macrófagos peritoneais (PMO), camundongos foram sacrificados em câmara de CO_2, e as células da cavidade peritoneal foram obtidas por lavagens, utilizando pipeta Pasteur, com 10 mL (quantidade por camundongo) de meio RPMI-1640 (criado pelo Roswell Park Memorial Institute) suplementado com HEPES (1 M), bicarbonato de sódio (0,4 g/L), piruvato de sódio (100 mM), penicilina/estreptomicina (1%), com pH 7,2. As células peritoneais foram centrifugadas por 10 minutos à uma força centrífuga relativa (RCF, do inglês *relative centrifugal force*) de 754 x g, sendo posteriormente ressuspendidas em meio RPMI. A contagem dos macrófagos (células maiores) foi realizada, e a suspensão celular foi incubada por 1 hora em placa de 24 poços, com lamínula de vidro, à temperatura de 37 °C em estufa com 5% de CO_2.

Após incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com meio RPMI, e meio R10 fresco foi adicionado, incubando a cultura por mais 5 dias sem troca do meio. Após este intervalo de tempo duas populações celulares foram obtidas: células aderidas na lamínula, constituídas por macrófagos, e células presentes no sobrenadante da cultura, sendo as células B-1 o principal tipo celular presente nesta população.

Para os experimentos em que os macrófagos peritoneais não foram utilizados, após o lavado peritoneal com meio RPMI, a suspensão celular foi colocada diretamente em garrafas de cultura cujo tamanho foi escolhido de acordo com o número de animais utilizados (garrafa de 25 cm^2 para 1 camundongo, de 75 cm^2 para 3 camundongos e de 175 cm^2 para 5 camundongos). As garrafas foram colocadas diretamente nas estufas, em posição horizontal, a 37 °C por 40 minutos a 1 hora, e após este tempo o sobrenadante foi descartado e meio R10 foi adicionado

mantendo a cultura por mais 5 dias em incubação. Um esquema resumindo a obtenção das células B-1 e PMO se encontra na **figura 5**.

Para a diferenciação em fagócitos derivados de células B-1 (B-1CDP), este sobrenadante de 5º dia foi recuperado seguido por lavagens com meio RPMI e centrifugado a 931 x g. As células foram contadas e incubadas com meio R10 mais 50% de sobrenadante de cultura de células da linhagem L929 a 37 °C com 5% de CO_2, por no mínimo 24 horas para a diferenciação. Placas de 24 poços com lamínula de vidro foram utilizadas para ensaios de imunofluorescência e as placas de 6 poços para a obtenção de ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*). A estimativa de B-1CDPs aderidos foi realizada a partir da contagem do número de células presentes no sobrenadante, de todos os poços ou de no mínimo 3, após 24 horas de incubação. Com base na média obtida das células contadas de cada poço, este valor foi descontado do número de células plaqueadas inicialmente para a diferenciação em B-1CDPs. Desta forma se teve segurança do número de parasitos que deveria ser utilizado para os ensaios de infecção.

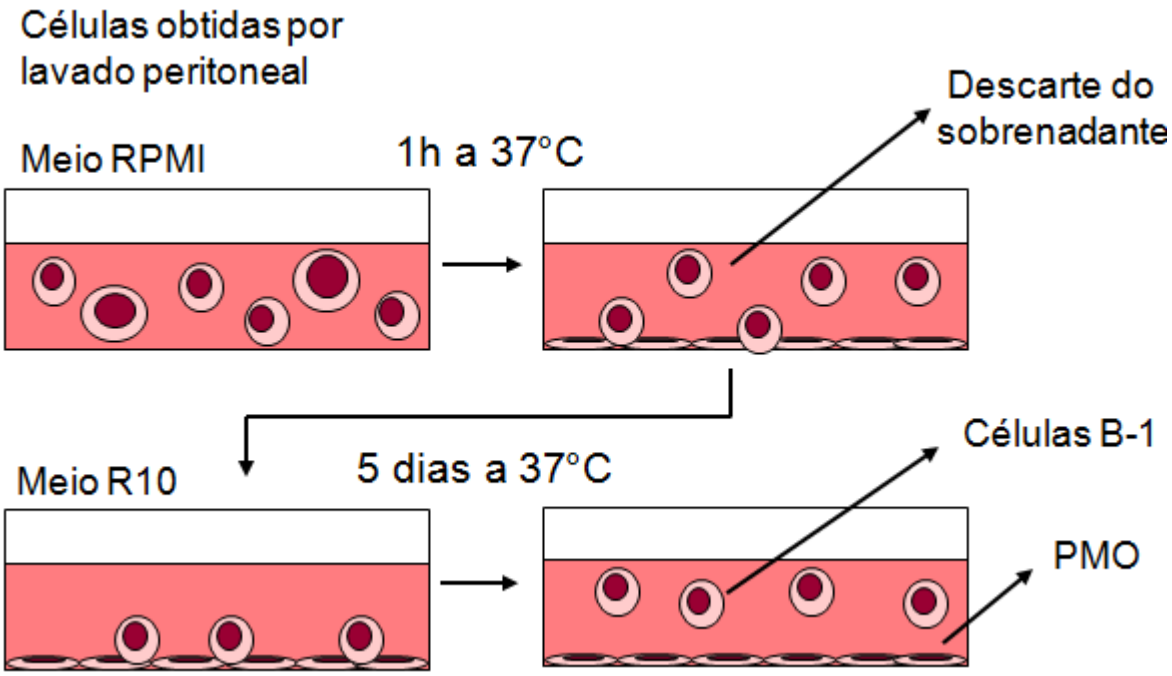


Figura 5 - **Obtenção e cultivo de células B-1 e PMO.** Após a realização do lavado peritoneal com meio RPMI, os macrófagos (células maiores) foram contados e a população celular total foi incubada por 1 hora a 37 °C. O sobrenadante contendo células não aderentes foi descartado após este tempo, e meio R10 foi adicionado nas células aderentes, incubando a cultura por mais 5 dias sem troca de meio. No 5º dia de cultura as células B-1 que se encontravam no

sobrenadante foram recultivadas para a obtenção de B-1CDPs, e meio foi adicionado aos PMOs para serem mantidos até o dia da infecção.

3.5 Análise do sobrenadante de 5º dia por citometria de fluxo

Para verificar a concentração de células B-1 recuperadas do sobrenadante de 5º dia do lavado peritoneal, diferentes marcadores moleculares foram utilizados para analisar esta população celular por citometria de fluxo. Após a obtenção das células do sobrenadante, elas foram centrifugadas a 754 x g por 5 minutos a 4 °C e ressuspendidas em tampão MACS [albumina sérica bovina (BSA) 0,5%, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 2 mM, em PBS] para lavagem. A suspensão celular foi centrifugada novamente repetindo essa etapa de lavagem para a retirada total do meio de cultura. As células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD16/CD32 (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos), na proporção 1:100 diluído em tampão MACS, por 15 minutos em gelo para bloquear os receptores Fc. Após este tempo, as células foram centrifugadas e lavadas uma vez com tampão MACS. Todo o sobrenadante foi retirado e as células ressuspendidas em tampão MACS foram dividas em microtubos para a triplicata técnica, contendo todas as marcações, e para os controles utilizando a técnica Fluorescence Minus One (FMO) em que cada microtubo recebe todos os anticorpos exceto um. Em cada análise foram utilizadas aproximadamente 6 x 10^5 células (nº de células/microtubo).

Em seguida, os anticorpos monoclonais para camundongos utilizados foram: anticorpo anti-CD19 conjugado com phycoerythrin (PE) (Caltag Medsystems, Buckingham, MK, Reino Unido), anti-F4/80 conjugado com Pacific Blue (PB) (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos) e anti-CD23 conjugado com Fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Pharmingen). Os anticorpos para CD19 e CD23 foram utilizados na proporção 1:100 e para F4/80 na proporção 1:50, diluídos em tampão MACS e incubados por 15 minutos em gelo protegidos da luz. Após uma lavagem com tampão MACS como citada anteriormente, as células foram ressuspendidas em PBS.

A análise das amostras foi realizada no citômetro com focalização acústica Attune (Applied Biosystems) com um número de 50.000 eventos adquiridos. A análise após aquisição foi realizada no programa FlowJo, versão 9.7.6. A estratégia de análise escolhida foi: primeiramente exclusão de agregados celulares (doublets),

utilizando os parâmetros de tamanho FSC-H e FSC-A, seguida pela seleção de toda a população celular a partir de seu tamanho e complexidade (FSC-A e SSC-A) excluindo os debris (**Figura 6**). Após a seleção da população total, foi verificado a porcentagem de células B-1 ($CD19^+$, $CD23^-$) e de macrófagos ($F4/80^+$, $CD19^-$) se baseando nos controles FMO para cada anticorpo.

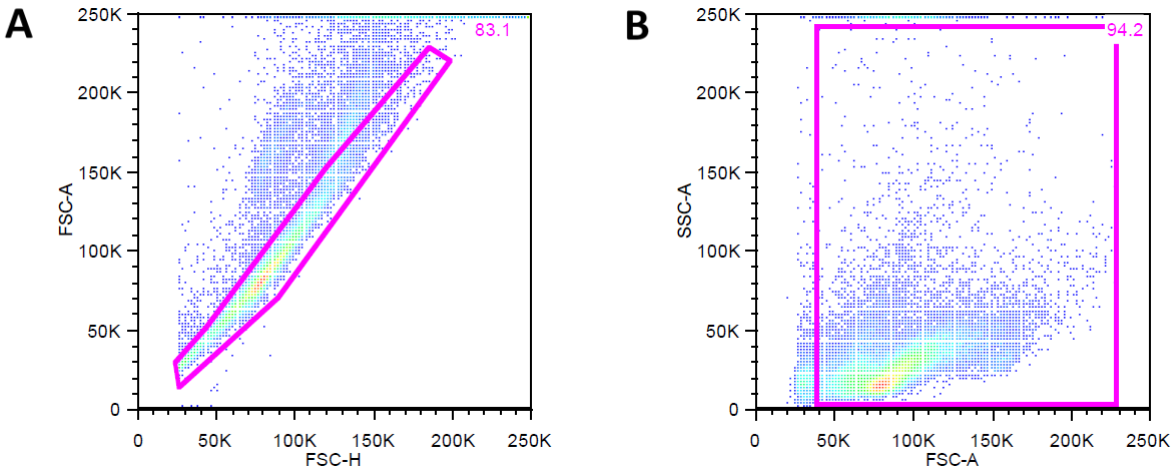


Figura 6 - Estratégia da análise utilizada para avaliar populações celulares do sobrenadante de 5º dia de cultura das células peritoneais. (**A**) Seleção de singlets por FSC-H e FSC-A. (**B**) Seleção da população total por tamanho e complexidade (FSC-A e SSC-A) com exclusão de debris.

3.6 Obtenção e cultura de macrófagos derivados de medula óssea

Macrófagos foram diferenciados a partir de células da medula óssea (MMO) de camundongos, como descrito anteriormente (40). Fêmures e tíbias de camundongos, sacrificados em câmara de CO_2, foram retirados, imergidos em álcool 70% por 2 minutos e mantidos em RPMI. As duas epífises de cada osso foram cortadas injetando pelas extremidades 5 mL de RPMI para cada osso, com auxílio de seringa e agulha 24G. O lavado foi recolhido em tubo de 50 mL contendo filtro de 70 µm, seguido por centrifugação a 524 x g por 10 minutos a 4 °C. As células foram ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 20% de SFB e 20% de sobrenadante de células L929 (meio R20), obtendo uma concentração de 4 x 10^6 células para cada 10 mL. As células foram distribuídas em placas de Petri (80 x 15

mm) contendo 10 mL cada e incubadas a 37 °C na presença de 5% CO_2 por 4 dias. No quarto dia, foi adicionado mais 10 mL de meio R20 por placa. Os macrófagos utilizados para os experimentos estavam no 7º dia de cultura. As placas foram colocadas em gelo, o sobrenadante contendo células soltas foi descartado, e 5 mL de meio RPMI foi adicionado para soltar as células aderidas utilizando raspador celular. A suspensão de células foi centrifugada a 524 x g por 10 minutos a 4 °C, e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer para posterior plaqueamento em placas de 24 poços com lamínula ou de 6 poços sem lamínula, de acordo com o número de B-1CDPs já determinado. Após o cultivo, os macrófagos foram mantidos a 37 °C por no mínimo 24 horas para posteriormente serem utilizados.

3.7 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das células murinas foi avaliada utilizando azul de tripan (0,04%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), em câmara de Neubauer, no momento da contagem das células para posterior cultivo. Células apresentando coloração azul foram consideradas inviáveis, portanto não foram contadas para não interferir no número de células aderidas após o plaqueamento.

3.8 Infecção de B-1CDP, PMO e MMO *in vitro*

Células peritoneais e de medula foram obtidas como descrito anteriormente. Para os ensaios em que macrófagos peritoneais foram utilizados, ao ser retirado o sobrenadante contendo células B-1 para posterior diferenciação, meio R10 foi adicionado logo em seguida para a manutenção da cultura destes macrófagos. Portanto, células B-1 já diferenciadas em B-1CDP, PMO e MMO também diferenciados foram utilizados nos experimentos de infecção *in vitro*.

Promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* que se encontravam no 6º ou 7º dia de cultura (**Figura 7**) foram utilizadas. A suspensão de parasitos foi centrifugada a 2095 x g por 10 minutos e lavada com PBS uma vez para a retirada total do meio de cultura. Uma alíquota dos parasitos foi fixada em paraformaldeído (PFA) 4% e contada em câmara de Neubauer. A proporção de 2:1 (parasito:célula) foi utilizada para a infecção de todos os tipos celulares. Os PMOs foram infectados baseando-se na contagem dos mesmos após o lavado peritoneal,

em que foram considerados como as células grandes presentes na suspensão, estimando que todos teriam aderido e não se soltado posteriormente como as células B-1. Já para os B-1CDPs, o valor estipulado para a infecção foi baseado no número de células aderidas estimadas como explicado anteriormente. Para os MMOs, a quantidade de parasitos utilizados foi a mesma para os B-1CDPs pelo fato de terem sido plaqueados conforme o número destes últimos.

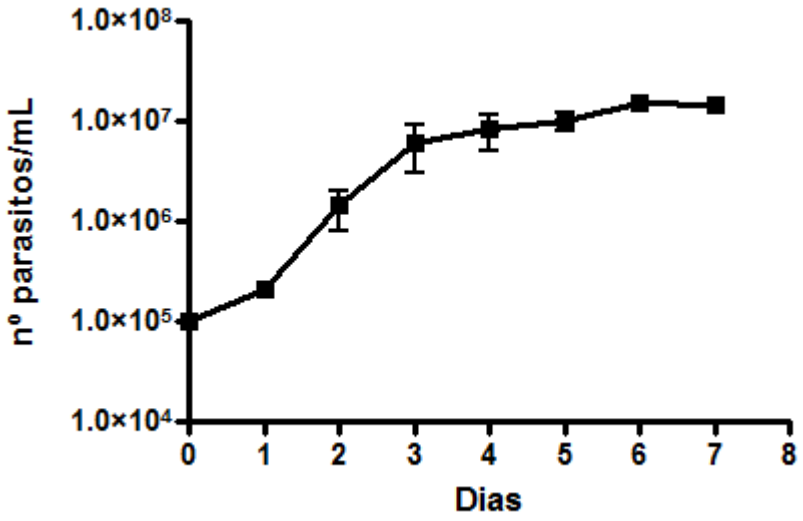


Figura 7 - **Curva de crescimento de promastigotas.** Para o início da curva de crescimento foram adicionados 1 x 10^5 parasitos em 5 mL de meio Grace suplementado com 10% de SFB. Cada ponto da curva representa o valor de parasitos/mL resultante da contagem no dia indicado. Os resultados correspondem à média e erro padrão de cinco curvas realizadas independentemente.

3.8.1 Infecção para avaliação da multiplicação intracelular

O meio em que cada tipo celular se encontrava foi descartado para ser adicionado meio R10 contendo os parasitos na quantidade adequada, mantendo a proporção de 2:1. Nas placas de 24 poços foram sempre adicionados 500 µL/poço, e nas de 6 poços, 2 mL em cada. Para os ensaios com o intuito de verificar a multiplicação dos parasitos no interior de cada tipo celular, as culturas foram incubadas a 33 °C por 2 horas. Após este tempo, as placas foram colocadas em gelo, e os poços foram lavados três vezes com PBS adicionando metanol 100% gelado por 5 minutos para a fixação das células. No caso dos tempos de 48 e 96

horas, após 2 horas de infecção os poços foram lavados com meio RPMI para retirar os parasitos não aderidos e não fagocitados, seguida da adição de meio R10 para as culturas serem incubadas novamente a 33 °C até o tempo estipulado em que também foi realizado a fixação das células como já descrito.

Em alguns experimentos vacuolina-1 foi utilizada para avaliar seu efeito no tamanho do vacúolo parasitóforo, indução da expressão de *Lyst* e na multiplicação dos parasitos no interior dos B-1CDPs e MMOs. Esta molécula é capaz de induzir a formação de grandes vacúolos a partir da fusão de endossomos e lisossomos (87). Antes da infecção com os parasitos, as células foram tratadas com vacuolina-1, na concentração de 1 µM diluída em meio R10, por 1 hora a 37 °C. Após este tempo as culturas foram lavadas com meio RPMI seguida da adição dos parasitos, mantendo a proporção de 2:1, e incubadas a 33 °C. Os tempos de infeção utilizados foram de 2 e 96 horas, realizando o procedimento de fixação das células ou extração de RNA em cada tempo.

3.8.2 Infecção para avaliação da capacidade fagocítica de B-1CDP e MMO

Para os ensaios destinados à avaliação da capacidade fagocítica as drogas latrunculina A (Sigma-Aldrich), uma toxina que inibe a polimerização dos filamentos de actina, e genisteína (Sigma-Aldrich), uma isoflavona inibidora de tirosina quinases, foram utilizadas. As células primeiramente foram incubadas com latrunculina A (5 µM) ou genisteína (250 µM) em meio R10 por 30 minutos a 37 °C. Após o tratamento, as culturas foram lavadas com meio RPMI e infectadas com os parasitos na proporção de 2:1. A placas de cultura foram mantidas em gelo durante 30 minutos, para os parasitos se depositarem no fundo dos poços, e em seguida foram incubadas por mais 30 minutos a 33 °C, tempo necessário para o processo fagocítico. Após a incubação, as culturas foram lavadas com PBS, e PFA 4% foi utilizado para a fixação das células não permitindo a permeabilização da membrana (que ocorre no uso de metanol), fator importante para a posterior discriminação dos parasitos aderidos dos internalizados.

3.9 Imunofluorescência

3.9.1 Marcação de CD19

Células obtidas do sobrenadante de 5º dia de cultura do lavado peritoneal foram submetidas ao método Cytospin para posterior marcação com anticorpo anti-CD19. Como controle, MMO foram utilizados já que não possuem esta molécula de superfície. Os dois tipos celulares foram fixados com metanol 100% gelado, lavados três vezes com PBS e tratados com solução de bloqueio, contendo 1% de BSA e 0,1% de azida de sódio em solução salina tamponada com Tris (TBS) 1X, por 30 minutos. As células foram lavadas novamente com PBS e incubadas com anticorpo primário anti-CD19 (Santa Cruz Biotech, Dalas, TX, Estados Unidos) na proporção 1:50 por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens, foi incubado anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 546 (Thermo Scientific, Grand Island, NY, Estados Unidos) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para a marcação do DNA, diluídos em solução bloqueadora na proporção 1:1000 (diluição utilizada para todos os anticorpos secundários) por 1 hora. As lâminas foram lavadas e ProLong (Thermo Scientific) foi utilizado para a adesão da lamínula e preservação da fluorescência das molélulas marcadas.

3.9.2 Quantificação de parasitos intracelulares

As lamínulas contendo células fixadas em metanol foram lavadas com PBS e tratadas com solução bloqueadora. Anticorpo primário policlonal anti-LAMP-1 produzido em rato, foi utilizado na diluição 1:50 por 2 horas, para evidenciar o vacúolo parasitóforo. Após 5 lavagens em PBS (sempre realizada entre cada incubação), as lamínulas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado com Alexa Fluor 568 (Thermo Scientific) por 1 hora. Anticorpo policlonal anti-*Leishmania* produzido em coelho foi utilizado na diluição de 1:500 por 2 horas, seguido por incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific) juntamente com DAPI por 1 hora. Para finalizar, ProLong foi utilizado aderindo as lamínulas em lâminas para microscopia.

3.9.3 Avaliação da capacidade fagocítica

Para diferenciar parasitos aderidos à membrana da célula dos internalizados, avaliando a capacidade fagocítica, foi utilizado PFA 4% para a fixação das células não permitindo a permeabilização da membrana celular. Após a fixação, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS, tratadas com cloreto de amônio (NH_4Cl) 50 mM por 15 minutos, lavadas novamente e tratadas com solução bloqueadora por 30 minutos. As lamínulas foram incubadas com anticorpo anti-*Leishmania* por 2 horas, seguida pelo seu anticorpo secundário junto com DAPI e faloidina conjugada com Texas Red-X (Thermo Scientific), diluída a 1:100 utilizada para a marcação de actina, incubados por 1 hora.

3.9.4 Análise microscópica

A análise de todas as lamínulas foi realizada em microscópio de fluorescência (Leica Microsystems, DMI6000B/AF6000) acoplado a um sistema de câmera digital (DFC 365 FX). No mínimo 300 células totais foram contadas por lamínula, entre elas foram contadas as células infectadas e parasitos totais. Além disso, para o ensaio da avaliação da capacidade fagocítica, também foram contados os parasitos aderidos. A carga parasitária foi representada pelo número de parasitos em 100 células infectadas. Para o índice de infecção, o cálculo utilizado teve como resultado o produto da porcentagem de células infectadas pela média do número de parasitos fagocitados. Imagens representativas foram adquiridas neste microscópio utilizando o programa incorporado ao sistema Leica AF6000. Para a comparação do tamanho dos vacúolos parasitóforos, foram fotografados no mínimo 50 vacúolos por lamínula no modo contraste de fase. O diâmetro maior dos vacúolos foi medido utilizando o programa ImageJ 1.49, no qual também foram editadas as imagens representativas da imunofluorescência.

3.10 Avaliação da produção de óxido nítrico

Após incubação por diferentes tempos de infecção, o sobrenadante da cultura celular foi recolhido, centrifugado a 2095 x g por 10 minutos e mantido a -80 °C até a realização da dosagem de nitrito ou citocinas. A produção de óxido nítrico (NO) foi

avaliada por meio da quantificação de nitrito pelo kit Measure-IT™ High-Sensitivity Nitrite Assay (Thermo Scientific), 50 vezes mais sensível do que o método colorimétrico utilizado com reagente de Griess. A leitura da fluorescência foi realizada no aparelho SpectraMax i3 (Molecular Devices) utilizando o programa SoftMax Pro 6.4. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram de 365 e 450 nm, respectivamente, e os resultados foram obtidos baseando-se na curva padrão.

3.11 Quantificação de citocinas

A avaliação da resposta imune gerada nos ensaios de infecção *in vitro* foi realizada a partir da quantificação de citocinas. O sobrenadante de diferentes tempos de infecção foi coletado e armazenado a -80 °C até a realização da análise. As citocinas IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN-γ, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1, do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*) e fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) foram quantificadas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA) Mouse inflammation (BD Biosciences). Os resultados foram baseados na curva padrão em que a concentração mínima utilizada foi de 20 pg/mL e a máxima de 5 ng/mL. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro FACSCantoII V87500070 (BD Biosciences) e para a análise dos dados o programa FACSDiva™ foi utilizado.

3.12 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A extração e purificação do RNA foi realizada utilizando o kit Quick-RNA™ MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, Estados Unidos). A quantificação foi feita no aparelho NanoDrop (Thermo Scientific) e a síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) seguindo o protocolo indicado pelo mesmo. Para a amplificação do cDNA, foram utilizados 3,597 ng de cDNA de cada amostra, em todos os experimentos, e 0,6 µM de cada primer (*forward* e *reverse*) (**Tabela 2**) somados ao reagente Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific). Triplicata técnica foi feita de cada amostra. A reação de qPCR foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied

Biosystems). As condições para amplificação utilizadas foram: um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos.

Os resultados da quantificação relativa, referentes à expressão gênica, foram obtidos utilizando os níveis de expressão do gene controle *Hprt1* pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak e Schmittgen (88).

Tabela 2 – Primers utilizados nos experimentos de PCR em tempo real.

Gene	Primer *Forward*	Primer *Reverse*
Cd200	5' AACCCTTGATTGTGACATGGC 3'	5' AGGATAAATGTCACAGAGCTGGG 3'
Lyst	5' AGCAGAAGGTGATAGACCAGAA 3'	5' CCCACACTTGGATCATCAATGC 3'
Hprt1	5' TCAGTCAACGGGGGACATAAA 3'	5' GGGGTCGTACTGCTTAACCAG 3'

3.13 Análise estatística

Para avaliar a significância dos resultados obtidos foi realizada análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism 6. Para três ou mais amostras o teste escolhido foi ANOVA, e Kruskal-Wallis foi utilizado para a análise dos resultados de expressão gênica. A diferença entre os grupos foram consideradas significativas para valores de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células recuperadas do sobrenadante de 5º dia de cultura do lavado peritoneal

Para confirmar que as células peritoneais presentes no sobrenadante do 5º dia de cultura eram predominantemente células B-1, foi realizada imunofenotipagem destas células utilizando anticorpos para os marcadores de superfície CD19, CD23 e F4/80. A seleção das células positivas para CD19 e negativas para CD23 foi realizada a partir dos FMOs para cada anticorpo. Assim, foi verificado que 88,6% das células totais representam as células B-1 (**Figura 8**).

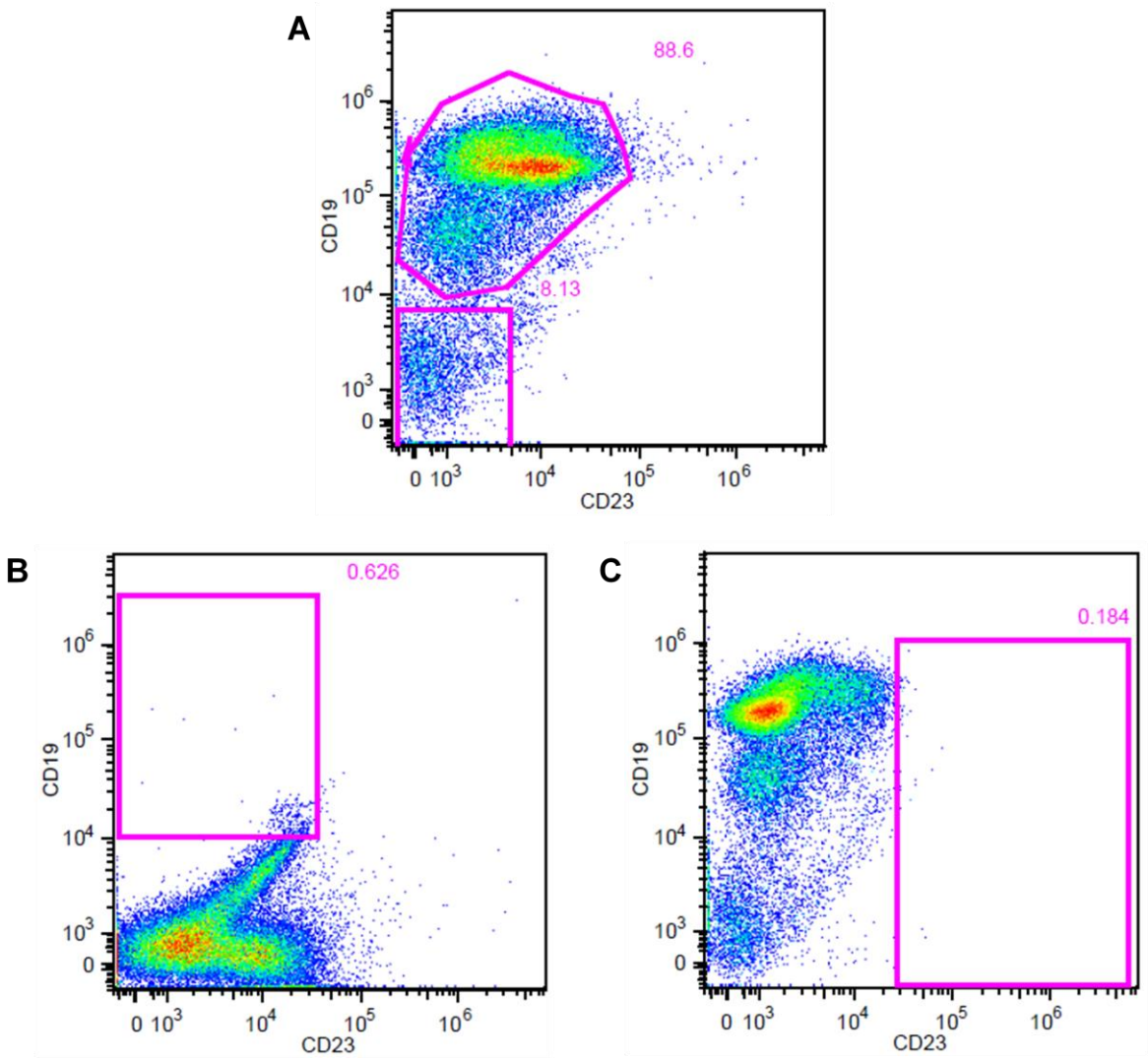


Figura 8 - Citometria do sobrenadante de 5º dia das células peritoneais de camundongos C57BL/6, marcação de CD19 e CD23. (**A**) Seleção de $CD19^{+}$ e $CD23^{-}$ indicando que 88,6% da população total representa as células B-1.

(**B**) FMO de CD19. (**C**) FMO de CD23. Os resultados correspondem à aquisição de uma amostra representativa da triplicata técnica.

Baseando-se no FMO de F4/80 foi verificado que apenas 1,23% das células totais eram positivas para F4/80 (**Figura 9**). Entretanto, a partir deste grupo de células F4/80^{+} verificou-se que quase 50% desta população possuiam marcação para CD19. Desta forma, pode-se afirmar que menos de 1% de toda a população celular representa os macrófagos. Estes resultados mostraram que as células consideradas B-1CDPs eram realmente derivadas de células B-1 e não macrófagos contaminantes.

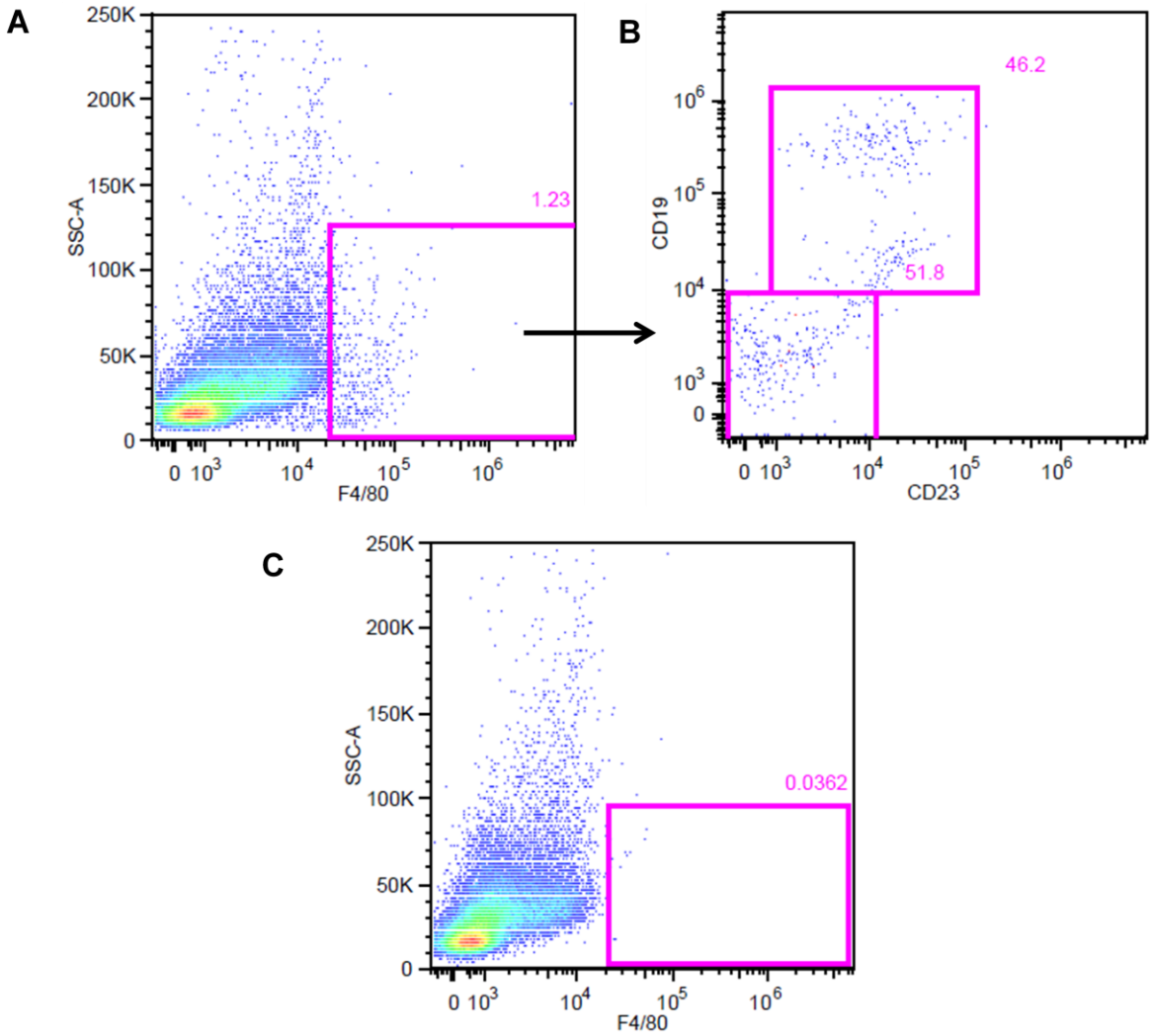


Figura 9 - Citometria do sobrenadante de 5º dia de células peritoneais de camundongos C57BL/6, marcação de F4/80. (**A**) Seleção de células F4/80^{+} representando 1,23% da população total. (**B**) Marcação de CD19 e CD23 em

células positivas para F4/80. (**C**) FMO de F4/80. Os resultados correspondem à aquisição de uma amostra representativa da triplicata técnica.

Células obtidas deste mesmo sobrenadante foram submetidas à Cytospin e incubadas com anticorpo anti-CD19. Por imunofluorescência estas células apresentaram marcação para CD19, o que não ocorreu nos macrófagos de medula utilizados como controle negativo (**Apêndice A**).

Para as células provenientes de camundongo BALB/c, as análises por citometria também foram realizadas. Os resultados mostraram que 85,9% da população total é representada pelas células B-1 e que apenas 0,37% das células é positiva para F4/80 e negativa para CD19 (**Apêndice B**), valores muito próximos aos obtidos com as células derivadas de camundongo C57BL/6.

4.2 Comparação da capacidade de infecção e de multiplicação da *Leishmania (L.) amazonensis* em B-1CDP, PMO e MMO

Infecção dos B-1CDPs, PMOs e MMOs foi realizada na proporção 2:1 utilizando os tempos de infecção de 2 e 48 horas. O número de parasitos a cada 100 células infectadas é muito semelhante nos três tipos celulares não tendo diferença significativa nos tempos de infecção de 2 e 48 horas (**Figura 10A**). A semelhança, entre os grupos celulares, da proporção do número de parasitos em relação às células infectadas, contados no primeiro tempo, indica que estas células possuem a mesma capacidade fagocítica ou de serem igualmente infectadas. Ao comparar o tempo de 2 horas de infecção com o de 48 horas pós-infecção, nota-se que o parasito conseguiu se multiplicar no interior das diferentes células, sendo este aumento significativo estatisticamente.

A porcentagem de células infectadas (**Figura 10B**) se apresentou a mesma durante os dois tempos de infecção. Quando comparado ao MMO, PMO apresentou maior porcentagem de infecção nos dois tempos, não tendo diferença significativa quando comparado ao B-1CDP.

Os resultados mostram que B-1CDP, PMO e MMO permitem a multiplicação da *Leishmania* de maneira semelhante quando comparados até o tempo de 48 horas

pós-infecção. Imagens de imunofluorescência representativas do experimento são encontradas na **figura 11.**

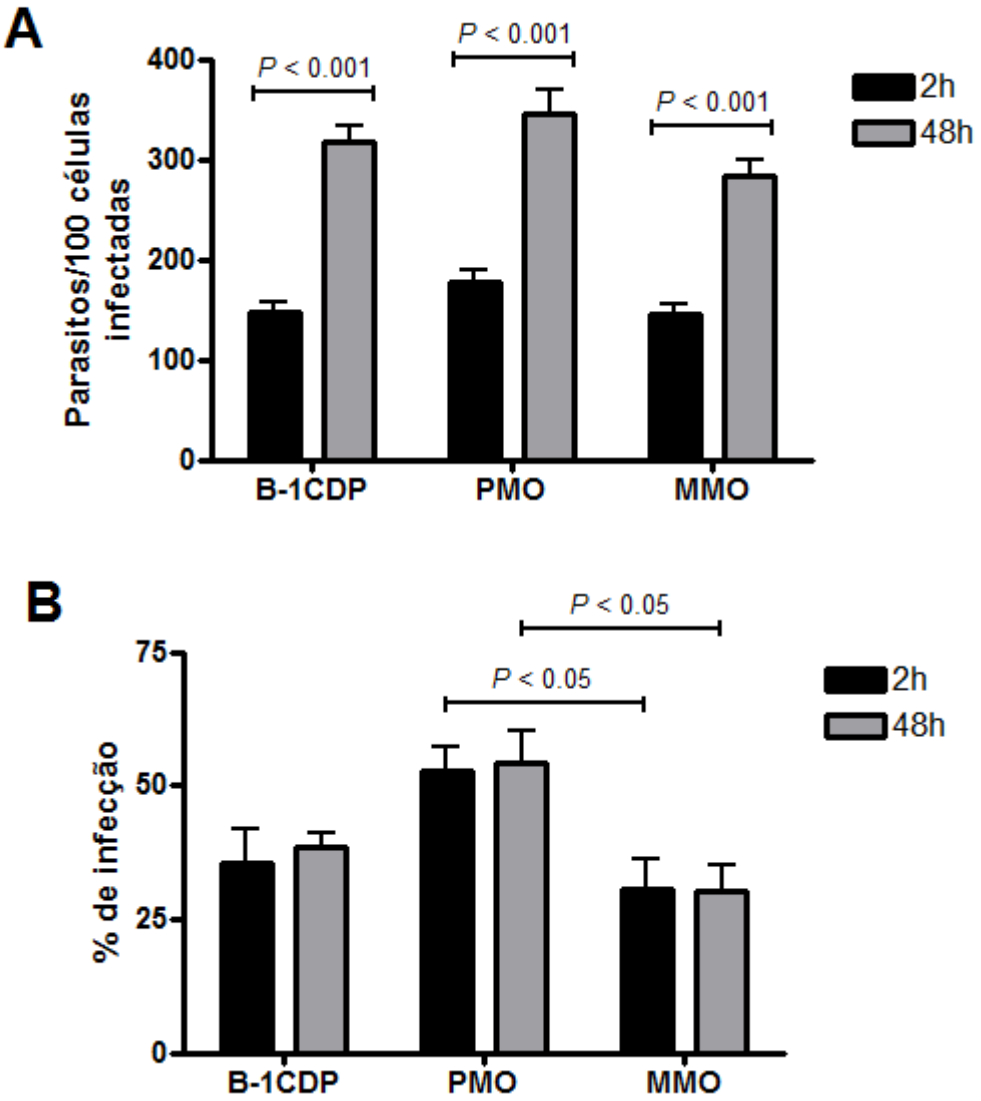


Figura 10 - **Comparação da multiplicação de *Leishmania* em B-1CDP, PMO e MMO.** B-1CDP, PMO e MMO foram infectados com promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* na proporção 2:1 (parasito:célula) por 2 e 48 horas a 33 °C. Três lamínulas de cada tipo celular infectado foram contadas (mínimo 300 células/lamínula) em microscópio de fluorescência. (**A**) Número de parasitos para cada 100 células infectadas. (**B**) Porcentagem de células infectadas. Foram realizados três experimentos independentes nas mesmas condições técnicas e os valores representam a média e erro padrão dos três ensaios. Análise estatística utilizada: ANOVA.

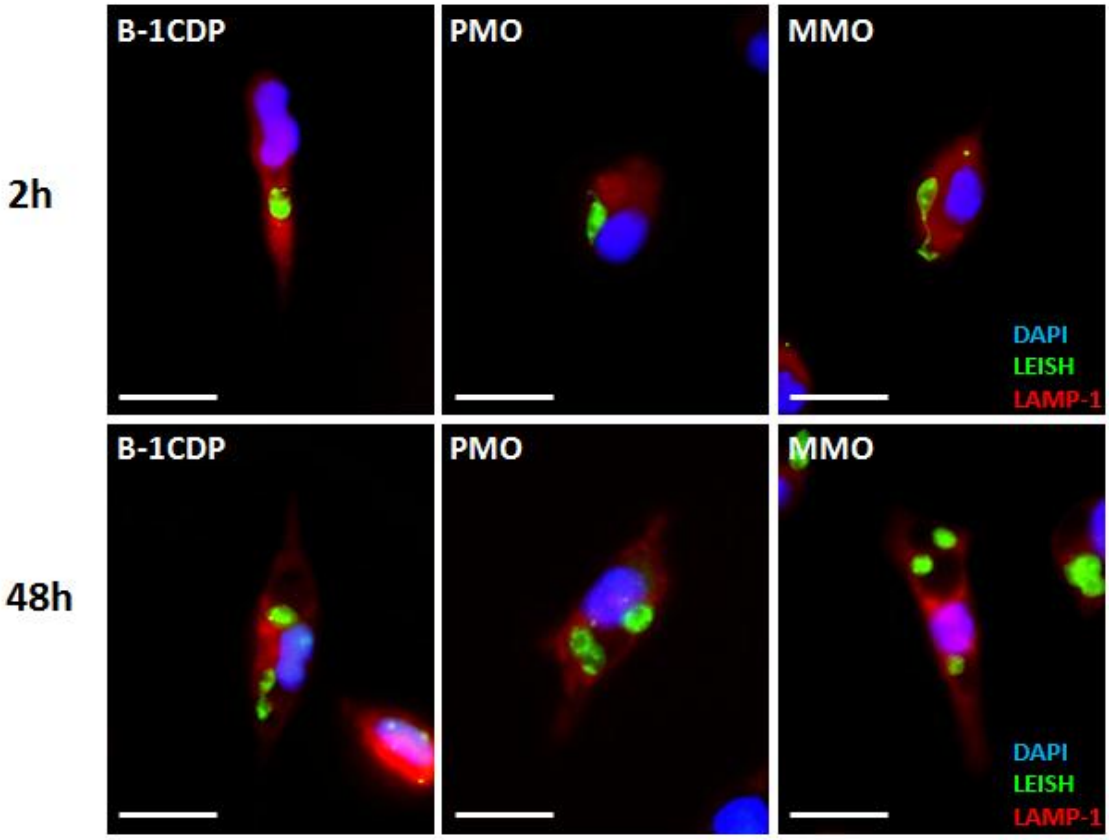


Figura 11 - **Imagens de imunofluorescência representativas do ensaio de infecção dos B-1CDPs, PMOs e MMOs com *Leishmania (L.) amazonensis*.** Os três tipos celulares foram infectados por 2 horas com promastigotas de fase estacionária. Após lavagem com PBS para retirar parasitos não aderidos, as células foram incubadas em meio fresco por mais 48 horas para observar a multiplicação do parasito e formação do vacúolo parasitóforo. (**A**) Tempo de 2 horas de infecção com promastigotas aderidas ou já fagocitadas pelas células. (**B**) Tempo de 48 horas pós-infecção contendo amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo. Núcleo foi marcado com DAPI (azul); proteína 1 de membrana associada ao lisossomo foi marcada com anticorpo anti-LAMP-1 (vermelho) e os parasitos com anticorpo anti-*Leishmania* (verde). Barra de escala corresponde a 10 µm.

4.2.1 Participação das vias dos receptores do tipo Toll na infecção dos B-1CDPs e MMOs por L. (L.) amazonensis

Dada a importância dos receptores do tipo Toll, em fagócitos profissionais, no reconhecimento de patógenos e na sinalização intracelular, um experimento preliminar foi realizado utilizando B-1CDPs e MMOs de camundongos deficientes para as moléculas adaptadoras dos TLRs, MyD88 e TRIF. Os tempos utilizados para este experimento foram de 2 e 96 horas de infecção. De acordo com os resultados,

os B-1CDPs MyD88$^{-/-}$ apresentaram maior número de parasitos por 100 células infectadas em relação ao controle (WT, *wild type*) e ao TRIF$^{-/-}$ nos dois tempos (**Figura 12A**). A porcentagem de infecção diminuiu para os B-1CDPs WT e TRIF$^{-/-}$, exceto para MyD88$^{-/-}$ que permaneceu maior comparado aos outros dois grupos (**Figura 12B**). Para os MMOs, não teve diferença entre WT, MyD88$^{-/-}$ e TRIF$^{-/-}$ tanto no número de parasitos a cada 100 células infectadas quanto na porcentagem de infecção, exceto para TRIF$^{-/-}$ que mostrou menor porcentagem de células infectadas comparado ao WT (**Figura 13A e B**).

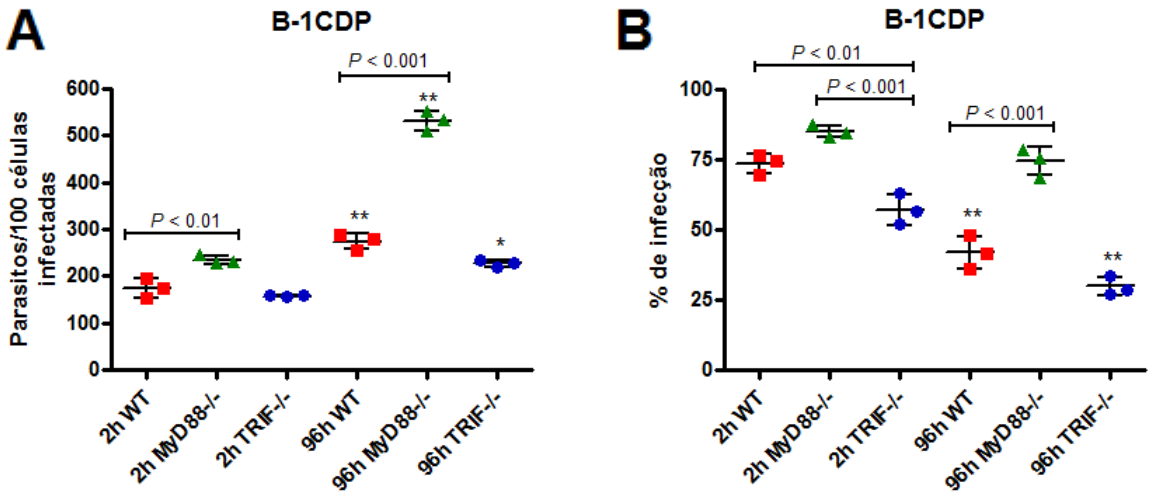


Figura 12 - **Comparação da multiplicação de *L. (L.) amazonensis* em B-1CDPs WT e deficientes de MyD88 e TRIF.** B-1CDPs foram infectados com promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* na proporção 2:1 (parasito:célula) por 2 e 96 horas a 33 °C. Três lamínulas de cada tipo celular infectado foram contadas (mínimo 300 células/lamínula) em microscópio de fluorescência. Os gráficos representam o número de parasitos para cada 100 células infectadas (**A**) e a porcentagem de B-1CDPs infectados (**B**). Estes dados foram obtidos a partir de um experimento biológico realizado em triplicata técnica. Os valores representam a média e desvio padrão da triplicata. * $P < 0,01$ e ** $P < 0,001$ comparado ao tempo de 2 horas correspondente. Análise estatística utilizada: ANOVA.

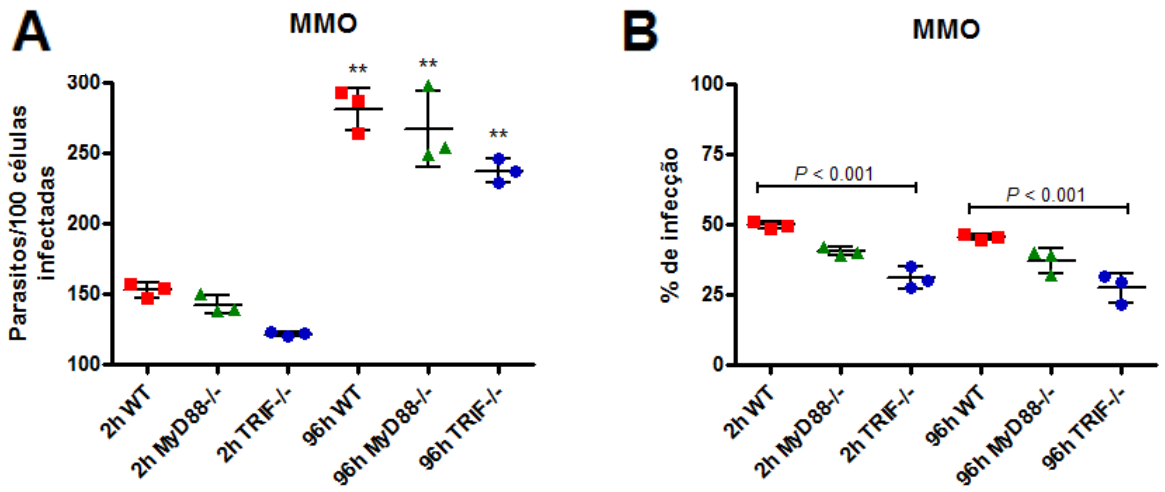


Figura 13 - Comparação da multiplicação de *L. (L.) amazonensis* em MMOs WT e deficientes de MyD88 e TRIF. MMOs foram infectados com promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* na proporção 2:1 (parasito:célula) por 2 e 96 horas a 33 °C. Três lamínulas de cada tipo celular infectado foram contadas (mínimo 300 células/lamínula) em microscópio de fluorescência. Os gráficos representam o número de parasitos para cada 100 células infectadas (**A**) e a porcentagem de MMOs infectados (**B**). Estes dados foram obtidos a partir de um experimento biológico realizado em triplicata técnica. Os valores representam a média e desvio padrão da triplicata. * $P < 0{,}01$ e ** $P < 0{,}001$ comparado ao tempo de 2 horas correspondente. Análise estatística utilizada: ANOVA.

As imagens de imunofluorescência representativas deste experimento preliminar se encontram no **Apêndice C** para os B-1CDPs e no **Apêndice D** para os MMOs.

4.3 Avaliação da infecção dos B-1CDPs e MMOs tratados com drogas inibidoras de fagocitose

De acordo com os resultados acima, os B-1CDPs mostraram que podem ser infectados por *L. (L.) amazonensis* e que o parasito consegue se multiplicar no seu interior. Desta forma, levanta-se a questão sobre de que maneira a infecção ocorre, podendo ser por processo ativo do parasito ou pelo mecanismo de fagocitose do B-1CDP. Para investigar isso, B-1CDPs e MMOs foram tratados com as drogas genisteína e latrunculina A, que são capazes de diminuir e até mesmo de inibir o processo fagocítico. Após o tratamento, as células foram infectadas e

posteriormente analisadas por imunofluorescência. Como a membrana celular não foi permeabilizada, o anticorpo anti-*Leishmania* não pôde reconhecer os parasitos internalizados. Dessa forma, todos os parasitos foram contados pela marcação do DAPI, ou seja, do núcleo, e os que apresentavam marcação verde estavam sendo reconhecidos pelos anticorpos anti-*Leishmania*, portanto foram considerados parasitos aderidos. Com estes dados foi possível obter a porcentagem dos parasitos aderidos e internalizados em relação ao total quantificado. Imagens de imunofluorescência exemplificando o modo da contagem se encontram no **Apêndice E**.

Para os macrófagos, já se sabe que o mecanismo pelo qual esta célula se infecta com *Leishmania* é via fagocitose (17,36), por esta razão foi escolhida como controle. Comparando com o grupo de células não tratadas, os B-1CDPs e MMOs que receberam o tratamento com as drogas mostraram diferença significativa na porcentagem de parasitos internalizados e aderidos (**Figura 14**). Os resultados mostram que ao prejudicar o processo de fagocitose, a porcentagem de parasitos internalizados diminui em relação ao total, indicando que a infecção dos B-1CDPs ocorre pela via fagocítica sendo semelhante aos MMOs. Além disso, o tratamento com latrunculina A diminuiu a porcentagem de células infectadas (**Figura 15**), o que também ocorreu nas células tratadas com genisteína, porém sem diferença significativa para estas últimas quando os valores foram comparados ao controle. Este resultado mostra que o fato do tratamento com latrunculina A diminuir o número de parasitos internalizados está relacionado também ao baixo número de parasitos que aderem à superfície da célula.

Portanto, este experimento mostrou que a infecção dos B-1CDPs por *L. (L.) amazonensis* ocorre pelo mecanismo de fagocitose e não por um processo ativo do parasito, assim como nos MMOs.

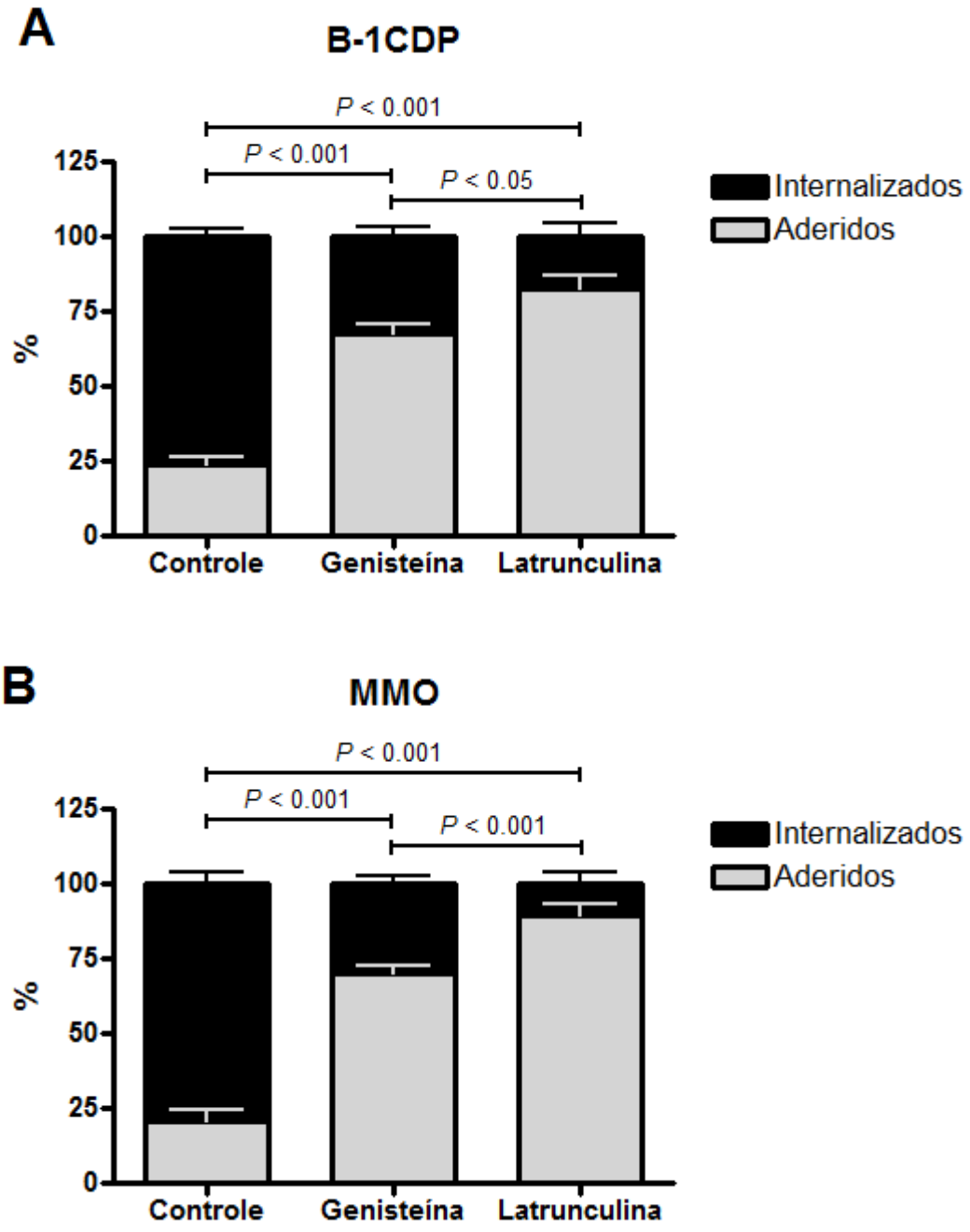


Figura 14 - **Porcentagem de parasitos internalizados e aderidos em B-1CDPs e MMOs previamente tratados com drogas inibidoras de fagocitose.** B-1CDPs e MMOs foram tratados com genisteína (250 µM) e latrunculina A (5 µM) por 30 minutos a 37 °C e posteriormente infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 30 minutos a 33 °C. As células foram fixadas com PFA 4% e marcadas com anticorpos anti-*Leishmania*, DAPI e faloidina Texas-Red X. Total de parasitos foram contados pela marcação por DAPI, e os aderidos pela marcação com anti-*Leishmania*. Os valores respresentam a porcentagem de parasitos internalizados e aderidos nos B-1CDPs (**A**) e MMOs (**B**) em relação ao total. Estes resultados correspondem à três experimentos independentes realizados nas mesmas condições técnicas e os valores representam a média e erro padrão dos três ensaios. Análise estatística utilizada: ANOVA.

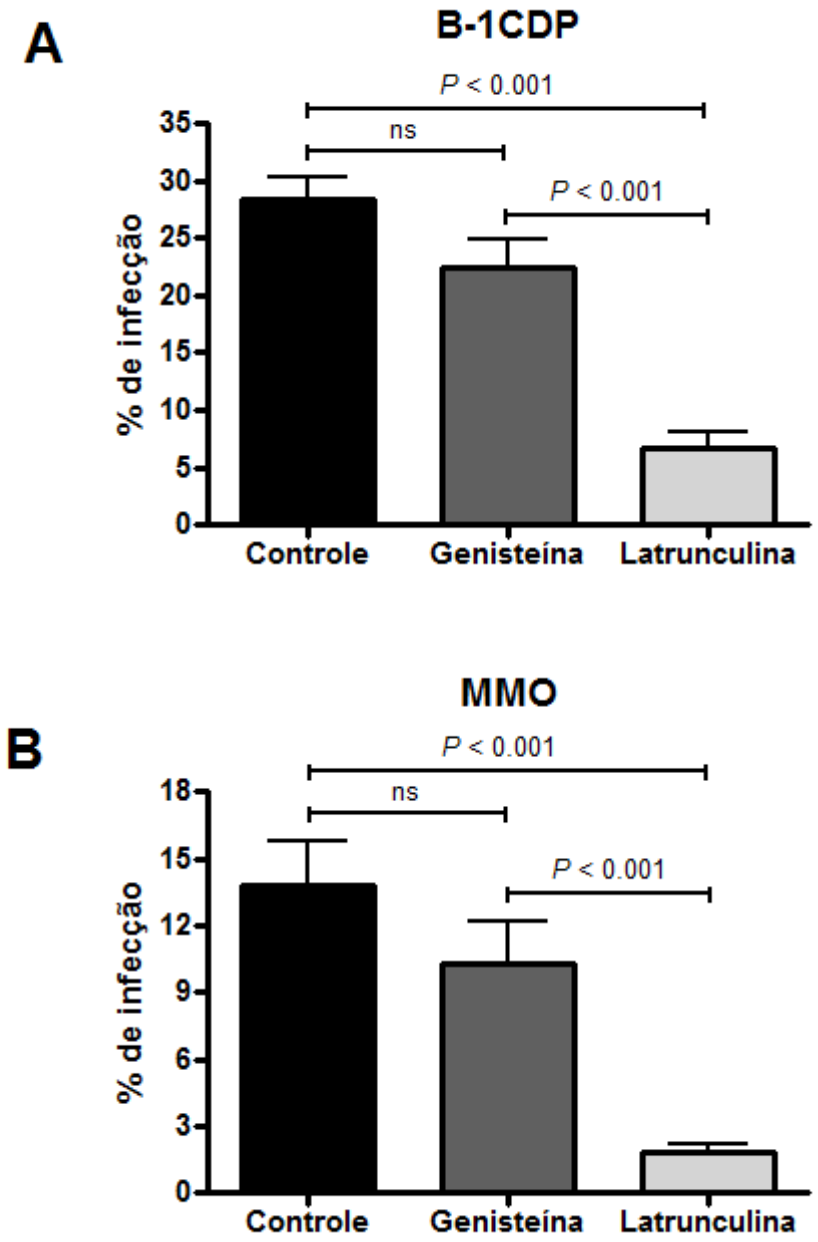


Figura 15 - **Porcentagem de B-1CDPs e MMOs infectados com *L (L.) amazonensis* previamente tratados com drogas inibidoras de fagocitose.** B-1CDPs e MMOs foram tratados com genisteína (250 µM) e latrunculina A (5 µM) por 30 minutos a 37 °C e posteriormente infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 30 minutos a 33 °C. As células foram fixadas com PFA 4% e marcadas com anticorpos anti-*Leishmania*, DAPI e faloidina Texas-Red X. (**A**) Porcentagem de B-1CDPs infectados. (**B**) Porcentagem de MMOs infectados. Estes resultados correspondem à três experimentos independentes realizados nas mesmas condições técnicas e os valores representam a média e erro padrão dos três ensaios. ns = não significativo. Análise estatística utilizada: ANOVA.

4.4 Efeito da vacuolina-1 na infeçcão de B-1CDP e MMO por *L. (L.) amazonensis*

A vacuolina-1 é uma pequena molécula que causa expansão de vacúolos derivados de endossomos e lisossomos em diversos tipos celulares (87). A avaliação do seu efeito na infecção por *L. (L.) amazonensis* foi realizada. Pelo fato desta espécie ser capaz de induzir a formação de grandes vacúolos parasitóforos (21,41,42), pensou-se na possibilidade da vacuolina-1 favorecer ainda mais a multiplicação dos parasitos. Desta maneira, B-1CDPs e MMOs foram tratados com vacuolina-1 (1 µM) por 1 hora e infectados (2:1) por 2 horas. O tempo de pós-infecção determinado foi de 96 horas, para uma melhor observação dos vacúolos parasitóforos com a intenção de medir seus comprimentos posteriormente.

Os resultados mostram que no tempo de 2 horas de infecção o número de parasitos a cada 100 células infectadas é o mesmo para o grupo controle e tratado, tanto para B-1CDP quanto para MMO (**Figura 16A e B**), mostrando que a vacuolina-1 não interfere no processo inicial da infecção. No tempo de 96 horas pós-infecção dos B-1CDPs, os dois grupos (controle e tratado) também apresentaram a mesma carga parasitária. Por outro lado, o número de parasitos nos MMOs tratados com vacuolina-1 é maior comparado ao controle neste último tempo (**Figura 16B**), embora este resultado não tenha diferença estatística significativa quando analisado utilizando o número de parasitos para cada 100 células infectadas.

A porcentagem de infecção dos B-1CDPs, tratados ou não, diminuiu no tempo de 96 horas pós-infecção (**Figura 17A**), mas esta queda não interferiu nos resultados do índice de infecção (**Figura 17B**), que é baseado na porcentagem de células infectadas. Mesmo utilizando o índice de infecção para os B-1CDPs, não teve diferença entre o grupo controle e o tratado em 96 horas. Contudo, para os MMOs, as células tratadas com vacuolina-1 tiveram um maior índice de infecção quando comparadas ao controle (**Figura 18B**), sendo estatisticamente significativa esta diferença. A porcentagem de MMOs infectados, com ou sem tratamento, não mudou no tempo de 96 horas (**Figura 18A**). Imagens representativas do experimento podem ser encontradas na **figura 19**.

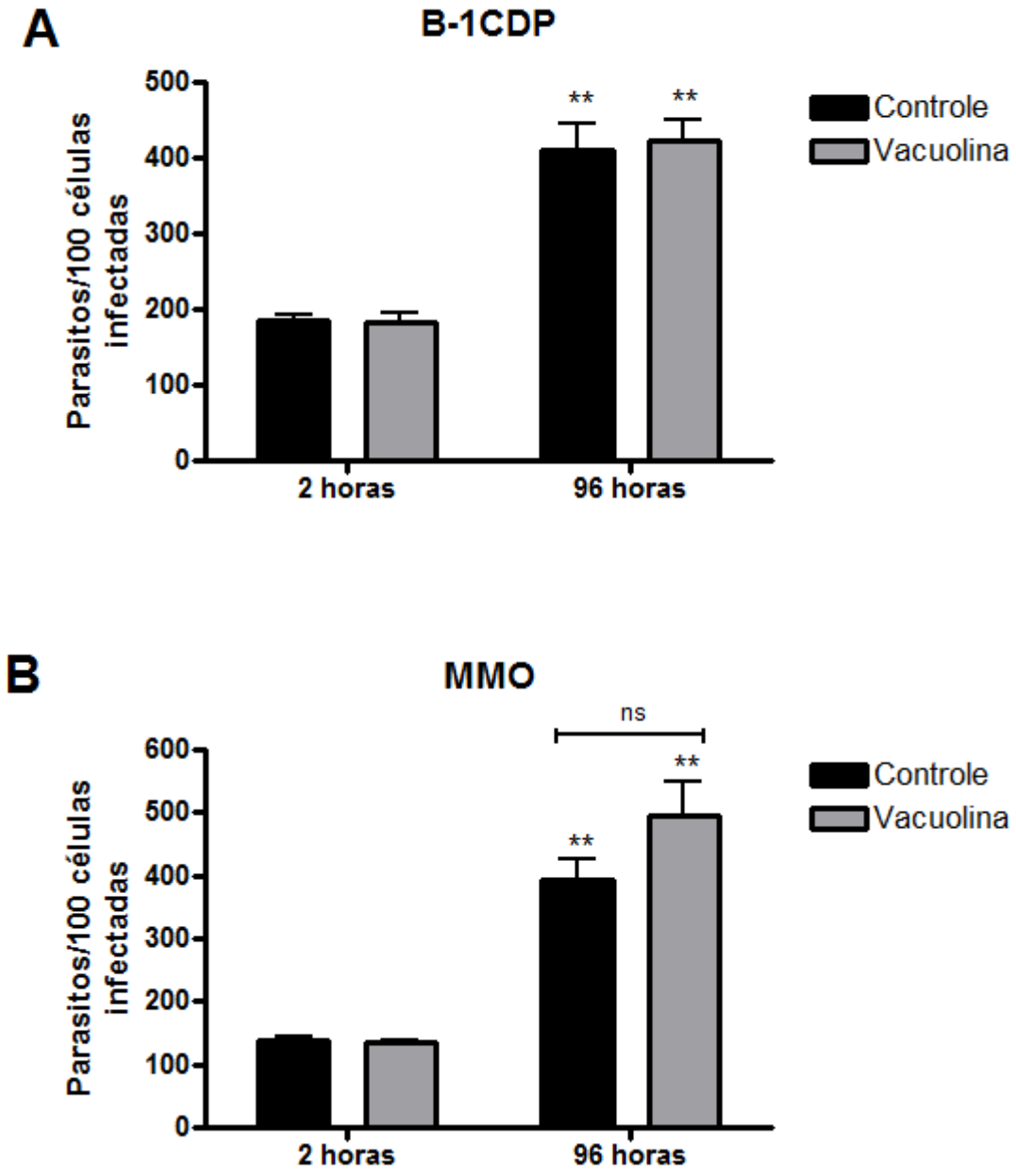


Figura 16 - Multiplicação de *L (L.) amazonensis* em B-1CDPs e MMOs previamente tratados com vacuolina-1. B-1CDPs e MMOs foram tratados com vacuolina-1 (1 µM) por 1 hora a 37 °C e posteriormente infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 2 horas a 33 °C. O tempo de pós-infecção foi de 96 horas. Os gráficos representam número de parasitos para cada 100 células infectadas para B-1CDP (**A**) e MMO (**B**). Foram realizados três experimentos independentes nas mesmas condições técnicas e os valores representam a média e erro padrão dos três ensaios. ** $P < 0,001$ comparado ao tempo de 2 horas correspondente, ns = não significativo. Análise estatística utilizada: ANOVA.

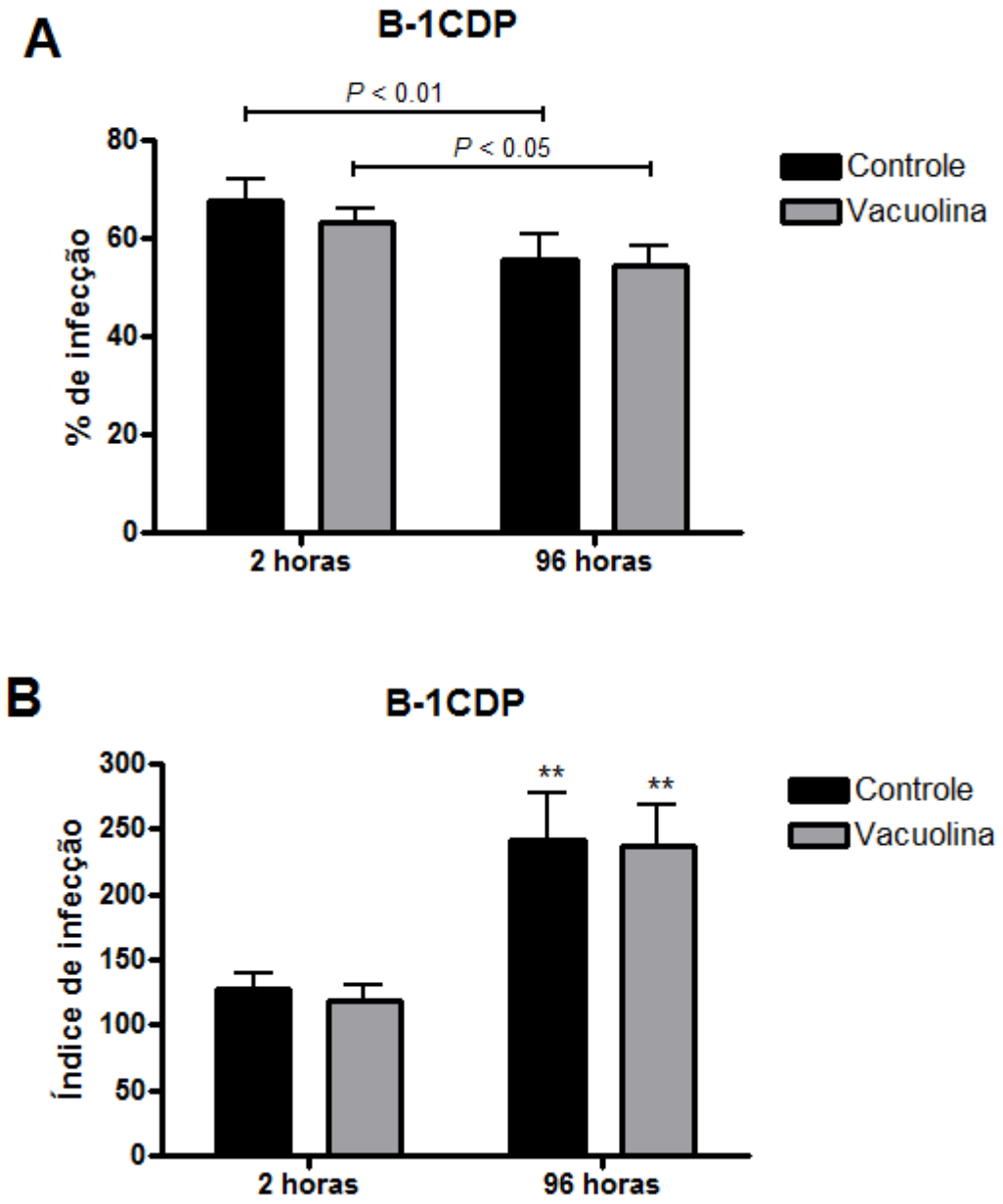


Figura 17 - **Porcentagem e índice de infecção dos B-1CDPs previamente tratados com vacuolina-1.** B-1CDPs foram tratados com vacuolina-1 (1 µM) por 1 hora a 37 °C e posteriormente infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 2 horas a 33 °C. O tempo de pós-infecção foi de 96 horas. (**A**) Porcentagem de infecção. (**B**) Índice de infecção (Produto da porcentagem de células infectadas pela média do número de parasitos fagocitados). Foram realizados três experimentos independentes nas mesmas condições técnicas e os valores representam a média e erro padrão dos três ensaios. ** $P < 0,001$ comparado ao tempo de 2 horas correspondente. Análise estatística utilizada: ANOVA.

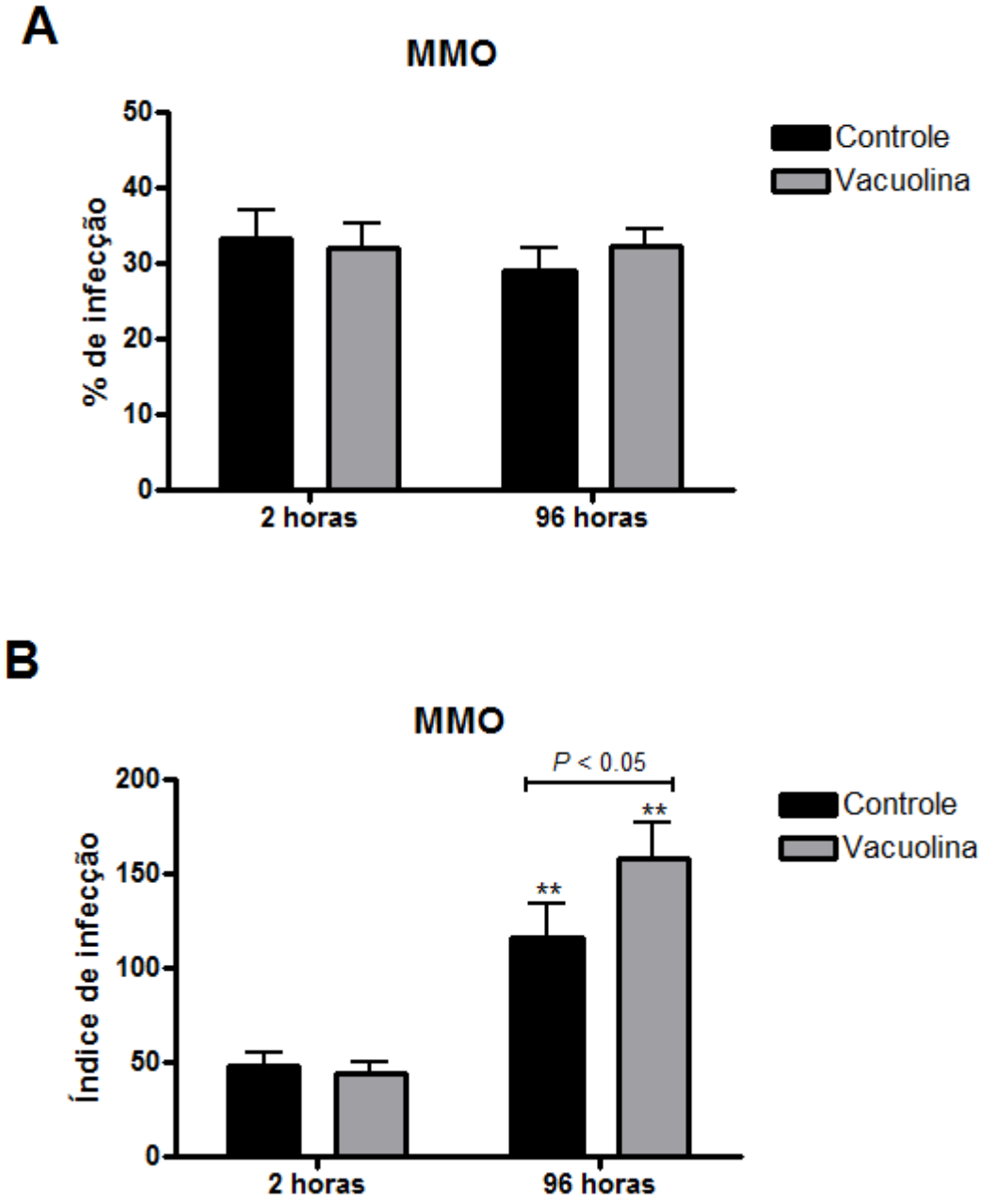


Figura 18 - Porcentagem e índice de infecção dos MMOs previamente tratados com vacuolina-1. MMOs foram tratados com vacuolina-1 (1 µM) por 1 hora a 37 °C e posteriormente infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 2 horas a 33 °C. O tempo de pós-infecção foi de 96 horas. (**A**) Porcentagem de infecção. (**B**) Índice de infecção (Produto da porcentagem de células infectadas pela média do número de parasitos fagocitados). Foram realizados três experimentos independentes nas mesmas condições técnicas e os valores representam a média e erro padrão dos três ensaios. ** $P < 0,001$ comparado ao tempo de 2 horas correspondente. Análise estatística utilizada: ANOVA.

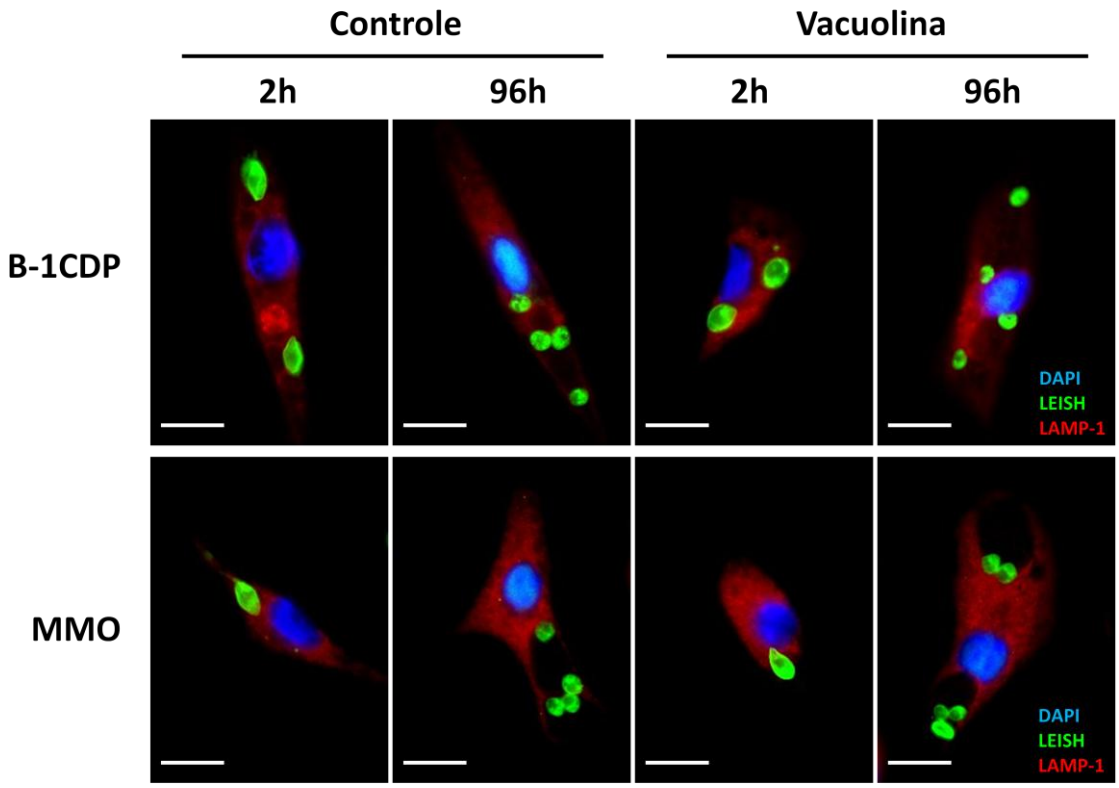


Figura 19 - Imagens de imunofluorescência representativas do ensaio de infecção dos B-1CDPs e MMOs com *Leishmania (L.) amazonensis*, previamente tratados com vacuolina-1. B-1CDPs e MMOs foram tratados com vacuolina-1 (1 µM) por 1 hora a 37 °C e posteriormente infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 2 horas a 33 °C. O tempo de pós-infecção foi de 96 horas para observar de melhor forma o vacúolo parasitóforo. Pelas imagens é possível visualizar o aumento do número de parasitos no interior das células no tempo de 96 horas. Núcleo foi marcado com DAPI (azul); proteína 1 de membrana associada ao lisossomo foi marcada com anticorpo anti-LAMP-1 (vermelho) e os parasitos com anticorpo anti-*Leishmania* (verde). Barra de escala corresponde a 10 µm.

4.5 Comparação do tamanho do vacúolo parasitóforo dos B-1CDPs e MMOs infectados com *L. (L.) amazonensis* previamente tratados com vacuolina-1

Como mostrado anteriormente a vacuolina-1 não teve efeito na multiplicação da *L. (L.) amazonensis* em B-1CDPs, mas sim em MMOs quando o perfil da infecção é analisado pelo índice de infecção. Como esta molécula induz a formação de grandes vacúolos, uma análise do tamanho dos vacúolos dos B-1CDPs e MMOs infectados foi realizada para avaliar o efeito da vacuolina-1 neste aspecto. De cada lamínula do tempo de 96 horas pós-infecção foram fotografados no mínimo 50

vacúolos para a realização da medição. Os resultados mostram que o tamanho dos vacúolos dos B-1CDPs não tratados é maior comparado aos dos MMOs também não tratados (**Figura 20**). Quando ambas as células são tratadas com vacuolina-1, o comprimento do vacúolo aumenta para as duas, ficando praticamente com o mesmo tamanho.

Os resultados indicam que o comprimento dos vacúolos parasitóforos dos B-1CDPs não tratados é maior do que dos MMOs controle, mas o tratamento com vacuolina-1 para os dois tipos celulares fez praticamente igualar o tamanho médio dos vacúolos, mostrando que os B-1CDPs não conseguiram manter seu fenótipo de vacúolos maiores que dos MMOs. O modo contraste de fase foi escolhido para a medição dos vacúolos e para a obtenção das fotos representativas. O tamanho médio dos vacúolos dos B-1CDPs observados está representado na **figura 21** e dos MMOs na **figura 22**. Mesmo as imagens representarem a média do comprimento dos vacúlos de cada grupo celular e de tratamento, é possível notar a diferença de tamanho entre eles.

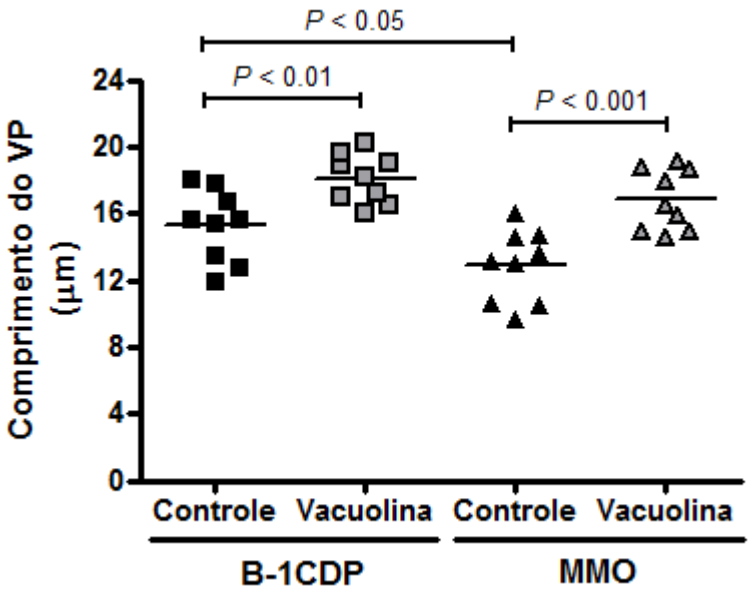


Figura 20 - Comparação do comprimento do vacúolo parasitóforo entre B-1CDPs e MMOs previamente tratados ou não com vacuolina-1. B-1CDPs e MMOs foram tratados com vacuolina-1 (1 µM) por 1 hora a 37 °C e posteriormente infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 2 horas a 33 °C. O tempo de pós-infecção foi de 96 horas para observar de melhor forma o vacúolo parasitóforo. Cada ponto representa a média do comprimento de 50 vacúolos medidos por lamínula. Foram realizados três experimentos independentes

nas mesmas condições técnicas e os valores representam a média da triplicata biológica. Análise estatística utilizada: ANOVA.

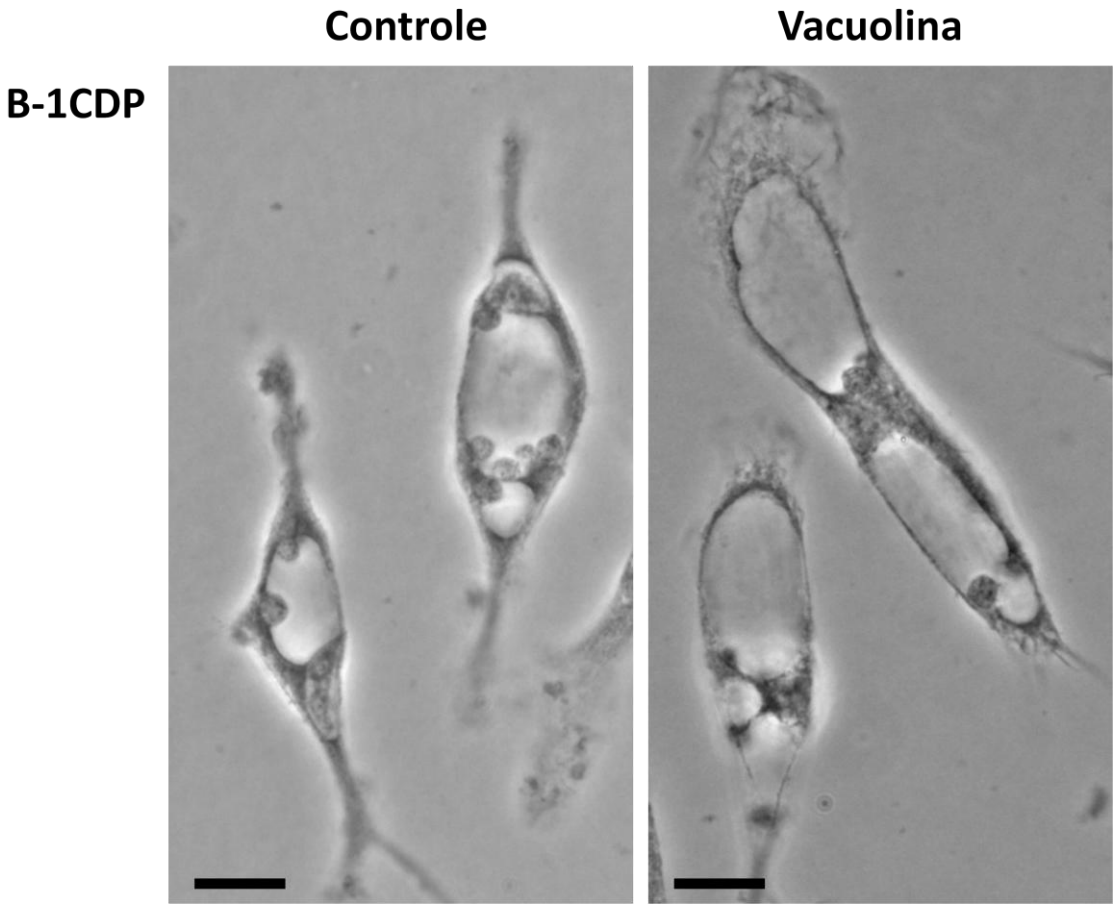


Figura 21 - Imagens de contraste de fase dos vacúolos parasitóforos de B-1CDPs previamente tratados ou não com vacuolina-1. B-1CDPs foram tratados com vacuolina-1 (1 µM) por 1 hora a 37 °C e posteriormente infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 2 horas a 33 °C. O tempo de pós-infecção foi de 96 horas escolhido para a obtenção destas imagens e posterior medição dos vacúolos utilizando o programa ImageJ. As imagens mostram que o tamanho dos vacúolos dos B-1CDPs tratados com vacuolina-1 é maior comparado ao controle não tratado. Barra de escala corresponde a 10 µm.

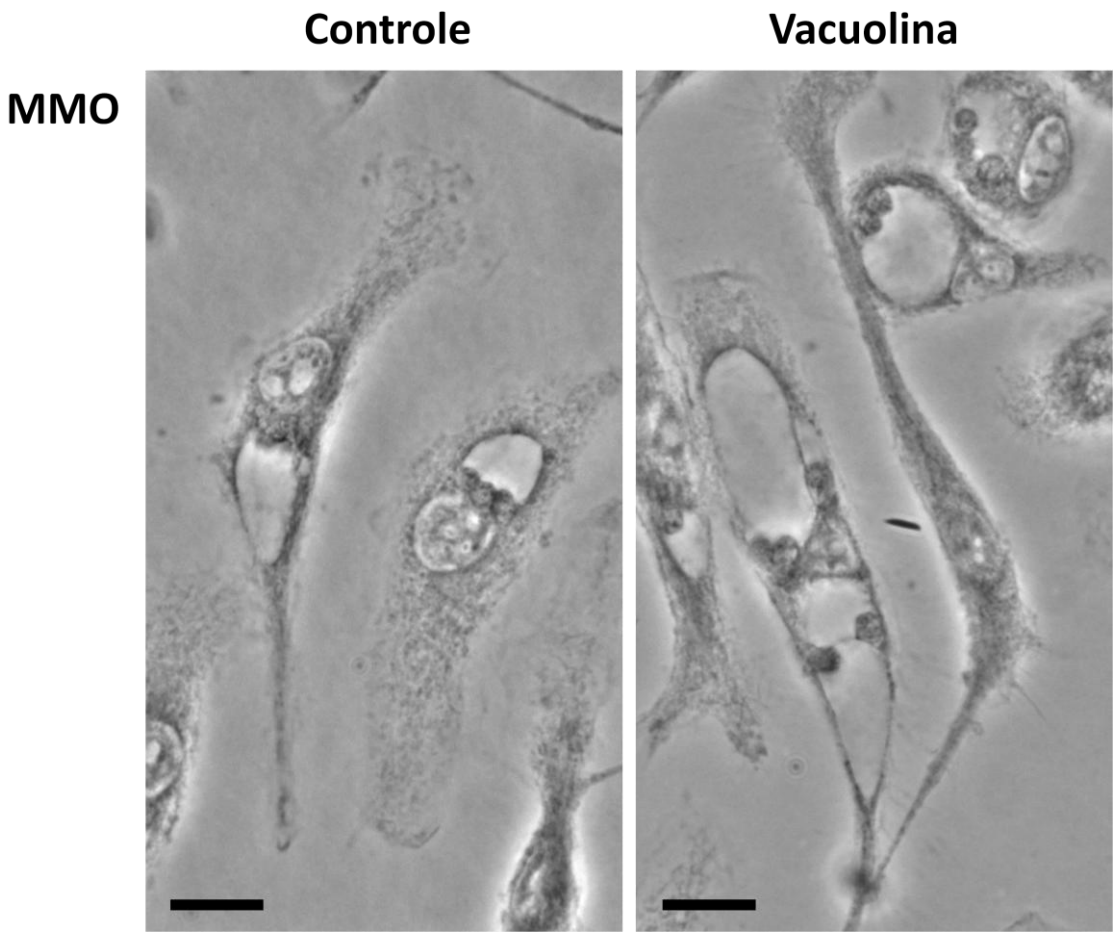


Figura 22 - Imagens de contraste de fase dos vacúolos parasitóforos de MMOs previamente tratados ou não com vacuolina-1. MMOs foram tratados com vacuolina-1 (1 µM) por 1 hora a 37 °C e posteriormente infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 2 horas a 33 °C. O tempo de pós-infecção foi de 96 horas escolhido para a obtenção destas imagens e posterior medição dos vacúolos utilizando o programa ImageJ. As imagens mostram que o tamanho dos vacúolos dos MMOs tratados com vacuolina-1 é maior comparado ao controle não tratado. Barra de escala corresponde a 10 µm.

4.6 Expressão de *Lyst* e *Cd200* nos B-1CDPs e MMOs infectados tratados ou não com vacuolina-1

A expressão dos genes *Lyst* e *Cd200* foi quantificada a partir das amostras de 96 horas pós-infecção, previamente tratadas ou não com vacuolina-1. *Lyst* é um gene responsável na regulação do tamanho do lisossomo nas células mamíferas (45) e *Cd200* está envolvido no controle da resposta imune das células mielóides (89). Os resultados mostram que a infecção com *L. (L.) amazonensis* e apenas o

tratamento com vacuolina-1, sem posterior infecção dos B-1CDPs, são capazes de aumentar a expressão de *Lyst* quando comparado ao controle não tratado e não infectado (**Figura 23A**). Contudo, por mais que a vacuolina-1 seja capaz de aumentar a expressão de *Lyst*, este tratamento não foi sinérgico à infecção, pois o grupo tratado e infectado não apresentou maior expressão do que os grupos tratado e infectado isoladamente. Porém, mesmo a média dos experimentos representar o dobro de expressão do controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Em relação aos MMOs, a média da expressão de *Lyst* dos grupos tratados e/ou infectados foi muito semelhante ao controle (**Figura 23B**), embora tenha sido calculada a partir de valores que oscilaram entre os experimentos realizados, sendo necessário a realização de mais ensaios.

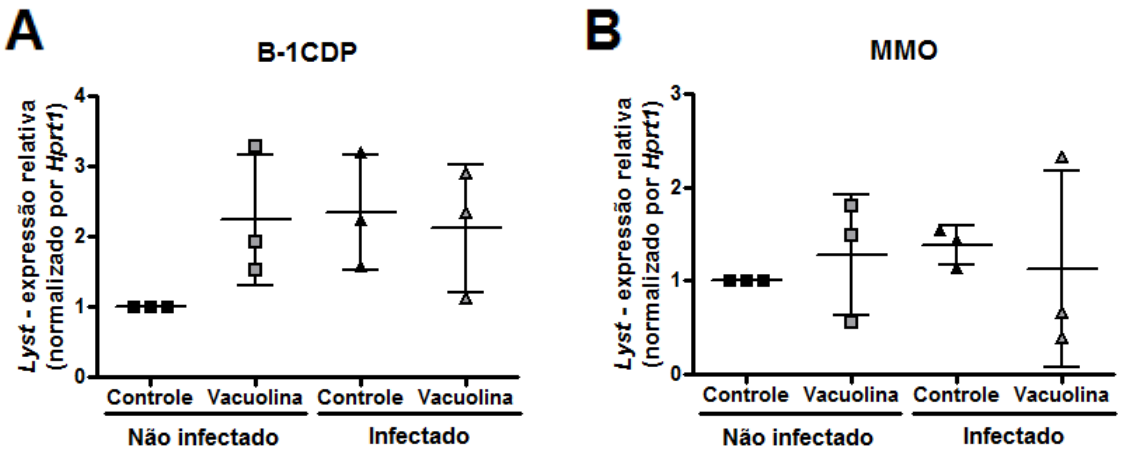


Figura 23 - Expressão de *Lyst* em B-1CDPs e MMOs infectados com *L. (L.) amazonensis* previamente tratados ou não com vacuolina-1. B-1CDPs e MMOs foram tratados com vacuolina-1 (1 µM) por 1 hora a 37 °C e posteriormente infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 2 horas a 33 °C. O tempo de pós-infecção foi de 96 horas e o RNA foi extraído para a realização da PCR em tempo real. Cada ponto representa a média da triplicata técnica realizada em cada experimento. Foram realizados três experimentos independentes nas mesmas condições técnicas e os valores representam a média e desvio padrão. Os resultados foram obtidos a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, em que o gene *Hprt1* foi utilizado como controle. Análise estatística utilizada: Kruskal-Wallis.

Em conjunto com *Lyst*, os níveis de expressão de *Cd200* também foram quantificados. Para os B-1CDPs, a média da expressão de *Cd200* foi muito parecida

entre os grupos somente tratado, somente infectado e tratado e infectado (**Figura 24A**), apresentando serem maiores, porém sem diferença significativa, quando comparadas ao controle. Resultados semelhantes podem ser observados nos ensaios com MMOs (**Figura 24B**), em que apenas o tratamento com vacuolina-1 e somente a infecção foram suficientes para aumentar a expressão de *Cd200*, porém sem sinergismo da expressão quando as duas condições se encontram juntas.

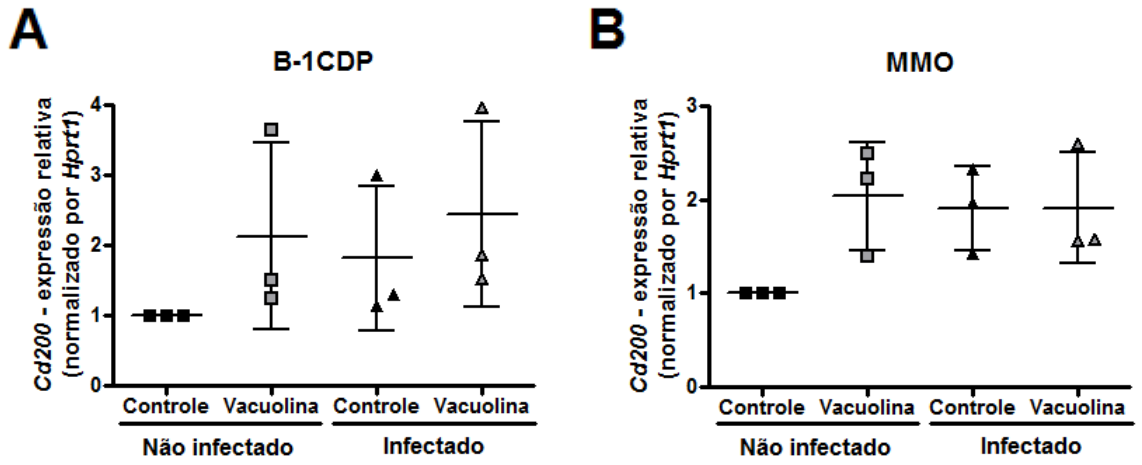


Figura 24 - Expressão de *Cd200* em B-1CDPs e MMOs infectados com *L. (L.) amazonensis* previamente tratados ou não com vacuolina-1. B-1CDPs e MMOs foram tratados com vacuolina-1 (1 µM) por 1 hora a 37 °C e posteriormente infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 2 horas a 33 °C. O tempo de pós-infecção foi de 96 horas e o RNA foi extraído para a realização da PCR em tempo real. Cada ponto representa a média da triplicata técnica realizada em cada experimento. Foram realizados três experimentos independentes nas mesmas condições técnicas e os valores representam a média e desvio padrão. Os resultados foram obtidos a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, em que o gene *Hprt1* foi utilizado como controle. Análise estatística utilizada: Kruskal-Wallis.

Portanto, estes resultados mostram que o tratamento com vacuolina-1 e a infecção com *L. (L.) amazonensis* aumentam, de forma não significativa, a expressão de *Lyst* e *Cd200* nos B-1CDPs, mas nos MMOs apenas a expressão de *Cd200* é aumentada nessas condições. A realização de mais ensaios é fundamental para o fortalecimento dos resultados devido o perfil de expressão gênica não ter se apresentado consistente entre os experimentos.

4.7 Produção de citocinas e óxido nítrico pelos B-1CDPs e MMOs infectados com *L. (L.) amazonensis* em diferentes tempos de infecção

A quantificação das citocinas IL-12p70, IL-10, IFN-γ, TNF, MCP-1 e IL-6 foi realizada para avaliar o perfil imunológico conduzido pelos B-1CDPs e MMOs ao serem infectados com *L. (L.) amazonensis*. Os sobrenadantes utilizados para esta análise foram provenientes dos tempos de 2 horas de infecção e 24 horas pós-infecção. Para as citocinas pró-inflamatórias TNF (**Figura 25A**) e MCP-1 (**Figura 25B**), no tempo de 2 horas os B-1CDPs mostraram menor capacidade de produção do que os MMOs, fato que se repete para o tempo de 24 horas. Os dois tipos celulares aumentaram a produção de ambas citocinas no tempo de 24 horas, sendo esta concentração maior do que o dobro da quantidade produzida no tempo de 2 horas, exceto para MCP-1 produzida pelos MMOs. Por outro lado, a produção de IL-6 (**Figura 25C**), uma citocina também pró-inflamatória, foi maior nos B-1CDPs para os dois tempos comparados aos MMOs. A concentração desta citocina mostrou-se no mínimo dez vezes maior no tempo de 24 horas pós-infecção quando comparada à quantidade do tempo de 2 horas tanto para B-1CDPs quanto para MMOs. As demais citocinas quantificadas, IL-12p70, IL-10 e IFN-γ, não foram exibidas graficamente pelo fato das concentrações detectadas (menores que 10 pg/mL) se encontrarem abaixo do limite de detecção da técnina utilizada.

Desta forma, estes resultados mostraram que no tempo de 24 horas pós-infecção a concentração das citocinas pró-inflamatórioas TNF, MCP-1 e IL-6 é maior quando comparada ao tempo de 2 horas. Além disso, os MMOs possuem maior capacidade de produzir TNF e MCP-1 do que os B-1CDPs, mas em relação a citocina IL-6, os B-1CDPs são os maiores produtores.

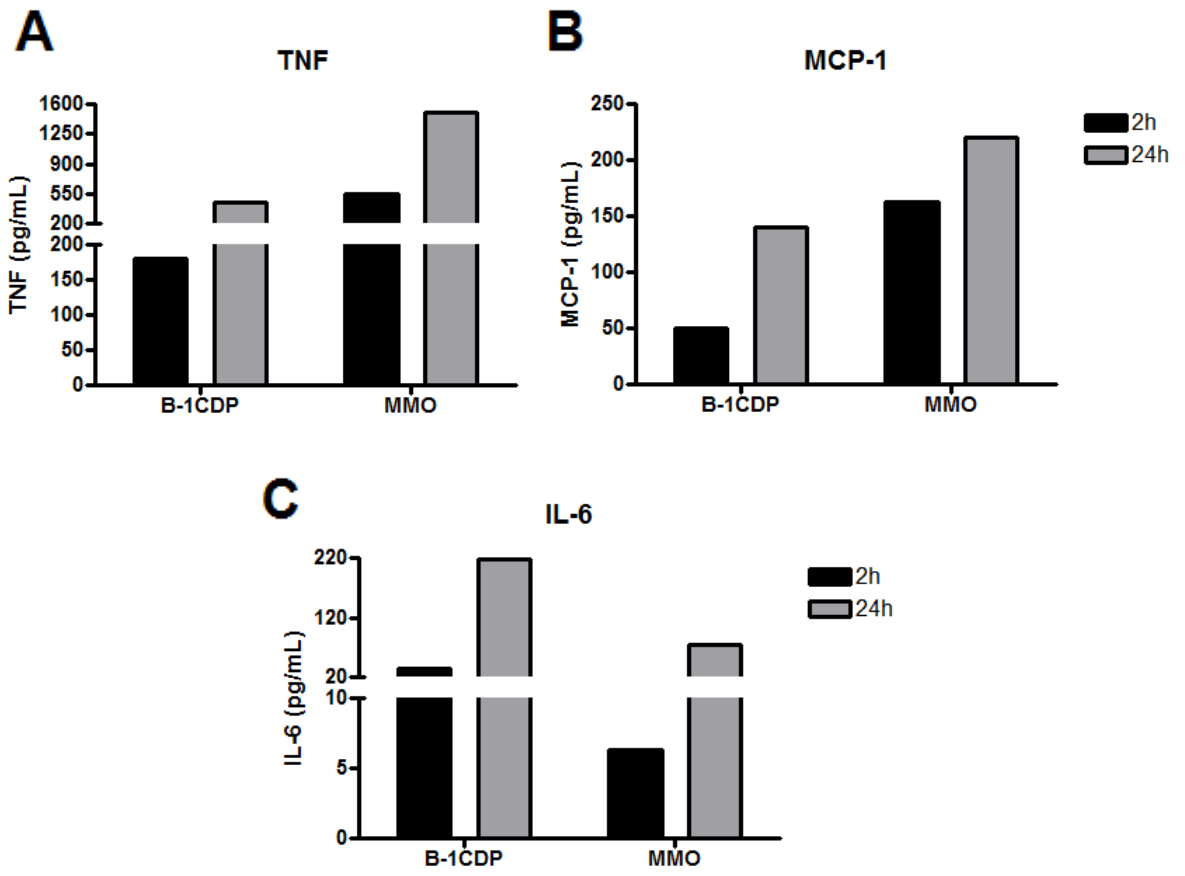


Figura 25 - Produção de citocinas pelos B-1CDPs e MMOs em 24 horas pós-infecção com *L. (L.) amazonensis*. B-1CDPs e MMOs foram infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 2 horas a 33 °C, tendo o sobrenadante recolhido e meio fresco adicionado. As culturas foram incubadas até o tempo de 24 horas pós-infecção em que o sobrenadante também foi recolhido. A dosagem das citocinas TNF (**A**), MCP-1 (**B**), IL-6 (**C**), IL-12p70, IL-10 e IFN-γ (dados não mostrados) foi realizada por citometria de fluxo utilizando o kit CBA. Resultados representam um experimento biológico.

A produção de óxido nítrico foi avaliada no tempo de 2 e 24 horas de infecção dos B-1CDPs e MMOs, bem como em B-1CDPs e MMOs deficientes em MyD88 e TRIF (**Figura 26**). Esta dosagem também foi realizada no sobrenadante do experimento envolvendo as células tratadas ou não com vacuolina-1 (**Figura 27**). Os resultados mostram que não houve diferença na concentração de nitrito entre todos os grupos analisados.

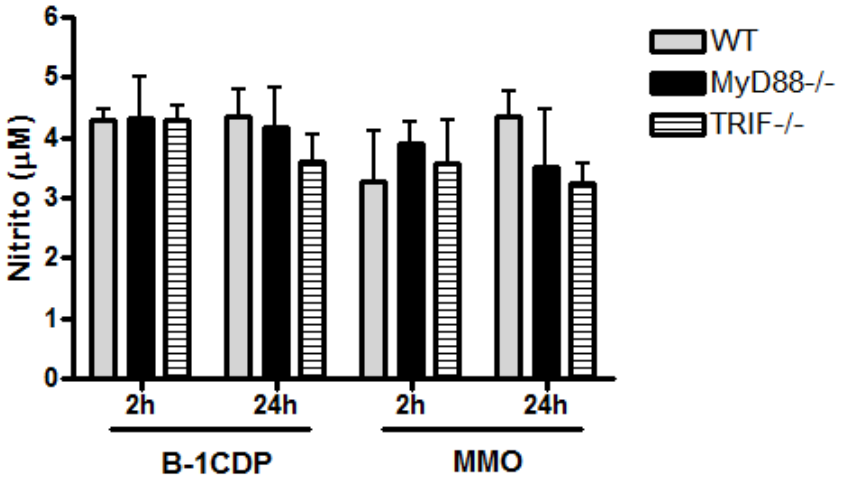


Figura 26 - Produção de óxido nítrico em 2 e 24 horas de infecção dos B-1CDPs e MMOs WT e deficientes de MyD88 e TRIF. B-1CDPs e MMOs WT, MyD88$^{-/-}$ e TRIF$^{-/-}$ foram infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 2 horas a 33 °C e incubados novamente em meio fresco até o tempo de 24 horas pós-infecção. O sobrenadante destes dois tempos foi recolhido e a dosagem de nitrito foi realizada utilizando o kit Measure-IT^{TM} High-Sensitivity Nitrite Assay. Os valores correspondem à média e desvio padrão da triplicata de um experimento, que representa a dosagem feita do sobrenadante de três poços diferentes. Análise estatística utilizada: ANOVA.

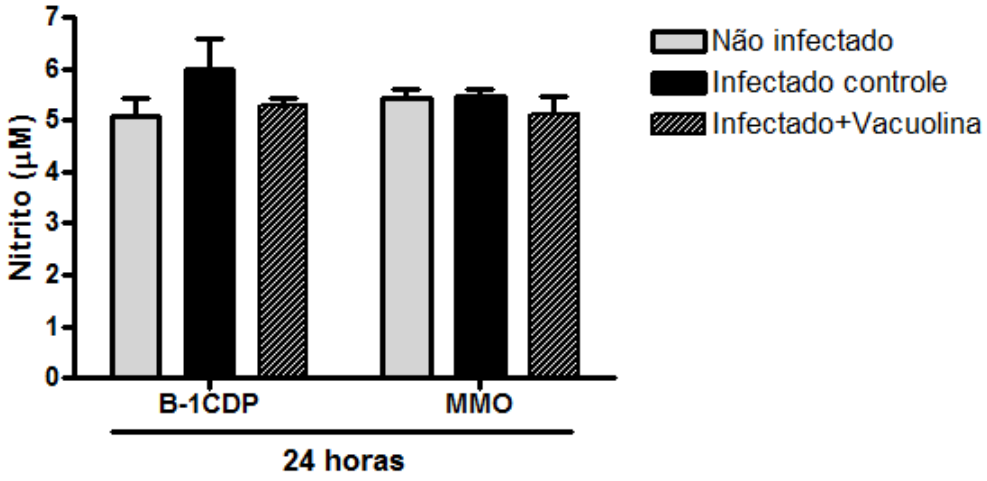


Figura 27 - Produção de óxido nítrico em 24 horas pós-infecção dos B-1CDPs e MMOs tratados ou não com vacuolina-1. B-1CDPs e MMOs foram infectados com *L. (L.) amazonensis* (2:1) por 2 horas a 33 °C e incubadas novamente em meio fresco até o tempo de 24 horas pós-infecção em que o sobrenadante foi recolhido. A dosagem de nitrito foi realizada utilizando o kit Measure-IT^{TM} High-Sensitivity Nitrite Assay. Os valores correspondem à média e desvio padrão da triplicata de um experimento, que representa a dosagem feita no sobrenadante de três poços diferentes. Análise estatística utilizada: ANOVA.

5 DISCUSSÃO

Durante a infecção por *Leishmania*, várias células do sistema imune estão envolvidas na resposta contra o patógeno, e como as leishmânias possuem diversos mecanismos de evasão, se torna muito importante ter um conhecimento cada vez mais profundo em relação ao papel exercido por cada tipo celular, para compreender de melhor forma a imunobiologia deste tipo de infecção. A principal célula hospedeira para a *Leishmania* é o macrófago devido à sua susceptibilidade, que permite o estabelecimento da infecção e a persistência do parasito (3,17). Desta forma, pode-se pensar no envolvimento de outras células fagocíticas na manutenção da doença, servindo como abrigo seguro para os parasitos assim como os macrófagos.

Poucos estudos têm abordado o papel das células B-1 na infecção por *Leishmania*, e a grande maioria destes trabalhos tem mostrado que estas células contribuem para a susceptibilidade à doença, como já visto em infecções por *L. (L.) major* (83,85) e *L. (L.) infantum chagasi* (86). Devido às diversas características encontradas na infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, o presente trabalho foi realizado com a intenção de avaliar a participação das células B-1, especificamente os fagócitos derivados de células B-1, durante a infecção por *L. (L.) amazonensis*.

As células B-1 diferem das células B convencionais por serem encontradas principalmente nas cavidades peritoneal e pleural, por seu fenótipo de marcadores de superfície e pela capacidade de produzir grandes quantidades de IgM polirreativas (52,53). Muitos trabalhos já mostraram que a obtenção das células B-1 por lavado peritoneal garante uma alta reprodutibilidade, e que quando recolhidas do sobrenadante da cultura após 5 ou 7 dias de incubação é a população prevalente, comprovada por citometria de fluxo (69,81,90). Para a confirmação de que os experimentos realizados para este estudo fossem realmente com uma população de células B-1 com baixa contaminação por macrófagos peritoneais, a imunofenotipagem foi realizada. Para isso foram utilizados anticorpos anti-CD19, anti-CD23 e anti-F4/80. Os resultados mostraram que 88,6% da população total de células peritoneais obtidas do sobrenadante de 5º dia de cultura representam as células B-1 (**Figura 8**). Além disso, menos de 1% das células apresentaram ser positivas para F4/80 e negativas para CD19 (**Figura 9**) correspondente aos macrófagos, indicando um número tão baixo que não poderia interferir nos ensaios realizados com as células B-1.

Almeida e colaboradores (69) demonstraram que as células B-1 podem se diferenciar em fagócitos e migrar da cavidade peritoneal para um local inflamatório não específico. A capacidade microbicida dos B-1CDPs foi investigada por Popi e colaboradores (46) utilizando a bactéria *Coxiella burnetii*. Neste estudo foi mostrado que os B-1CDPs são mais permissivos à esta infecção do que os macrófagos, sendo menos efetivos na eliminação das bactérias. Desta forma, foi sugerido que a IL-10 liberada pelos B-1CDPs estaria associada diretamente com esta suceptibilidade, não explorando com maior detalhe os efeitos microbicidas destas células. Outro estudo, utilizando *L. (L.) major*, também mostrou que os B-1CDPs são mais susceptíveis à infecção quando comparados aos PMOs, apresentando um maior número de amastigotas intracelulares e maior porcentagem de células infectadas (85). Neste mesmo estudo, além da contribuição da IL-10 na susceptibilidade dos B-1CDPs, a presença de prostaglandinas mostrou ser importante para a multiplicação do parasito no interior das células. Os nossos resultados mostraram que os B-1CDPs possuem a mesma capacidade de serem infectados por *L. (L.) amazonensis* e de permitir a multiplicação dos parasitos no seu interior quando comparados aos PMOs e MMOs (**Figura 10A**). O número de parasitos a cada 100 células infectadas foi equivalente entre os três tipos celulares nos dois tempos de infecção (2 e 48 horas). Como nossos resultados não foram semelhantes aos do trabalho de Arcanjo e colaboradores (85), em que mostrou que os B-1CDPs possuem maior carga parasitária quando comparados aos PMOs, isto pode ser explicado pelo fato deste estudo ter utilizado camundongos BALB/c, *L. (L.) major*, maior inóculo de parasitos e maior tempo de infecção. De qualquer forma, os nossos dados demonstram, assim como os outros trabalhos, que os B-1CDPs são capazes de abrigar *Leishmania*, inclusive a espécie *L. (L.) amazonensis*, o que fortemente sugere que esta célula deveria ser considerada também uma célula hospedeira importante na infecção do mesmo modo que os macrófagos.

A interação da *Leishmania* com macrófagos pode ocorrer pelo reconhecimento de antígenos do parasito por vários receptores da célula. Fazendo parte deste grupo estão os receptores do tipo Toll, que possuem vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória à infecção por *Leishmania* (19). Para verificarmos qual via de sinalização está sendo utilizada pela *L. (L.) amazonensis* na infecção dos B-1CDPs e MMOs, camundongos deficientes para moléculas adaptadoras dos TLRs, MyD88 e TRIF, foram utilizados neste estudo. Os resultados

preliminares mostraram que a ausência da molécula MyD88 resulta no aumento da infecção dos B-1CDPs comparados ao WT, e que na ausência de TRIF a infecção é equivalente ao controle WT (**Figura 12A**). Já para os MMOs, tanto o controle quanto MyD88$^{-/-}$ e TRIF$^{-/-}$ apresentaram o mesmo perfil de infecção não tendo diferença significativa (**Figura 13A**). Em trabalhos publicados com experimentos *in vivo*, foi mostrado que camundongos deficientes para MyD88 são mais susceptíveis à infecção por *L. (L.) major* (91,92), como também para *L. (L.) amazonensis* (93). O que mais chama a atenção é a grande diferença na multiplicação do parasito observada em B-1CDPs MyD88$^{-/-}$ quando comparada aos MMOs (**Figuras 12A e 13A**), também deficientes desta molécula. Isto sugere que vias envolvendo MyD88 devem servir como mecanismos importantes para a resistência à infecção por *L. (L.) amazonensis*, com maior relevância para os B-1CDPs do que para MMOs. Futuros ensaios precisam ser realizados para compreender de melhor forma as diferenças em relação à sinalização mediada pelos TLRs em B-1CDPs e macrófagos.

Sobre a capacidade fagocítica dos B-1CDPs, foi mostrado que ao incubar estas células com eritrócitos opsonizados com IgG ou com partículas de zimozan, elas são capazes de fagocitar via receptores Fc e de manose (69). Além disso, os B-1CDPs possuem atividade fagocítica ativa para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, demonstrada com o uso de citocalasina B e colchicina. Estas drogas impedem a polimerização de actina e microtúbulos, respectivamente, auxiliando na avaliação do papel do citoesqueleto no processo de engolfamento de partículas (76). Na infecção por *Leishmania,* a atividade da proteína tirosina quinase no macrófago pode ser induzida durante a interação com os receptores no momento da entrada do parasito na célula hospedeira. O tratamento de macrófagos com genisteína (inibidor da proteína tirosina quinase) e citocalasina B, antes da infecção com *L. (L.) donovani,* mostrou uma diminuição do número de parasitos por célula, evidenciando a importância da tirosina quinase e da polimerização de actina para a fagocitose (94). Assim, para avaliar o mecanismo de entrada da *L. (L.) amazonensis* nos B-1CDPs, estas células e os MMOs foram tratados com as drogas genisteína e latrunculina A (inibidor da polimerização dos filamentos de actina) e em seguida infectados com os parasitos. Os resultados foram semelhantes aos encontrados na literatura, mostrando que os B-1CDPs e MMOs tratados com ambas as drogas apresentaram menor número de parasitos internalizados e maior número de parasitos aderidos à membrana, quando comparados ao grupo controle não tratado

(**Figura 14**). A porcentagem de infecção dos grupos tratados com latrunculina A, para ambas as células, diminuiu drasticamente comparado ao controle (**Figura 15**). Isso mostra o papel fundamental que a actina possui, pois a desestabilização do citoesqueleto, induzida por drogas que afetam os filamentos de actina, reduz a aderência e engolfamento das promastigotas e, concomitantemente, a carga parasitária no interior das células (17). Portanto, nossos resultados mostraram que ao inibir o processo de fagocitose os parasitos não são capazes de infectar os B-1CDPs, demonstrando que o mecanismo de entrada envolvido é a via fagocítica. Os MMOs foram utilizados como controle pois, como já bem descrito, só podem ser infectados pelo processo de fagocitose (17,36).

A *L. (L.) amazonensis* possui a característica de induzir a formação de grandes vacúolos parasitóforos no macrófago devido à fusão com os lisossomos e fagolisossomos, o que facilita sua sobrevivência no ambiente hostil da célula por resultar na diluição das moléculas microbicidas (21,41,42). Esta capacidade da *Leishmania* em relação aos B-1CDPs ainda não foi estudada. Porém, na infecção por *Coxiella burnetii* foi mostrada a formação de grandes vacúolos nos B-1CDPs, sendo maiores do que dos macrófagos infectados (46). A multiplicação e sobrevivência da *L. (L.) amazonensis* está relacionada com o tamanho do vacúolo parasitóforo. Um estudo utilizando macrófagos e fibroblastos murinos possuindo uma anormalidade que gera a formação de grandes lisossomos (camundongos *beige*, mutação no gene *Lyst*), demonstrou que estas células apresentam um maior vacúolo parasitóforo quando infectadas com *L. (L.) amazonensis*, com um aumento na multiplicação dos parasitos intracelulares. Quando estas células foram complementadas geneticamente para superexpressar o gene deficiente, *Lyst* (gene regulador do tamanho de lisossomos), os vacúolos passaram a ser visivelmente pequenos, não sustentando a multiplicação da *L. (L.) amazonensis*. Quando são tratadas com vacuolina-1 (molécula que promove a expansão de vacúolos), estas células passam a apresentar grandes vacúolos parasitóforos promovendo a multiplicação dos parasitos (45). Como já foi mostrado em nossos resultados que os B-1CDPs e macrófagos podem ser infectados e permitem a multiplicação de *L. (L.) amazonensis* de maneira semelhante, foi avaliado o efeito da vacuolina-1 nesta infecção para comparar a susceptibilidade de cada célula após o tratamento. Para os B-1CDPs não teve diferença no número de parasitos a cada 100 células infectadas e no índice de infecção, do tempo de 96 horas pós-infecção, quando

previamente tratados ou não com vacuolina-1 (**Figuras 16A e 17B**). Em contrapartida, os MMOs tratados apresentaram maior número de parasitos por 100 células infectadas e maior índice de infecção quando comparados ao controle não tratado com vacuolina-1 (**Figuras 16B e 18B**). A capacidade de infecção no tempo de 2 horas não foi alterada pelo tratamento com vacuolina-1 para ambas as células, mostrando apenas um efeito tardio na infecção dos MMOs.

Como o tamanho do vacúolo parasitóforo pode influenciar na capacidade de sobrevivência e multiplicação da *L. (L.) amazonensis*, nós investigamos se os B-1CDPs e MMOs possuem a mesma capacidade de formar grandes vacúolos, incorporando nestes ensaios o tratamento com vacuolina-1, analisando as diferenças no tamanho dos vacúolos parasitóforos e posteriormente na expressão de *Lyst*. A média do comprimento dos vacúolos de B-1CDPs contendo parasitos se apresentou maior do que a média dos MMOs (**Figura 20**), mesmo sem o tratamento com vacuolina-1. Isso concorda com os resultados obtidos por Popi e colaboradores (46) em que os B-1CDPs apresentaram maiores vacúolos do que dos macrófagos, quando infectados com *Coxiella burnetii*. Em relação às células tratadas com vacuolina-1, a média do comprimento dos vacúolos dos B-1CDPs e MMOs se encontrou maior quando comparados aos seus controles. Para os MMOs, o aumento no tamanho dos vacúolos, causado pela vacuolina-1, correlacionou com o aumento no índice de infecção quando comparado ao controle não tratato, confirmando este efeito na multiplicação da *Leishmania*. Já os B-1CDPs, mesmo apresentando maiores vacúolos quando tratados com vacuolina-1, não permitiram o aumento da carga parasitária, sendo semelhante ao perfil do grupo de células não tratadas. Este fenômeno pode estar relacionado ao fato de que estas células quando infectadas já apresentam grandes vacúolos mesmo sem o tratamento com vacuolina-1. Por outro lado, para os MMOs, como foi observado uma maior diferença do tamanho dos vacúolos entre o grupo tratado e não tratado, este aumento mais significativo pode ter sido o suficiente para influenciar na capacidade de multiplicação da *Leishmania*, o que resultou no aumento do índice de infecção dos MMOs tratados com vacuolina-1.

A expressão do gene *Lyst* foi quantificada para investigar se a *L. (L.) amazonensis* é capaz de modular a expressão deste gene regulador de maneira diferente em B-1CDPs e MMOs. O tratamento com vacuolina-1 e a infecção com *Leishmania*, utilizados separadamente, mostraram ser capazes de aumentar a

expressão de *Lyst* nos B-1CDPs (**Figura 23A**) 96 horas pós-infecção. A partir destes resultados pode-se pensar que com o estímulo do tratamento ou da infecção, em que ambos induzem a expansão de vacúolos, os B-1CDPs responderam aumentando a expressão de *Lyst* na tentativa de controlar esta expansão. Este mesmo fenômeno ocorreu para as células tratadas e infectadas, e como a expressão relativa foi semelhante entre os três grupos avaliados, mostrou que o tratamento somado à infecção não apresentam sinergismo. Estes resultados foram baseados na média da expressão relativa da triplicata biológica, que mesmo representando o dobro em relação ao controle, este aumento não possui diferença significativa. Para os MMOs, a média da expressão relativa se apresentou muito semelhante ao controle para todos os grupos estudados (tratados com vacuolina-1 e/ou infectados com *Leishmania*) (**Figura 23B**). Isto indica que os MMOs, diferente dos B-1CDPs, não são capazes de aumentar a expressão de *Lyst* sob estímulo da vacuolina-1 ou do parasito, ou o aumento é significativamente menor quando comparado aos B-1CDPs. Como Lyst está estritamente relacionado ao tráfego e tamanho dos lisossomos, seria interessante analisar a biogênese de lisossomos nestas duas populações celulares, quando infectadas por *Leishmania*. Muitos trabalhos têm demonstrado que Lyst está envolvido na biogênese e fusão de lisossomos em vários compartimentos (95,96). Recentemente foi demonstrado por Cortez e colaboradores (97) que células tratadas em diferentes condições de estresse diminuem ou aumentam a entrada de *Trypanossoma cruzi*, e que a biogênese/distribuição de lisossomos é essencial para este fenômeno. Sendo assim, *Leishmania* ativaria diferentes processos envolvendo lisossomos, como fusão de membranas, biogênese do vacúolo parasitóforo e tráfego de vesículas, dependendo do tipo celular infectado. Neste sentido, sabe-se que a fusão do vacúolo parasitóforo de *Leishmania* com diferentes estruturas da célula é um processo contínuo (98).

A *L. (L.) amazonensis* possui muitos mecanismos de evasão do sistema imune e um deles está relacionado à sua capacidade de induzir a expressão de CD200 (40). A CD200 é uma glicoproteína de membrana presente nos timócitos, células B, células T, neurônios, células endoteliais, entre outras; já seu receptor é encontrado nas células mielóides, como os macrófagos (99). Um dois efeitos da interação da CD200 com seu receptor é a inibição da expressão de moléculas pró-inflamatórias, contendo o processo inflamatório e, em consequência, a resolução de uma infecção (89). A indução da expressão de CD200 em macrófagos murinos no

início da infecção (1 hora após a infecção) por amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi mostrada ser importante para a manutenção da infecção (40). Por outro lado, formas promastigotas não são capazes de induzir CD200 em níveis significativos no início da infecção (dados obtidos pelo nosso laboratório), o que leva a pensar em escolher pontos de infecção mais tardios que tenham maior quantidade de amastigotas intracelulares. Desta forma, os níveis de expressão gênica de *Cd200* dos B-1CDPs e MMOs, infectados e previamente tratados ou não com vacuolina-1, foram verificados no tempo de 96 horas pós-infecção. Nossos resultados mostraram que a média da expressão dos transcritos de *Cd200* nos B-1CDPs e MMOs foi muito semelhante entre as células somente tratadas ou infectadas e as células que receberam os dois estímulos (**Figura 24**). Esta expressão apresentou-se como o dobro em relação ao controle, embora este aumento não tenha sido significativo estatisticamente. A razão pela qual a vacuolina-1 aumenta a expressão de *Cd200* pode ser o fato de que a célula conduza para uma resposta anti-inflamatória frente a este estímulo, sendo equivalente à resposta contra *L. (L.) amazonensis*, diferindo apenas no propósito de que o parasito induz essa expressão para a sua sobrevivência. Além disso, o tratamento com vacuolina-1 seguido da infecção com os parasitos não possui um efeito sinérgico para a expressão de *Cd200*. De qualquer forma, o aumento da expressão de *Cd200* no tempo de 96 horas pós-infecção pode ser muito importante para a manutenção do parasito no interior da célula por evitar a ativação da mesma. Os níveis de expressão dos transcritos de *Cd200* dos B-1CDPs mostraram ser variáveis entre os três experimentos, ficando bem evidente a baixa expressão em dois deles e uma alta expressão em um ensaio. Dessa forma, a realização de mais experimentos seria importante para conferir qual padrão de expressão é o mais frequente, bem como identificar os níveis de expressão proteica de CD200 durante a infecção das células pelo parasito.

Para a avaliação da resposta imune dos B-1CDPs e MMOs, citocinas foram quantificadas do sobrenadante de 2 horas de infecção e 24 horas pós-infecção. A produção das citocinas pró-inflamatórias TNF e MCP-1 aumentou no tempo de 24 horas em relação ao tempo de 2 horas, tanto para os B-1CDPs quanto para os MMOs (**Figura 25A e B**). Embora ambas as células aumentaram a produção destas citocinas em 24 horas, os MMOs mostraram maior capacidade de produção do que os B-1CDPs, produzindo praticamente o dobro da quantidade nos dois tempos de infecção. Quando estimulados com LPS, os macrófagos se ativam e produzem TNF

como uma resposta inicial (100). Sua produção também já foi visualizada na infecção dos macrófagos por *L. (L.) amazonensis*, mas seus níveis só foram detectados na presença de neutrófilos na cultura, tanto em 24 quanto em 72 horas pós-infecção. Enquanto para MCP-1, sua maior produção foi detectada no tempo de 24 horas na ausência dos neutrófilos (101). As citocinas TNF e MCP-1 possuem capacidade de recrutar células para o local inflamatório ou de infecção, sendo esta última específica para monócitos. Assim, os B-1CDPs e MMOs foram ativados e mostraram resposta pró-inflamatória na tentativa de combater a infecção pelo menos até este tempo observado.

A citocina IL-6 foi produzida em maior quantidade pelos B-1CDPs do que pelos MMOs, nos dois tempos de infecção (**Figura 25C**). Porém, as duas células foram capazes de aumentar esta produção no tempo de 24 horas mais de dez vezes em relação ao produzido em 2 horas de infecção. A IL-6 é conhecida como uma citocina multifuncional devido ao seu papel na resposta imune, inflamação, hematopoiese, no sistema endócrino e nervoso. Os macrófagos produzem grandes quantidades desta citocina, que também é responsável pela proliferação e diferenciação dos linfócitos T, indução da diferenciação das células B em plasmócitos, entre muitas outras funções (102). Um estudo mostrou e sugeriu que a IL-6 produzida pelos macrófagos peritoneais é importante para a sobrevivência das células B-1 por aumentar sua viabilidade. Além disso, observaram que sem qualquer estímulo as células B-1 não produzem IL-6 (103). Nossos resultados mostraram que os B-1CDPs são capazes de produzir IL-6 quando infectados com *L. (L.) amazonensis*, e além disso esta produção é mais eficiente do que a dos MMOs, embora esta capacidade contribua para a resposta pró-inflamatória de ambas as células.

As outras citocinas, IL-12p70, IL-10 e IFN-γ, foram quantificadas (dados não mostrados), contudo não apresentaram concentrações significantes devido aos seus níveis se encontrarem abaixo do limite de detecção. A IL-12 é muito importante para o desenvolvimento de uma resposta efetiva contra *Leishmania*, e como os macrófagos representam a principal célula hospedeira para este parasito, consequentemente acabam não sendo a principal fonte desta citocina, concedendo este papel para as células dendríticas (104). De forma semelhante ocorre para a produção de IFN-γ, que é secretado por células T e que possui capacidade de ativar os macrófagos sendo um fator muito importante na defesa contra a *Leishmania*

intracelular (105). Já a IL-10, uma citocina anti-inflamatória com papel muito importante na sobrevivência do parasito, pode ser secretada pelos macrófagos (106), mas também pelas células B-1, que neste caso age como fator de autorrenovação destas últimas além do efeito anti-inflamatório (60).

Outro aspecto avaliado em nossos estudos foi a produção de óxido nítrico. Durante a resposta imune, este fator é essencial para a citotoxicidade mediada pelos macrófagos (107). Apenas macrófagos ativados podem produzir NO, e foi verificado que este é essencial para o controle da infecção por *L. (L.) major* (108). Por outro lado, as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* são resistentes ao NO, estando correlacionado à gravidade da doença (109). Nossos resultados mostraram que não teve diferença na produção de NO entre os B-1CDPs e MMOs WT e deficientes para MyD88 e TRIF (**Figura 26**), mesmo apresentando um perfil de infecção maior no grupo dos B-1CDPs MyD88$^{-/-}$. Também não houve diferença na produção de NO entre as células controle com as infectadas e/ou tratadas com vacuolina-1 no tempo de 24 horas pós-infecção (**Figura 27**). Isso mostra que mesmo com o estímulo dos parasitos e/ou do tratamento com vacuolina-1, os B-1CDPs e MMOs não foram capazes de produzir significantes níveis de NO até este momento da infecção.

Tendo em vista todos os resultados observados, este estudo mostrou que os B-1CDPs são capazes de fagocitar e permitir a multiplicação de *L. (L.) amazonensis* no seu interior. Além disso, possuem a característica de formar grandes vacúolos parasitóforos, um ambiente propício para a sobrevivência desta espécie, apresentando uma resposta imune voltada para o perfil pró-inflamatório em 24 horas pós-infecção, na tentativa de controlar este tipo de infecção. Este trabalho contribui para os estudos relacionados à investigação das diferentes células envolvidas na resposta imune contra *Leishmania*, fortalecendo a ideia de que além dos macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e fibroblastos, outras células podem estar servindo como um abrigo seguro para estes parasitos, contribuindo fortemente para a manutenção da infecção. Com este conhecimento, o presente trabalho pode servir como base para futuras pesquisas relacionadas ao estudo dos mecanismos de escape da resposta imune que a *Leishmania* utiliza. Como um destes mecanismos pode estar relacionado com a indução da expressão de CD200 nos B-1CDPs, mais investigações nesta área poderiam contribuir para o melhor entendimento da imunobiologia deste patógeno.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

- As células B-1 correspondem à maior população obtida do sobrenadante das células peritoneais cultivadas por cinco dias.

- A capacidade de infecção da *L. (L.) amazonensis* e seu perfil de multiplicação nos B-1CDPs é semelhante quando comparada aos PMOs e MMOs.

- Os B-1CDPs deficientes para a molécula adaptadora MyD88 dos TLRs são mais susceptíveis à infecção por *L. (L.) amazonensis* e mais permissivos para a multiplicação dos parasitos no seu interior quando comparados ao WT e TRIF$^{-/-}$.

- O modo pelo qual os B-1CDPs são infectados por *L. (L.) amazonensis* é pelo mecanismo de fagocitose, mesma via utilizada pelos MMOs.

- O tratamento com vacuolina-1 não aumenta a capacidade de multiplicação dos parasitos nos B-1CDPs, mas sim nos MMOs.

- Os B-1CDPs possuem vacúolos parasitóforos maiores do que dos MMOs, porém o tratamento com vacuolina-1 somado à infecção com *L. (L.) amazonensis* faz igualar o tamanho dos vacúolos.

- Apenas o tratamento com vacuolina-1 ou a infecção com *L. (L.) amazonensis* é capaz de aumentar a expressão de *Lyst* nos B-1CDPs, porém o sinergismo destes dois fatores não ocorre.

- Os MMOs infectados com *L. (L.) amazonensis* são capazes de produzir maior quantidade de TNF e MCP-1 do que os B-1CDPs, porém o inverso ocorre em relação à produção de IL-6.

- O perfil da resposta imune conduzido pelos B-1CDPs e MMOs quando infectados com *L. (L.) amazonensis*, de acordo com as principais citocinas produzidas em 24 horas pós-infecção, caracteriza ser pró-inflamatório sem diferença na produção de óxido nítrico.

REFERÊNCIAS[1]

[1] De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

1. World Health Organization (WHO). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases. 2015.

2. Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007;7(9):581–96.

3. Lipoldová M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. Nat Rev Genet. 2006;7(4):294–305.

4. Hartley M, Drexler S, Ronet C, Beverley SM, Fasel N. The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. Trends in Parasitol; 2014;30(8):412–22.

5. Goto H, Lindoso JAL. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am. 2012;26(2):293–307.

6. McGwire BS, Satoskar AR. Review Leishmaniasis : clinical syndromes and treatment. Q J Med. 2013;1–8.

7. Saúde M da. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnósticos clínico e diferencial. 1ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006. 1-136 p.

8. David C V, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatol Ther. 2009;22(6):491–502.

9. Dostálová A, Volf P. Leishmania development in sand flies : parasite-vector interactions overview. Parasit Vectors. 2012;5:276.

10. Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu Rev Microbiol. 2001;55:453–83.

11. da Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(2):149–53.

12. do Vale ECS, Furtado T. Leishmaniose tegumentar no Brasil : revisão histórica da origem, expansão e etiologia. An Bras Dermatol. 2005;80(4):421–8.

13. Pires AMS, Costa GC, Gonçalves EGR, Alvim A de C, Nascimento FRF. Aspectos imunológicos e clínicos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão. Rev Ciênc Saúde. 2012;14(1):30–9.

14. Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, et al. Comparative microsatellite typing of new world leishmania infantum reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(6):e1155.

15. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. Leishmania species : models of intracellular parasitism. J Cell Sci. 1999;112(18):2993–3002.

16. Barral-Netto M, Badaró R, Barral A, Carvalho EM. Imunologia da Leishmaniose Tegumentar: Revisão. Rev Soc Bras Med Trop. 1986;19(3):173–91.

17. Podinovskaia M, Descoteaux A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. Futur Microbiol. 2015;10(1):111–29.

18. Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of Leishmania. Immunol Rev. 2011;240:286–96.

19. de Almeida M, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection : analysis of its first steps . A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(7):861–70.

20. Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc.; 2007;37(10):1097–106.

21. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol. Nature Publishing Group; 2011;9(8):604–15.

22. Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annu Rev Microbiol. 1994;48:449–70.

23. Naderer T, McConville MJ. Microreview The Leishmania–macrophage interaction: a metabolic perspective. Cell Microbiol. 2008;10(2):301–8.

24. Real F, Florentino PTV, Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Veras PST, Goto H, et al. Cell-to-cell transfer of Leishmania amazonensis amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. Cell Microbiol. 2014;16(10):1549–64.

25. Ashok D, Acha-Orbea H. Timing is everything: dendritic cell subsets in murine Leishmania infection. Trends Parasitol. 2014;30(10):499–507.

26. Sousa LMA, Carneiro MBH, Resende ME, Martins LS, Santos LMDOS, Vaz LG, et al. Neutrophils have a protective role during early stages of Leishmania amazonensis infection in BALB/c mice. Parasite Immunol. 2014;36(1):13–31.

27. Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by leishmania parasites. J Biomed Biotechnol. 2010;1–8.

28. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106(16):6748–53.

29. Bogdan C, Donhauser N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. J Exp Med. 2000;191(12):2121–30.

30. León B, López-Bravo M, Ardavin C. Article monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T Helper 1 responses against Leishmania. Immunity. 2007;26(4):519–31.

31. Bogdan C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:1–9.

32. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Ouaissi A, Akharid K, Silvestre R, et al. Impairment of T cell function in parasitic infections. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(2):e2567.

33. Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous Leishmaniasis. PLoS Pathog. 2013;9(7):e1003504.

34. Ronet C, Voigt H, Himmelrich H, Doucey M-A, Torre YH-L, Revaz-Breton M, et al. Leishmania major-Specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to L. major LV39 in BALB/c mice. J Immunol. 2008;180(7):4825–35.

35. Wanasen N, Xin L, Soong L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine Leishmania amazonensis infection. Int J Parasitol. 2008;38(3-4):417–29.

36. Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. Trends Parasitol. 2012;28(8):335–44.

37. Goto H, Sanchez MCA. Does the complement system work for or against the host during parasite infections. Trends Immnunity. 2013;1(2):1–11.

38. Duclos S, Desjardins M. Microreview Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. Cell Microbiol. 2000;2(5):365–77.

39. Matheoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier, Shio MT, Hong WJ, Olivier M, et al. Article Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. Cell Host Microbe. 2013;14(1):15–25.

40. Cortez M, Huynh C, Fernandes MC, Kennedy KA, Aderem A, Andrews NW. Leishmania Promotes Its Own Virulence by Inducing Expression of the Host Immune Inhibitory Ligand CD200. Cell Host Microbe. 2011;9(6):463–71.

41. Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat Immunol. 2002;3(11):1041–7.

42. Antoine J, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. Trends Microbiol. 1998;6(10):392–401.

43. Courret N, Fréhel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, et al. Biogenesis of Leishmania-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. J Cell Sci. 2002;115(11):2303–16.

44. Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. J Exp Med. 1997;185(12):2061–8.

45. Wilson J, Huynh C, Kennedy KA, Ward DM, Kaplan J, Aderem A, et al. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of Leishmania amazonensis. PLoS Pathog. 2008;4(10):e1000179.

46. Popi AF, Zamboni DS, Mortara RA, Mariano M. Microbicidal property of B1 cell derived mononuclear phagocyte. Immunobiology. 2009;214(8):664–73.

47. Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. Springer

Semin Immunopathol. 2005;26(4):347–62.

48. Ledbetter JA, Rouse R V, Micklem HS, Herzenberg LA. T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views. J Exp Med. 1980;152(2):280–95.

49. Lanier LL, Warner NL, Ledbetter JA, Herzenberg LA. Expression of Lyt-1 antigen on certain murine B cell lymphomas. J Exp Med. 1981;153(4):998–1003.

50. Manohar V, Brown E, Leiserson WM, Chused TM. Expression of Lyt-1 by a subset of B lymphocytes. J Immunol. 1982;129(2):532–8.

51. Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR, Herzenberg LA. The “Ly-1 B” cell subpopulation in normal immunodefective, and autoimmune mice. J Exp Med. 1983;157(1):202–18.

52. Hayakawa K, Hardy RR, Honda M, Herzenberg LA, Steinbergt AD, Herzenberg LA. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. Proc Natl Acad Sci USA. 1984;81(8):2494–8.

53. Hayakawa K, Hardy RR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. J Exp Med. 1985;161(6):1554–68.

54. Düber S, Hafner M, Krey M, Lienenklaus S, Roy B, Hobeika E, et al. Induction of B-cell development in adult mice reveals the ability of bone marrow to produce B-1a cells. Blood. 2009;114(24):4960–7.

55. Kantor A. A new nomenclature for B cells. Immunol Today. 1991;12(11):388.

56. Kantor AB. The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells). Immunol Today. 1991;12(11):389–91.

57. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. Nat Rev Immunol. 2011;11(1):34–46.

58. Hastings WD, Gurdak SM, Tumang JR, Rothstein TL. CD5+/Mac-1− peritoneal B cells: A novel B cell subset that exhibits characteristics of B-1 cells. Immunol Lett. 2006;105(1):90–6.

59. Ghosn EEB, Yang Y, Tung J, Herzenberg LA, Herzenberg LA. CD11b expression distinguishes sequential stages of peritoneal B-1 development. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(13):5195–200.

60. O'Garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G, Howard M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. Eur J Immunol. 1992;22(3):711–7.

61. Duan B, Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity. Autoimmun Rev. 2006;5(6):403–8.

62. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown L, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(5):2250–5.

63. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. Annu Rev Immunol. 2002;20:253–300.

64. Youinou P, Mackenzie L, Katsikis P, Merdrignac G, Isenberg DA, Tuaillon N, et al. The relationship between CD5-expressing B lymphocytes and serologic abnormalities in rheumatoid arthritis patients and their relatives. Arthritis Rheum. 1990;33(3):339–48.

65. Ito T, Ishikawa S, Sato T, Akadegawa K, Yurino H, Kitabatake M, et al. Defective B1 Cell Homing to the Peritoneal Cavity and Preferential Recruitment of B1 Cells in the Target Organs in a Murine Model for Systemic Lupus Erythematosus. J Immunol. 2004;172(6):3628–34.

66. Borrello MA, Phipps RP. Fibroblasts support outgrowth of splenocytes simultaneously expressing B lymphocyte and macrophage characteristics. J Immunol. 1995;155(9):4155–61.

67. Borrello MA, Phipps RP. Fibroblast-Secreted Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Responsible for Generation of Biphenotypic B/Macrophage Cells from a Subset of Mouse B Lymphocytes. J Immunol. 1999;163(7):3605–11.

68. Popi AF, Motta FLT, Mortara RA, Schenkman S, Lopes JD, Mariano M. Co-ordinated expression of lymphoid and myeloid specific transcrip- tion factors during B- 1 b cell differentiation into mononuclear phagocytes in vitro. Immunology. 2009;126(1):114–22.

69. Almeida SR, Aroeira LS, Frymuller E, Dias MÂA, Bogsan CSB, Lopes JD, et al.

Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. Int Immunol. 2001;13(9):1193–201.

70. Popi AF, Osugui L, Perez KR, Longo-Maugéri IM, Mariano M. Could a B-1 Cell Derived Phagocyte "'Be One'" of the peritoneal macrophages during LPS-driven inflammation? PLoS One. 2012;7(3):e34570.

71. Tumurkhuu G, Koide N, Dagvadorj J, Noman ASM, Khuda II, Naiki Y, et al. B1 cells produce nitric oxide in response to a series of toll-like receptor ligands. Cell Immunol. 2010;261(2):122–7.

72. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Eur J Pharmacol. 2004;500(1-3):255–66.

73. Marlettaz MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. J Biol Chem. 1993;268(17):12231–4.

74. Ha S, Tsuji M, Suzuki K, Meek B, Yasuda N, Kaisho T, et al. Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. J Exp Med. 2006;203(11):2541–50.

75. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA, Chen J. B-1 and B-2 Cell – derived Immunoglobulin M Antibodies Are Nonredundant Components of the Protective Response to Influenza Virus Infection. J Exp Med. 2000;192(2):271–80.

76. Gao J, Ma X, Gu W, Fu M, An J, Xing Y, et al. Novel functions of murine B1 cells: Active phagocytic and microbicidal abilities. Eur J Immunol. 2012;42(4):982–92.

77. Chen M, Mun H, Piao L, Aosai F, Norose K, Mohamed RM, et al. Induction of Protective Immunity by Primed B-1 Cells in Toxoplasma gondii-Infected B Cell-Deficient Mice. Microbiol Immunol. 2003;47(12):997–1003.

78. Yoder BJ, Goodrum KJ. Plasmodium chabaudi chabaudi: B-1 Cell Expansion Correlates with Semiresistance in BALB/cJ Mice. Exp Parasitol. 2001;98(2):71–82.

79. Gaubert S, Viana Da Costa A, Maurage C-A, Lima ECS, Fontaine J, Lafitte S, et al. X-linked immunodeficiency affects the outcome of Schistosoma mansoni infection in the murine model. Parasite Immunol. 1999;21(2):89–101.

80. Paciorkowski N, Porte P, Shultz LD, Rajan T V. B1 B Lymphocytes Play a Critical Role in Host Protection against Lymphatic Filarial Parasites. J Exp Med. 2000;191(4):731–5.

81. Popi AF, Godoy LC, Xander P, Lopes JD, Mariano M. B-1 cells facilitate Paracoccidioides brasiliensis infection in mice via IL-10 secretion. Microbes Infect. 2008;10(7):817–24.

82. Minoprio P, Cheikh MC El, Murphy E, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coffman R, Coutinho A, et al. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. J Immunol. 1993;151(8):4200–8.

83. Hoerauf A, Solbach W, Lohoff M, Röllinghoff M. The Xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. Int Immunol. 1994;6(8):1117–24.

84. Babai B, Louzir H, Cazenave PA, Dellagi K. Depletion of peritoneal CD5+ B cells has no effect on the course of Leishmania major infection in susceptible and resistant mice. Clin Exp Immunol. 1999;117(1):123–9.

85. Arcanjo AF, Larocque-de-Freitas IF, Rocha JDB, Zamith D, Costa-da-Silva AC, Nunes MP, et al. The PGE2/IL-10 Axis Determines Susceptibility of B-1 Cell-Derived Phagocytes (B-1CDP) to Leishmania major Infection. PLoS One. 2015;10(5):e0124888.

86. Gonzaga WFKM, Xavier V, Vivanco BC, Lopes JD, Xander P. B-1 cells contribute to susceptibility in experimental infection with Leishmania (Leishmania) chagasi. Parasitology. 2015;142(12):1506–15.

87. Huynh C, Andrews NW. The small chemical vacuolin-1 alters the morphology of lysosomes without inhibiting Ca2+-regulated exocytosis. EMBO Rep. 2005;6(9):843–7.

88. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402–8.

89. Vaine CA, Soberman RJ. The CD200-CD200R1 inhibitory signaling pathway: immune regulation and host-pathogen interactions. Adv Immunol. 2014;121:191–211.

90. Ghosn EB, Russo M, Almeida SR. Nitric oxide-dependent killing of Cryptococcus neoformans by B-1-derived mononuclear phagocyte. J Leukoc

Biol. 2006;80(1):36–44.

91. de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, et al. MyD88 is essential for clearance of Leishmania major: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. Eur J Immunol. 2003;33(10):2822–31.

92. Muraille E, De Trez C, Brait M, De Baetselier P, Leo O, Carlier Y. Genetically Resistant Mice Lacking MyD88-Adapter Protein Display a High Susceptibility to Leishmania major Infection Associated with a Polarized Th2 Response. J Immunol. 2003;170(8):4237–41.

93. Lima-junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva ALN, Mineo TWP, et al. Inflammasome-derived IL-1β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. Nat Med. 2013;19(7):909–15.

94. Ghosh D, Chakraborty P. Involvement of protein tyrosine kinases and phosphatases in uptake and intracellular replication of virulent and avirulent Leishmania donovani promastigotes in mouse macrophage cells. Biosci Rep. 2002;22(3-4):395–406.

95. Charette SJ, Cosson P. A LYST/beige homolog is involved in biogenesis of Dictyostelium secretory lysosomes. J Cell Sci. 2007;120(14):2338–43.

96. Sepulveda FE, Burgess A, Heiligenstein X, Goudin N, Ménager MM, Romao M, et al. LYST controls the biogenesis of the endosomal compartment required for secretory lysosome function. Traffic. 2015;16(2):191–203.

97. Cortez C, Real F, Yoshida N. Lysosome biogenesis/scattering increases host cell susceptibility to invasion by Trypanosoma cruzi metacyclic forms and resistance to tissue culture trypomastigotes. Cell Microbiol. 2015;1–13.

98. Ndjamen B, Kang B, Hatsuzawa K, Kima PE. Leishmania parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. Cell Microbiol. 2010;12(10):1480–94.

99. Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH, Barclay AN, Wright GJ. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. Trends Immunol. 2002;23(6):285–90.

100. Stow JL, Low PC, Offenhäuser C, Sangermani D. Cytokine secretion in macrophages and other cells: Pathways and mediators. Immunobiology.

2009;214(7):601–12.

101. de Souza Carmo ÉV, Katz S, Barbiéri CL. Neutrophils reduce the parasite burden in Leishmania (Leishmania) amazonensis-infected macrophages. PLoS One. 2010;5(11):e13815.

102. Hirano T. Interleukin 6 and its Receptor: TenYears Later. Int Rev Immunol. 1998;16(3-4):249–84.

103. Thies FG, Fernanda M, Laurindo L, Perez EC, Novaes e Brito RR, Mariano M, et al. Cross Talk between Peritoneal Macrophages and B-1 Cells In Vitro. PLoS One. 2013;8(5):e62805.

104. von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. 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. 1998;188(8):1547–52.

105. Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. J Exp Med. 1989;169(1):59–72.

106. Verma R, Balakrishnan L, Sharma K, Khan AA, Advani J, Gowda H, et al. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. J Cell Commun Signal. 2015;1–7.

107. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico. Revisão. Acta Cirúrgica Bras. 2002;17(6):417–23.

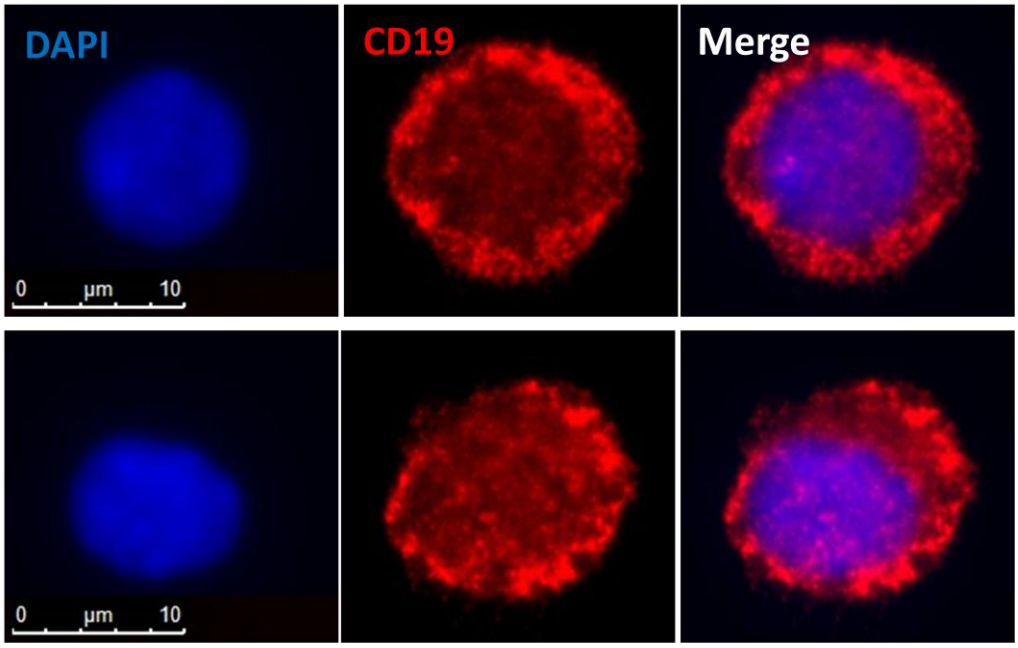
108. Assreuy J, Cunha FQ, Epperleind M, Noronha-Dutraa A, O'Donnell C, Liew FY, et al. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of Leishmania major. Eur J Immunol. 1994;24(3):672–6.

109. Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira JMB, Riley LW, Wilson ME, et al. Resistance of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasi. BMC Infect Dis. 2007;7:1–12.

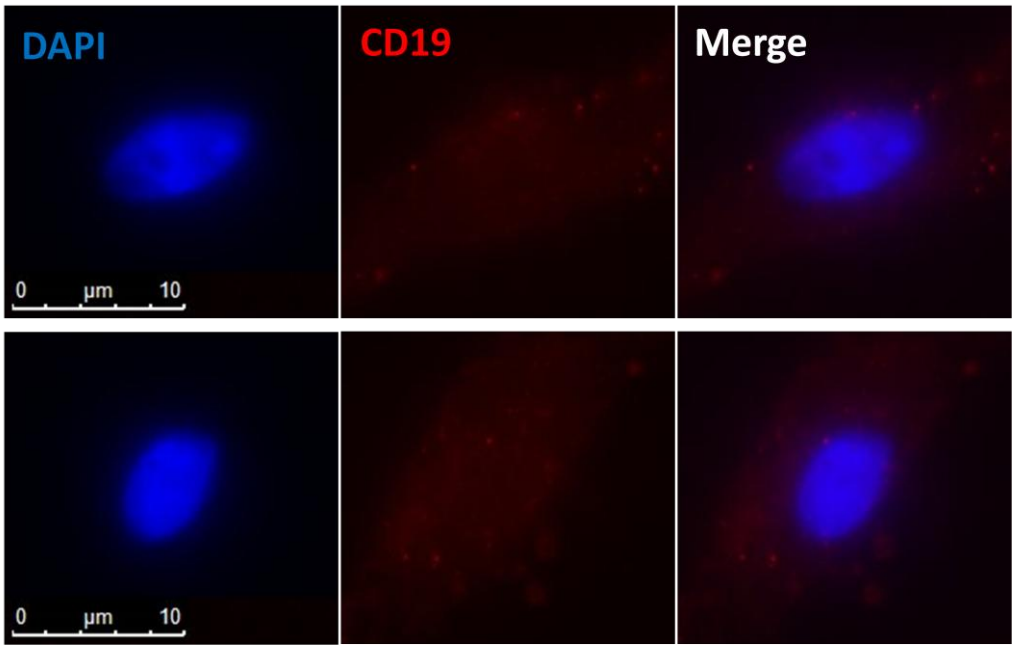
APÊNDICES

APÊNDICE A – Marcação de CD19 das células peritoneias do sobrenadante de 5º dia e de macrófagos de medula de camundongos C57BL/6.

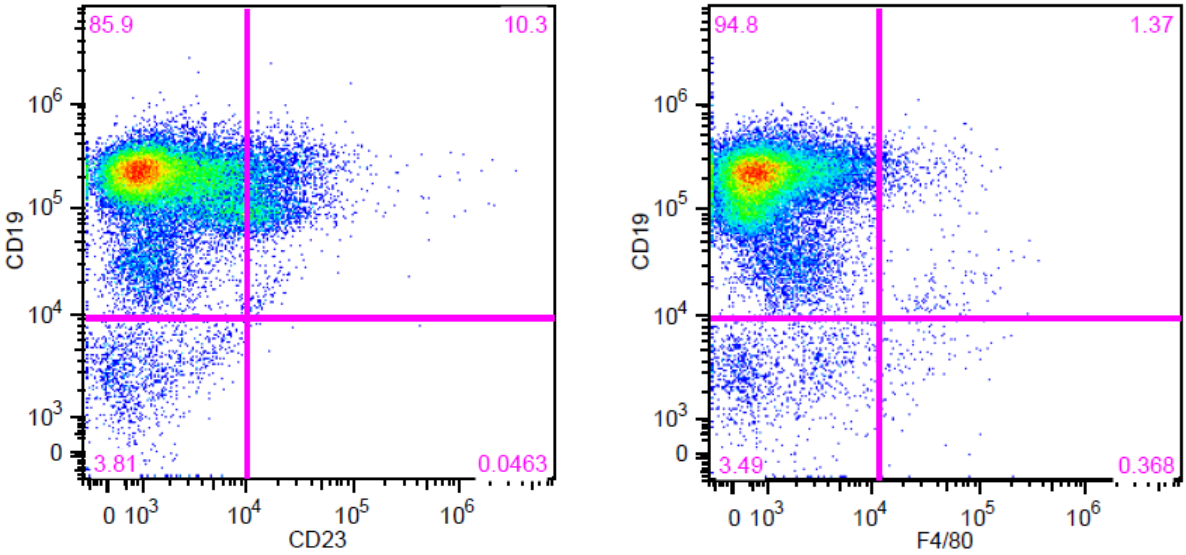
Células do sobrenadante



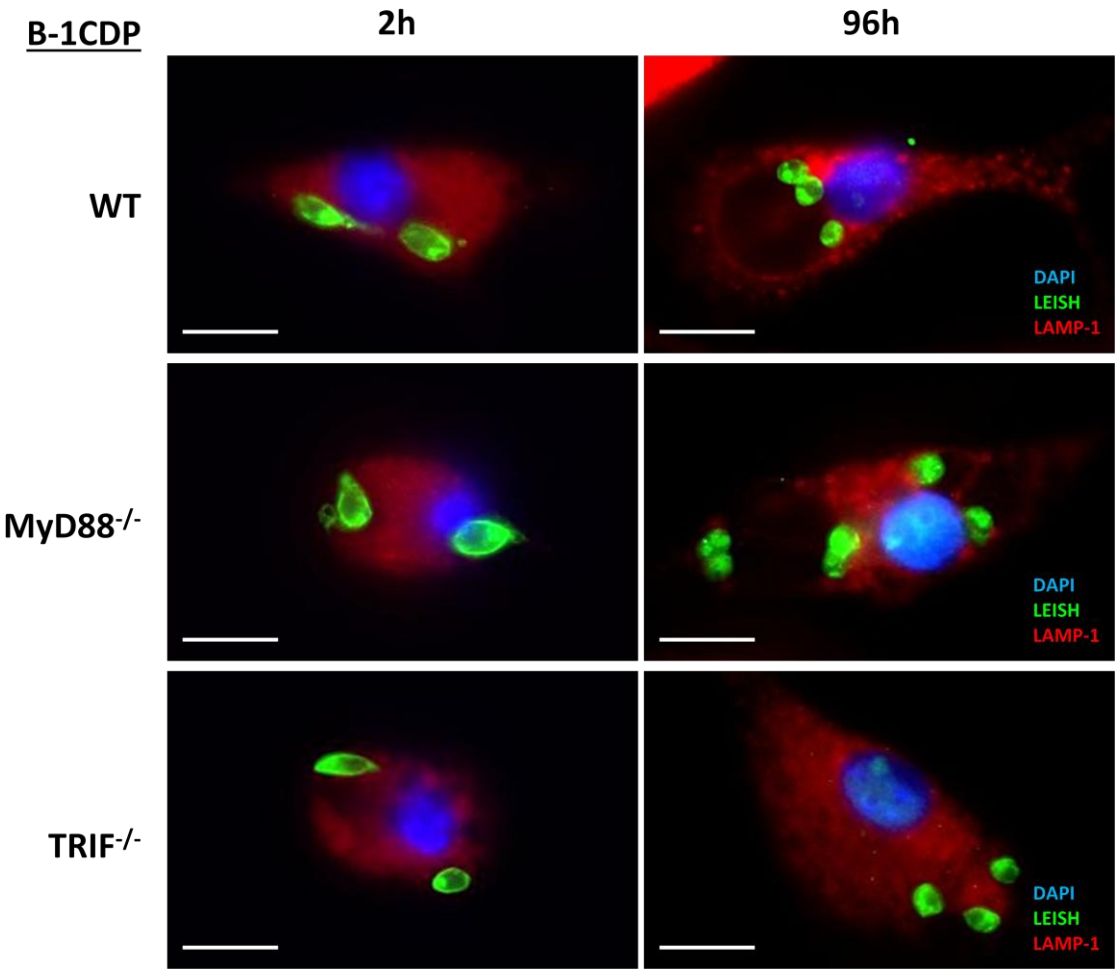
Macrófagos de medula



APÊNDICE B – Citometria do sobrenadante de 3º dia de células peritoneais de camundongos BALB/c, marcação de CD19, CD23 e F4/80.

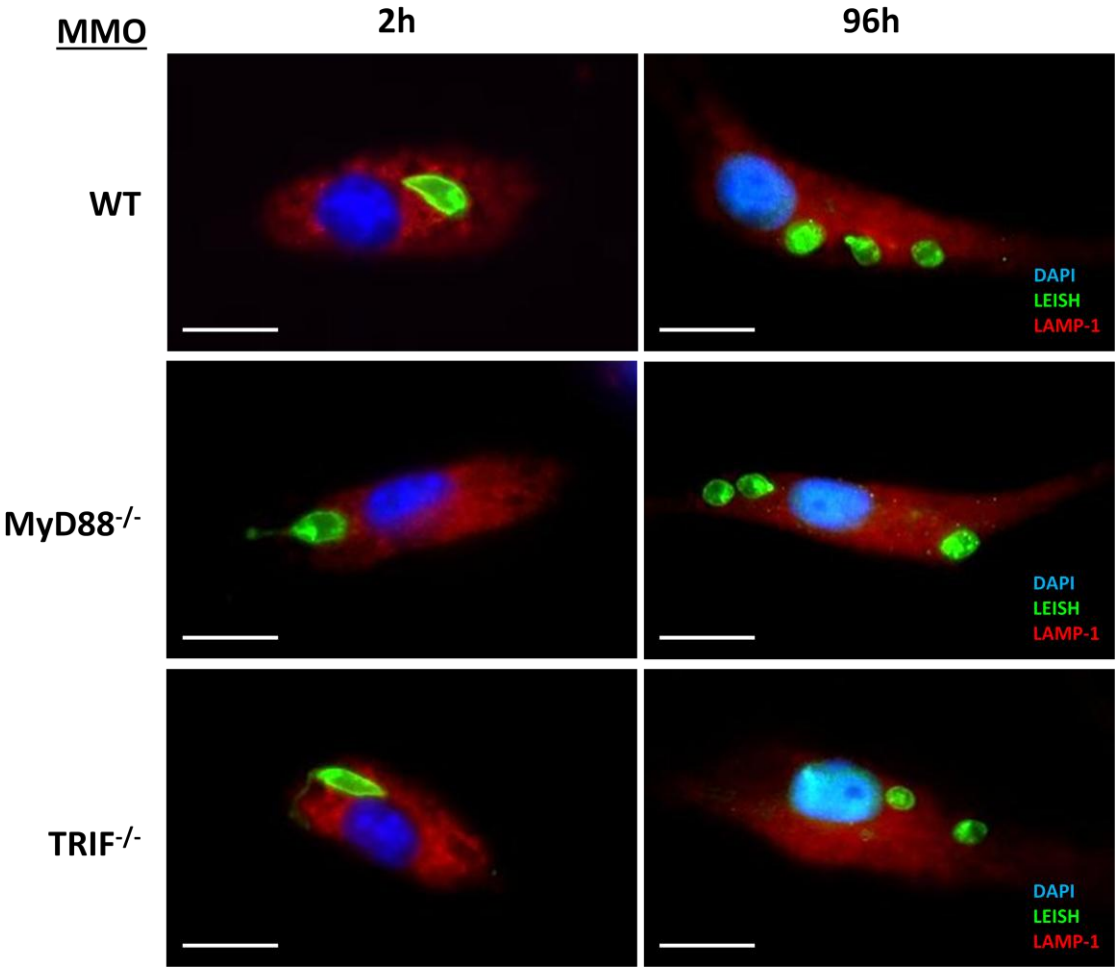


APÊNDICE C – Imagens de imunofluorescência representativas do experimento de B-1CDPs WT, MyD88$^{-/-}$ e TRIF$^{-/-}$ infectados com *L. (L.) amazonensis* ilustrando sua multiplicação.



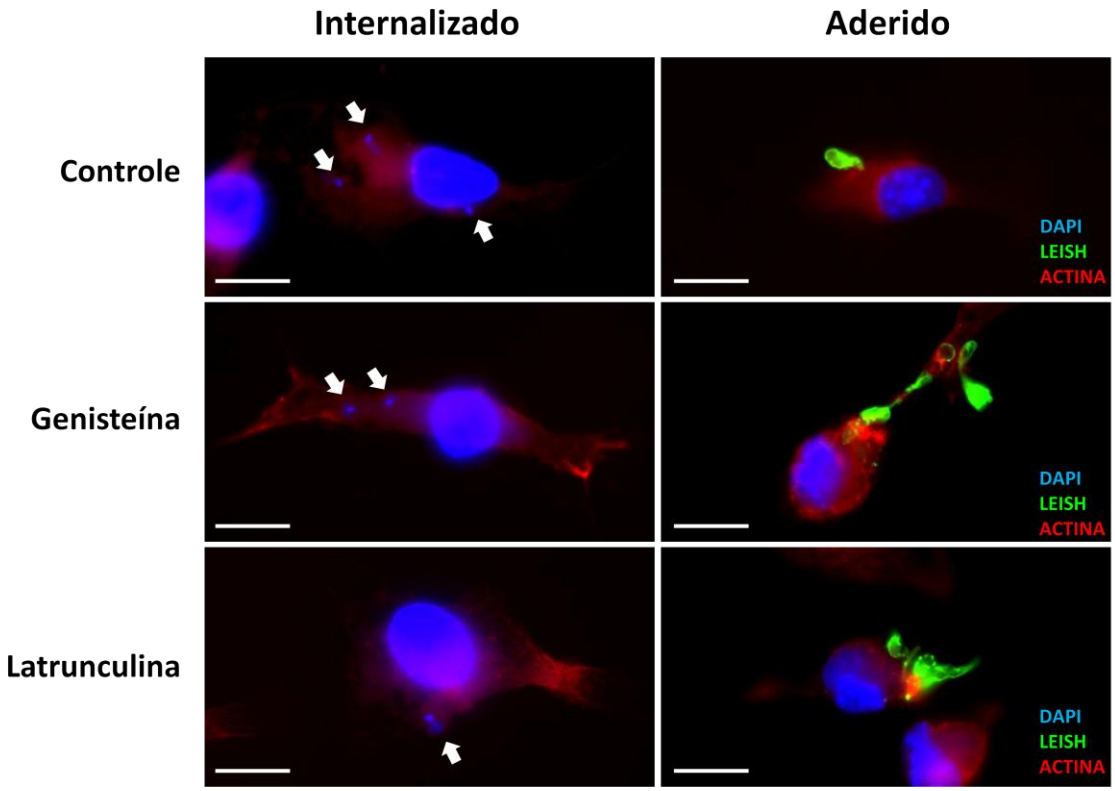
Barra de escala corresponde a 10 µm

APÊNDICE D – Imagens de imunofluorescência representativas do experimento de MMOs WT, MyD88$^{-/-}$ e TRIF$^{-/-}$ infectados com *L. (L.) amazonensis* ilustrando sua multiplicação.



Barra de escala corresponde a 10 µm

APÊNDICE E – Imagens de imunofluorescência exemplificando a contagem dos parasitos aderidos e internalizados dos ensaios sobre a avaliação da capacidade fagocítica.



Barra de escala corresponde a 10 µm e as setas brancas indicam o núcleo do parasito internalizado quando o mesmo não possuía marcação em verde.