UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**Papel do receptor padrão do tipo TOLL9 (TLR9) no
controle da infecção experimental por *Leishmania*
*infantum***

Laís Amorim Sacramento

Ribeirão Preto - SP

2013

LAÍS AMORIM SACRAMENTO

**Papel do receptor padrão do tipo TOLL9 (TLR9) no controle da
infecção experimental por *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Carregaro
Pereira

Ribeirão Preto - SP

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sacramento, Laís Amorim

Papel do receptor padrão do tipo TOLL9 (TLR9) no controle da
infecção experimental por *Leishmania infantum*.

Ribeirão Preto, 2013. 109p.; Il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e
Aplicada.

Orientador(a): Pereira, Vanessa Carregaro.

1. Leishmaniose visceral. 2. TLR9. 3. Células dendríticas. 4.
Recrutamento de neutrófilos.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com auxílio Financeiro da Capes/INCTV, CNPQ e FAPESP.

Laís Amorim Sacramento

**Papel do receptor padrão do tipo TOLL9 (TLR9) no controle da
infecção experimental por *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área de
concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof^ª. Dr^a. Vanessa Carregaro Pereira
FMRP – USP

Prof^ª. Dr^a. Isabel Kinney Ferreira Miranda Santos
FMRP – USP

Prof. Dr. Roque Pacheco
UFS

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Olga Sacramento e Dailton Sacramento,
pelo amor imensurável e incentivo constante.
Vocês são o meu alicerce.*

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colhe.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª Dr^ª Vanessa Carregaro pela orientação, pelos ensinamentos e incentivo nos momentos necessários. Muito obrigada pela confiança depositada em mim.

Ao Prof. Dr. João Santana pelo exemplo de amor e dedicação à ciência. Agradeço infinitamente a oportunidade de fazer parte do laboratório de Imunoparasitologia.

Ao Prof. Dr. Marcos Rossi pelas suas sugestões e discussões para a realização deste trabalho e suas técnicas de laboratório Maria Elena e Mônica, pelo valioso auxílio.

Ao Prof. Dr. Fernando Cunha pela contribuição direta neste trabalho e disponibilidade do Laboratório de Inflamação e Dor (LID) e à Msc. Silvia Trevelin pela colaboração.

Aos professores que compõem a banca, Dr^ª. Isabel Miranda e Dr. Roque Pacheco, pela disponibilidade concedida.

Aos Leishmanióticos Manuela, Djalma e Diego pelas discussões científicas, auxílio nos experimentos, momentos de descontração e amizade.

À Ana Cristine pela dedicação e profissionalismo com que cuida da nossa pós-graduação.

A grande família do Laboratório de Imunoparasitologia e ao grupo do carrapato, técnicos, bioteristas, alunos de iniciação científica, mestrando, doutorando e pós-docs pelas discussões científicas, extra-científicas e convivência.

A CAPES/INCT, CNPq, FAPESP e FAEPA pelo incentivo financeiro.

Agradecimentos especiais:

Aos meus pais, pela dedicação ao longo dos anos. Vocês são sinônimos de companheirismo e amor. Acredito que é praticamente impossível traduzir meu sentimento de gratidão a vocês. Obrigada por tudo, amo vocês!

Ao Paulo, meu namorado querido, obrigada pelo companheirismo, amor, incentivo, compreensão, apoio e respeito às minhas escolhas. Você faz parte de toda essa trajetória.

A toda minha grande família Sacramento e Amorim, obrigada por todo amor, incentivo e compreensão da minha ausência.

Às amigas Fernanda e Nathália, pela convivência diária e momentos de descontração. Além de amigas, se tornaram minhas irmãs. Vocês foram essenciais nesses dois anos em Ribeirão Preto.

Às Imunogirls e Imunoboy, obrigada pela grande amizade, carinho e companheirismo ao longo desses anos. Vocês contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos de Recife, que mesmo distantes fazem parte da minha vida. Obrigada pelo carinho e incentivo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELA.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XIX
1 INTRODUÇÃO	22
1.1 As leishmanioses.....	22
1.2 Relação Parasito x Hospedeiro	26
1.3 Receptores do Tipo Toll (TLRs) durante a infecção por <i>Leishmania</i>	33
2 HIPÓTESE.....	38
3 Objetivos.....	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 METODOLOGIA.....	42
4.1 Animais.....	42
4.2 Parasitos e Infecção Experimental	42
4.3 Análise da Carga Parasitária dos Animais Infectados	42
4.4 Análise Histopatológica do Fígado.....	43
4.5 Antígeno Particulado de <i>L. infantum</i>	44
4.6 Imuno-histoquímica (IH)	44
4.7 Obtenção das Células do Baço.....	45
4.8 Fenotipagem dos Leucócitos Presentes no Baço	45
4.9 Cultura de células de baço de animais infectados com <i>L. infantum</i>	46
4.10 Ensaio de migração celular <i>in vivo</i>	46
4.11 Diferenciação de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC).....	47
4.12 Infecção de células dendríticas <i>in vitro</i> com <i>L. infantum</i>	47
4.13 Dosagem de Quimiocinas	48
4.14 Extração de RNA total e confecção do DNA complementar (cDNA)	48
4.15 PCR em Tempo Real	49

4.16 Ensaio de Migração Celular <i>in vivo</i>	51
4.17 Isolamento de neutrófilos da medula óssea	51
4.18 Cultura <i>in vitro</i> de Neutrófilos	52
4.19 Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos	52
4.20 Análise estatística dos resultados	53
5 RESULTADOS	55
5.1 A infecção por <i>L. infantum</i> induz o aumento da expressão de TLR9 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	55
5.2 TLR9 participa no controle da infecção por <i>L. infantum</i>	58
5.3 Análise fenotípica do baço de animais WT e TLR9 ^{-/-} infectados com <i>L. infantum</i>	63
5.4 A ausência de TLR9 em neutrófilos não interfere na sua ativação e migração para o sítio de infecção	68
5.5 TLR9 participa no processo de maturação e na produção de fatores quimiotáticos de neutrófilos pelas células dendríticas	73
6 DISCUSSÃO	80
7 SUMÁRIO	91
8 CONCLUSÃO	94
9 MODELO PROPOSTO	96
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recrutamento celular durante a leishmaniose cutânea	30
Figura 2. Infecção por <i>L. infantum</i> induz aumento da expressão de TLR9 pelas células dendríticas	57
Figura 3. TLR9 é importante para o controle da infecção por <i>L. infantum</i>	60
Figura 4. Processo inflamatório hepático durante a infecção por <i>L. infantum</i>	62
Figura 5. O recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório durante a infecção por <i>L. infantum</i> é dependente de TLR9	67
Figura 6. Ausência de TLR9 em neutrófilos não influencia na sua ativação e recrutamento	72
Figura 7. TLR9 é importante para a produção de fatores quimioatraentes de neutrófilos durante a infecção por <i>L. infantum</i>	76
Figura 8. TLR9 participa do processo de maturação das células dendríticas frente à infecção por <i>L. infantum</i>	77
Figura 9. Células dendríticas produzem fatores quimiotáticos de neutrófilos frente à infecção por <i>L. infantum</i> de forma dependente de TLR9	78
Figura 10. Modelo proposto	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.....50

Tabela 2. Fenotipagem das células do infiltrado inflamatório no baço de animais infectados com *L. Infantum*65

LISTA DE ABREVIATURAS

APC - Células apresentadoras de antígeno

BMDC – Células dendríticas derivadas de precursores da medula óssea

BSA – Albumina sérica bovina

CCL2 – Ligante de quimiocina (C-C motif) 2

CCR2 – Receptor de quimiocina C-C do tipo 2

CD - *Cluster* de diferenciação

cDNA - DNA complementar

Células NK - Células *Natural Killer*

CpG – Sequência de dinucleotídeo citosina-guanina

CXCL - *Chemokine (C-X-C motif) ligand*

CXCR - Receptor de quimiocina CXC

DC - Célula dendrítica

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GR-1 – Receptor de granulócito 1

h- hora

H&E - Hematoxilina e eosina

HIV- Human immunodeficiency vírus

HPRT – Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

IRFs - Fatores reguladores de Interferon

KC – *Keratinocyte-derived cytokine*

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutânea disseminada

LM – Leishmaniose mucocutânea

LPG - Lipofosfoglicano

LPS – Lipopolissacarídeo

LV – leishmaniose visceral

MAL - *MyD88-adaptor-like*

MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*

MHCII – Complexo principal de histocompatibilidade

MIP - Macrophage inflammatory protein

MIP-2 - *Macrophage inflammatory protein-2*

MyD88 - *Myeloid differentiation primary response gene 88*

NET - *neutrophils extracellular traps*

NF-κB - Fator nuclear κB

NO – Óxido nítrico

PAMPs - Padrões moleculares associados ao patógeno

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico

PCR – Reação da polimerase em cadeia

PtdSer – Fosfatidilserina

RNA - Ácido ribonucleico

RRP - Receptores de reconhecimento padrão

Th – Célula T *helper*

TIR - *Toll-like and IL-1 receptor*

TIRAP - *TIR-containing adaptor protein*

TLR - *Toll-like Receptors*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TRAM - *TRIF-related adaptor molecule*

TRIF - *Containing adaptor-inducing IFN (interferon)- β*

Who – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

WT - *wild type*

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica e potencialmente fatal causada, no Brasil, pelo protozoário *Leishmania infantum*. A resistência à LV é relacionada ao desenvolvimento de uma resposta imune celular eficiente. Para isso, células dendríticas (DCs) reconhecem produtos antigênicos do parasito, através dos *Toll-like Receptors* (TLRs), e, após ativação, produzem fatores, que irão orquestrar o recrutamento celular e desenvolvimento da resposta imune protetora. Dentre os vários TLRs, tem sido demonstrado que o TLR9 está relacionado com a resistência à infecção em modelo de leishmaniose cutânea. No presente estudo, nosso objetivo foi determinar o papel do TLR9 durante a infecção por *L. infantum*. Nossos resultados demonstram que a expressão de TLR9 é modulada positivamente durante a infecção *in vivo* e *in vitro* pela *L. infantum*. O TLR9 é essencial para o controle da infecção contra *L. infantum*, uma vez que camundongos TLR9^{-/-} são mais susceptíveis à infecção, apresentando maior número de parasitos no baço e fígado na 4^a e 6^a semana pós-infecção. A fenotipagem de leucócitos presente no baço demonstrou que camundongos TLR9^{-/-} possuem menor número de neutrófilos. De maneira semelhante, a análise imuno-histoquímica mostrou uma reduzida marcação de células 7/4⁺ (específica para neutrófilos) no fígado de animais TLR9^{-/-}. A falha na migração de neutrófilos observada em animais TLR9^{-/-} não está associada a uma incapacidade de ativação dos polimorfonucleares, mas sim a deficiências na produção de fatores quimiotáticos, como CXCL1 (KC) e CXCL2 (MIP-2) nos órgãos-alvo. Investigando o mecanismo de ação, as células dendríticas oriundas de animais TLR9^{-/-} falham em seu processo de ativação frente à infecção *in vitro* e *in vivo* com *L. infantum*, apresentando um fenótipo semi-maduro, com redução de expressão de MHC-II e moléculas coestimuladoras. Interessante que essas células

apresentaram deficiência na produção de mediadores quimiotáticos de neutrófilos como KC e MIP-2, e consequentemente, induzindo o menor recrutamento de neutrófilos *in vitro*. Em conjunto, nossos resultados demonstram que o TLR9 é essencial para o controle da infecção por *L. infantum*, através de um mecanismo dependente do recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório mediado pela ativação apropriada de fatores quimiotáticos de neutrófilos pelas DCs.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, células dendríticas, TLR9, recrutamento de neutrófilos.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a chronic and potentially fatal disease caused by protozoan *Leishmania infantum*, in Brazil. The resistance against VL is related to the development of cellular immune response. During infection, the dendritic cells (DCs) recognize antigenic products through Toll-like Receptors (TLRs) and then orchestrate the cellular recruitment and immune response development. Among several TLRs, it has been showed that TLR9 is related to resistance to cutaneous leishmaniasis. In the present study, our aim was to determinate the role of TLR9 during *L. infantum* infection. Our results demonstrated that TLR9 is up regulated during *in vitro* and *in vivo* *L. infantum* infection. TLR9 is critical for protective immunity against *L. infantum*, since TLR9^{-/-} mice infected were more susceptible to infection, displaying high amounts of parasites in spleen and liver, at 4th and 6th weeks post-infection. Phenotyping the leukocytes into the spleen, TLR9^{-/-} mice presented reduced neutrophils when compared to WT. Likewise, imunohistochemistry analyses showed the reduced of 7/4⁺ cells (specific to neutrophils) staining into the TLR-9^{-/-} liver. The failure of neutrophil migration is not associated to their stage of activation impaired, but due the reduced levels of CXCL1 (KC) and CXCL2 (MIP-2) (neutrophil chemoattractant) produced into the spleen cells culture from infected TLR9^{-/-}. Furthermore, DCs from TLR9^{-/-} presented a semi-mature stage during *in vitro* and *in vivo* *L. infantum* infection, showing reduced expression of MHC-II and co-stimulatory molecule. Interestingly, the ability of DC to produce the neutrophil chemotact mediators (KC and MIP-2) was completely reduced by that derived from TLR9^{-/-} mice, affecting neutrophil migration into Boyden chamber. Altogether, we demonstrated that TLR9 presents a critical role in the

protective response against *L.infantu* through the mechanism dependent of crosstalk between neutrophil recruitment and DC activation.

Keywords: Visceral Leishmaniose, dendritic cell, TLR9, neutrophil recruitment.

Introdução

1 –INTRODUÇÃO

1.1) As leishmanioses

As leishmanioses formam um complexo de doenças, clinicamente divididas em visceral e tegumentar (cutânea, mucocutânea e difusa) e estão entre as dez endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde, devido ao seu caráter endêmico em 88 países de várias regiões do mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais das Américas, África, Ásia e Europa. Estima-se que aproximadamente 12 milhões de pessoas estejam atualmente infectadas, sendo a incidência anual estimada em cerca de 2 milhões de novos casos (nos quais, aproximadamente, 1-1,5 milhões de casos são de leishmaniose cutânea-LC e 500.000 de leishmaniose visceral-LV) (WHO, 2004 <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/res-dch-leish-priorities.pdf>). Dentre as leishmanioses, a leishmaniose visceral (LV) é endêmica em 65 países com um total estimado de 350 milhões de pessoas sob risco de contrair a infecção, sendo 90% dos casos concentrados na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (DESJEUX, 2004).

Os parasitos do gênero da *Leishmania* são protozoários unicelulares, heteróxeos, pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*. Atualmente as espécies de *Leishmania* que infectam o homem são classificadas em complexos agrupados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, de acordo com seu ciclo de vida no interior do intestino do inseto vetor. O subgênero *Viannia*, inclui espécies em que os promastigotas se desenvolvem na porção posterior do intestino do inseto vetor, com migração para a porção anterior. No subgênero *Leishmania*, os

promastigotas multiplicam-se na porção anterior e média do trato digestivo do inseto vetor (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK; PETERS, 1987).

A *Leishmania* apresenta-se em duas formas distintas durante seu ciclo biológico, dependendo do hospedeiro que habita. Quando na forma amastigota, os parasitos são ovóides e possuem flagelo interiorizado; enquanto na forma promastigota, apresenta cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo livre. A transmissão da *Leishmania* depende do inseto vetor, os flebotomíneos do gênero *Lutzomya* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (LAINSON et al., 1987). O ciclo biológico da leishmaniose é iniciado quando o inseto vetor, sempre uma fêmea, faz o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado e ingerem monócitos ou macrófagos infectados. No tubo digestivo do inseto, essas células são rompidas liberando as formas amastigotas que, após divisão binária, transformam-se em promastigotas procíclicas e se aderem ao trato digestivo médio e anterior do flebotomíneo. As formas promastigotas procíclicas são pequenas, ovóides e com pouca motilidade. Após diversas multiplicações por divisão binária, os parasitas tornam-se promastigotas afiladas e com muita motilidade, denominados promastigotas metacíclicas (SACKS, D. L.; BRODIN; TURCO, 1990; SARAIVA et al., 1995). Cerca de 48 a 72 horas após o repasto alimentar, alguns dos promastigotas metacíclicas migram para o esôfago, faringe e probóscida do flebotomíneo e, após o repasto sanguíneo, infectam outro hospedeiro vertebrado, reiniciando um novo ciclo biológico.

A *Leishmania* apresenta uma extensa diversidade genética, mas os mecanismos envolvidos nessa diversidade eram desconhecidos até Akopyants et al. (2009) descobrirem que as formas promastigotas da *Leishmania* possuem um ciclo sexuado consistente com o processo meiótico (AKOPYANTS et al., 2009). A variabilidade genética decorrente desse processo nos parasitos é de grande relevância epidemiológica,

uma vez que a hibridação pode permitir que a *Leishmania* se adapte a novos nichos ecológicos, vetores, e hospedeiros, incluindo seres humanos e animais domésticos.

Dentre os hospedeiros vertebrados em potencial, inclui-se uma grande variedade de mamíferos, sendo os mais comuns os roedores e os canídeos, mas também podem infectar os edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados e primatas, incluindo o homem (NEAL; REEVES; PETERS, 1990; PETERS, W. et al., 1990).

As doenças causadas pelos parasitas do gênero *Leishmania* podem ser classificadas em dois tipos, de acordo com os órgãos acometidos: Leishmaniose Visceral, que acomete as vísceras, principalmente baço, fígado e medula óssea e a Leishmaniose Tegumentar (Leishmaniose Tegumentar Americana, no Novo Mundo e Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo), que acomete a pele e mucosas, podendo apresentar-se clinicamente como leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LM) e cutânea disseminada (LCD).

A LC no Novo Mundo é causada por espécies pertencentes ao complexo *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, e *L. peruviana*) e é caracterizada por lesões ulceradas, únicas, de bordas elevadas e circulares, com pouca secreção e indolores, podendo haver casos de controle da infecção com cura espontânea (HERWALDT; ARANA; NAVIN, 1992; MARSDEN et al., 1984), mas também podem evoluir para a forma LM sem invasão nas vísceras. A LM é uma consequência da LC, que pode surgir mesmo anos após a cicatrização da primeira úlcera da pele, resultando em uma progressiva ulceração na mucosa nasal e/ou junções mucocutâneas. Nos países do Velho Mundo, na região da Bacia do Mediterrâneo e na Ásia, o complexo *Leishmania tropica* (que inclui as espécies *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*) causa lesões restritas à pele – LC (EL-HASSAN et al., 1995; REITHINGER et al., 2007; WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005).

A leishmaniose cutânea disseminada (LCD) é a forma rara da LC, caracterizada por nódulos cutâneos disseminados por toda região corpórea, em decorrência de uma resposta imune mediada por células deficientes. As espécies relacionadas a essas manifestações clínicas pertencem ao complexo *Leishmania mexicana*, o qual inclui as espécies *L. mexicana*, *L. pifanoi* e *L. amazonensis*.

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da doença, tem caráter sistêmico e crônico e, quando não tratada, pode ser fatal. Estima-se que a taxa de letalidade em países em desenvolvimento pode ser de 100% em 2 anos (WHO 2011 http://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/index.html). A LV é causada por espécies do complexo *Leishmania donovani*. No Brasil e em países do Novo Mundo, o agente etiológico é a *L. infantum* e *L. chagasi*, que atualmente foram descritas como uma única espécie (MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000; MOMEN et al., 1993), enquanto que em países do Velho Mundo a LV é causada pela *L. donovani* (WILSON et al., 2005).

A doença caracteriza-se pela disseminação dos parasitos para as vísceras, baço e fígado e também para a medula óssea. Do ponto de vista clínico, a LV pode ser dividida conforme suas características clínico-laboratoriais, podendo variar desde a cura espontânea, às formas oligo ou assintomática, bem como pode progredir para a forma mais grave (ROBERTS; HANDMAN; FOOTE, 2000). Durante a fase aguda da infecção, as queixas frequentes estão relacionadas com tosse, diarreia e dor abdominal. Progressivamente, em casos mais graves, o paciente pode apresentar hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia, linfadenopatia e anemia, podendo levar ao óbito (DESJEUX, 2004).

A epidemiologia da LV vem se alterando através do tempo. Até a década de 80, a maioria dos casos concentrava-se nas áreas rurais dos municípios, aos poucos a

doença veio adquirindo característica periurbana e atualmente, encontra-se em plena urbanização, estando presente em grandes cidades. Essa mudança na distribuição da LV parece ser consequência de processo multifatorial. Acredita-se que um dos mais relevantes seja a participação do cão como reservatório doméstico da LV, assim como a adaptação do hospedeiro invertebrado, *Lutzomyia longipalpis*, ao ambiente peridomiciliar, além do aumento dos casos de co-infecção HIV-*Leishmania* (FUNASA, 2003; JERONIMO et al., 2004). O controle da LV está diretamente associado ao diagnóstico precoce atrelado ao tratamento eficiente de todos os casos humanos (FUNASA, 2003), para isso é necessário melhor o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na proteção do hospedeiro contra os parasitos.

1.2) Relação Parasito x Hospedeiro

Múltiplos fatores determinam a susceptibilidade ou resistência do hospedeiro frente à infecção por *Leishmania*; como os componentes presentes na saliva do inseto vetor, proteínas de superfície e secretadas pelos parasitos e os padrões distintos de resposta imunes gerados pelo hospedeiro (SACKS, D. L.; PERKINS, 1985). Ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, os flebotomíneos inoculam parasitas potencialmente infectantes e componentes salivares (TITUS, 2002). Estima-se que durante a inoculação de formas promastigotas de *L. major* na orelha do camundongo, são liberadas de 1000 a 100.000 parasitas e os camundongos que recebem menores quantidades de parasitas apresentam a patologia moderada (KIMBLIN et al., 2008).

Os componentes presentes na saliva dos insetos vetores possuem propriedades importantes para que a inoculação dos parasitos seja realizada de forma eficiente, como por exemplo a capacidade anti-coagulante, vasodilatadora e imunomoduladora (ZER et

al., 2001) Foi demonstrado que ao inocular *L. major* e saliva em camundongos BALB/C, estes apresentaram lesões maiores e mais parasitas quando comparados com o grupo de animais que recebeu apenas os parasitos. Ao investigar o mecanismo pelo qual a saliva torna a doença mais severa, foi verificado que há o aumento de IL-4 e consequente inibição da produção de citocinas do padrão Th1, como IFN- γ e IL-12, resposta imune relacionada à resistência a infecção (BELKAID et al., 1998).

A resposta imune inicial contra a *Leishmania* é essencialmente mediada pela resposta imune celular. A inoculação das formas infectantes dos parasitos induz o recrutamento localizado de leucócitos (PETERS, N. C. et al., 2008; THALHOFER et al., 2011) e a qualidade e a magnitude da resposta imune gerada são decisivas para o curso da infecção (SOLBACH; LASKAY, 1995). No local da inoculação da *Leishmania*, as células residentes como células dendríticas (DCs) e macrófagos, equipadas com receptores de reconhecimento padrão (RRPs), como por exemplo os Toll-like receptors (TLRs) (MUZIO et al., 2000), possibilitam o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (GORDON, 2002). A *Leishmania* interage e infecta uma grande variedade de células do hospedeiro, sendo as DCs e macrófagos indiscutivelmente as células mais importantes que regulam o desenvolvimento da infecção (LIU; UZONNA, 2012). Ao reconhecer os parasitas, as DCs aumentam a expressão de MHCII e moléculas coestimuladoras como CD40, CD80/CD86 (BOGDAN et al., 1996); aumentam a secreção de citocinas que participam da indução da resposta imune para o perfil de resistência ou susceptibilidade; e produzem quimiocinas, orquestrando seu próprio recrutamento dos tecidos para as áreas de linfócitos T do linfonodo (FÖRSTER et al., 1999) e o recrutamento de outros subtipos celulares para o sítio de inflamação (TEIXEIRA et al., 2006).

As citocinas produzidas pelas DCs orquestram o desenvolvimento da resposta imune de caráter protetor ou não protetor durante a infecção por *Leishmania*. É bem estabelecido que a resistência à infecção está relacionada com padrão de resposta do tipo Th1. As células dendríticas (DCs) capturam os parasitos no sítio de inoculação, migram para os órgãos linfóides onde estimulam a diferenciação de células T CD4⁺ “naive” em Th1 pela produção de IL-12 (ALEXANDER; BRYSON, 2005), culminando na produção de IFN- γ . A produção inicial de IL-12 também induz a ativação de células NK, NK T e T CD8⁺, que são também fontes de IFN- γ (BELKAID et al., 2002; BIRON; GAZZINELLI, 1995; SCHARTON-KERSTEN et al., 1995). Uma vez ativados pelo IFN- γ , os macrófagos são as principais células efetoras responsáveis pela destruição dos parasitas através de mecanismos dependentes de espécies reativas do oxigênio (GORAK; ENGWERDA; KAYE, 1998; LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007; TEIXEIRA et al., 2006). Esta citocina atua nos macrófagos, induzindo a ativação do óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2), que por sua vez utiliza como substrato o aminoácido L-arginina para a subsequente produção de citrulina e óxido nítrico (NO), que leva à morte dos parasitos fagocitados (BOGDAN, 2001; BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2002). A citocina TNF- α é produzida por macrófagos e age em sinergismo com IFN- γ aumentando a ativação de iNOS e, assim, levando a morte mediada por óxido nítrico (BOGDAN et al., 2002; LIEW, F. et al., 1990; LIEW, F. Y.; WEI; PROUDFOOT, 1997).

Por outro lado, um microambiente com ausência da resposta Th1 e com predomínio de IL-4, IL-13 e IL-10 induz a diferenciação e proliferação de células Th2, levando à desativação dos macrófagos, o que propicia a multiplicação do parasito e a progressão da doença, conferindo suscetibilidade à infecção (BABALOO; KAYE; ESLAMI, 2001; SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, 2002; THAKUR; MITRA;

NARAYAN, 2003). Atualmente o paradigma “Th1/Th2” na leishmaniose tem sido discutido, uma vez que foi identificado uma população de células Th1 ($CD4^+CD25^-FoxP3^-$) durante a infecção por *L. major* em animais geneticamente resistentes que secretavam IL-10 e IFN- γ concomitantemente, exacerbando a doença (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005; ANDERSON et al., 2007).

A infecção por *Leishmania* induz a secreção de inúmeras quimiocinas no sítio de inoculação (ANTONIAZI et al., 2004; RITTER; KÖRNER, 2002), as quais são essenciais para determinar a composição do infiltrado celular nos órgãos-alvo acometidos na LV, ou no sítio de inoculação durante a LC, e definir a resolução ou progressão da doença (TEIXEIRA et al., 2006). Sabe-se que durante a infecção em modelos de LV induzida por *L. donovani*, a imunidade protetora é órgão-específica. Enquanto o baço permanece cronicamente infectado resultando em esplenomegalia, o fígado consegue controlar o crescimento parasitário pela formação de granulomas (MALLA; MAHAJAN, 2006; STANLEY; ENGWERDA, 2006). A formação de granulomas hepáticos está intimamente associada ao recrutamento eficiente de neutrófilos, monócitos, células NK T e células T $CD4^+$ e T $CD8^+$, para o subsequente controle da infecção (CERVIA; ROSEN; MURRAY, 1993; STANLEY; ENGWERDA, 2006).

A dinâmica do recrutamento celular mediado pela liberação de mediadores quimioatraentes pelas DCs é mais bem estabelecida em modelo experimental de LC induzida por *L. major*. É bem descrito que os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o sítio de inoculação dos parasitas (BEIL et al., 1992; PETERS, N. C. et al., 2008; THALHOFER et al., 2011) de maneira dependente da produção de quimiocinas, como CXCL8/IL-8 em humanos (BROADDUS et al., 1994) e CXCL1 e CXCL2 em camundongos (CHARMOY et al., 2009), as quais se ligam à dois principais

receptores de superfície celular presentes nos neutrófilos do sangue periférico, o CXCR1 e CXCR2 (CHUNTHARAPAI et al., 1994, SABROE et al., 1997), sendo o CXCR2 predominantemente responsável pelo recrutamento de neutrófilos em resposta aos seus ligantes (SABROE et al., 2003). É descrito também que as formas promastigotas produzem o Fator Quimiotático de *Leishmania*, do inglês *Leishmania chemotactic factor (LCF)*, que recruta especificamente polimorfonucleares para o sítio de infecção. Seguido do recrutamento de neutrófilos, as células mononucleares compostas por monócitos precursores de macrófagos e DCs são as células que migram para o sítio de infecção. Os macrófagos ativados fagocitam a *Leishmania* e produzem CCL2, que atrai células CCR2⁺, como células NK e outros macrófagos, e outros quimioatraentes de monócitos como MIP-1 α , MIP-1 β e CCL5 (BAJÉNOFF et al., 2006; BEIL et al., 1992; MÜLLER et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2006) (**Figura 1**).

Figura 1: Recrutamento celular durante a leishmaniose cutânea. Retirado e adaptado de (TEIXEIRA et al., 2006)

Como falado anteriormente, os neutrófilos são a primeira subpopulação celular recrutada para o sítio inflamatório durante a infecção por *Leishmania* (BEIL et al., 1992; THALHOFER et al., 2011) e seu papel protetor está diretamente associado à sua rápida capacidade de migração para o sítio de infecção (NAUSEEF, 2007). Uma das atribuições clássicas dos neutrófilos é a sua capacidade de fagocitar e matar microorganismos. Estudos *in vitro* utilizando neutrófilos humanos e formas amastigotas e promastigotas de *L. donovani* atribuem o *killing* dos parasitas aos metabólitos de oxigênio (CHANG, 1981; PEARSON; STEIGBIGEL, 1981). *In vivo*, estudos ultraestruturais de lesões geradas em modelos experimentais de LC demonstram a presença de parasitas degradados dentro dos neutrófilos (BEIL et al., 1992), assim como também são encontrados um grande número de parasitas lisados no espaço extracelular de neutrófilos e outros *debris* leucocitários (POMPEU et al., 1991). Além dos mecanismos de *killing* relacionados ao estresse oxidativo, os neutrófilos formam *neutrophils extracellular traps* (NETs), que são redes de DNA associadas à histonas e peptídeos anti-microbianos, que juntos formam uma rede que captura e elimina patógenos no ambiente extracelular (KAPLAN; RADIC, 2012; WARTHA et al., 2007). Há evidências de que a *Leishmania* é capaz de induzir a formação de NETs e é eliminadas por esse mecanismo (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009).

Entretanto, alguns trabalhos sugerem que formas promastigotas de *L. major* conseguem sobreviver dentro dos neutrófilos (LAUFS et al., 2002; PETERS, N. C. et al., 2008) e possuem a capacidade de modular a apoptose dessas células após serem fagocitadas. É demonstrado que a infecção *in vitro* de neutrófilos derivados da cavidade peritoneal de camundongos ou humanos com formas promastigotas de *Leishmania* retarda a apoptose (AGA et al., 2002; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Durante a morte celular por apoptose, os neutrófilos infectados secretam MIP-1 β , que estimula o

recrutamento de macrófagos. Esses fagócitos, por sua vez, reconhecem a fosfatidilserina (PtdSer) expressa na superfície dos neutrófilos em processo de morte celular, e os fagocitam (GUEIRARD et al., 2007; MÜLLER et al., 2001; RIBEIRO-GOMES et al., 2012; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Dessa forma, é sugerido que os neutrófilos infectados são utilizados pela *Leishmania* como “Cavalo de Tróia” para transferir os parasitos, de forma silenciosa, aos macrófagos (VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

O papel protetor ou não protetor dos neutrófilos durante a infecção pela *Leishmania* ainda é bastante discutido, uma vez que os modelos de estudos de caracterização da função dos neutrófilos utilizados durante a infecção por *Leishmania* são bastante heterogêneos no que diz respeito à linhagem dos camundongos, espécie de *Leishmania* utilizada e tempo/sítio de recrutamento analisado (RIBEIRO-GOMES et al., 2012; RITTER; FRISCHKNECHT; VAN ZANDBERGEN, 2009). Para o melhor esclarecimento do real papel dos polimorfonucleares durante a infecção, foram realizados estudos utilizando anticorpos anti-GR1 para depleção dos neutrófilos. É demonstrado que durante a infecção por *L. major*, o papel dos neutrófilos parece ser linhagem-dependente, uma vez que a depleção de neutrófilos reduz a carga parasitária em camundongos da linhagem BALB/c, que são geneticamente susceptíveis à infecção, enquanto que a depleção em camundongos C57BL/6, geneticamente resistentes, houve exacerbação da infecção (LIMA et al., 1998; RIBEIRO-GOMES et al., 2004; TACCHINI-COTTIER et al., 2000). Já durante a infecção induzida pelas espécies *L. infantum* e *L. donovani*, a depleção de neutrófilos acarreta o aumento do número de parasitas no baço e fígado, sugerindo seu papel protetor na LV (MCFARLANE et al., 2008; ROUSSEAU et al., 2001; SMELT et al., 2000). De forma geral, a compreensão dos mecanismos pelos quais os neutrófilos participam da infecção por *Leishmania* e o entendimento das vias de ativação e mobilização dos neutrófilos auxiliam a identificação de alvos terapêuticos para seletivamente inibir ou ativar determinadas funções.

1.3) Receptores do Tipo Toll (TLRs) durante a infecção por *Leishmania*

A invasão do hospedeiro por agentes infecciosos patogênicos desencadeia uma série de eventos imunológicos através da interação entre uma gama diversificada de fatores de virulência do patógeno e mecanismos de vigilância do sistema imunológico do hospedeiro. A interação patógeno-hospedeiro é geralmente iniciada quando o hospedeiro reconhece estruturas moleculares conservadas conhecidas como PAMPs, que são essenciais para o ciclo de vida do patógeno (JANEWAY JR; MEDZHITOV, 2002). O reconhecimento dos PAMPs acontece através dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que são expressos principalmente em células da imunidade inata como células dendríticas, macrófagos e neutrófilos (KAWAI; AKIRA, 2010). O reconhecimento efetivo dos PAMPs induz rapidamente uma resposta imune do hospedeiro por meio da ativação de vias complexas de sinalização que culminam na indução de respostas inflamatórias mediadas por citocinas e quimiocinas, que subsequentemente irão orquestrar a eliminação do patógeno (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009). Sendo assim, a identificação dos receptores de imunidade inata que participam do reconhecimento de patógenos e desenvolvimento das respostas imunológicas é de extrema relevância para o entendimento da patogênese de diversas infecções.

Os Receptores do Tipo Toll, do inglês *Toll-like receptors (TLRs)*, são PRRs amplamente estudados e são considerados os principais sensores de patógenos, que coletivamente reconhecem estruturas de lipídeos, carboidratos, peptídeos e ácidos nucleicos que são expressos em vários grupos de agentes infecciosos como vírus, bactérias, fungos e parasitas (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011). Alguns TLRs são expressos na superfície celular, enquanto outros estão presentes na membrana de

vesículas endossomais. Foram identificados, 10 e 13 membros TLRs em humanos, e camundongos, respectivamente. TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 e 11 são expressos na superfície dos fagócitos e reconhecem lipoproteínas, peptidoglicano, zimosan (TLR2 quando associado a TLR1 e 6), lipopolissacarídeo (TLR4) e flagelina (TLR5). Os TLR3, 7, 8 e 9 estão localizados em compartimentos intracelulares e reconhecem RNA (ácido ribonucléico) de fita dupla, RNA de fita simples, DNA (ácido desoxirribonucléico) não metilado, respectivamente (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Os TLRs são estruturalmente compostos por repetições ricas em leucina em seu domínio extracelular, e um domínio de sinalização citoplasmático homólogo ao receptor de IL-1beta, denominado domínio *TIR* (*toll-like and IL-1 receptor*) (AKIRA; TAKEDA, 2004).

Os TLRs sinalizam via proteínas adaptadoras contendo domínio TIR tais como MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP [TIR-containing adaptor protein, também conhecida como MAL (*MyD88-adaptor-like*)], TRIF [*TIR-containing adaptor-inducing IFN (interferon)- β*] e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*). De forma geral, a cascata de sinalização mediada pela ativação dos TLRs leva à ativação de MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) e fatores de transcrição tais como NF- κ B (fator nuclear κ B) e IRFs (fatores reguladores de Interferon) induzindo a produção de citocinas inflamatórias e interferons (IFNs) do tipo I (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

O papel dos TLRs tem sido amplamente estudado durante a infecção por protozoários como *Plasmodium*, *Toxoplasma* e *Trypanosoma*, assim como também nas diversas espécies de *Leishmania* (BAFICA et al., 2006; CAMPOS et al., 2001; HAWN et al., 2002; SHODA et al., 2001; YAROVINSKY et al., 2005). Trabalhos demonstram que a via de sinalização do MyD88 confere proteção à infecção *in vivo* em modelo de LC. Utilizando camundongos C57BL/6, linhagem geneticamente resistente

com tendência de cura espontânea das lesões causadas por *L. major*, foi demonstrado que animais MyD88^{-/-} exibiram fenótipo de susceptibilidade, com maior número de lesões cutâneas e do número de parasitas (MURAILLE; DE TREZ; BRAIT; et al., 2003; REVAZ-BRETON et al., 2010), sugerindo a participação dos TLRs durante a infecção por *Leishmania*. Estudo demonstrou que a resistência à infecção induzida por *L. major* acontece de maneira dependente do reconhecimento do lipofosfoglicano presente na superfície do parasita via TLR2 (DE VEER et al., 2003). Recentemente, foi demonstrado que oligossacarídeos construídos baseados na estrutura do LPG, ligante de TLR2, induzem a produção de IL-12 e consequente resposta Th1, corroborando os dados que indicam TLR2 potencializa a resposta anti-leishmanicida (OSANYA et al., 2011). As consequências da ativação do TLR2 foram investigadas também em modelo de LV. O tratamento de animais Balb/c infectados com *L. donovani* com Ara-LAM (ligante de TLR2), induz uma forte resposta Th1 e reduz em 80% a infecção no baço e fígado bem como modula positivamente a expressão de TLR2 e a produção de NO e citocinas pró-inflamatórias em macrófagos infectados *in vitro* (BHATTACHARYA et al., 2010). Além dos estudos envolvendo TLR2, tem sido demonstrado que o TLR4 também está relacionado com mecanismos de resistência a doença. Foi relatado que o TLR4 controla a replicação dos parasitas durante LC induzida por *L. major* por um mecanismo dependente de NO (KROPF et al., 2004). Outros estudos demonstraram que camundongos com uma mutação no gene *tlr4* foram incapazes de curar lesões cutâneas provocadas por *Leishmania major* (MULLER et al., 1997; POLTORAK et al., 2000).

Recentemente, trabalhos têm demonstrado a importância do TLR9 no reconhecimento de sequência de CpG do DNA de microrganismos e na indução de citocinas pró-inflamatórias com consequente controle da infecção por diversas espécies de patógenos intracelulares, como por exemplo, *E. coli* e *M. bovis*, além da *L. major*

(GUILLEREY et al., 2012), bem como alguns estudos relatam que o TLR9 reconhece o DNA de outros protozoários de *T. cruzi*, *T. brucei* e *Babesia bovis* e estimula a ativação de macrófagos e células dendríticas (SHODA et al., 2001). Além da sua importância no reconhecimento dos parasitas, o TLR9 participa do controle da parasitemia durante a infecção experimental por *T. brucei* (DRENNAN et al., 2005) e *T. cruzi* (BAFICA et al., 2006). Com relação a leishmaniose, é demonstrado que o DNA da *L. major* é reconhecido pelas DCs via TLR9 (FAKHER et al., 2009; SCHLEICHER et al., 2007). O reconhecimento do parasito induz a ativação das DCs e, consequente, induz a resposta imune protetora com produção de IL-12, que irá induzir o padrão de resposta Th1, com células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ (FAKHER et al., 2009), bem como ativar células NK, que são potenciais fontes de IFN- γ (LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2007). Assim como também foi demonstrado que a hipertrofia dos lindonodos drenantes durante a LC é dependente de TLR9, indicando que este receptor está envolvido no recrutamento de celular para a resolução da infecção (CARVALHO et al., 2012).

Embora o papel protetor do TLR9 seja descrito durante a infecção por *L. major*, pouco se conhece sobre sua participação na LV. Em 2007 foi relatado que o DNA da *L. infantum* é reconhecido via TLR9 pelas DCs, e esse reconhecimento induz produção de IL-12 e consequente ativação de células NK produtoras de IFN- γ (SCHLEICHER et al., 2007), entretanto o papel deste receptor na patogênese da LV induzida por *L. infantum* permanece desconhecido. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar se o TLR9 participa da defesa contra a *L. infantum* e analisar quais os mecanismos envolvidos na suscetibilidade/resistência do hospedeiro.

Hipótese

2 - HIPÓTESE

Os TLRs são considerados os principais sensores de patógenos, que coletivamente reconhecem vários grupos de agentes infecciosos. Recentes evidências demonstram que esses receptores estão envolvidos no reconhecimento de PAMPs e desenvolvimento de mecanismos de proteção contra a infecção por espécies de *Leishmania*. Mais especificamente, trabalhos têm demonstrado a importância do TLR9 na indução da resposta imune inata e inflamatória em resposta a diversas espécies de patógenos intracelulares, dentre eles a *Leishmania*. Baseando-se nisso, nós acreditamos que o desenvolvimento da resposta imune de caráter protetor durante a LV induzida experimentalmente pela infecção por *L. infantum* seja dependente do TLR9.

Objetivos

3) Objetivos

3.1) Objetivo geral

Determinar a participação do TLR9 durante a infecção experimental por *Leishmania infantum*.

3.2) Objetivos específicos

- ✓ Analisar a expressão do TLR9 durante a infecção por *L. infantum* *in vitro* e *in vivo*;
- ✓ Avaliar a carga parasitária no baço e fígado dos animais WT e TLR9^{-/-} infectados;
- ✓ Caracterizar o perfil do infiltrado inflamatório presente nos sítios de infecção dos animais WT e TLR9^{-/-};
- ✓ Determinar o papel de TLR9^{-/-} nas células do Sistema Imune Inato, como neutrófilos e DCs *in vitro* e *in vivo* durante a infecção por *L. infantum*;
- ✓ Analisar a participação das células dendríticas no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório durante a infecção por *L. infantum*.

Animais,
Material e Métodos

4 - METODOLOGIA

4.1) Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 selvagens (do inglês *wild type* / *WT*) e camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes para TLR9 (TLR9^{-/-}), com cerca de 7 a 8 semanas de idade. Os animais pesando entre 18 e 22 g foram mantidos em micro-isoladores em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) e receberam água e ração *ad libitum* no biotério do Departamento de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, SP - Processo Nº 190-2011.

4.2) Parasitos e Infecção Experimental

Os camundongos foram infectados por via intravenosa ou intraperitoneal com 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas da cepa HU-USF 14 de *L. infantum* mantidas a 25°C em meio Schneider (Sigma-Co, Saint Louis, EUA) suplementado com soro bovino fetal a 20% (Cultilab, Campinas, SP - Brasil), 2% de urina humana masculina, 2 mM de L-glutamina, e 20 µg/mL de gentamicina (Schneider 20 %) em garrafas de cultura estéreis (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA).

4.3) Análise da Carga Parasitária dos Animais Infectados

Para detecção do número de parasitos presentes nos órgãos, o baço e o fígado de camundongos WT e TLR9^{-/-} na 4ª e 6ª semana de infecção foram removidos, pesados e a porção inferior do baço e o lóbulo esquerdo do fígado, após pesados, foram triturados em um volume de 2 mL de meio de cultura Schneider (Sigma) incompleto. O volume total foi

centrifugado a 3000 rpm, 25°C, 10 minutos e ressuspensão num volume final de 1 mL de Schneider 20%. Posteriormente, as diluições seriadas foram feitas em placas estéreis de 96 poços de fundo chato, conforme a técnica de diluição limitante descrita anteriormente por TITUS et al., 1985. A contagem de poços *Leishmania*-positivos foi realizada 15 dias após o início da cultura e o número de parasitos presentes nos órgãos foi estimado conforme descrito por BUFFET *et al.*, 1995 (BUFFET et al., 1995).

4.4) Análise Histopatológica do Fígado

Para análise histopatológica, amostras de tecido hepático foram fixadas em formaldeído a 10%, por 48h, e depois transferidas para álcool 70%. As amostras foram submetidas a uma bateria de desidratação em soluções com concentrações crescentes de álcool e xilol, e então foram incluídas em parafina, cortadas com auxílio do micrómetro (5 µm de espessura) e dispostos em lâminas. As lâminas foram incubadas a 60°C para fixação do corte e em seguida foram lavadas em xilol para retirar o excesso de parafina, e hidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao álcool 70%). Os cortes foram então corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), desidratados com concentrações crescentes de álcool (do álcool 70% ao absoluto), lavados com xilol e montados em lamínula com Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil). A mensuração da área da lesão (área do infiltrado inflamatório) nos órgãos de animais WT ou TLR9^{-/-} foi realizada com auxílio do programa Leica QWin - Quantitative Imaging (Leica Microsystems), na qual foram contadas 50 campos com a magnitude de 400x por animal individual/grupo.

4.5) Antígeno Particulado de *L. infantum*

As culturas do parasito foram mantidas conforme descrito anteriormente. Os parasitos foram coletados quando atingiram a fase estacionária de crescimento e foram submetidos a 10 ciclos de congelamento (-196°C em nitrogênio líquido) e descongelamento (56°C em banho-Maria). As proteínas foram dosadas em NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e utilizadas para estimulação das culturas celulares.

4.6) Imuno-histoquímica (IH)

O método para análise imuno-histoquímica da presença de neutrófilos no fígado de camundongos infectados por *L. infantum* foi o da imunoperoxidase, por meio da avidina-biotina-peroxidase. A reação foi realizada em cortes de fígado (5µm de espessura) obtidos de tecidos parafinados, os quais foram provenientes de camundongos WT ou TLR9^{-/-} com 2, 4 e 6 semanas após a infecção.

Inicialmente, a parafina foi removida dos cortes histológicos com xilol e hidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao álcool 70%). Em seguida, a recuperação antigênica foi realizada através do calor (banho-maria a 37 °C) utilizando tampão citrato pH 6.0 durante 30 minutos. A peroxidase endógena do tecido foi bloqueada através da incubação dos cortes com água oxigenada a 3% em PBS, por 20 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados três vezes com PBS e permeabilizados com Triton 0,5% por 20 minutos. Para o bloqueio das ligações proteicas inespecíficas foi utilizado BSA 1% durante 30 minutos. Os cortes foram finalmente incubados com anticorpo primário de superfície, específico para marcação de neutrófilos, Rat monoclonal anti-7/4 (Abcam – ab53457) diluído em BSA 1% numa titulação de 1:100, overnight à 20°C.

Após esse período, as lâminas foram lavadas e incubadas por 45 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo secundário biotinilado (Vector Laboratories). Após novas lavagens, foi adicionado o complexo avidina-biotina peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos, à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, os cortes foram lavados com PBS e a revelação da reação foi realizada através da adição do substrato diaminobenzidina DAB (Vector Laboratories). As reações foram interrompidas com água, as lâminas contra-coradas com hematoxilina de Mayer por 20 segundos e, então, montadas com Bálsamo de Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil).

4.7) Obtenção das Células do Baço

Para o isolamento de leucócitos, baços de camundongos WT ou TLR9^{-/-} foram removidos na 4^a e 6^a semana pós-infecção. Sob condições estéreis, o órgão foi macerado em RPMI 1640 (Sigma) incompleto, lavado e centrifugado (10 min, 300 x g a 4°C). As hemáceas presentes foram lisadas por choque osmótico e, imediatamente após, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 completo.

O número absoluto das células foi determinado pela contagem de alíquotas diluídas em Tripan Blue, na proporção de 1:100, em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 40x) e contador manual.

4.8) Fenotipagem dos Leucócitos Presentes no Baço

Com o objetivo de caracterizar o infiltrado celular no baço dos animais WT e TLR9^{-/-} infectados com *L. infantum*, as células obtidas de baço dos animais foram ressuspensas numa concentração de 1 x10⁶ células / 50µL. Subsequente, foram adicionados 5µg de anticorpo monoclonal anti-receptor de Fc (anti-CD16/CD32- clone 2.4G2- Pharmingen, San Diego, CA, USA) para bloqueio durante 30 minutos, a 4°C.

Após o período de incubação, foram adicionados os anticorpos monoclonais de superfícies para NK1.1 e MHC-II conjugados com FITC, CD40, GR1 e $\gamma\delta$ conjugado com PE, CD86 conjugado com APC, CD3 e CD11b conjugado com APCcy7, CD19, CD8 e CD11c conjugado com PECy7 e CD4, F4/80 conjugado com PERCP (todos anticorpos da BD Bioescience e eBioscience, San Diego, CA, EUA). Subsequente ao período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS-BSA, por 10 minutos à 500 x g, e ressuspensas em 50 μ l de PBS-formol a 1%. A aquisição das células foi realizada em citômetro de fluxo (FACs canto II; Becton Dickinson, San Jose, USA). As análises foram feitas usando o programa FlowJo (FlowCytometry Analysis Software v7.2.5) o qual permite analisar todas as células adquiridas (100.000/amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (“Gates”) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

4.9) Cultura de células de baço de animais infectados com *L. infantum*.

A cultura de células do baço foi realizada em placas de cultura com 48 poços (Corning, New York, USA) numa concentração de $2,5 \times 10^6$ céls./poço em um volume final de 500 μ l. As células foram estimuladas com o antígeno específico (antígeno particulado de *Leishmania infantum*) (50 μ g/ml) ou meio por um período de 48 horas em estufa de BOD, 5% de CO₂ a 37°C. Decorrido o período de incubação, o sobrenadante foi coletado para mensurar os níveis de CXCL1 e CXCL2 por ELISA.

4.10) Ensaio de migração celular *in vivo*

Camundongos WT e TLR9^{-/-} com idade aproximadamente de 7 semanas foram submetidos à inoculação de 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum*, via intraperitoneal. Após 24h da inoculação, o lavado peritoneal foi coletado e as células

totais foram quantificadas na câmara de Neubauer e posteriormente realizada a caracterização fenotípica de neutrófilos por citometria de fluxo.

4.11) Diferenciação de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC)

A geração de células dendríticas *in vitro* foi realizada a partir de precursores da medula óssea (BMDC) de camundongos WT ou TLR9^{-/-}, como descrito anteriormente por Carregaro et al., 2008 (CARREGARO et al., 2008) . Brevemente, as células foram distribuídas em placas de Petri (Falcon 1029 placas; BD Discovery Labware) numa concentração de 1×10^6 células/placa e cultivadas com meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF, 2Mm de L-glutamina, 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina, 0.05 mM de 2-ME) acrescido de 20ng/ml do recombinante murino GM-CSF (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, MO, USA). No 3º dia de cultura, outros 20ng/ml de rGM-CSF foram adicionados na cultura e cultivadas por mais 3 dias. Subsequente, as células dendríticas foram obtidas por seleção positiva utilizando beads magnéticas anti-CD11c, seguindo as recomendações do fabricante (Miltenyi Biotec). A avaliação por citometria de fluxo das células CD11c⁺ purificadas apresentou 85-90% de positividade para CD11c.

4.12) Infecção de células dendríticas *in vitro* com *L. infantum*

Decorrido a diferenciação, as células foram coletadas e plaqueadas (2×10^6 /ml, em um volume final de 500µl) em placa de 24 poços (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA), utilizando meio RPMI suplementado com 10% de SBF, e incubadas com *L. infantum* (1 célula: 5 parasitos) ou com meio. As culturas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, por 24h. Subsequente, o sobrenadante da cultura foi utilizado para dosagem das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 por ELISA. A expressão de TLR9

bem como a expressão de moléculas de superfície como MHC-II, CD40 e CD86 foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo monoclonal TLR9 conjugado com FITC, CD11c conjugado com Pcy7, CD80 conjugado com APC, CD40 conjugado com FITC e MHCII conjugado com PE. Todos anticorpos utilizados foram da BD Bioscience e eBioscience (San Diego, CA, EUA).

4.13) Dosagem de Quimiocinas

As concentrações de CXCL1 e CXCL2 foram mensuradas no sobrenadante da cultura de células do baço de animais na 6ª de infecção, conforme anteriormente descrito, e no sobrenadante da cultura de células dendríticas incubadas 24h com *L. infantum* ou com meio RPMI apenas, por meio de ensaio imunoenzimático ELISA do tipo “sandwich”, utilizando-se o *kit* comercial (OpTEIA, BD Biosciences, San Diego, CA) seguindo as recomendações do fabricante. A leitura da reação colorimétrica foi realizada a 450 nm em leitor de microplacas (EMAX, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). A concentração das quimiocinas nos sobrenadantes analisados foi determinada a partir dos valores obtidos com a curva-padrão realizada com as diferentes diluições da proteína recombinante.

4.14) Extração de RNA total e confecção do DNA complementar (cDNA)

O RNA total foi extraído das culturas de BMDCs infectadas e controles e de fragmentos do fígado e baço de camundongos C57BL/6 WT coletados após 4 e 6 semanas de infecção e de controles não infectados. O método de extração combinou a utilização de TRIzol (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA) seguida pela utilização parcial do *kit* de extração Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, Alemanha). Resumidamente, após coleta do órgão, um fragmento de aproximadamente 100 mg de tecido foi armazenado em 500

μL de reagente TRIzol a -70°C até o momento da extração. O tecido foi então descongelado e triturado com auxílio de haste homogenizadora livre de RNase seguido da adição de mais 500 μL de TRIzol e 5 minutos de repouso a temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 200 μL de clorofórmio e a solução foi agitada durante 15 segundos e centrifugada a 10 000 x g por 10 minutos a 4°C. A porção aquosa superior foi removida e utilizada para prosseguimento da extração pelo *kit* Illustra RNAspin Mini de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Após extração, o RNA foi quantificado e avaliado quanto a pureza e qualidade com auxílio do NanoDrop™ 2000. O RNA extraído foi submetido à confecção do cDNA. Para isso, inicialmente todas as amostras foram diluídas para concentrações semelhantes e conhecidas e depois foi adicionado 1 μL de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ à 2 μg do RNA mais H₂O livre de RNase para completar um volume final de 13 μL. Esse volume foi então incubado a 65°C por 5 minutos em termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, EUA) seguido por uma incubação no gelo por 1 minuto. À reação foi adicionado um mix contendo 4 μL de tampão da enzima, 1 μL de DTT 0,1 mM, 1 μL de dNTP 10 mM e 1 μL da enzima Transcriptase Reversa SuperScript™ III (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA) (200 U/μL), totalizando 20 μL de volume final. A reação foi incubada a 50°C por 60 minutos e depois a 70°C por 10 minutos. O cDNA foi diluído 10 vezes em água estéril e foi armazenado a -70°C até o momento do uso.

4.15) PCR em Tempo Real

A análise relativa de transcritos de genes alvos foi realizada por PCR em tempo real utilizando-se do cDNA confeccionado a partir das amostras supracitadas. A reação foi realizada com 6,5 μL de SYBER Green Mix (Invitrogen Corporation-Carlsbad, USA), 0,5 μL de cada primer (senso e antisenso) a 10 μM, 5 μL do cDNA sintetizado a partir de

2 µg de RNA extraído e água destilada estéril suficiente para completar o volume final para 15 µL. A reação foi feita em aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, EUA) compreendendo 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C – 30 segundos a 58°C - 30 segundos a 72°C. Um ciclo final de 20 minutos com temperatura crescente de 60 a 95°C foi empregado para obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação. Todas as reações foram feitas em duplicatas, os resultados foram normalizados com o HPRT constitutivamente expresso e analisados com base no valor de Ct (*cycle threshold*) ou linha de corte. O resultado foi calculado com a fórmula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ da amostra} - \Delta Ct \text{ da amostra controle}$, onde $\Delta Ct = Ct \text{ gene estudado} - Ct \text{ HPRT}$. O número de vezes de expressão diferencial do RNA mensageiro comparado com o controle foi definido pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os *primers* e sequências utilizados durante a reação de PCR em tempo real estão listados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

SEQUÊNCIAS		
Gene	Senso	Antisenso
HPRT	TGG AAA AGC CAA ATA CAA AGC	CAA CAT CAA CAG GAC TCC TCG
TLR9	GGA CCT ACA GCA GAA TAG CTC A	AAC TCG GGA ACC AGA CAT G

4.16) Ensaio de Migração Celular *in vivo*

Camundongos TLR9^{-/-} e WT foram submetidos à inoculação de 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum*, via intraperitoneal. Decorrido 24h, o lavado peritoneal foi coletado utilizando 3 ml de PBS-EDTA. As células totais foram lavadas com PBS, centrifugadas (500 x g, 10 min a 4 °C), quantificadas em câmara de Neubauer. Posteriormente, 1×10^6 células foram marcadas com anticorpo monoclonal de superfície GR1-PE e MHCII-APC para a caracterização fenotípica de neutrófilos (GR1^{high} MHCII^{negativo}) por citometria de fluxo.

O número absoluto de neutrófilos (GR1^{high} MHCII⁻) obtido a partir do lavado da cavidade peritoneal foi calculado proporcionalmente em relação ao número de células totais, obtido a partir da contagem na câmara de Neubauer.

4.17) Isolamento de neutrófilos da medula óssea

Os neutrófilos da medula óssea de camundongo WT ou TLR9^{-/-} foram obtidos por meio de separação em gradiente constituído por soluções a 72 e 65% de Percoll (Percoll, Fiuka Biochemica, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Sweden.), 3ml cada. Cerca de 2ml do lavado do canal medular (fêmur e tíbia) foram colocados sobre o gradiente de Percoll e centrifugados 1200g, a 20°C, com 2m/s² de aceleração e desaceleração, durante 32 minutos. Em seguida, a camada de células mononucleares foi descartada e a de polimorfonucleares, sobre a solução a 72%, colocada em tubo plástico estéril de 15mL. A lise das hemácias foi realizada com tampão de NH₄Cl 4% e as células lavadas em meio Hank's. O número de células após o isolamento foi obtido em contador automático, a pureza dos neutrófilos feita a partir de análise em lâmina pela contagem de 100 células e a viabilidade por exclusão com azul de Tripan 1% (1:1). Apenas as amostras com pureza e viabilidade acima de 95% foram consideradas nos ensaios.

4.18) Cultura *in vitro* de Neutrófilos

Os neutrófilos recém-isolados da medula óssea foram cultivados em placa de cultura celular de 24 poços (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA) em meio RPMI 1640 (suplementado a 10% com SBF) numa concentração de 5×10^6 céls./ml em um volume final de 500µl. As células foram estimuladas com formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* (5 parasitos : 1 célula) ou meio por um período de 12h horas em estufa de BOD, 5% de CO₂ a 37°C. Decorrido o período de incubação, as células foram coletadas e a ativação e expressão de CXCR2 frente à infecção por *L. infantum* foram avaliadas por citometria de fluxo. Para isso, os neutrófilos foram coletados, fixados 30 minutos com PBS-formol a 1% e marcados com anticorpo monoclonal de superfície GR1 conjugado com APC, CXCR2 conjugado com PE, CD11b conjugado com PEcy7 e CD62L conjugado com FITC.

4.19) Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos

A quimiotaxia foi realizada em câmara de 48 poços (Câmara de Boyden, Neuro Probe Inc., Cabin John, U.S.A.) com membrana de policarbonato (Filtro de policarbonato 5µm, Neuroprobe, Pleasanton, CA, USA.) conforme preconizado por ARRAES et al. (2006). Para avaliação da capacidade quimiotática de neutrófilos, será adicionado o sobrenadante da cultura *in vitro* de células dendríticas (WT ou TLR9^{-/-}), cultivadas durante 24h na presença ou não de *L. infantum*. Como controle positivo foi utilizado a quimiocina CXCL2 (30ng/ml) e como controle negativo utilizou-se meio RPMI (RPMI-1640 medium, Sigma-Culture®, St. Louis- U.S.A.) acrescido de albumina sérica bovina (BSA) 0,01%. Após uma hora de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, a membrana contendo as células foi fixada, corada com panótico rápido e, em seguida, os neutrófilos contados em microscópio óptico (1000X com lente de

imersão em óleo) abrangendo aleatoriamente cinco campos por amostra. O experimento foi realizado em quadruplicata e os resultados expressos em número de neutrófilos/campo.

4.20) Análise estatística dos resultados

Os resultados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para determinar a diferença estatística entre os grupos de animais WT e TLR9^{-/-} foi utilizado o teste t de *Student* não-pareado. A análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey foi aplicado para amostras com distribuições normais. As análises foram realizadas através do programa GraphPad-Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA) e foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de P igual ou menor a 0,05.

Resultados

5- RESULTADOS

5.1) A infecção por *L. infantum* induz o aumento da expressão de TLR9 *in vitro* e *in vivo*

As células dendríticas (DCs) são células essenciais envolvidas na indução da resposta imune à leishmanias por agirem tanto como células hospedeiras, bem como células apresentadoras de antígeno, modulando a resposta imune celular específica e, depois de apropriada ativação também operam como células efetoras no controle do parasito (BRANDONISIO; SPINELLI; PEPE, 2004; REINER et al., 1990). A ativação apropriada de DCs é decorrente, em grande parte, pela expressão de receptores de reconhecimento padrão (RRP), como por exemplo, os TLRs (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010). Nesse sentido, investigamos se o TLR9 é expresso em DCs infectadas *in vitro* com *L. infantum*.

Para este fim, BMDCs provenientes de animais C57BL/6 (WT) foram infectadas com *L. infantum* em fase estacionária de crescimento (5 parasitos: 1 célula) por 24 horas. Decorrido o período de incubação, as células foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos e a expressão de TLR9 foi analisada por citometria de fluxo. Conforme demonstrado na **Figura 2A**, a infecção induziu o aumento da expressão de TLR9 pelas células dendríticas CD11c^{high}, tanto na porcentagem de células (aumento de 28,5% para 68,14%, P<0,0001) bem como na média de intensidade de fluorescência integrada (iMIF) (P<0,0001).

Para avaliar se esse evento também ocorre durante o modelo de infecção *in vivo*, animais WT foram infectados ou não com 1×10^7 formas metacíclicas de *L. infantum* e a expressão do mRNA para *TLR9* foi avaliada no baço e no fígado, bem como a proteína expressa em DCs presentes no baço. A infecção induziu a expressão de mRNA

para tlr9 no baço e fígado na 4^a e 6^a semana, ressaltando que esse aumento foi aproximadamente 60 vezes maior no fígado dos animais na 6^a semana de infecção, comparado com os animais não infectados ($P < 0,0039$) (**Figura 2B**).

Em nível de proteína, verificamos que a infecção *in vivo* por *L. infantum* induz o aumento significativo de células CD11c^{high} expressando TLR9. Como demonstrado na **Figura 2B**, a porcentagem de células CD11c^{high}TLR9⁺ aumentou de 10,78% para 17,7% ($P < 0,036$), bem como do número absoluto de $6,31 \times 10^6$ para $14,92 \times 10^6$ ($P < 0,0045$). (**Figura 2C**). Esses dados em conjunto demonstram que a expressão de TLR9 é modulada positivamente durante a infecção por *L. infantum*.

Figura 2: Infecção por *L. infantum* induz aumento da expressão de TLR9 pelas células dendríticas. (A) Análise da expressão de TLR9 por células dendríticas *in vitro*. BMDCs (2×10^6 /ml) foram infectadas com *L. infantum* (barra preta) em fase estacionária de crescimento (5 parasitos : 1 célula) ou não infectadas (barra branca). Após 24h, as células foram coletadas e marcadas com anticorpo monoclonal para análise da expressão de TLR9 em CD11c^{high}, por citometria de fluxo. (B) Expressão de mRNA para TLR9 no baço e fígado na 4^a e 6^a semana pós-infecção (barra fechada) ou *naive* (barra aberta) por PCR em tempo real e normalizada de acordo com a expressão constitutiva do HPRT na célula. (C) *Dot-plots* representativos da porcentagem de células CD11c^{high} expressando TLR9. Os gráficos de barra representam a porcentagem ou o número absoluto da expressão de TLR9 por células dendríticas *in vivo*. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, * P < 0,05 comparado ao grupo controle não infectado.

5.2) TLR9 participa no controle da infecção por *L. infantum*

Visto que a expressão de TLR9 é aumentada durante a infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. infantum* (**Figura 3**), nós avaliamos se TLR9 participa no controle da infecção induzida pelo parasita. Para isso, animais TLR9^{-/-} e WT foram infectados por via intravenosa (iv) com 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas estacionárias de *L. infantum* e o número de parasitas presentes no baço e no fígado na 4^a e 6^a semana pós-infecção foi determinado pela técnica de diluição limitante, conforme previamente descrito em Material e Métodos. Como demonstrado na **Figura 3**, os animais TLR9^{-/-} foram mais susceptíveis à infecção em ambos os tempos analisados, apresentando quantidades significativamente maiores de parasitos no baço (Figura 3A) e no fígado (Fígado 3B), quando comparados aos animais WT.

Já está bem estabelecido na literatura que o controle da infecção durante a LV experimental está diretamente relacionado com a formação de um infiltrado inflamatório granulomatoso (ENGWERDA; KAYE, 2000). Dessa forma, a fim de determinar os fatores envolvidos com a susceptibilidade dos animais TLR9^{-/-}, nós avaliamos a cinética do processo inflamatório no fígado. Para isso, secções do fígado de animais WT e TLR9^{-/-} na 2^a, 4^a e 6^a semana pós-infecção foram coradas com H&E. Como controle, foram utilizados os respectivos animais não infectados (tempo 0).

As análises histopatológicas demonstraram que animais WT apresentaram um aumento gradativo de leucócitos no tecido hepático, o qual se iniciou na 2^a semana, estendendo-se até a 6^a semana pós-infecção, período o qual se observa um intenso acúmulo de leucócitos infiltrantes (**Figura 4A**). De maneira interessante, o mesmo perfil de inflamação foi observado em animais TLR9^{-/-} em todos os períodos analisados, quando comparados ao grupo WT infectado (**Figura 4A**).

Na 4ª semana, nota-se no fígado do camundongo WT uma infiltração leucocitária mais compacta e organizada. Entretanto, ao quantificar as áreas de tecido inflamado dos animais TLR9^{-/-}, observamos o infiltrado leucocitário mais disperso no parênquima hepático e, conseqüentemente, granulomas menores (**Figura 4B**). Na 6ª semana, ambos os grupos apresentaram distribuição de áreas de inflamação semelhantes. Assim, podemos sugerir que a ausência da molécula de TLR9 promove um retardo na formação da resposta inflamatória tecidual durante a LV experimental.

Figura 3: TLR9 é importante para o controle da infecção por *L. infantum*. Camundongos na WT e TLR9^{-/-} foram infectados com 1×10^7 parasitos por via intravenosa. O número de parasitos presentes no baço (A) e no fígado (B) na 4ª e 6ª semana pós-infecção foi determinada pela técnica de diluição limitante. Os resultados são representativos de três experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle WT.

Figura 4: Processo inflamatório hepático durante a infecção por *L. infantum*. (A) Corte histológico de tecido hepático de animais infectados com 2, 4 e 6 semanas corados com H & E em aumento de 400X. (B) Quantificação da área de tecido hepático inflamado foi realizado nos animais WT (círculo aberto) e TLR9^{-/-} (círculo fechado) com 4 e 6 semanas após infecção. A quantificação das áreas foi realizada através do programa *Leica QWin - Quantitative Imaging* com aumento de 400X. Os resultados da histopatologia são representativos de dois experimentos independentes.

5.3) Análise fenotípica do baço de animais WT e TLR9^{-/-} infectados com *L. infantum*

Tendo em vista que a ausência de TLR9^{-/-} não comprometeu o recrutamento de leucócitos totais (**Figura 4**), tornou-se necessário fenotipar as células do infiltrado inflamatório a fim de relacioná-las com o caráter de susceptibilidade. Para isso, identificamos e comparamos, por citometria de fluxo, o perfil celular presente no baço de camundongos WT e TLR9^{-/-} na 4ª e 6ª semana pós-infecção.

Devido ao fato dos neutrófilos desempenharem um importante papel no controle da infecção em modelo murino de LV (MCFARLANE et al., 2008; ROUSSEAU et al., 2001; SMELT et al., 2000), avaliamos a presença do polimorfonuclear no baço. De maneira interessante, os animais TLR9^{-/-} apresentaram uma redução acentuada na porcentagem e no número absoluto (**Figuras 5A e 5B**) de neutrófilos (caracterizados como GR1^{high}MHCII⁻) na 4ª e 6ª semana pós-infecção (P<0,0047 e P<0,0054, respectivamente). A ausência do TLR9 foi associada com a redução do polimorfonuclear de aproximadamente 75% na porcentagem e no número absoluto na 4ª semana e aproximadamente 50% na 6ª semana pós-infecção, quando comparados aos animais WT.

Outros leucócitos também foram fenotipados. De acordo com a tabela 1, os linfócitos B na 4ª semana e TCD4⁺, TCD8⁺, TCD4⁺CD25⁺ na 6ª semana também estiveram reduzidos nos animais TLR9^{-/-} infectados (**Tabela 2**).

Investigamos se esse fenômeno ocorre também no fígado. Para isso, secções de tecido hepático de animais WT e TLR9^{-/-} na 2ª, 4ª e 6ª semana pós-infecção e dos respectivos animais não infectados foram marcados com anticorpo anti-7/4, específico para neutrófilos, pela técnica de imuno-histoquímica. Nós observamos que na 2ª semana após infecção, ambos os grupos, WT e TLR9^{-/-}, apresentaram cerca de 2 neutrófilos/

campo. À medida que a infecção evoluiu e a inflamação tecidual é intensificada, o número de neutrófilos/campo aumentou nos animais WT. Na 4ª semana, os camundongos WT apresentaram 15 neutrófilos/campo e na 6ª semana esse número aumentou para 20 neutrófilos/campo. Entretanto, os camundongos TLR9^{-/-} exibiram deficiência no processo de recrutamento de polimorfonucleares ao longo do curso da infecção. Na 4ª semana, os animais *knockouts* apresentaram uma média de 6 neutrófilos/campo, uma redução de aproximadamente 50% comparado ao grupo WT, e manteve o mesmo número de células/ campo na 6ª semana pós-infecção (**Figura 5C**).

Para confirmar o recrutamento de neutrófilos dependente de TLR9 frente à infecção por *L. infantum*, nós realizamos um ensaio de migração *in vivo*. Para isso, animais WT e TLR9^{-/-} foram infectados por via intraperitoneal (ip) com 1×10^7 parasitos em fase estacionária de crescimento. Após 24h, os neutrófilos (caracterizados como GR1^{high} MHCII⁻) presentes no lavado peritoneal foram fenotipados e analisados por citometria de fluxo.

De acordo com a Figura 4D, o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongo TLR9^{-/-} foi reduzido quando comparado ao animal WT. Os animais TLR9^{-/-} apresentaram redução na porcentagem (~ 4 vezes menor, $P < 0,0026$) e também no número absoluto (~3 vezes menor, $P < 0,0009$) de neutrófilos comparado aos animais WT. Dessa forma, nossos dados em conjunto sugerem que o TLR9 é requerido na migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a LV experimental.

Tabela 2: Fenotipagem das células do infiltrado inflamatório no baço de animais infectados com *L. infantum*

Células	4 semanas p.i.		6 semanas p.i.	
	WT	TLR9 ^{-/-}	WT	TLR9 ^{-/-}
Totais	79.63 ± 8.552	48.00 ± 7.360*	62.60 ± 9.548	53.50 ± 6.739
T CD4 ⁺	13.99 ± 1.490	9.221 ± 1.768	8.788 ± 0.498	6.530 ± 0.928*
T CD8 ⁺	8.452 ± 0.805	6.547 ± 1.469	9.484 ± 0.796	3.413 ± 0.697*
T CD4 ⁺ CD25 ⁺	0.570 ± 0.073	0.447 ± 0.130	0.881 ± 0.062	0.432 ± 0.053*
B (CD19 ⁺)	42.40 ± 4.126	23.57 ± 4.767*	9.080 ± 1.613	15.01 ± 0.822
NK T	2.197 ± 0.171	1.746 ± 0.327	1.403 ± 0.272	0.7402 ± 0.280

Dados representam a média ± SD do número absoluto de linfócitos presente no baço de camundongos WT e TLR9^{-/-} na 4^a e 6^a semana pós- infecção por *L. infantum*. Os valores representados são x 10⁶ / baço. Os grupos experimentais incluem 4-5 animais. *P < 0,05 comparado ao grupo controle. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Figura 5: O recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório durante a infecção por *L. infantum* é dependente de TLR9. Fenotipagem dos neutrófilos presentes no baço de camundongos WT e TLR9^{-/-}. Em A, *dot-plots* representativos da porcentagem de células GR1^{high} MHCII^{low/-} (neutrófilos) presentes no baço de animais infectados. **(B)** Porcentagem e número absoluto de polimorfonucleares presentes no baço dos animais WT (barra aberta) e TLR9^{-/-} (barra fechada) após 4 e 6 semanas de infecção. **(C)** Cinética de marcação de neutrófilos no tecido hepático por imuno-histoquímica utilizando anticorpo Rat anti-7/4. As fotos representam capturas feitas em aumento de 400X. **(D)** Porcentagem e número absoluto de neutrófilos presentes no lavado peritoneal de animais WT e TLR9^{-/-} após 24h de infecção com *L. infantum*. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média ± DP, * P <0,05 comparado ao grupo controle WT.

5.4) A ausência de TLR9 em neutrófilos não interfere na sua ativação e migração para o sítio de infecção

A ativação de neutrófilos via TLRs promove a expressão de selectinas e integrinas as quais permitem o rolamento, adesão e subsequente transmigração dos neutrófilos do endotélio para o sítio de infecção. (59–62). Assim, nós investigamos se a falha no recrutamento do polimorfonuclear observada em camundongos TLR9^{-/-} estava relacionada com o seu fenótipo de ativação.

Para esse fim, neutrófilos da medula de animais WT e TLR9^{-/-} foram isolados e infectados *in vitro* com formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* (5 parasitos : 1 célula) ou meio por 12h. Decorrido o período de incubação, as células foram marcadas com anticorpos específicos e analisadas a expressão de marcadores de superfície relacionados com a ativação do polimorfonuclear tais como CD11b, CD62L e CXCR2 por citometria de fluxo.

A infecção *in vitro* de neutrófilos com o parasito aumentou a expressão de CD11b e a clivagem proteolítica de CD62L em neutrófilos provenientes de animais WT e TLR9, quando comparados ao meio. De maneira interessante, o grau de ativação dos neutrófilos WT e TLR9 infectados foi similar (CD11b: P = 0,116; CD62L: P = 0,3735), assim como também a expressão de CXCR2 também foi similar entre ambos os grupos (P = 0,1189) (**Figura 6A**).

Avaliamos a ativação de neutrófilos *in vivo*. Para isso, animais WT e TLR9^{-/-} foram infectados iv com 1×10^7 parasitos em fase estacionária de crescimento. Na 6ª semana pós-infecção, os neutrófilos presentes no sangue periférico de ambos os grupos experimentais foram isolados e as moléculas de superfície analisadas.

Similar aos dados obtidos pela infecção *in vitro*, os neutrófilos do sangue periférico de animais TLR9^{-/-} infectados apresentaram-se ativados, com expressão de

CD11b e CD62L e do receptor CXCR2 de forma semelhante aos neutrófilos de animais WT (**Figura 6B**).

Os neutrófilos são predominantemente responsivos aos membros da família de quimiocina CXC, e a secreção desses fatores quimioatraentes é de fundamental importância para o processo de migração destas células para o sítio inflamatório (CHARMOY et al., 2009). Visto que não houve diferença fenotípica entre os neutrófilos TLR9^{-/-} e WT frente à infecção por *L. infantum*, avaliamos sua capacidade migratória frente a um estímulo quimiotático. Para isso, foi realizado o ensaio de quimiotaxia *in vitro* em câmara de Boyden utilizando polimorfonucleares isolados da medula óssea de camundongos WT e TLR9^{-/-} sob o estímulo quimiotático de MIP-2, ou meio, como controle da migração.

Como mostrado na **Figura 5C**, o estímulo quimiotático de MIP-2 promoveu a migração de neutrófilos WT, quando comparado ao neutrófilo WT na presença de meio. De maneira semelhante, neutrófilos de animais TLR9^{-/-} também migram frente à quimiocina. Não houve diferenças estatisticamente significantes na capacidade migratória de TLR9^{-/-} comparado ao WT quando ambos foram estimulados com a quimiocina.

Figura 6: Ausência de TLR9 em neutrófilos não influencia na sua ativação e recrutamento. (A) Análise de ativação de neutrófilos *in vitro*. Neutrófilos isolados da medula óssea de animais WT e TLR9^{-/-} foram infectados com *L. infantum* (barra fechada) ou com meio (barra aberta). Decorrido 12h de cultura, as células foram coletadas e marcadas com anticorpos monoclonais para análise da expressão de moléculas relacionadas à ativação (CD11b e CD62L) e CXCR2 por citometria de fluxo. Ensaio realizado em quintuplicata e a análise de expressão das moléculas foi realizada na população celular caracterizada como GR1^{high}. (B) Análise de ativação de neutrófilos *in vivo*. Células do sangue periférico provenientes de camundongos WT e TLR9^{-/-} com 6 semanas de infecção foram isoladas e marcadas para análise por citometria de fluxo. A análise dos neutrófilos foi realizada na população de células caracterizadas como GR1^{high} MHCII⁻. (C) Ensaio de migração de neutrófilos *in vitro* em câmara de boyden utilizando neutrófilos WT (barra aberta) e TLR9^{-/-} (barra fechada) (5×10^4 células/ poço) sob o estímulo quimiotático de MIP-2 ou meio (controle), em quadruplicata. Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP, # P <0,05 comparado ao meio.

5.5) TLR9 participa no processo de maturação e na produção de fatores quimiotáticos de neutrófilos pelas células dendríticas

Visto que a ausência de TLR9 em polimorfonucleares não interferiu na sua ativação frente à infecção por *L. infantum* e nem na sua capacidade migratória sob um estímulo quimiotático, o nosso próximo passo foi determinar os fatores quimioatraentes de neutrófilos durante a infecção por *L. infantum*. Assim, as células do baço dos animais WT e TLR9^{-/-} na 6ª semana pós-infecção foram cultivadas na presença ou ausência do antígeno total de *L. infantum* e, após 48h, o sobrenadante foi coletado para quantificação de CXCL1 (KC) e CXCL2 (MIP-2) por ELISA.

Como demonstrado na **Figura 7**, a estimulação antígeno-específica de células do baço de animais WT infectados induziu a produção de altos níveis de KC (Figura 6A) e MIP-2 (**Figura 7B**), quando comparada ao controle (meio). As células do baço de animais TLR9^{-/-} também foram responsivas ao estímulo específico, apresentando produção significativa de ambas quimiocinas, quando comparadas ao grupo TLR9^{-/-} meio. Porém, os níveis desses mediadores apresentaram-se significativamente menores no sobrenadante da cultura do baço desses animais do que naqueles obtidos em células de animais WT estimuladas com o antígeno, sugerindo que a deficiência na migração de neutrófilos nos animais TLR9^{-/-} para o foco de infecção está diretamente relacionada, em grande parte, ao comprometimento da produção dos mediadores quimiotáticos.

As células dendríticas (DCs) orquestram o desenvolvimento da resposta imune contra leishmanias através da liberação de citocinas e fatores quimiotáticos de leucócitos (KAWAI; AKIRA, 2010) em decorrência de sua maturação e ativação induzida pelos parasitos (MOLL, 2002). No intuito de elucidar o mecanismo envolvido no recrutamento de neutrófilos durante a infecção por *L. infantum*, investigamos a participação de DCs nesse processo. Sendo assim, primeiramente avaliamos o estágio

de maturação das DCs frente à infecção por *L. infantum*. Para este fim, BMDCs provenientes de camundongos WT e TLR9^{-/-} foram infectadas com parasitos em fase estacionária de crescimento ou com meio (controle). Após 24h, as células foram coletadas e a análise da expressão de MHCII e de moléculas coestimuladoras como CD40 e CD80 foi realizada por citometria de fluxo.

A infecção com *L. infantum* induziu o aumento da expressão de MHCII, CD40 e CD80 pelas BMDCs provenientes de animais WT, quando comparadas com as não infectadas (meio). As BMDCs TLR9^{-/-} também apresentaram aumento na expressão dessas moléculas quando infectadas. Porém, a expressão de MHCII (P<0,0007), CD40 (P<0,0280) e CD80 (P<0,0420) foi significativamente menor quando comparadas às BMDCs WT (**Figura 8A**).

O fenótipo de maturação das DCs também foi avaliado *in vivo*. Assim, as células do baço de animais WT e TLR9^{-/-} na 6ª semana pós-infecção foram isoladas e marcadas com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas citadas anteriormente. De acordo com a **Figura 8B**, as DCs provenientes de camundongos TLR9^{-/-} apresentaram menor expressão de MHCII (P<0,0161) e da molécula coestimuladora CD80 (P<0,0085), quando comparadas as DCs de camundongos WT. Em conjunto, nossos dados sugerem que o TLR9 participa do processo de maturação de DCs durante a infecção por *L. infantum*.

Como próximo passo, investigamos o papel de DCs no recrutamento de neutrófilos durante a LV. Para isso, realizamos o ensaio de quimiotaxia *in vitro* em câmara de Boyden utilizando polimorfonucleares isolados da medula óssea de camundongos WT. Como fator quimiotático utilizamos o sobrenadante da cultura de BMDCs provenientes de animais WT ou de TLR9^{-/-} infectadas ou não com *L. infantum*

por 24h. A quimiocina MIP-2 ou meio foi utilizado como controle positivo ou negativo, respectivamente.

O sobrenadante de BMDC WT e BMDC TLR9^{-/-} na ausência de infecção (meio) promoveu a migração basal de neutrófilos que foi aproximadamente 1,5 e 1,7 neutrófilos/campo, respectivamente. Quando infectadas, ambos os sobrenadantes, WT e TLR9^{-/-}, induziram o recrutamento de neutrófilos, quando comparados aos respectivos meios. Entretanto, esse aumento foi significativamente menor quando utilizado o sobrenadante de BMDC TLR9^{-/-}, comparado com o sobrenadante de BMDC WT. O sobrenadante das BMDCs WT induziu a migração de 12,3 neutrófilos/campo, enquanto que o sobrenadante proveniente das BMDCs TLR9^{-/-} infectadas induziu apenas a migração de 5,25 neutrófilos/campo, sendo essa diferença aproximadamente duas vezes menor ($P < 0,0028$) (**Figura 9A**). Esses dados sugerem que a falha de migração de neutrófilos em animais TLR9^{-/-} seja decorrente do comprometimento na produção de fatores quimiotáticos envolvidos na migração de polimorfonucleares pelas DCs.

Para testar essa hipótese, mensuramos os níveis de KC e MIP-2 no sobrenadante da cultura das BMDCs WT e TLR9^{-/-} infectadas ou não com *L. infantum*, por ELISA. De fato, os níveis de KC e MIP-2 estavam reduzidos no sobrenadante de BMDC TLR9^{-/-}, quando comparados ao sobrenadante BMDC WT. Essa redução foi aproximadamente duas vezes menor para ambas as quimiocinas (**Figura 9B**).

Figura 7: TLR9 é importante para a produção de fatores quimioatraentes de neutrófilos durante a infecção por *L. infantum*. Camundongos WT e TLR9^{-/-} foram infectados iv com 1×10^7 parasitos em fase estacionária de crescimento. O baço foi coletado após 6 semanas de infecção e as células foram estimuladas com antígeno bruto de *L. infantum* (50 μ g/ml). Após 48h de cultura, o sobrenadante foi coletado para quantificação de quimiocinas por ELISA. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, # $P < 0,05$ comparado ao meio, * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle WT.

Figura 8: TLR9 participa do processo de maturação das células dendríticas frente à infecção por *L. infantum*. (A) Maturação das células dendríticas *in vitro*. BMDCs originadas de animais WT e TLR9^{-/-} (2×10^6 /ml) infectadas (barra fechada) ou não (barra aberta) com *L. infantum* em fase estacionária de crescimento (5 parasitos : 1 célula). Após 24h de cultura, as células foram coletadas e marcadas com anticorpos para avaliar a expressão de MHCII e moléculas coestimulatórias (CD80 e CD40). A análise foi realizada na população de células CD11c^{high} por citometria de fluxo. Ensaio realizado em quadruplicata. (B) Maturação de células dendríticas *in vivo*. Células de baço provenientes de camundongos WT e TLR9^{-/-} 6 semanas de infecção foram isoladas e marcadas para análise por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes e estão expressos como média $\pm$ DP, # $P < 0,05$ comparado ao meio, * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle WT.

Figura 9: Células dendríticas produzem fatores quimiotáticos de neutrófilos frente à infecção por *L. infantum* de forma dependente de TLR9. BMDCs originadas de animais WT ou TLR9^{-/-} (2×10^6 /ml) infectadas (barra fechada) ou não (barra aberta) com *L. infantum* em fase estacionária de crescimento (5 parasitos : 1 célula). Após 24h de cultura, o sobrenadante da cultura foi coletado. **(A)** Ensaio de migração de neutrófilos *in vitro* em câmara de boyden utilizando neutrófilos WT isolados da medula (5×10^4 células/ poço) sob o estímulo quimiotático do sobrenadante de cultura de células dendríticas WT (barra aberta) ou TLR9^{-/-} (barra fechada) infectadas com *L. infantum* ou não. Como controles positivo e negativo do ensaio, foram utilizados MIP-2 (barra listra horizontal) e meio RPMI (barra listra vertical), respectivamente. **(B)** Análise da produção dos fatores quimioatraentes de neutrófilos (KC e MIP-2) dosados no sobrenadante de cultura de células dendríticas por ELISA. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (em quadruplicata) e são expressos como média $\pm$ DP. # P<0,05 comparado ao meio, * P <0,05 comparado ao grupo controle WT.

Discussão

6- DISCUSSÃO

As principais moléculas caracterizadas no reconhecimento de patógenos são os Receptores do Tipo Toll (TLRs) e, dependendo do tipo de receptor e a intensidade de ativação, podem atuar no controle da LV. Em conjunto, nossos resultados demonstram que a molécula TLR9 possui papel importante para conferir proteção durante a infecção experimental por *L. infantum* através de um mecanismo dependente do recrutamento de neutrófilos para o sítio de inflamação, mediado pela ativação de DCs e secreção de fatores quimioatrantes.

Inicialmente, nós verificamos que a infecção *in vivo* pela *L. infantum* tem a capacidade de modular positivamente a expressão de TLR9, sugerindo que esse receptor está envolvido com o reconhecimento dos parasitos e desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro. Corroborando nossos dados, estudos demonstram que a *Leishmania* possui a capacidade de modular a expressão de TLRs, interferindo, dessa maneira, na disponibilidade e/ou subsequente qualidade das respostas mediadas por esses receptores (BECKER et al., 2003; CEZÁRIO et al., 2011; DE VEER et al., 2003; SRIVASTAVA et al., 2012). Além disso, existe uma correlação positiva na expressão de TLRs com o potencial papel desses receptores em gerar uma resposta inflamatória ou anti-inflamatória. A expressão de TLR2 e TLR4 está relacionada com a produção das citocinas IL-12 ou IFN- γ , e a consequente diminuição da carga parasitária, demonstrando, dessa maneira, que os TLRs estão envolvidos no reconhecimento do parasita e desenvolvimento da resposta protetora durante a LV (CEZÁRIO et al., 2011).

O aumento da expressão do TLR9 pelas DCs após a infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. infantum* observado em nossos dados sugere o papel-chave das DCs no reconhecimento dos parasitas. De fato, trabalhos relatam a capacidade das DCs no

reconhecimento de moléculas associadas à *Leishmania* através de TLRs, como por exemplo sequencias de CpG presentes no DNA da *L. major* e *L. infantum* (FAKHER et al., 2009; LIESE et al., 2007; SCHLEICHER et al., 2007). Além das DCs, é demonstrado que a infecção por *Leishmania* é capaz de induzir o aumento da expressão de TLRs em várias subpopulações celulares como, por exemplo, em macrófagos e neutrófilos (CHARMOY et al., 2007). Entretanto, os trabalhos demonstram que estimulação dos TLRs em macrófagos e neutrófilos está relacionada com a eliminação dos parasitas por aumentar sua capacidade microbicida. Como por exemplo, o TLR2 e TLR3 são essenciais no processo de fagocitose e *killing* de formas promastigotas de *L. donovani* por macrófagos primados com IFN- γ (FLANDIN; CHANO; DESCOTEAUX, 2005). Já nas DCs, a ativação de TLRs implica, em grande parte, na secreção de mediadores que irão orquestrar o desenvolvimento da resposta imune contra o parasito. Dessa forma, é plausível sugerir que a expressão de TLR9 em leucócitos, principalmente em DCs e neutrófilos, poderia apresentar um potencial efeito no controle da infecção induzida por *L. infantum*.

Nós verificamos o papel protetor do TLR9 durante a infecção experimental por *L. infantum*, uma vez que camundongos deficientes para a molécula TLR9 foram incapazes de controlar o crescimento de parasitos no baço e fígado, órgãos-alvo afetados na LV. Trabalhos anteriores também demonstraram a contribuição dos TLRs no desenvolvimento da resposta protetora durante a infecção experimental com várias espécies de *Leishmania* e outros protozoários. É claramente demonstrado que a replicação dos parasitas durante a infecção por *T. gondii* (HOU et al., 2011), *T. cruzi* (CAMPOS et al., 2004) e *L. major* (MURAILLE; DE TREZ; PAJAK; et al., 2003; REVAZ-BRETON et al., 2010) é dependente da molécula adaptadora MyD88, sugerindo a participação dos TLRs no controle da infecção *in vivo*. Embora a

susceptibilidade dos animais TLR9^{-/-} seja semelhante àquela encontrada em animais Myd88^{-/-} (dados não mostrados), que são altamente susceptíveis a diversas infecção, inclusive à *Leishmania*, nós não descartamos a possibilidade de outros TLRs também participarem nos mecanismos de proteção ao hospedeiro relacionados ao controle da infecção em nosso modelo de estudo. Como demonstrado na literatura, outros TLRs podem participar da resposta protetora diante da infecção por diversos parasitos, inclusive de forma coordenada, como no caso da infecção por *T. cruzi*, em que o TLR2 e TLR9 atuam em sinergismo para a eficiente indução da resposta imune protetora (BAFICA et al., 2006).

Durante o modelo experimental de LV, os amastigotas se multiplicam rapidamente nas primeiras quatro semanas de infecção e esse processo é acompanhado pela formação de granulomas hepáticos, até por volta da sexta semana, progredindo espontaneamente para a resolução da infecção, enquanto que o baço continua cronicamente infectado por um mecanismo ainda desconhecido (ENGWERDA; KAYE, 2000; WILSON et al., 2005). Embora o número total de células inflamatórias presentes no fígado dos animais TLR9^{-/-} tenha sido semelhante aos animais WT, a ausência da molécula promoveu um retardo na formação da resposta inflamatória tecidual durante a LV experimental, sugerindo o envolvimento de TLR9 no processo de recrutamento celular. Corroborando nossos dados, Carvalho et al. (2012) demonstraram em modelo de *L. major* que a hipertrofia dos linfonodos drenantes é dependente de TLR9 (CARVALHO et al., 2012). Ainda, pacientes com forma progressiva da LV possuem deficiência na formação de granulomas maduros (MURRAY, 1999).

O controle da infecção no fígado durante a LV não está relacionada apenas aos aspectos morfológicos do granuloma. A composição celular que define o infiltrado inflamatório é crítico para que a resposta imune protetora contra os parasitos seja

eficiente (TEIXEIRA et al., 2006). Trabalhos demonstram que a formação adequada dos granulomas hepáticos em modelos experimentais de infecção por *L. donovani* ocorre por um processo dependente da produção de quimiocinas, com subsequente recrutamento de neutrófilos, monócitos, células T CD4⁺ e CD8⁺, produção de citocinas inflamatórias e ativação adequada de células infectadas (STANLEY; ENGWERDA, 2006). Esta resposta é análoga à resposta granulomatosa protetora encontrada na maior parte dos humanos infectados com *L. donovani* que permanecem subcl clinicamente infectados (EL HAG et al., 1994; VERESS et al., 1977). Interessante que nós observamos que não somente a morfologia do granuloma estava comprometida, mas a qualidade do infiltrado inflamatório foi alterada em animais em animais TLR9^{-/-}. Houve uma falha acentuada na migração de neutrófilos para os órgãos-alvo, baços e fígado de animais TLR9^{-/-} na 4^a e 6^a semana pós-infecção, demonstrando dessa forma que, a molécula TLR9 é indispensável para o recrutamento eficiente de neutrófilos para os sítios inflamatórios ao longo da infecção por *L. infantum*. Corroborando nossos resultados, alguns trabalhos utilizando diversos modelos de estudos, relatam o envolvimento dos TLRs modulando o recrutamento de neutrófilos. Foi demonstrado que o pré-tratamento de neutrófilos com LPS potencializa sua capacidade de migração (FAN; MALIK, 2003), sugerindo o envolvimento do TLR4 na indução do processo de recrutamento. Johnson et al. (2005), utilizando camundongos TLR9^{-/-}, demonstraram em modelo de ceratite que o TLR9 e a via de sinalização MyD88 são essenciais para o recrutamento de neutrófilos para a córnea (JOHNSON et al., 2005). Além disso, é demonstrado que o silenciamento de TLR9 presente em células de Langerhans com siRNA reduz a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório durante a infecção pela *P. aeruginosa* e aumenta a carga bacteriana (HUANG et al., 2005). Entretanto, em modelo de sepse severa, foi demonstrado que camundongos TLR9^{-/-} exibem altos níveis

de migração de neutrófilos para o sítio inflamatório. Pois em camundongos TLR9^{+/+}, o receptor CXCR2 é dessensibilizado e, conseqüentemente, há falha na migração de neutrófilos (TREVELIN et al., 2012).

A LV é classicamente descrita como uma doença de caráter crônico. Devido a essa característica, o aumento progressivo no número de neutrófilos em períodos mais tardios de infecção (na 4ª e 6ª semana pós-infecção) no baço e fígado de camundongos WT foi surpreendente, uma vez que é descrito que os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para sítio de infecção durante a infecção por *L. major* e *L. infantum* (MÜLLER et al., 2001; THALHOFER et al., 2011). Ainda, em linhagens de camundongos resistentes à infecção por *L. major*, os neutrófilos são recrutados com horas para o sítio de inoculação e seus níveis diminuem para 1 – 2% do infiltrado celular com 3 dias após a infecção (CHARMOY et al., 2007). Nós acreditamos que durante a LV, a dinâmica do recrutamento celular é diferente da LC. Neste caso, a persistência dos parasitos nos órgãos-alvo é o estímulo necessário para que a migração de neutrófilos aconteça ao longo de todo o curso da infecção. Ainda, não descartamos a possibilidade de citocinas de imunidade adaptativa, como é o caso da IL-17, classicamente produzida por linfócitos Th17, participarem do recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção. Porém, não foi objetivo, no presente trabalho, avaliar a resposta imune adaptativa gerada por TLR9.

O papel de neutrófilo durante os processos infecciosos induzidos por *Leishmanias* ainda é divergente. É demonstrado que durante a infecção por *L. major*, o papel dos neutrófilos parece ser linhagem-dependente, uma vez que a depleção de neutrófilos reduz a carga parasitária em camundongos da linhagem BALB/c, que são geneticamente susceptíveis à infecção, enquanto que a depleção em camundongos C57BL/6, geneticamente resistentes, houve exacerbação da infecção (LIMA et al.,

1998; RIBEIRO-GOMES et al., 2004; TACCHINI-COTTIER et al., 2000). Em nosso estudo, embora não avaliamos a resposta protetora de neutrófilos durante a infecção por meio da depleção de polimorfonucleares com anticorpos monoclonais, nós temos fortes evidências do seu papel protetor em nosso modelo, visto que a ausência de TLR9 acarretou em falhas no recrutamento de neutrófilos e maiores números de parasitas presentes nos sítios de infecção. Trabalhos demonstram que, durante a infecção induzida pelas espécies *L. infantum* e *L. donovani*, a depleção de neutrófilos acarreta no aumento do número de parasitas no baço e fígado, sugerindo seu papel protetor na LV (MCFARLANE et al., 2008; ROUSSEAU et al., 2001; SMELT et al., 2000).

Visto que existe uma falha no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório de animais TLR9^{-/-} infectados, nós hipotetizamos que a deficiência na migração estava relacionada a fatores ligados à ativação dos neutrófilos, uma vez que os TLRs possuem capacidade de regular funções dos polimorfonucleares como a migração, ativação e apoptose (SABROE; DOWER; WHYTE, 2005). Nós observamos, de maneira inesperada, que a ausência do TLR9 em neutrófilos não interfere na sua ativação e expressão de CXCR2 frente à infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. infantum*. De maneira geral, de acordo com a literatura, ligantes de TLRs como LPG, zimosam, LPS e R484 são capazes de estimular os receptores presentes nos neutrófilos e induzir sua ativação e expressão de CXCR2, entretanto de acordo com nossos dados a ativação dos polimorfonucleares, *in vitro* e *in vivo*, por *L. infantum* não é dependente das sequências de CpG presente no DNA da *L. infantum*.

Trabalhos demonstram que o TLR2 ou TLR4 tem participação direta na clivagem proteolítica (*shedding*) de L-selectina (CD62L) e no aumento da expressão de CD11b na superfície dos neutrófilos de maneira concentração-dependente (SABROE et al., 2003), bem como é capaz de modular a expressão de CXCR2 (SABROE et al.,

2005). HAYASHI et al. (2003), ao estimular neutrófilos com LPS (ligante do TLR4), zimosam (ligante do TLR2) e R484 (ligante do TLR7 e TLR8) observou uma menor expressão de L-selectina na superfície das células (HAYASHI; MEANS; LUSTER, 2003). FAN e MALIK (2003) observaram que o estímulo de neutrófilos com TLR4 induz não só o aumento da expressão de CXCR2, como também potencializa o processo de migração celular (FAN; MALIK, 2003).

Ainda com o intuito de entender o motivo pelo qual os neutrófilos falham no seu processo de recrutamento para os sítios inflamatórios, nós analisamos a produção *in vivo* de mediadores quimiotáticos para granulócitos e verificamos que os camundongos TLR9^{-/-} produzem menores níveis de fatores quimiotáticos de neutrófilos, como CXCL1 (MIP-2) e CXCL2 (KC). É demonstrado em humanos que a produção de CXCL8/IL-8 é essencial para atrair neutrófilos para o sítio de infecção nas primeiras horas após a inoculação da *Leishmania* (BADOLATO et al., 1996; LAUFS et al., 2002; VAN ZANDBERGEN et al., 2004; VENUPRASAD et al., 2002). Em modelo experimental de LC, Muller et al. (2001) demonstraram que a eficiente migração de neutrófilos para a pele de animais infectados com *L. major* está correlacionada com a produção de MIP-2 e KC (MÜLLER et al., 2001). Dessa forma, nós evidenciamos que a falha na migração de neutrófilo em animais geneticamente deficientes para TLR9 não é decorrente a um defeito intrínseco do neutrófilo (como a expressão de receptor CXCR2 *in vivo* e *in vitro* de maneira similar aos de WT), mas sim, à uma ineficiente produção de mediadores quimioatraentes de granulócitos, a qual implica numa deficiente indução do gradiente de quimiotaxia necessário para que o neutrófilo migre em direção ao sítio inflamatório.

Apesar de representarem uma pequena população de leucócitos, as DCs possuem papel importante na iniciação de respostas imunes. Sabe-se que a LV é capaz de modular a função de DCs presentes no baço de camundongos infectados (BASU et al.,

2001), e que as DCs, e não as células de Kupffer (macrófagos residentes no fígado), são as células responsáveis pela produção inicial de mediadores que orquestram a resposta imune durante a infecção por *L. donovani* em camundongos Balb/c (GORAK et al., 1998). É descrito que diversas espécies de *Leishmania* são capazes de modular a maturação de DCs (DE TREZ et al., 2004). Uma vez maduras, as DCs adquirem características fenotípicas e funcionais: (1) aumento da expressão do MHC e moléculas coestimulatórias como CD40, CD80, CD86; (2) redução da capacidade fagocítica e captura de antígeno; (3) aumento da secreção de citocinas; (4) produção de quimiocinas, as quais permitem a migração de DCs e de outros subtipos celulares (REIS E SOUSA, 2004). No presente estudo, nós demonstramos que a ativação de DCs frente à infecção por *L. infantum* é dependente de TLR9, uma vez que DCs provenientes de camundongos TLR9^{-/-} apresentaram fenótipo de maturação reduzido, com menor expressão de MHCII e moléculas coestimuladoras *in vitro* e *in vivo*. Corroborando nossos dados, alguns trabalhos demonstram que a maturação e ativação de DCs frente à infecção com *Leishmania* é dependente da estimulação de TLRs (DE TREZ et al., 2004; FAKHER et al., 2009; MOLL, 2002). Embora existam conflitos entre estudos sobre a capacidade das diversas espécies de *Leishmania* ativarem DCs *in vitro* (BENNETT et al., 2001; QI; POPOV; SOONG, 2001; VON STEBUT et al., 1998), Trez et al., (2004) demonstraram que *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* e *L. mexicana* são capazes de modular efetivamente a ativação de DCs de maneira dependente de MyD88, sugerindo a participação dos TLRs nesse processo de maturação das DCs (DE TREZ et al., 2004). Foi demonstrado que a ativação de DCs presentes em linfonodo drenante de animais C57BL/6 infectados com *L. major* é dependente de TLR9, uma vez que DCs provenientes de camundongos TLR9^{-/-} apresentaram menor expressão de DC40, DC80 e DC86 (FAKHER et al., 2009).

As DCs são essenciais durante as Leishmanioses por serem fonte inicial de moléculas que orquestram o desenvolvimento das respostas imune, sejam elas citocinas ou quimiocinas (GORAK et al., 1998; LIU; UZONNA, 2012; TEIXEIRA et al., 2006). A produção de quimiocinas no local da infecção determina a composição celular no sítio inflamatório e define o desenvolvimento da doença (TEIXEIRA et al., 2006). Uma vez maduras, as DCs são potenciais fonte de mediadores quimiotáticos de leucócitos (MOLL, 2002; REIS E SOUSA, 2004). É descrito que as DCs secretam quimiocinas em resposta ao estímulo *in vitro* com ligantes dos TLRs (PENNA et al., 2002; PROIETTO et al., 2004). Subpopulações de DCs isoladas de baço *naive* foram cultivadas *in vitro* em diferentes condições, e foi observado que quando estimuladas com ligantes do TLR7 (R848) e TLR9 (CpG), as DCs produziram elevados níveis de diversas quimiocinas (PROIETTO et al., 2004), sugerindo que a secreção de fatores quimioatraentes pelas DCs é dependente de TLRs. Nossos resultados demonstram que, além de participar da maturação das DCs, o TLR9 é essencial para a indução da secreção de fatores quimioatraentes de neutrófilos frente à infecção por *L. infantum*. Nós verificamos que BMDC provenientes de camundongo TLR9^{-/-} produziram menores níveis de KC e MIP-2 quando cultivadas com *L. infantum* e, consequentemente, não induzem a migração de neutrófilos de forma eficiente. Corroborando nossos dados, é demonstrado em modelo de infecção experimental com *T. Gondii*, que as DCs orquestram a resposta imune inata mediada pela via de sinalização dos TLRs. Nesse trabalho foi verificado que a ausência do MyD88 nas DCs, e não em macrófagos e neutrófilos, resulta na alta susceptibilidade à infecção por *T. gondii*. Camundongos *knockout* condicionais, com deficiência genética para o MyD88 nas DCs exibiram falha no recrutamento de células para o sítio inflamatório (HOU et al., 2011) demonstrando,

dessa forma, que a via de sinalização dos TLRs participa no processo de migração celular com a indução de mediadores quimiotáticos durante os processos inflamatórios.

Em conjunto, no presente estudo demonstramos que o TLR9 exerce um papel importante no desenvolvimento da resposta imune inata durante a LV induzida experimentalmente por *L. infantum*. Os mecanismos pelo qual a proteção à infecção é induzida estão relacionados com o recrutamento adequado de neutrófilos para o sítio inflamatório, baço e fígado, mediado pela eficiente ativação e produção de fatores quimiotáticos de neutrófilos pelas DCs de forma dependente do TLR9.

Sumário

7 - SUMÁRIO

- ✓ A infecção por *L. infantum* tem a capacidade de modular positivamente a expressão de TLR9, *in vitro* e *in vivo*;
- ✓ Animais deficientes para TLR9 são mais susceptíveis à infecção por *L. infantum*, apresentando quantidades significativamente maiores de parasitos no baço e fígado, quando comparados aos camundongos WT;
- ✓ Durante as fases mais tardias da infecção, os animais TLR9^{-/-} apresentaram menor infiltrado inflamatório no fígado, com consequente formação inadequada do granuloma e ineficiente controle da replicação dos parasitas;
- ✓ Os animais deficientes para TLR9 possuem uma acentuada redução na migração de neutrófilos para os sítios inflamatórios durante a fase crônica da infecção por *L. infantum*;
- ✓ Neutrófilos deficientes para TLR9 possuem fenótipo de ativação e expressão de CXCR2 normal frente à infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. infantum*, bem como apresentam capacidade funcional de migração eficiente quando submetidos a estímulo quimiotático;
- ✓ DCs provenientes de camundongos TLR9^{-/-} apresentaram fenótipo de maturação reduzido, com deficiências na expressão de moléculas co-estimuladoras e

apresentadoras de antígenos, durante a infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. infantum*;

- ✓ A secreção de mediadores quimiotáticos de neutrófilos pelas DCs frente à infecção por *L. infantum* é dependente de TLR9.

Conclusão

8- CONCLUSÃO

TLR9 possui papel chave no controle da infecção experimental por *L. infantum* através de um mecanismo dependente do recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório, mediado pela eficiente ativação e produção de fatores quimiotáticos de neutrófilos pelas DCs.

Modelo Proposto

9- MODELO PROPOSTO

Figura 10: Modelo proposto. TLR9 possui papel chave no controle da infecção por *L. infantum* através de um mecanismo dependente do recrutamento de neutrófilos, mediado pela ativação e secreção de fatores quimiotáticos pelas células dendríticas (DCs). **1)** Durante a infecção experimental por *L. infantum*, as DCs reconhecem os parasitos via TLR9, **2)** o apropriado reconhecimento do patógeno induz a maturação das DCs e **3)** consequente produção de mediadores quimioatraentes de neutrófilos, como KC (CXCL1) e MIP-2 (CXCL2), gerando o gradiente de quimiotaxia. **4)** Os neutrófilos, presentes na corrente sanguínea, são ativados (pela *upregulation* de CD11b e *shedding* de DC62L) e aumentam a expressão de CXCR2. **5)** Por fim, os neutrófilos migram para o sítio inflamatório seguindo o gradiente quimiotático para controlar a infecção.

Referências Bibliográficas

10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGA, E. et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 898-905, 2002. ISSN 0022-1767.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004. ISSN 1474-1733.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-802, 2006. ISSN 0092-8674.

AKOPYANTS, N. S. et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. **Science**, v. 324, n. 5924, p. 265-268, 2009. ISSN 0036-8075.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h) 1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology letters**, v. 99, n. 1, p. 17-23, 2005. ISSN 0165-2478.

ANDERSON, C. F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 5, p. 2934-2941, 2005. ISSN 0022-1767.

ANDERSON, C. F. et al. CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 2, p. 285-297, 2007. ISSN 0022-1007.

ANTONIAZI, S. et al. Chemokine gene expression in toll-like receptor-competent and-deficient mice infected with *Leishmania major*. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 5168-5174, 2004. ISSN 0019-9567.

BABALOO, Z.; KAYE, P. M.; ESLAMI, M. B. Interleukin-13 in Iranian patients with visceral leishmaniasis: relationship to other Th² and Th¹ cytokines. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 1, p. 85-88, 2001. ISSN 0035-9203.

BADOLATO, R. et al. *Leishmania major*: Infection of Human Monocytes Induces Expression of IL-8 and MCP-1. **Experimental parasitology**, v. 82, n. 1, p. 21-26, 1996. ISSN 0014-4894.

BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 6, p. 3515-3519, 2006. ISSN 0022-1767.

BAJÉNOFF, M. et al. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 3, p. 619-631, 2006. ISSN 0022-1007.

BASU, A. et al. Modulation of CD11C⁺ splenic dendritic cell functions in murine visceral leishmaniasis: correlation with parasite replication in the spleen. **Immunology**, v. 99, n. 2, p. 305-313, 2001. ISSN 1365-2567.

BECKER, I. et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 130, n. 2, p. 65-74, 2003. ISSN 0166-6851.

BEIL, W. et al. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **Journal of leukocyte biology**, v. 52, n. 2, p. 135-142, 1992. ISSN 0741-5400.

BELKAID, Y. et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 10, p. 1941-1953, 1998. ISSN 0022-1007.

BELKAID, Y. et al. CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 8, p. 3992-4000, 2002. ISSN 0022-1767.

BENNETT, C. L. et al. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. **European journal of immunology**, v. 31, n. 3, p. 876-883, 2001. ISSN 1521-4141.

BHATTACHARYA, P. et al. Arabinosylated Lipoarabinomannan—Mediated Protection in Visceral Leishmaniasis through Up-Regulation of Toll-Like Receptor 2 Signaling: An Immunoprophylactic Approach. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 1, p. 145-155, 2010. ISSN 0022-1899.

BIRON, C. A.; GAZZINELLI, R. T. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. **Current opinion in immunology**, v. 7, n. 4, p. 485-496, 1995. ISSN 0952-7915.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001. ISSN 1529-2908.

BOGDAN, C. et al. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current opinion in immunology**, v. 8, n. 4, p. 517-525, 1996. ISSN 0952-7915.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological reviews**, v. 173, n. 1, p. 17-26, 2002. ISSN 1600-065X.

BRANDONISIO, O.; SPINELLI, R.; PEPE, M. Dendritic cells in Leishmania infection. **Microbes and infection**, v. 6, n. 15, p. 1402-1409, 2004. ISSN 1286-4579.

BUFFET, P. et al. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 2167-2168, 1995. ISSN 0066-4804.

CAMPOS, M. A. S. et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 416-423, 2001. ISSN 0022-1767.

CARREGARO, V. et al. Phlebotomine salivars inhibit immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE₂/IL-10 sequential pathway. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 1, p. 104-114, 2008. ISSN 0741-5400.

CARVALHO, L. P. et al. Lymph Node Hypertrophy following *Leishmania major* Infection Is Dependent on TLR9. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 3, p. 1394-1401, 2012. ISSN 0022-1767.

CERVIA, J.; ROSEN, H.; MURRAY, H. Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 61, n. 4, p. 1330-1333, 1993. ISSN 0019-9567.

CEZÁRIO, G. A. G. et al. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 573-583, 2011. ISSN 0074-0276.

CHANG, K. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 30, n. 2, p. 322, 1981. ISSN 0002-9637.

CHARMOY, M. et al. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2009. ISSN 1110-7243.

CHARMOY, M. et al. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. **Journal of leukocyte biology**, v. 82, n. 2, p. 288-299, 2007. ISSN 0741-5400.

DE TREZ, C. et al. Myd88-dependent in vivo maturation of splenic dendritic cells induced by *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species. **Infection and immunity**, v. 72, n. 2, p. 824-832, 2004. ISSN 0019-9567.

DE VEER, M. J. et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. **European journal of immunology**, v. 33, n. 10, p. 2822-2831, 2003. ISSN 1521-4141.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004. ISSN 0147-9571.

DRENNAN, M. B. et al. The induction of a type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88 dependent. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 4, p. 2501-2509, 2005. ISSN 0022-1767.

EL-HASSAN, A. et al. Sudanese mucosal leishmaniasis: epidemiology, clinical features, diagnosis, immune responses and treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 6, p. 647-652, 1995. ISSN 0035-9203.

EL HAG, I. et al. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). **Journal of clinical pathology**, v. 47, n. 6, p. 547-551, 1994. ISSN 1472-4146.

ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. **Immunology today**, v. 21, n. 2, p. 73-78, 2000. ISSN 0167-5699.

FAKHER, F. H. A. et al. TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 3, p. 1386-1396, 2009. ISSN 0022-1767.

FAN, J.; MALIK, A. B. Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. **Nature medicine**, v. 9, n. 3, p. 315-321, 2003.

FLANDIN, J. F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- γ -primed macrophages. **European journal of immunology**, v. 36, n. 2, p. 411-420, 2005. ISSN 1521-4141.

FÖRSTER, R. et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. **Cell**, v. 99, n. 1, p. 23-33, 1999. ISSN 0092-8674.

FUNASA. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Secretaria de Saúde: Ministério da Saúde Brasília 2003.

GORAK, P.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **European journal of immunology**, v. 28, n. 2, p. 687-695, 1998. ISSN 1521-4141.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 927, 2002. ISSN 0092-8674.

GUEIRARD, P. et al. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 1, p. 100-111, 2007. ISSN 1462-5822.

GUILLEREY, C. et al. Pivotal role of plasmacytoid dendritic cells in inflammation and NK-cell responses after TLR9 triggering in mice. **Blood**, v. 120, n. 1, p. 90-99, 2012. ISSN 0006-4971.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 16, p. 6748-6753, 2009. ISSN 0027-8424.

HAWN, T. R. et al. *Leishmania major* activates IL-1 α expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway. **Microbes and infection**, v. 4, n. 8, p. 763-771, 2002. ISSN 1286-4579.

HAYASHI, F.; MEANS, T. K.; LUSTER, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2660-2669, 2003. ISSN 0006-4971.

HERWALDT, B. L.; ARANA, B. A.; NAVIN, T. R. The natural history of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 3, p. 518-527, 1992. ISSN 0022-1899.

HOU, B. et al. Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 1, p. 278-283, 2011. ISSN 0027-8424.

HUANG, X. et al. Silencing Toll-like receptor-9 in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 46, n. 11, p. 4209-4216, 2005. ISSN 1552-5783.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science Signalling**, v. 327, n. 5963, p. 291, 2010.

JANEWAY JR, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Science Signalling**, v. 20, n. 1, p. 197, 2002.

JERONIMO, S. M. B. et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 36, n. 6-7, p. 443-449, 2004. ISSN 0036-5548.

JOHNSON, A. C. et al. Activation of toll-like receptor (TLR) 2, TLR4, and TLR9 in the mammalian cornea induces MyD88-dependent corneal inflammation. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 46, n. 2, p. 589-595, 2005. ISSN 1552-5783.

KAPLAN, M. J.; RADIC, M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2689-2695, 2012. ISSN 0022-1767.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373-384, 2010. ISSN 1529-2908.

KIMBLIN, N. et al. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 29, p. 10125-10130, 2008. ISSN 0027-8424.

KROPF, P. et al. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infection and immunity**, v. 72, n. 4, p. 1920-1928, 2004. ISSN 0019-9567.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochem. J**, v. 420, p. 1-16, 2009.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International reviews of immunology**, v. 30, n. 1, p. 16-34, 2011. ISSN 0883-0185.

LAINSON, R. et al. **Evolution, classification and geographical distribution**. Academic Press, 1987. ISBN 0125521014.

LAUFS, H. et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 826-835, 2002. ISSN 0019-9567.

LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against *Leishmania*. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519-531, 2007. ISSN 1074-7613.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. **European journal of immunology**, v. 37, n. 12, p. 3424-3434, 2007. ISSN 1521-4141.

LIEW, F. et al. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, v. 69, n. 4, p. 570, 1990.

LIEW, F. Y.; WEI, X. Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 352, n. 1359, p. 1311-1315, 1997. ISSN 0962-8436.

LIMA, G. M. A. C. et al. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. **Immunology letters**, v. 64, n. 2, p. 145-151, 1998. ISSN 0165-2478.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, 2012.

MALLA, N.; MAHAJAN, R. Pathophysiology of visceral leishmaniasis-some recent concepts. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 267, 2006. ISSN 0971-5916.

MARSDEN, P. et al. Spontaneous healing of Leishmania braziliensis braziliensis skin ulcers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 561-562, 1984. ISSN 0035-9203.

MAURICIO, I.; STOTHARD, J.; MILES, M. The strange case of Leishmania chagasi. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MCFARLANE, E. et al. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with Leishmania donovani. **Infection and immunity**, v. 76, n. 2, p. 532-541, 2008. ISSN 0019-9567.

MOLL, H. The role of dendritic cells at the early stages of Leishmania infection. **The Biology and Pathology of Innate Immunity Mechanisms**, p. 163-173, 2002.

MOLYNEUX, D.; KILLICK-KENDRICK, R.; PETERS, W. Morphology, ultrastructure and life cycles. **The leishmaniasis in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology**, p. 121-176, 1987.

MOMEN, H. et al. Molecular evidence for the importation of Old World Leishmania into the Americas. **Biol. Res**, v. 26, n. 1/2, p. 249-55, 1993. ISSN 0716-9760.

MÜLLER, K. et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of Leishmania major infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, n. 1, p. 73-76, 2001. ISSN 0300-8584.

MURAILLE, E. et al. Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with a polarized Th2 response. **J Immunol**, v. 170, n. 8, p. 4237-41, Apr 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682257> >.

MURAILLE, E. et al. Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with *Leishmania major*. **Infection and immunity**, v. 71, n. 5, p. 2704-2715, 2003. ISSN 0019-9567.

MURRAY, H. Granulomatous inflammation: host antimicrobial defense in the tissues in visceral leishmaniasis. **Inflammation: basic principles and clinical correlates, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa**, p. 977-994, 1999.

MUZIO, M. et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 11, p. 5998-6004, 2000. ISSN 0022-1767.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological reviews**, v. 219, n. 1, p. 88-102, 2007. ISSN 1600-065X.

NEAL, R.; REEVES, A.; PETERS, W. < i> *Leishmania*</i> infecting man and wild animals in Saudi Arabia 7. Partial protection of mice against< i> *Leishmania major*</i> by prior infection with< i> *L. arabica*</i>. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 233-238, 1990. ISSN 0035-9203.

OSANYA, A. et al. Pathogen-derived oligosaccharides improve innate immune response to intracellular parasite infection. **The American journal of pathology**, v. 179, n. 3, p. 1329-1337, 2011. ISSN 0002-9440.

PEARSON, R.; STEIGBIGEL, R. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Immunology**, v. 127, n. 4, p. 1438-1443, 1981. ISSN 0022-1767.

PENNA, G. et al. Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 12, p. 6673-6676, 2002. ISSN 0022-1767.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008. ISSN 0036-8075.

PETERS, W. et al. < i> *Leishmania*</i> infecting man and wild animals in Saudi Arabia 8. The influence of prior infection with< i> *Leishmania arabica*</i> on challenge with< i> *L. major*</i> in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 5, p. 681-689, 1990. ISSN 0035-9203.

POMPEU, M. et al. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. **Acta tropica**, v. 48, n. 3, p. 185-193, 1991. ISSN 0001-706X.

PROIETTO, A. I. et al. Differential production of inflammatory chemokines by murine dendritic cell subsets. **Immunobiology**, v. 209, n. 1, p. 163-172, 2004. ISSN 0171-2985.

QI, H.; POPOV, V.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4⁺ T cells in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 8, p. 4534-4542, 2001. ISSN 0022-1767.

REINER, N. E. et al. Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor- α and interleukin 1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 6, p. 1914, 1990.

REIS E SOUSA, C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 1, p. 21-25, 2004. ISSN 0952-7915.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007. ISSN 1473-3099.

REVAZ-BRETON, M. et al. The MyD88 protein 88 pathway is differently involved in immune responses induced by distinct substrains of *Leishmania major*. **European journal of immunology**, v. 40, n. 6, p. 1697-1707, 2010. ISSN 1521-4141.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 7, p. 4454-4462, 2004. ISSN 0022-1767.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* response. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002536, 2012. ISSN 1553-7374.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505-510, 2009. ISSN 1471-4922.

RITTER, U.; KÖRNER, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis*. **Parasite immunology**, v. 24, n. 6, p. 295-301, 2002. ISSN 1365-3024.

ROBERTS, L. J.; HANDMAN, E.; FOOTE, S. J. Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. **BMJ: British Medical Journal**, v. 321, n. 7264, p. 801, 2000.

ROUSSEAU, D. et al. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17, 2001. ISSN 1471-2180.

SABROE, I.; DOWER, S. K.; WHYTE, M. K. B. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. **Clinical infectious diseases**, v. 41, n. Supplement 7, p. S421-S426, 2005. ISSN 1058-4838.

SABROE, I. et al. Selective roles for Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 10, p. 5268-5275, 2003. ISSN 0022-1767.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002. ISSN 1474-1733.

SACKS, D. L.; BRODIN, T. N.; TURCO, S. J. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 42, n. 2, p. 225-233, 1990. ISSN 0166-6851.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 34, n. 3, p. 456, 1985. ISSN 0002-9637.

SARAIVA, E. et al. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, v. 111, n. 03, p. 275-287, 1995. ISSN 1469-8161.

SCHARTON-KERSTEN, T. et al. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 154, n. 10, p. 5320-5330, 1995. ISSN 0022-1767.

SCHLEICHER, U. et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 4, p. 893-906, 2007. ISSN 0022-1007.

SHODA, L. K. M. et al. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. **Infection and immunity**, v. 69, n. 4, p. 2162-2171, 2001. ISSN 0019-9567.

SMELT, S. C. et al. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3681-3688, 2000. ISSN 0022-1767.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. < i> Leishmania major</i> infection: the overture. **Parasitology Today**, v. 11, n. 10, p. 394-397, 1995. ISSN 0169-4758.

SRIVASTAVA, A. et al. Identification of TLR inducing Th1-responsive Leishmania donovani amastigote-specific antigens. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 359, n. 1, p. 359-368, 2012. ISSN 0300-8177.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 138-147, 2006. ISSN 0818-9641.

TACCHINI-COTTIER, F. et al. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with Leishmania major. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 5, p. 2628-2636, 2000. ISSN 0022-1767.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010. ISSN 0092-8674.

TEIXEIRA, M. J. et al. Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 1, p. 32-40, 2006. ISSN 1471-4922.

THAKUR, C.; MITRA, D.; NARAYAN, S. Skewing of cytokine profiles towards T helper cell type 2 response in visceral leishmaniasis patients unresponsive to sodium antimony gluconate. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 409-412, 2003. ISSN 0035-9203.

THALHOFER, C. J. et al. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan Leishmania infantum chagasi. **Infection and immunity**, v. 79, n. 1, p. 108-117, 2011. ISSN 0019-9567.

TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite immunology**, v. 22, n. 7, p. 319-331, 2002. ISSN 1365-3024.

TREVELIN, S. C. et al. Toll-like receptor 9 activation in neutrophils impairs chemotaxis and reduces sepsis outcome*. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 9, p. 2631-2637, 2012. ISSN 0090-3493.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004. ISSN 0022-1767.

VENUPRASAD, K. et al. Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN- γ secretion and restriction of Leishmania growth. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 920-928, 2002. ISSN 0022-1767.

VERESS, B. et al. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 33, n. 5, p. 607, 1977.

VON STEBUT, E. et al. 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. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 8, p. 1547-1552, 1998. ISSN 0022-1007.

WARTHA, F. et al. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 1, p. 52-56, 2007. ISSN 1369-5274.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147-160, 2005. ISSN 0882-4010.

YAROVINSKY, F. et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science Signalling**, v. 308, n. 5728, p. 1626, 2005.

ZER, R. et al. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 8, p. 810-814, 2001. ISSN 0020-7519.