

Estudo de macrófagos alternativamente ativados em leishmaniose murina.

Marcondes Sena Filho^I, Milton Adriano Pelli de Oliveira^{II}

Departamento de Imunologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública,
 Universidade Federal de Goiás.

I- Aluno PIBIC – junior_senna@brturbo.com.br

II- Professor Orientador - mapoliv@usp.br

Palavras-chave: *Leishmania major*, Macrófagos Alternativamente Ativados, CD301.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença endêmica que se difunde em países de clima tropical, geralmente subdesenvolvidos e com população rural abundante e/ou com cidades situadas muito próximas de regiões com ampla vegetação silvestre. As Américas são amplamente atingidas pela enfermidade desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, sendo o Brasil um dos países mais afetados. Atualmente, não se tem perspectivas de total extinção da doença, pois, além da mesma ser nativa de regiões com vegetação silvestre, afetando cães e tatus, por exemplo, ainda não há vacinas eficazes contra leishmaniose. De 1985 a 1999, foram registrados no país 388.115 casos autóctones, mostrando que a leishmaniose continua progredindo (Funasa, 2000).

A doença é classificada como uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, a qual é transmitida ocasionalmente ao ser humano por flebotomíneos, conhecido popularmente por "Mosquito Palha" (Desjeux, 2004). Em infecções naturais, o parasita é inoculado na pele do hospedeiro através da picada do inseto, que por sua vez possui os protozoários que se desenvolveram em seu intestino anterior e migraram para o esôfago e prosbócita já em sua forma infectante (promastigota). (Da Silva e Sacks, 1987; Mauel, 1996).

Um dos modelos experimentais mais utilizados atualmente é a inoculação da forma infectante do parasito, cultivados *in vitro*, em diferentes linhagens de camundongos, como os BALB/c, que apresentam uma suscetibilidade natural à

infecção por *Leishmania major* (*L. major*). O estudo com essas diferentes linhagens possibilita uma melhor compreensão a cerca do desenvolvimento da leishmaniose e das respostas imunes inatas e adquiridas induzidas pelo parasito (Sacks e Anderson, 2004)

Como em toda resposta imune/inflamatória, células residentes do tecido infectado pelo parasito atraem outras células inflamatórias, como os polimorfonucleares (PMN), onde os principais representantes são os neutrófilos, células mononucleares, incluindo monócitos (precursores de macrófagos e células dendríticas), linfócitos e células *Natural Killer* (Beil, Meinardus-Hager *et al.*, 1992; Bajenoff, Breart *et al.*, 2006).

Uma vez inoculados, os protozoários são internalizados por fagócitos, onde passam a residir em fagossomos. Os mesmos sofrem um processo de maturação e fusão com organelas endocíticas, formando assim o vacúolo parasitário (Solbach e Laskay, 2000). De acordo com a ativação dos macrófagos, estes podem ser divididos em pelo menos dois grupos: macrófagos ativados por via clássica (induzidos por citocinas inflamatórias, como IFN γ e TNF α), que têm alto poder microbicida e produzem maior quantidade de IL-12 capaz de induzir uma resposta Th1 (celular específica) protetora contra o parasito; macrófagos alternativamente ativados (aaM0) (induzidos por IL-4, IL10 e IL13), possuem baixo poder microbicida e maior produção de IL-10, podendo favorecer a reprodução do parasito (Gordon, 2003; Rodriguez-Sosa, Rivera-Montoya *et al.*, 2006).

A característica não microbicida dos aaM0 é atribuída ao fato do mesmo não utilizar a L-arginina para produzir óxido nítrico, como os macrófagos ativados por via clássica, e sim, para a produção de poliaminas e uréia, desfavorecendo a atividade microbicida contra parasitos fagocitados pelo mesmo (Gordon, 2003). Além disso, sua produção de IL-10 pode ser potencialmente prejudicial à resposta imunológica contra o patógeno, onde a mesma leva a uma considerável inibição da produção de IL-12, promovendo uma supressão da resposta Th1, a qual é a única capaz de manter a presença e atividade microbicida dos macrófagos ativados por via clássica.

Recentemente foi descoberto que fagócitos residentes de dermes de camundongos possuem mesmos marcadores (CD301) de aaM0 (Dupasquier, Stoitzner *et al.*, 2006). O aparecimento desses fagócitos pode ser estimulado por infecções helmínticas, como a infecção por *Taenia crassiceps* em camundongos BALB/c (Raes, Brys *et al.*, 2005).

O receptor CD301 (mMGL- lectina específica para galactose/N-acetilgalactosamina), atualmente, é considerado o principal marcador específico de aaM0 (Raes, Brys *et al.*, 2005). Este, por sua vez, pode ser bloqueado pela ligação do anticorpo ER-MP23 (Dupasquier, Stoitzner *et al.*, 2006), servindo assim, como uma boa alternativa para a detecção dessas células através de ensaios imunistoquímicos, por exemplo.

Como os aaM0 podem favorecer a reprodução de leishmanias em indivíduos infectados e, conseqüentemente, a uma manutenção da doença, o presente trabalho analisou a cinética do aparecimento destas células no linfonodo drenante da lesão de animais infectados por *L. major* no decorrer da infecção, utilizando-se a expressão da molécula CD301 como marcador de superfície. Os resultados nos permitirão um maior entendimento da patogênese da leishmaniose e também facilitará estudos para interferir no desenvolvimento da mesma, abrindo caminho para utilização de novos tratamentos.

OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo investigar e avaliar a presença e cinética das populações de fagócitos portando o marcador CD301 em linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c controles e infectados com *Leishmania major* no período de 24h, 48h, 72h, 7 dias e 30 dias, buscando correlacionar os dados obtidos com a suscetibilidade natural do animal à leishmaniose.

METODOLOGIA

Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de 8-12 semanas de idade provenientes do Biotério do IPTSP/Universidade Federal de Goiás. Todos os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de 20 x 30 cm, com até 6 camundongos por gaiola com alimentação e hidratação fornecidas à vontade.

Parasitas e Infecção

Foi utilizado o clone de *L. major* (MHOM/IL/80/Friedlin) cedido pela Dra. Leda Quercia Vieira (Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de

Minas Gerais). Os parasitas foram mantidos em frascos de 75 cm² (Costar, Cambridge, MA, o E.U.A.) a 26 °C e sub-cultivados a cada dois dias, iniciando-se a cultura com 1 x 10⁵ promastigotas/mL em meio Grace (Sigma, St., Louis, MO) suplementado com 20% de soro de bovino fetal inativado (SBF, Gibco BRL, argentino), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Foram usados parasitos em fase estacionária de crescimento (quinto dia de cultura). Antes da infecção, os parasitos foram lavados três vezes em PBS, mantendo-se as leishmanias em gelo até o inoculo.

As formas infectantes foram inoculadas no coxim plantar de ambas as patas traseiras, em um total de 5 x 10⁶ parasitas em fase estacionária de crescimento em 50µl de PBS por pata.

Os animais foram sacrificados 24h, 48h, 72h, 7 dias e 30 dias após a infecção para obtenção de células dos linfonodos poplíteos.

Obtenção de anticorpos a partir de hibridomas ER-MP23

Os anticorpos monoclonais para CD301 (rato Ig2a) foram purificados em coluna de proteína G (Pierce, IL, E.U.A.) a partir de sobrenadante de cultura de hibridomas ER-MP23 doados pelo Dr. Pieter Leenen, (Centro Médico Erasmus de Rotterdam, Rotterdam, Holanda).

A purificação é seguida por diálise de 3 dias em PBS sob agitação a 4°C. A concentração de proteína foi avaliada pelo método de Bradford (Biorad). Para verificação da pureza do anticorpo, uma alíquota de 10 µL do mesmo foi submetida a uma Eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 12%.

Dotblotting para Anticorpos de ratos

A presença de anticorpos de ratos purificados foi testada por *dotblotting*, onde 5µl de cada solução aplicada na membrana de nylon (Biorad). Foram utilizados como controle positivo anticorpos ER-MP23 na concentração de 1 mg/mL e 80µg/mL previamente testados e padronizados. Como controle negativo foi utilizada a albumina 2 mg/mL (controle negativo). Após 10 minutos a membrana foi bloqueada com SBF 2% em PBS por 30 min, lavada em PBS-Tween 20 seguido pela adição do conjugado anti-rato-biotilado (1:1000) (α-Ig rato total, BIOSOURCE) que foi incubado por 30 min. Seguiu-se a incubação com streptoavidina conjugada a peroxidase 1:2000 (Zymed) por 30 min e a revelação por DAB (DAKO).

Biotilinação de Anticorpos

Para biotilinar os anticorpos foram adicionados 10µL de uma solução de Biotinamidocaproate N-hydroxysuccinimidyl (Sigma) a 20 mg/ml em 1 ml de solução contendo 750µg de anticorpos ER-MP23. A solução foi homogeneizada por 4 h, seguido por diálise contra PBS 1x por 3 dias.

Imunoistoquímica para CD301 e titulação do IgG2a recém purificado e biotilinado

Foram utilizadas lâminas limpas e silanizadas com cortes por congelamento de orelhas de camundongos BALB/c (gentilmente cortados pela equipe do Departamento de Patologia do Hospital Araújo Jorge/Goiânia-Goiás), que por sua vez eram armazenadas a fresco e livre de umidade a -20°C.

Inicialmente, as lâminas eram retiradas do congelador e submetidas à temperatura ambiente sob ventilação abundante até ficarem livres de qualquer umidade. Subseqüentemente, eram aplicados dois banhos consecutivos de 10 minutos em PBS-tween 20, para a dissolução do meio de inclusão para criostato (KILLIK, EasyPath) impregnado nos cortes. Os banhos eram seguidos por um mergulho de 10 segundos das lâminas em Acetona (Acetona PA, MERCK) e secas com ventilação abundante. Outro banho de 10 minutos em PBS-tween 20 foi aplicado. Em seguida, os cortes foram tratados com 100µl de Peróxido de Hidrogênio a 3% (diluído a partir do Peróxido de Hidrogênio 30%, MERCK) por 5 minutos por 3 vezes. Segue-se um banho em PBS-tween 20 e a incubação dos cortes em solução de bloqueio (soro de camundongo a 2% em PBS 1x) por 10 minutos.

Após bloqueio, houve a aplicação do anticorpo ER-MP23 biotilinado, nas concentrações de 10µl/ml, 20µl/ml, 50µl/ml e 100µl/ml, para a titulação do mesmo. A incubação do anticorpo específico durou 60 minutos, seguida de banho em PBS-tween 20 por 10 min. Em seguida, foi feita a incubação de estreptoavidina conjugada a peroxidase (Zymed) diluída em 1:500 em solução de bloqueio por 30 minutos. A incubação foi sucedida por banho em PBS-tween 20 por 10 minutos e revelado com DAB (DAKO). A contra-coloração foi realizada com Corante Azul (Instant Prov) e Vermelho Neutro (SIGMA), seguida por montagem em glicerol (REAGEN) e lamínulas.

Obtenção das células totais do linfonodo

Os linfonodos poplíteos dos camundongos injetados com *L. major* ou PBS (controle) foram removidos assepticamente e triturados em placas de petri. As células obtidas foram lavadas com PBS em centrífuga (SORVALL RT 6000) 300 x g a 20°C, e ressuspensas na concentração de 5×10^5 células/100µL em PBS 1x com 5% de SFB inativado.

A suspensão celular foi utilizada na preparação das lâminas, previamente silanizadas, em citocentrífuga (FANEN), com a aplicação de 100µl da suspensão em cada poço. As lâminas eram identificadas, secas a temperatura ambiente e mantidas a fresco, em frascos com três unidades cada, livres de umidade a -20°C.

Imunocitoquímica para detecção de células CD301+

Lâminas contendo células de linfonodos eram descongeladas e fixadas por 5 segundos em acetona (MERK), lavadas por 10 minutos em PBS-tween 20, bloqueadas por 10 min com PBS contendo 2% de soro de camundongo e lavadas novamente por 10 min em PBS-tween 20. A incubação com o anticorpo primário específico biotilado ER-MP23 foi feita na concentração de 20µg/ml *valor obtido a partir da titulação em cortes de orelha) por 60 minutos. Outro banho de PBS-tween 20 por 10 minutos foi aplicado.

A partir daí, foi adicionada uma solução de estreptoavidina conjugada a fosfatase alcalina (Zymed) diluída 1:500 em solução de bloqueio. Novamente as lâminas foram lavadas em PBS-tween 20 por 10 minutos e o ensaio revelado com o NBT/BCIP (ZYMED), preparado de acordo com instruções do fabricante. A contra-coloração foi feita com o corante Verde Luz, doado pela Dra. Aline Carvalho Batista (Departamento de Ciências Estomatológicas - Universidade Federal de Goiás), seguidas de montagem das lâminas com glicerol e lamínulas.

Lâminas contendo macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *Taenia crassiceps* por 54 dias foram gentilmente cedidas pela mestrandia Vânia Beatriz Lopes Moura (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - Universidade Federal de Goiás).

Análise quantitativa e estatística dos resultados

O número de células CD301 positivas (CD301+) foi quantificado por meio de análise morfológica, utilizando microscópio de luz sob o aumento de uma objetiva de 40x. Para cada amostra, foram quantificadas duas mil células em campos aleatórios e não repetidos.

A partir do número total de células (positivas + negativas = 2000) e do número total de células positivas por amostra, obteve-se, pela regra de três, a porcentagem de células positivas em cada uma. Com as porcentagens de todas as amostras, calculou-se as porcentagens medianas e seus respectivos desvios padrão, observados em cada grupo.

Os resultados foram analisados e comparados estatisticamente através do teste de análise de variância ANOVA complementada pelo Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni ($p < 0,05$), com o auxílio do programa GraphPad Prism® 5.

RESULTADOS

Anticorpos de Rato foram purificados de sobrenadante de cultura de hibridomas ER-MP23

A cultura do hibridoma produtor de anticorpos (rato IgG2a) para o marcador CD-301 foi mantida por volta de 45 dias, possibilitando o armazenamento de aproximadamente 1000mL de sobrenadante de cultura recolhido durante todo o cultivo, a cada dois dias.

Após purificação do sobrenadante em proteína G e diálise de 3 dias, obteve-se uma alíquota de aproximadamente 1000 μ l, com uma concentração protéica aproximada de 750 μ g/ml, segundo o resultado obtido pelo Teste de Bradford. Para certificar de que as proteínas presentes na alíquota eram realmente anticorpos livres de contaminação com outras proteínas (albumina, por exemplo), uma amostra de 10 μ l foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. Observou-se claramente a presença de três bandas correspondentes aos pesos moleculares de 25kDa, 50kDa e 150kDa. Poucas bandas foram notadas em outras alturas, sendo estas fracamente marcadas. Estes dados sugerem que a maior parte da proteína presente na alíquota era constituída de anticorpos, pois os pesos moleculares detectados na eletroforese coincidiam ao peso molecular conhecido das cadeias leves, pesadas e do anticorpo como um todo, respectivamente (dado não mostrado).

Após a demonstração de que houve uma boa purificação dos possíveis anticorpos, foi realizado o teste de *dotblotting* para garantir que eram realmente anticorpos de ratos que estavam sendo produzidos pelos hibridomas. Na **figura 1** pode-se observar a formação de halos hipercrômicos, correspondendo a área onde os anticorpos foram depositados, sendo que a amostra de IgG2a em concentração igual a 1000 $\mu\text{g/ml}$ apresentou um halo mais denso (**Figura 1-I**) e os anticorpos na concentração de 80 μg apresentou uma mancha menos densa (**Figura 1-II**). Os possíveis anticorpos recém purificados que também devem pertencer ao isotipo IgG2a e cuja concentração protéica foi igual a 750 $\mu\text{g/ml}$, apresentou uma densidade intermediária (**Figura 1-III**). Como o conjugado utilizado no *dotblotting* era específico para Ig total de rato, acredita-se que os anticorpos obtidos são derivados de rato.

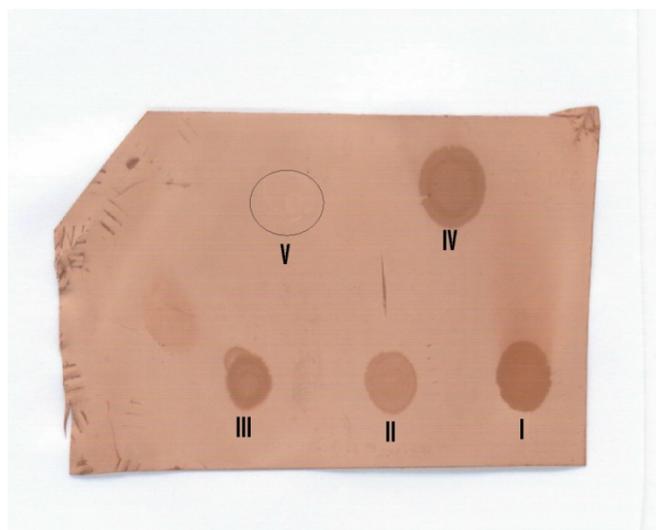


Figura 1 – *Dotblotting* em fita de nylon da alíquota obtida da purificação do sobrenadante de cultura do hibridoma ER-MP23 com concentração protéica de 750 $\mu\text{g/ml}$ (**III**). Como controle positivo foram usados os anticorpos ER-MP23 já padronizados nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/ml}$ (**I**), 80 $\mu\text{g/ml}$ (**II**) e produto de ascite com hibridoma ER-MP23 com diluição de 1:100, concentração desconhecida e não padronizado (**IV**). Como controle negativo foi usada albumina a 2mg/ml (**V**). Cada halo corresponde a 5 μl da amostra correspondente, onde nenhuma se encontrava previamente biotilizada.

Anticorpos obtidos de sobrenadante de cultura do hibridoma ER-MP23 reconhecem células CD301+ em derme de camundongos BALB/c.

Para minimizar as etapas durante a imunocitoquímica utilizada neste trabalho, decidiu-se biotilinar os anticorpos purificados. A **figura 2** apresenta um *dotblotting* positivo revelado na ausência de um conjugado biotilinado, indicando que o processo de biotilinação foi eficiente.

Para ter segurança que os anticorpos produzidos eram específicos para células portadoras do marcador CD301, realizou-se a imunistoquímica em cortes por congelação de orelhas de camundongos BALB/c, onde o perfil de marcação de células CD301+ já foi bem caracterizada (Dupasquier, Stoitzner *et al.*, 2006). Constatou-se que houve marcação específica de células de formato alongado situadas, em sua maioria, na derme, principalmente na região subepitelial (**figura 3a e 3b**), condizendo com a literatura revisada.

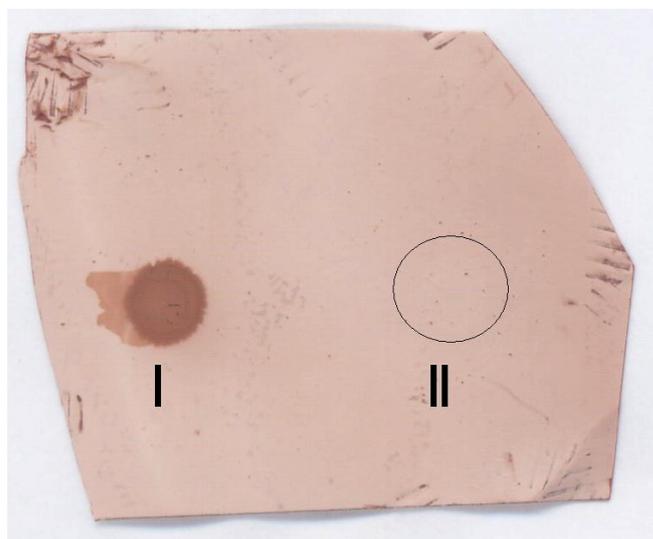


Figura 2 – *Dotblotting* em fita de nylon da alíquota com concentração protéica de 750 μ g/ml obtida da purificação do sobrenadante de cultura do hibridoma ER-MP23 após ser submetida ao processo de biotilinação (**I**). Como controle negativo foi utilizada albumina à 2mg/ml (**II**). Cada halo corresponde a 5 μ l da amostra correspondente, onde não foi utilizado anticorpo α -rato biotilinado para marcação do IgG2a de rato (ER-MP23).

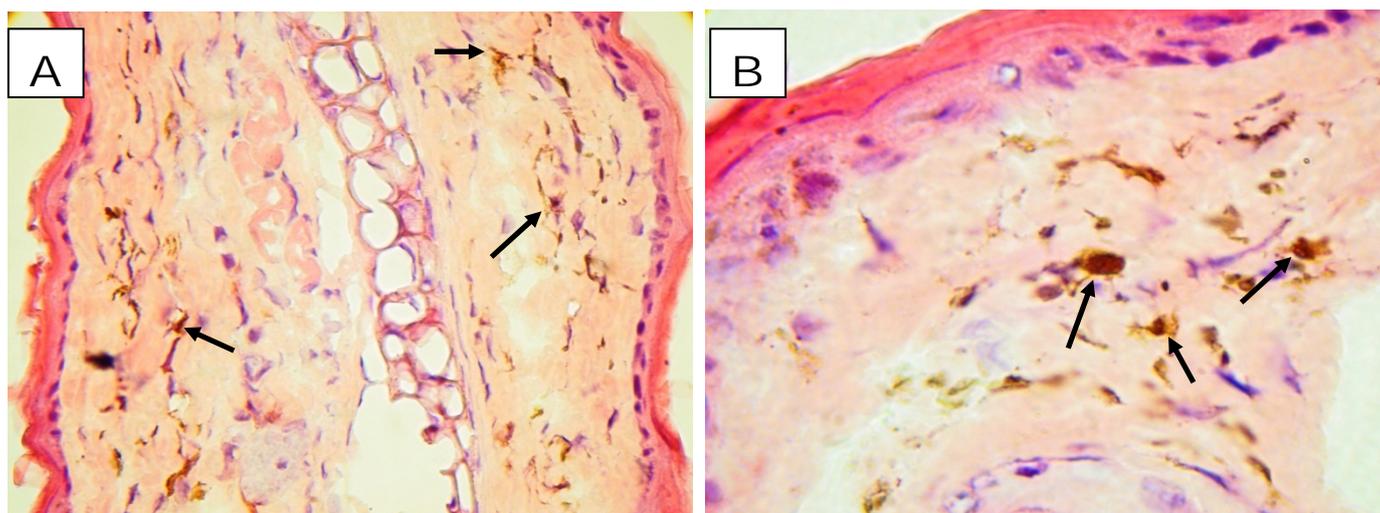


Figura 3 – (A) Imunoistoquímica para células CD301+ realizada em cortes por congelamento de orelha de camundongo BALB/c, ampliada por objetiva de 40x. Células CD301+ espalhadas por toda extensão da derme, na região subepitelial, distribuídos heterogeneamente (setas). **(B)** Mesmo corte ampliado por objetiva de 100x. Marcações nítidas e bem definidas em células fusiformes na região subepitelial (setas).

Anticorpo reconhece fagócito CD301+ em lavados peritoneais de camundongos BALB/c infectados com Taenia crassiceps

Para verificar a capacidade deste anticorpo marcar células em imunocitoquímica, realizou-se esta técnica em células obtidas a partir do lavado peritoneal de camundongos BALB/c infectados com *Taenia crassiceps*, já que trabalhos anteriores sugerem a presença de células portadoras do marcador CD301 em fases tardias da infecção por este patógeno (Raes, Brys *et al.*, 2005).

Na **figura 4** pode-se observar uma boa especificidade de marcação, onde a aparência morfológica (célula grande, com citoplasma abundante e núcleo oval e bem definido) da célula marcada sugere que a mesma caracteriza-se por ser um macrófago.

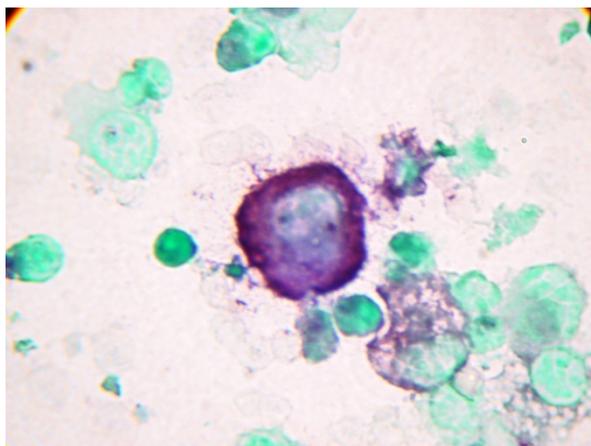


Figura 4 – Imunocitoquímica para células CD301+ realizada em amostra de lavado peritoneal de camundongos BALB/c infectados com *Taenia crassiceps*, ampliada por objetiva de 100x. Célula maior que as demais, com citoplasma amplo e núcleo bem definido e oval.

Os fagócitos CD301+ estão presentes em linfonodos de camundongos BALB/c

Após demonstração de que estes anticorpos marcam especificamente fagócitos CD301+, tentou-se observar se estes estão presentes em linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c. Com a técnica de imunocitoquímica em células obtidas dos respectivos linfonodos pôde-se confirmar tal hipótese.

As **figuras 5a e 5b** exemplificam as células encontradas, apresentando marcação bem específica. Estas se apresentaram morfológicamente semelhantes e maiores que as demais não marcadas, tendo um citoplasma abundante e núcleo oval bem definido (assim como as células encontradas em lavados peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *Taenia crassiceps*).

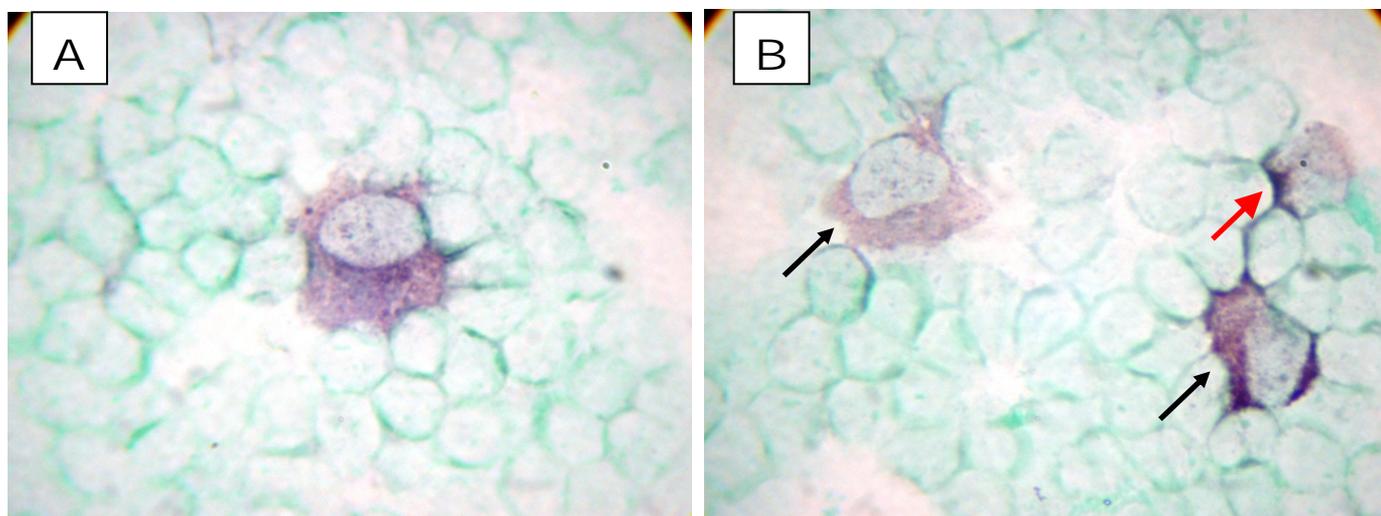
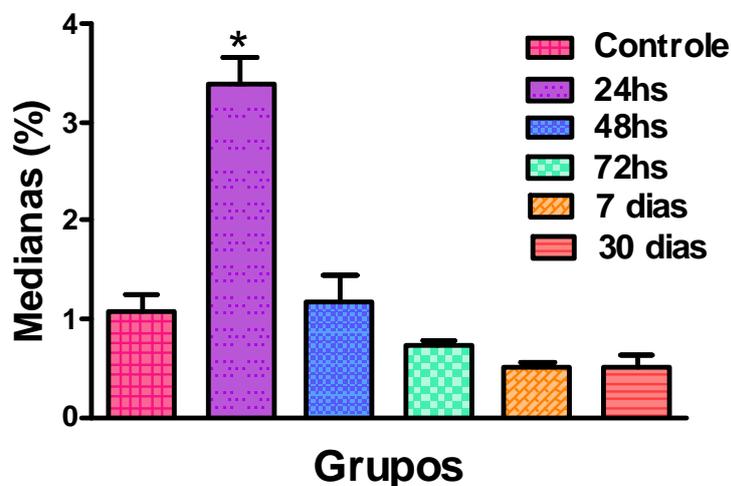


Figura 5 – (A) Imunocitoquímica para células CD301+ em linfonodo poplíteo, drenante de sítio de infecção da pata traseira do camundongo BALB/c, ampliado por objetiva de 100x. Célula aparentemente maior que as demais não marcadas, com citoplasma amplo, núcleo oval e bem definido (semelhante às células encontradas no lavado peritoneal). **(B)** Mesma lâmina, sob aumento de 100x. As células marcadas aparentam ser morfológicamente semelhantes entre si (setas pretas). Células fracamente marcadas (seta vermelha) também foram consideradas positivas na análise quantitativa de CD301+ nos linfonodos analisados.

O número de fagócitos CD301+ no linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectadas com L. major aumenta nas primeiras 24h de infecção.

A presença dos fagócitos CD301+ sempre foi notada em linfonodos infectados e controles. Percentualmente, a variação entre os grupos estudados foi pequena, salvo o grupo com 24 horas de infecção, que se destacou dos demais devido ao relativo aumento das células CD301+. No **Gráfico 1** pode-se observar as medianas das porcentagens encontradas em cada grupo com seus respectivos desvios padrão, evidenciando que a cinética dos fagócitos CD301+ só sofre variação significativa (aumento do número de fagócitos) entre o grupo com infecção de 24hs e aos demais.

Comparação das medianas obtidas a partir das porcentagens de células CD301+ encontradas nos linfonodos



* Diferença significativa com os demais grupos

Gráfico 1 – Medianas da porcentagem de células CD301+ em um total de duas mil células quantificadas por linfonodo de cada grupo, com seus respectivos desvios padrão. Nota-se que o único grupo que apresentou diferença significativa foi o de 24 horas de infecção.

DISCUSSÃO

Os macrófagos desempenham diferentes e importantes papéis na resposta imunológica em geral, sendo estes muitas vezes antagônicos, como possivelmente ocorre na resposta imunológica nas infecções por *leishmania*. Os macrófagos alternativamente ativados e os ativados por via clássica podem ser um grande exemplo desse antagonismo. O fato das células CD301+, possíveis aaM0, serem residentes da derme de camundongos (Dupasquier, Stoitzner *et al.*, 2006) e possuírem uma característica não microbicida (Rodriguez-Sosa, Rivera-Montoya *et al.*, 2006), pode fazer delas um alvo estratégico para as *leishmanias* recém inoculadas, servindo-as como um verdadeiro “esconderijo” (Battaglia M, 2006) nas primeiras horas de infecção, evitando que as mesmas sejam capturadas por fagócitos com poderes microbicidas, como os macrófagos ativados por via clássica, por exemplo.

O aumento significativo do número celular CD301+, verificado nos linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c com patas infectadas por *L. major* nas primeiras 24 horas de infecção, sugere tal comportamento. Os parasitos podem ter sido fagocitados por essas células, que por sua vez migraram para os linfonodos drenantes da região para desempenharem o seu papel de apresentadoras de antígenos, provavelmente. A partir daí, essas células podem ter tido três destinos: migraram para outros linfonodos, entraram em apoptose ou foram induzidas a deixarem de expressar o marcador CD301 por algum motivo. O fato do número dessas células decair, como foi detectado a partir das 48 horas de infecção, até voltar à mesma proporção demonstrada no controle, sugere que a partir desse momento as células CD301+ presentes são residentes do linfonodo, assim como foi demonstrado nos controles.

Tal comportamento destes possíveis aaM0 pode ser um fator de suscetibilidade do animal a infecção por *L. major*. A elevada taxa parasitaria

resultante da reprodução dos parasitos internalizados por essas células pode sobressair à capacidade da resposta imune do hospedeiro, possibilitando aos parasitos uma manutenção de sua população. Além disso, as células CD301+ podem estar produzindo IL-10 (Gordon, 2003), inibindo assim a produção da citocina pró-inflamatória IL-12 (Trinchieri, 2003), favorecendo ainda mais a manutenção parasitaria.

Estudos complementares a respeito da proporção de citocinas presentes nos linfonodos, como a IL-10 e IL-12 em infecções por *L. major*, bem como ensaios imunocitoquímicos utilizando a dupla marcação para CD301+ e *leishmania*, respectivamente, podem elucidar ainda mais a participação desses fagócitos na leishmaniose.

CONCLUSÃO

Através do presente estudo conclui-se que as células CD301+ estão presentes em linfonodos de camundongos BALB/c. Só houve alterações significativas no número das mesmas entre grupo com 24 horas de infecção e os demais. Os outros grupos apresentaram uma população de células CD301+ proporcionalmente igual.

A presença dessas células pode ser um fator de suscetibilidade desses animais, pois as mesmas podem internalizar os parasitos sem mata-los, proporcionando um ambiente favorável para a reprodução e disseminação do mesmo. Estudos complementares são necessários para elucidar melhor o papel dessas células em camundongos infectados com *L. major*.

REFERÊNCIAS

1. Bajenoff, M., B. Breart, *et al.* Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. **J Exp Med**, v.203, n.3, Mar 20, p.619-31. 2006.
2. Battaglia M, G. S., Bacchetta R, Roncarolo Mg. Tr1 cells: From discovery to their clinical application. **Seminars in Immunology**, v.18, p.120-127. 2006.
3. Beil, W. J., G. Meinardus-Hager, *et al.* Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **J Leukoc Biol**, v.52, n.2, Aug, p.135-42. 1992.

4. Da Silva, R. e D. L. Sacks. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. **Infect Immun**, v.55, n.11, Nov, p.2802-6. 1987.
5. Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.27, n.5, Sep, p.305-18. 2004.
6. Dupasquier, M., P. Stoitzner, *et al.* The dermal microenvironment induces the expression of the alternative activation marker CD301/mMGL in mononuclear phagocytes, independent of IL-4/IL-13 signaling. **J Leukoc Biol**, v.80, n.4, Oct, p.838-49. 2006.
7. Funasa. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**: Ministério da Saúde. 2000. 1-62 p.
8. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.1, Jan, p.23-35. 2003.
9. Muel, J. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. **Adv Parasitol**, v.38, p.1-51. 1996.
10. Raes, G., L. Brys, *et al.* Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. **J Leukoc Biol**, v.77, n.3, Mar, p.321-7. 2005.
11. Rodriguez-Sosa, M., I. Rivera-Montoya, *et al.* Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. **Cell Immunol**, v.242, n.2, Aug, p.61-71. 2006.
12. Sacks, D. e C. Anderson. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. **Immunol Rev**, v.201, Oct, p.225-38. 2004.
13. Solbach, W. e T. Laskay. The host response to *Leishmania* infection. **Adv Immunol**, v.74, p.275-317. 2000.
14. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.2, Feb, p.133-46. 2003.