ISMAEL PRETTO SAUTER

Estudo do papel dos receptores do tipo Toll (TLRs) na indução de CD200 em macrófagos murinos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

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

ISMAEL PRETTO SAUTER

Estudo do papel dos receptores do tipo Toll (TLRs) na indução de CD200 em macrófagos murinos infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis

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

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Mauro Javier Cortez Véliz

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-Graduação que aloja o Programa de Pós-Graduação.

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pretto Sauter, Ismael
Estudo do papel dos receptores do tipo Toll
(TLRs) na indução de CD200 em macrófagos murinos
infectados com Leishmania (Leishmania) amazonensis
/ Ismael Pretto Sauter; orientador Mauro Javier
Cortez Véliz. -- São Paulo, 2017.
125 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. L. (L.) amazonensis. 2. CD200. 3. TLR9. 4. Macrófago. 5. Vesículas extracelulares (VEs). I. Cortez Véliz, Mauro Javier, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Ismael Pretto Sauter

Título da Tese: Estudo do papel dos receptores do tipo toll (TLRs) na indução de CD200 em macrófagos murinos infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis

Orientador: Prof. Dr. Mauro Javier Cortez Véliz

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **21/11/2017**, considerou o(a) candidato(a):

(X) Aprovado	o(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura:Nome:Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
Examinador(a):	Assinatura:
Presidente:	Assinatura:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 95 nas fls. 03 do livro 09 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Mauro Javier Cortez Veliz Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Estudo do papel dos receptores do tipo toll (TLRs) na indução de CD200 em macrófagos murinos infectados com Leishmania (L.) amazonensis" do qual participam o(s) aluno(s) Ismael Prettto Sauter, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 13.08.2013, com validade de 4 anos.

São Paulo, 19 de agosto de 2013.

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

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



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Mauro Cortez por ter aberto as portas do seu laboratório, para que eu pudesse concretizar um sonho. Por ter me dado a oportunidade de desenvolver um projeto com o qual me envolvi e aprendi a fazer ciência. Foram 4 anos de uma amizade que me ajudaram a me tornar mais profissional e humano.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao projeto 2013/14087-0. Poucas pessoas tem a sorte de contar com o apoio de uma instituição como esta, que está à frente da pesquisa no Brasil.

A todos os meus professores durante este período. Em especial à Prof.ª Sílvia Uliana, pelo exemplo de educadora que é.

Ao Dr. Anderson de Sá Nunes pela ajuda e paciência em nossos experimentos. E à sua aluna Dra. Bruna Bizarro, que auxiliou em minhas análises de citometria de fluxo.

À Dra. Ana Cláudia Torrecilhas pela ajuda nos experimentos com vesículas extracelulares. Foi muito gostoso poder dividir o fluxo com uma profissional tão carismática.

Aos meus colegas de laboratório, que sempre estiveram presentes me auxiliando em experimentos e discutindo resultados. Albert, Viviane, Juliana, Natália Soares, Natália Fiesco, Ana, Talita, Thaís, Johanna, Karen, entre tantos outros. Agradeço de forma especial ao nosso técnico Mário Balanco pela amizade e pelo comprometimento em sempre deixar o laboratório organizado e funcionando.

Agradeço a todos os amigos que fiz no Departamento de Parasitologia, em especial: Janaína, Rosana, Flávia, Fernanda, Letícia, Raissa, Soraya, Rodolfo, Eloiza e Natália. Muitas vezes foi um sorriso pelos corredores e uma corversa sincera que me motivaram a nunca desistir.

Ao meu ex-colega de laboratório e hoje grande amigo, Andreas, pela parceria nos bons e maus momentos, dentro e fora do laboratório.

À Lina, que iluminou e divertiu meus dias. Uma colega de laboratório e grande amiga que me ajudou de tantas formas e tantas vezes. Dividimos risadas, sonhos, conquistas, tristezas e alegrias. Foram anos aprendendo juntos. Muitos erros e muitos

acertos. Sempre será uma pessoa especial na minha vida e tenho certeza que nunca haverá distância entre nós.

À Fernanda. Uma luz no meu caminho. Agradeço por Deus ter te enviado naquela tarde de chuva pedir ajuda com um experiento. Lá se foram anos de uma amizade intensa, engraçada e sincera. Me ensinou a ser positivo e acreditar no meu potencial.

Aos amigos que fiz em São Paulo. Em especial ao Adriano por sempre me dar bons conselhos.

A todos os meus amigos do Sul, que mesmo de longe me ajudaram com palavras de carinho e conforto. Muitas vezes foram suas mensagens, ligações e visitas que ajudaram a não me sentir sozinho nesse caminho que escolhi. Principalmente à Marcela, que se fez presente todos os dias, me apoiando e incentivando.

Ao meu colega de apartamento German, que foi como um irmão mais velho que a vida me deu, me ensinando a ser paciente e sempre dar ao máximo o meu melhor para conquistar meus objetivos.

À Sandra. Uma das pessoas mais incríveis que já conheci. Durante esses quatro anos, ela foi minha mãe, minha irmã e minha amiga. Quaria que fosse eterno aquele tempo que saíamos da USP, comprávamos cerveja no mercado e íamos para casa beber e reclamar da vida. Além disso, também me presenteou com o Mário, seu esposo, que hoje é uma das pessoas que mais admiro.

Aos meus pais, que nunca mediram esforçosa para me dar toda a educação necessária. Sempre me incentivaram a buscar meus sonhos. Estiveram presentes todo o tempo, mesmo a distância geográfica nos separando. Agradeço todas as noites pela sorte que eu tenho te ter esta família tão maravilhosa.

"Se você quer os acertos, esteja preparado para os erros" Carl Yastrzemski

RESUMO

Sauter IP. Estudo do papel dos receptores do tipo Toll (TLRs) na indução de CD200 em macrófagos murinos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Parasitos intracelulares do gênero Leishmania são responsáveis por causar um complexo de doenças denominadas leishmanioses. Uma vez dentro do hospedeiro, estes parasitos são fagocitados por células de defesa, como os macrófagos. Através da interação via receptores do tipo Toll (TLRs), macrófagos são ativados e iniciam o processo de destruição do parasito. Porém, para assegurar sua sobrevivência os parasitos são capazes de manipular as respostas de defesa dessas células através da inibição de mecanismos microbicidas. Um dos mecanismos imunomodulatórios utilizados pela Leishmania (Leishmania) amazonensis é a indução da expressão de CD200 no macrófago, uma glicoproteína de membrana que em contato com o seu receptor CD200R inibe a ativação da célula. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel de TLRs na indução de CD200 em macrófagos infectados por L. (L.) amazonensis. Para isto, macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagem ou deficientes (-/-) para diferentes TLRs (TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9) e suas proteínas adaptadoras (MyD88 e TRIF), foram infectados com amastigotas de L. (L.) amazonensis. Ensaios in vitro e in vivo foram preparados e analisados por imunoprecipitação, ensaios de infecção e citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a indução de CD200 por amastigotas internalizados e viáveis de L. (L.) amazonensis é dependente da via TLR9/MyD88/TRIF no macrófago infectado. Além disso, a ativação de TLR9 envolve DNA contido em microvesículas liberadas pelo parasita, estruturas capazes de induzir CD200, modulando a expressão de iNOS e a produção de NO no macrófago. Na infecção in vivo de camundongos TLR9^{-/-}, nenhuma diferença foi observada na lesão, mas a caga parasitária foi menor nestes camundongos infectados quando comparados ao camundongo controle. A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que a indução de CD200 na infecção por L. (L.) amazonensis é dependente da via de TLRs, ativadas por microvesículas contendo DNA de Leishmania.

Palavras-chave: L. (L.) amazonensis. CD200. TLR9. Macrófago. Microvesículas.

ABSTRACT

Sauter IP. Role of Toll-like receptors (TLRs) in CD200 induction in murine macrophages infected with *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis, [Ph. D. thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Intracellular parasites of the *Leishmania* genus are responsible for causing a complex of diseases called leishmaniasis. Once inside of the host, these parasites are phagocytosed by defense cells, such as macrophages. Through the interaction of Tolllike receptors (TLRs), macrophages are activated and initiate the process of parasite destruction. However, to ensure survival, the parasites are capable of manipulating the defense responses of the cells through the inhibition of microbicidal mechanisms. One immunomodulatory mechanisms used by Leishmania (Leishmania) amazonensis is the induction of CD200 expression in macrophages, a membrane glycoprotein which in contact with its receptor CD200R inhibits cellular activation. The objective of this work was to evaluate the role of TLRs in CD200 induction in macrophages infected by L. (L.) amazonensis. To accomplish this, Bone marrow macrophages (BMMs) from wild-type (WT), MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-}, TLR2^{-/-}, TLR3^{-/-}, TLR4^{-/-} and TLR9-/- mice were infected with L. (L.) amazonensis amastigotes and in vitro and in vivo assays were performed and analyzed by immunoprecipitation techniques, infection assays and flow cytometry. Our results showed that the CD200 induction by internalized and viable Leishmania amastigotes is dependent TLR9/MyD88/TRIF pathway in the infected macrophage. TLR9 activation involves DNA-containing microvesicles released by the parasite - structures capable of inducing CD200, inhibiting iNOS expression and NO production in macrophages. In in vivo infection of TLR9^{-/-}, no difference in the lesion was observed, but the parasite load was less than in infected WT mice. Thus, we concluded that the induction of CD200 in L. (L.) amazonensis infection is dependent on TLR pathways, activated by microvesicles containing Leishmania DNA.

Keywords: L. (L.) amazonensis. CD200. TLR9. Macrophage. Microvesicles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Manife	estações clínicas das diferentes formas da leishmaniose	.26
Figura 2 - Distrib	ouição da leishmaniose visceral, 2015	.28
Figura 3 - Distrib	ouição da leishmaniose cutânea, 2015	.29
Figura 4 - Taxon	nomia da <i>Leishmania</i>	.29
Figura 5 - Forma	as biológicas da <i>Leishmania</i> durante seu ciclo de vida	.31
Figura 6 - Ciclo	de vida da <i>Leishmania</i> no vetor	.33
Figura 7 - Ciclo I	biológico da <i>Leishmania</i>	.35
Figura 8 - Model	lo de imunomodulação por CD200-CD200R	.39
Figura 9 – Vias	de sinalização celular mediados por TLRs	.44
Figura 10 - Cur	va de crescimento em meio de cultura de promastigotas de L.	(L)
ama	azonensis	.49
Figura 11 - Pro	ocedimentos utilizados para obtenção de Vesículas Extracelula	res
(VE	ēs)	.60
Figura 12 - Estra	atégia da análise utilizada para avaliar a população de células F4/8	30+
CD	200+ nas lesões	.63
Figura 13 - Indu	ção de CD200 em macrófagos infectados com amastigotas de <i>L.</i>	(L.)
ama	azonensis	.66
Figura 14 - Indu	ução de CD200 em macrófagos infectados com diferentes MOI	de
ama	astigotas de <i>L. (L.) amazonensi</i> s	.67
Figura 15 - Impo	ortância da fagocitose de L. (L.) amazonensis para a expressão	de
CD	200 em macrófagos	.69
Figura 16 - Impo	ortância da viabilidade da L. (L.) amazonensis para a expressão	de
CD	200 em macrófagos	.70
Figura 17 - Aná	álise por microscopia confocal da expressão de CD200 durante	e a
infe	ecção por amastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i>	.69
Figura 18 - An	nálise da localização celular de CD200 durante a infecção p	por
ama	astigotas <i>L. (L.) amazonensis</i>	.74
Figura 19 - An	nálise da co-localização CD200-CD200R durante a infecção p	por
ama	astigotas <i>L. (L.) amazonensi</i> s	.75
Figura 20 - Im	portância dos TLRs para a indução de CD200 em macrófaç	gos
infe	ectados por amastigotas de <i>L. (L.) amazonensi</i> s	.77

Figura 21 - Infecção in vitro de macrófagos TLR-/- por amastigotas de L. (L
amazonensis7
Figura 22 - Indução de CD200 em macrófagos por agonistas de TLRs7
Figura 23 - Avaliação dos níveis de CD200R em macrófagos infectados po
amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> 7
Figura 24 - Importância de MyD88 e TRIF na indução de CD200 em macrófago
infectados por amastigotas de L. (L.) amazonensis8
Figura 25 - Infecção in vitro de macrófagos MyD88-/- e TRIF-/- por amastigotas de l
(L.) amazonensis8
Figura 26 - Multiplicação intracelular de amastigotas de L. (L.) amazonensis er
diferentes macrófagos8
Figura 27 - Importância de MyD88 e TRIF na indução de CD200 em macrófagos 96
após a infecção por amastigotas de L. (L.) amazonensis
Figura 28 - A importância de TLR9 na infecção de camundongos por L. (L
amazonensis8
Figura 29 - Indução de CD200 em macrófagos por DNA de L. (L.) amazonensis8
Figura 30 - Inibição da enzima iNOS e da produção de NO celular por DNA de <i>L. (L</i>
amazonensis8
Figura 31 - Vesículas extracelulares liberadas por amastigotas de L. (L
amazonensis9
Figura 32 - Caracterização das vesículas extracelulares liberadas por amastigotas d
L. (L.) amazonensis9
Figura 33 - Indução de CD200 por DNA de vesículas extracelulares liberadas po
amastigotas de <i>L. (L.) amazonensi</i> s9
Figura 34 - Níveis citoplasmáticos de NF-κB em macrófagos infectados po
amastigotas de <i>L. (L.) amazonensi</i> s8
Figura 35 - Participação de NF-κB, JAK, ERK e PKR na indução de CD200 po
amastigotas de <i>L. (L.) amazonensi</i> s9
Figura 36 - Fosforilação da proteína ERK em macrófagos durante os diferente
tempos de infecção por amastigotas de L. (L.) amazonensis9
Figura 37 - Importância do cálcio intracelular na indução de CD200 em macrófago
por amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> 9
Figura 38 - Regulação dos níveis de CD200 por sistemas celulares de degradaçã
proteica9

Figura 39 -	Esquema de indução de	e CD200 por	amastigotas	de <i>L. (L.)</i> a	amazonensis
	na infecção de macrófa	gos			112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais utilizados na Citometria de Fluxo. 62
--

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3MA 3-Metiladenina

aa Aminoácidos

ANOVA Análise de variância

AP-1 Proteína ativadora 1 (AP-1, do inglês activator protein 1)

BCA Ácido bicinconínico

BOD Estufa para demanda bioquímica de oxigênio

BSA Albumina sérica bovina

C3b Componente 3 do sistema complemento

C3bi Proteína C3b inativa

CaCl₂ Cloreto de cálcio

CD11c Cluster of differentiation 11c

CD19 Cluster of differentiation 19

CD200 Glicoproteína OX2 de membrana

CD200-Fc Proteína CD200 recombinante (fusionada a fragmento Fc)

CD200R Receptor da glicoproteína OX2 de membrana

CD45 Cluster of differentiation 45

cDNA DNA complementar

Cit D Citocalasina D

CO₂ Dióxido de Carbono

CpG Citosina-fosfato-Guanina

CREB Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico

DAMP Padrões moleculares associados a dano celular

DAPI 4 ',6-diamino-2-fenilindol

DNA Ácido desoxirribonucleico

Dok2 Proteína adaptadora a jusante de tirosina quinase 2

dsRNA RNA dupla fita

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERK Proteína guinase regulada por sinal extracelular

FcyR Receptores Fc

FITC Isotiocianato de fluoresceína

FMO Fluorescência menos um

FSC-A Forward scatter area

FSC-H Forward scatter height

GAPDH Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GIPL Glicoinositol fosfolipídeo

GP63 Glicoproteína 63

IFN Interferon

Ig Imunoglobulina

IgG Imunoglobulina G

IKK Proteína quinase do Inibidor de NF-kB

IL-1 Interleucina 1

IL-10 Interleucina 10

IL-12 Interleucina 12

IL-1R Receptor de interleucina 1

IL-1β Interleucina 1 Beta

IL-2 Interleucina 2

IL-4 Interleucina 4

IL-6 Interleucina 6

IL-8 Interleucina 8

iNOS Óxido nítrico sintase induzível

IP Imunoprecipitação

IRAK Proteína quinase associada ao receptor de IL-1

IRF Fator regulador de interferon

ISP2 Inibidor de serino peptidase 2

ITIM Imunorreceptor baseado em tirosina

IκB Inibidor de NF-κB

JAK Janus quinase

JNK c-Jun N-terminal quinase

KCI Cloreto de potássio

KO knockout

LAMP-1 Proteína 1 de membrana associada a lisosomo

L. Leishmania

LC Leishmaniose cutânea

LCD Leishmaniose cutânea difusa

LCL Leishmaniose cutânea localizada

LDPC Leishmaniose dérmica pós-calasar

LMC Leishmaniose mucocutânea

Log 10 Logaritmo na base 10

LPG Lipofosfoglicano

LPS Lipopolissacarídeo

LV Leishmaniose visceral

MAC Complexo de ataque à membrana

MAL Proteína adaptadora tipo MyD88

MAPK Proteína quinase ativada por mitógeno

M-CSF Fator estimulador de colônia de macrófagos

MEV Microscopia eletrônica de varredura

MFI Mediana da intensidade de fluorescência

MgCl₂ Cloreto de magnésio

MHC II Complexo principal de histocompatibilidade II

miRNA Micro RNA

MKK MAP quinase quinase

MOI Multiplicidade de infecção

mRNA RNA mensageiro

MyD88 Proteína de diferenciação mieloide 88

NaCl Cloreto de sódio

NALP3 Proteína 3 que contém os domínios NACHT, LRR e PYD

NET Armadilha extracelular de neutrófilo

NF-κB Fator nuclear kappa B

NH₄Cl Cloreto de amônio

NI Não infectado (Not infected)

NK Células *natural* killer

NLR Receptores tipo NOD

NO Óxido nítrico

OMS Organização Mundial da Saúde

PAMP Padrões moleculares associado à patógenos

PB Pacific blue

PBS Tampão fosfato-salino

PE Phycoerthrin

P-ERK Proteína quinase regulada por sinal extracelular fosforilada

PGN Peptideoglicano

PH8 L. (L.) amazonensis IFLA/BR/67/PH8

PI lodeto de Propídio

PI3K Fosfatidilinositol 3 quinase

PKC Proteína quinase C

PKR Proteína quinase dependente de dsRNA

poly I:C Ácido poli-inosínico
PPG Proteofosfoglicano

PRR Receptores de reconhecimento padrão

RANK L Ligante para RANK

RANK Receptor ativador de NF-kB

RasGAP Proteína ativadora GTPase de Ras

RE Retículo endoplasmático

RIP1 Proteína 1 de interação com o receptor

RNA Ácido ribonucleico rRNA RNA ribossômico:

SDS Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SERCA Bomba Ca²⁺-ATPase do retículo sarco/endoplasmático

SFB Soro fetal bovino

SNC Sistema nervoso central

ssRNA RNA fita simples

STAT Transdutores de sinais e ativadores de transcrição

TAB Proteína de ligação a TAK1

TAK Proteína quinase ativada por TGFβ

TBK1 Proteína quinase 1 de ligação à TANK

TBS Tampão salina Tris

TBS-T TBS com Tween-20

TEMED N, N, N', N'-Tetrametilnodiamina

TGF-β Fator de transformação do crescimento beta

Th1 Resposta celular Th1

Th2 Resposta celular Th2

TLR Receptores tipo Toll

TNF Fator de necrose tumoral

TRAF Fatores associados ao receptor de TNF

TRAM Molécula adaptadora relacionada a TRIF

TRIF Proteína adaptadora que contém o domínio TIR indutor de IFN β

Tris Tris(hidroximetil)aminometano

V. Viannia

VEs Vesículas extracelulares

VP Vacúolo parasitóforo

WT Wild type

WHO Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

LISTA DE SÍMBOLOS

% porcentagem

°GL grau Gay Lussac (% vol)

μg micrograma

μg/mL microgramas por mililitro

μL microlitroμm micrômetroμM micromolar

cm² centímetros quadrados

g gramas

g/L gramas por litro

h hora

kDa kilodaltons

L litro

M molaridade
mA miliamperes
mg miligrama
min minuto
ml mililitro

mL mililitro
mm milímetro
mM milimolar
MΦ macrófago
ng nanograma

nM nanomolar nm nanômetro

nº número

°C graus Célsius

pH potencial de hidrogênio

seg segundo

U/mL unidades por mililitro

V voltagem x g gravidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO24	4
1.1 Leishmaniose25	5
1.2 Epidemiologia da leishmaniose27	7
1.3 Leishmania30	0
1.3.1 Inseto vetor e transmissão da Leishmania31	
1.3.2 Ciclo biológico de Leishmania32	2
1.4 Células envolvidas na infecção por <i>Leishmania</i> 35	5
1.5 Mecanismo de evasão da resposta imunológica37	7
1.5.1 Vesículas extracelulares (VEs)39	
1.6 Glicoproteína de superfície CD20039	a
1.6.1 CD200 e Leishmania	2
4.7 December of the Tell (TLDs)	2
1.7 Receptores do tipo Toll (TLRs)	
1.7.2 TLR e CD200	
2 OBJETIVOS48	В
2.1 Objetivo Geral49	9
2.2 Objetivos Específicos49	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS50	0
3.1 Cultura de <i>Leishmania</i> 51	1
3.2 Animais52	2
3.3 Cultivo de células L929 e obtenção do sobrenadante53	3
3.4 Macrófagos53	3
3.5 Infecção experimental <i>in vitro</i> 54	4
3.6 Tratamentos de macrófagos55	5
3.6.1 Avaliação da importância da fagocitose na indução de CD20055	5
3.6.2 Avaliação da importância da viabilidade do amastigota na indução de CD20055	5
3.6.3 Avaliação da indução de CD200 por agonistas de TLRs e DNA de L. (L.	
amazonensis	
3.6.4 Avaliação da participação de diferentes vias de sinalização celular na indução	
de CD200 por L. (L.) amazonensis56 3.6.5 Modulação dos níveis proteicos de iNOS e da produção de NO57	

3.7 <i>Western blot</i> e imunoprecipitação57	
3.8 Imunofluorescência58	
3.9 Produção de Óxido Nítrico59	
3.10 Análise da produção de vesículas extracelulares (VEs)59	
3.11 Infecção <i>in vivo</i> e quantificação da carga parasitária61	
3.12 Citometria de fluxo62	
3.13 Análise estatística63	
4 RESULTADOS65	
4.1 Caracterização do processo de indução de CD200 em macrófagos infectados com amastigotas de L. (L.) amazonensis	
4.3 Avaliação da importância de TLR9 na infecção de camundongos com <i>L. (L.)</i> amazonensis86	
4.4 Identificação da molécula efetora de <i>L. (L.) amazonensis</i> responsável pela indução de CD200 em macrófagos87	
4.4.1 Indução de CD200 em macrófagos por DNA de L. (L.) amazonensis e sua modulação na atividade da enzima iNOS	
4.4.2 Indução de CD200 em macrófagos por vesículas extracelulares de L. (L.) amazonensis90	
4.5 Importância de diferentes vias de sinalização celular na indução de CD200 em macrófagos infectados por <i>L. (L.) amazonensis</i> 94	
4.5.1 Avaliação das vias de sinalização celular utilizadas por TLRs na indução de CD200 em macrófagos infectados por amastigotas de L. (L.) amazonensis94	

4.5.2	Avaliação da importância infectados por L. (L.) ama		,		
4.5.3	Participação das vias d macrófagos infectados po	e degradação	proteica na	indução de	CD200 em
5 DIS	CUSSÃO				101
6 COI	NCLUSÕES				111
REFE	RÊNCIAS				114

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é um complexo de doenças causadas por parasitos protozoários pertencentes a mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, um parasito tripanossomatídeo que é transmitido pela picada do inseto vetor, chamado de flebotomíneo [Bates, 2007; World Health Organization (WHO), 2015]. Existem três formas da doença dependendo da espécie de *Leishmania* infectante e da imunidade do hospedeiro: (i) a leishmaniose cutânea (LC) (forma mais comum da doença); (ii) a leishmaniose mucocutânea (LMC) (forma menos comum, causada por algumas espécies do parasito); e a leishmaniose visceral (LV), muitas vezes conhecida como calazar (forma mais grave da doença) (Kevric et al., 2015; WHO, 2015).

A leishmaniose cutânea pode apresentar diferentes formas de acordo com as manifestações clínicas apresentadas pelo hospedeiro. A forma mais comum é a leishmaniose cutânea localizada, que apresenta lesões ulcerativas no local da picada e pode ser auto curável (Figura 1A). A segunda forma, a leishmaniose cutânea difusa (LCD), se manifesta de modo mais severa, causando o aparecimento de múltiplos nódulos não ulcerativos (Figura 1B). Já a forma disseminada da leishmaniose cutânea é caracterizada por múltiplas lesões ulceradas e papulares encontradas em diversas áreas do corpo (Figura 1C), devido a disseminação por meio da via hematogênica ou linfática (McGwire, Satoskar, 2014).

A leishmaniose mucocutânea pode ocorrer simultaneamente com uma manifestação cutânea. No entanto, geralmente ocorre meses ou anos após a leishmaniose cutânea. Esta forma da doença atinge as mucosas do trato respiratório superior (Figura 1D), afetando a cavidade nasal e muitas vezes também a cavidade oral (Goto, Lindoso, 2012). A leishmaniose mucocutânea tem a capacidade de destruir os tecidos, causando desfiguração e até mesmo a morte do paciente por infecções secundárias (Goto, Lindoso, 2012; McGwire, Satoskar, 2014).

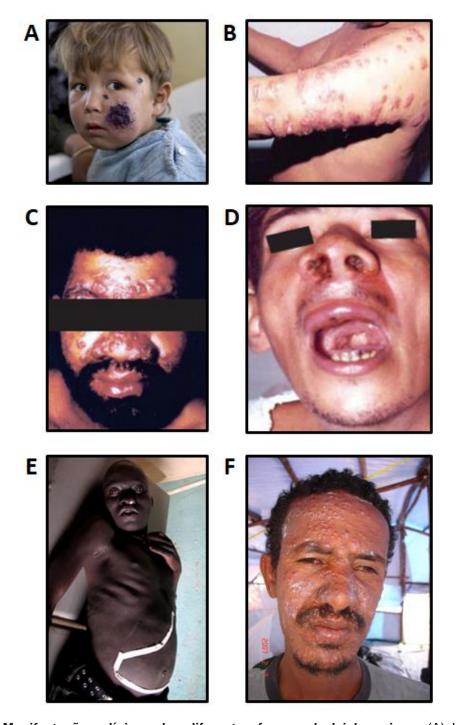


Figura 1 - Manifestações clínicas das diferentes formas da leishmaniose. (A) Leishmaniose cutânea localizada, (B) leishmaniose cutânea difusa, (C) leishmaniose cutânea disseminada, (D) leishmaniose mucocutânea, (E) leishmaniose visceral e (F) leishmaniose dérmica pós-calazar. Imagens A, B, C e D foram adaptadas do Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana (2006) e as imagens E e F foram obtidas do site da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015).

A leishmaniose visceral (calazar) ocorre devido à metástase das células infectadas do local da picada do flebotomíneo aos órgãos viscerais como baço, fígado e medula óssea. Devido à grande atividade de defesa imunológica do organismo, a

infecção provoca um quadro de hepatoesplenomegalia - aumento do tamanho do baço e do fígado (Figura 1E) - assim como um quadro de trombocitopenia e anemia, devido a supressão da medula. Esta forma da doença, se não tratada devidamente leva à morte do paciente (McGwire, Satoskar, 2014).

Alguns casos de leishmaniose visceral podem apresentar complicações posteriores. A leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) ocorre em pacientes clinicamente curados da leishmaniose visceral, podendo surgir até 20 anos após a infecção inicial. Neste caso o paciente apresenta lesões nodulares, maculares ou papulares com desenvolvimento progressivo (Figura 1F) (McGwire, Satoskar, 2014).

Apesar do grande avanço das pesquisas nos últimos anos, a leishmaniose ainda não apresenta um tratamento ideal e eficaz. Os fármacos de primeira escolha continuam sendo considerados os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina — Gluncantime®. Contudo, esses têm apresentado uma baixa eficácia terapêutica em alguns estudos (Machado et al., 2010; Chrusciak-Talhari et al., 2011; Neves et al., 2011; Dastgheib et al. 2012). A anfotericina B e a pentamidina são os fármacos de segunda escolha, mas apresentam uso limitado devido à sua toxicidade e custo elevado (Alvar et al., 2006). Além desses, a miltefosina oral também é usada, mas apresenta ação espécie-dependente (Soto et al., 2004; Yardley et al., 2005). Em geral, os agentes quimioterápicos disponíveis para o tratamento da leishmaniose são limitados por problemas como toxicidade, eficácia variável, resistência e alto custo, fazendo-se necessária a descoberta de novas opções terapêuticas para o tratamento da doença (Uliana, Trinconi, Coelho, 2017).

1.2 Epidemiologia da leishmaniose

A leishmaniose é uma das principais doenças tropicais negligenciadas. Ela afeta principalmente pessoas pobres e está associada principalmente à espécie infectante do parasito e ao sistema imunológico debilitado do hospedeiro. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 0,9 e 1,7 milhão de pessoas sejam infectadas todos os anos, mas apenas uma pequena fração delas desenvolverá a doença e 20,000-30,000 acabarão morrendo, em sua maioria por LV, quando não tratada (WHO, 2015).

A doença está amplamente distribuída nas áreas tropicais e subtropicais do planeta, sendo encontrada em países da Europa, África, Ásia e América (Alvar et al., 2012). Segundo dados OMS, cerca de 97 países encontram-se em áreas endêmicas para a leishmaniose: 65 países são endêmicos para LC e LV; 22 países são endêmicos apenas para LC; e 10 países são endêmicos apenas para LV. Além disso, em outros 4 países já foram relatados casos de LC ou LV (WHO, 2015).

Em 2015, 90% dos casos mundiais de LV foram reportados em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (Figura 2). Os 10 países com maior número de casos de LC relatados em 2015 foram: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, República Árabe da Síria, Tunísia e Iêmen (Figura 3), que juntos representam 87% da incidência global de LC relatada. Já a leishmaniose mucocutânea apresenta maior prevalência nos países: Brasil, Peru, Arábia Saudita, República Árabe da Síria e Tunísia (WHO, 2015).

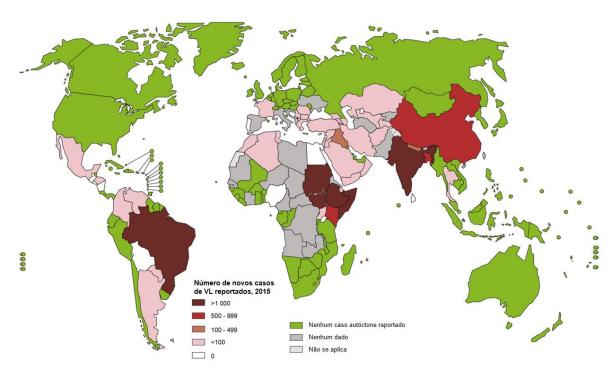


Figura 2 - Distribuição da leishmaniose visceral, 2015. Mapa adaptado da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015).

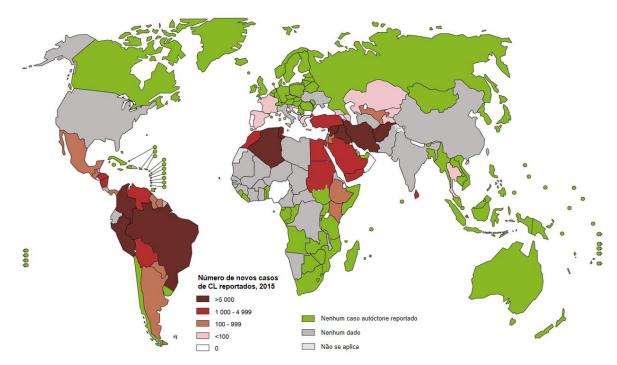


Figura 3 - Distribuição da leishmaniose cutânea, 2015. Mapa adaptado da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015).

As principais espécies causadoras de leishmaniose cutânea no Velho Mundo são *Leishmania* (*Leishmania*) major e *L.* (*L.*) tropica, enquanto que no Novo Mundo as espécies *L.* (*L.*) mexicana, *L.* (*L.*) amazonensis, *Leishmania Viannia guyanensis*, *L.* (*V.*) panamensis e *L.* (*V.*) braziliensis são as mais importantes (McGwire, Satoskar, 2014). No Brasil, as espécies *L.* (*V.*) braziliensis, *L.* (*V.*) guyanensis e *L.* (*L.*) amazonensis e, mais raramente, a *L.* (*V.*) lainsoni, *L.* (*V.*) naiffi e *L.* (*V.*) shawi, são responsáveis por causar a doença (do Vale, Furtado, 2005).

No Velho Mudo a forma visceral é causada pelas espécies *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* e no Novo Mundo pela *L. (L.) infantum*, conhecida como *L. (L.) infantum chagasi* (do Vale, Furtado, 2005; Kuhls et al., 2011; McGwire, Satoskar, 2014). No Novo Mundo, a espécie *L. (V.) braziliensis*, bem como *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* também podem causar a forma mucocutânea (Goto, Lindoso, 2012).

1.3 Leishmania

A Leishmania é um protozoário pertencente a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero Leishmania e subgêneros Leishmania ou Viannia. Por meio da análise de isoenzimas também foram definidos complexos de espécies (L. mexicana, L. donovani, L. tropica, L. major, L. atethiopica, L. braziliensis, L. guyanensis, L. panamensis, L. naiffi, L. lainsoni) dentro dos subgêneros (Rioux et al., 1990; Bañuls et al., 2007; Kevric et al., 2015). Na figura 4 é apresentada a taxonomia da Leishmania.

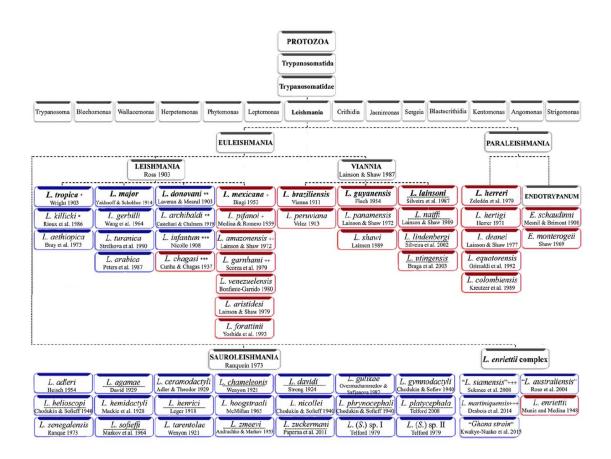


Figura 4 - Taxonomia da Leishmania. Figura adaptada de Akhoundi e colaboradores (2016).

O parasito apresenta duas formas biológicas (Figura 5). As formas flageladas e móveis do parasito são chamadas de promastigotas (as quais são divididas em promastigotas procíclicos e promastigotas metacíclicos). Elas são encontradas dentro do flebotomíneo, lugar onde multiplicam por fissão binária e progridem em diferentes

estágios de diferenciação morfologicamente distintos para, finalmente, se tornarem promastigotas metacíclicos não divisíveis e infecciosos que são transmitidas durante o repasto sanguíneo do inseto vetor (Bañuls et al., 2007; Kaufer et al., 2017). No interior do hospedeiro mamífero encontramos uma outra forma infecciosa chamada de amastigota, a qual não possui flagelo exteriorizado e vive como forma intracelular em uma variedade de células de mamíferos, principalmente em fagócitos profissionais, como macrófagos (Love et al., 1998; Lipoldová, Demant, 2006; Bañuls et al., 2007; Kevric et al., 2015).

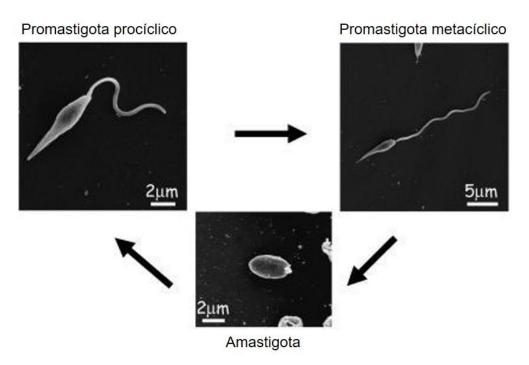


Figura 5 - Formas biológicas da *Leishmania* **durante seu ciclo de vida**. Imagens de microscópio eletrônico de varredura dos principais estágios do ciclo de vida da *Leishmania*: promastigotas procíclicos e metacíclicos (formas flageladas encontradas no inseto vetor), e o amastigota (forma intracelular encontrada no hospedeiro mamífero). Figura adaptada de Besteiro e colaboradores (2007).

1.3.1 Inseto vetor e transmissão da Leishmania

A transmissão do parasito envolve o inseto vetor flebotomíneo que pertence à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo ou *Lutzomyia* nas Américas. O flebotomíneo é menor que um mosquito, com tamanho médio de 1,5 a 2 mm, possui uma picada dolorosa e não faz barulho audível (Dostálová, Volf, 2012; Kevric et al., 2015; WHO, 2015). Atualmente existem em torno de 500 espécies conhecidas de flebotomíneos, mas apenas cerca

de 30 delas foram identificadas como vetores da doença (Bañuls et al., 2007; WHO, 2015). Em algumas regiões do Brasil o vetor já está adaptado às áreas peridomiciliares devido à destruição do habitat silvestre natural causada pelo homem (da Costa et al., 2007).

A transmissão da *Leishmania* ocorre no momento da picada do flebotomíneo fêmea. Para obter as proteínas necessária para o desenvolvimento de seus ovos, o flebtomíneo realiza o repasto sanguíneo infectando-se com parasitos contidos no sangue do hospedeiro mamífero infectado e transmitindo para outro hospedeiro em um novo repasto (WHO, 2015). A picada pode ocorrer de forma mais ativa do anoitecer até o amanhecer, e geralmente na pele exposta dos braços, pernas, pescoço e face. A infecção também pode ocorrer via compartilhamento de agulhas, transfusão de sangue infectado (revisado por Cardo, 2006) ou transplacentariamente (revisado por Figueiro-Filho et al., 2004), mas em menor frequência.

O ciclo de transmissão das diferentes *Leishmania* envolve flebotomíneos espécie-específicos e reservatórios peridomésticos ou silvestres, como os cães e roedores (Lipoldová, Demant, 2006; Kevric et al., 2015). Apesar da maioria das leishmanioses serem doenças zoonóticas, as leishmanioses causadas por *L. (L.) tropica* e *L. (L.) donovani* são uma exceção, sendo consideradas antroponóticas (Bañuls et al., 2007; WHO, 2015).

1.3.2 Ciclo biológico de Leishmania

O ciclo de vida da *Leishmania* é complexo, sendo o parasito exposto à diferentes ambientes extra e intracelulares. A infecção é iniciada quando o flebotomíneo fêmea ingere sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro. O sangue infectado passa para a parte posterior do intestino. Em seguida, os parasitos diferenciam-se em vários estágios de desenvolvimento distintos à medida que migram do intestino posterior para a válvula estomodeal (Figura 6). Esses estágios caracterizam-se por mudanças morfológicas funcionais destinadas a garantir sua sobrevivência no flebotomíneo (Kamhawi, 2006).

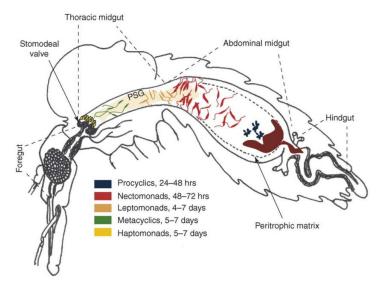


Figura 6 - Ciclo de vida da *Leishmania* **no vetor**. Ilustração das diferentes formas morfológicas de promastigotas ao longo do tempo dentro do flebotomíneo. Figura obtida da revisão de Kamhawi (2006).

Primeiramente, os amastigotas se diferenciam em formas promastigotas procíclicas (formas lentas com flagelos curtos) e iniciam a multiplicação rapidamente entre 24 e 48 h (Kamhawi, 2006). Essas formas são também relativamente resistentes ao ataque de enzimas digestivas. As formas procíclicas então se diferenciam em promastigotas nectomônadas - grandes formas cuja função é escapar do confinamento na matriz peritrófica (revestimento composto por quitina e proteínas secretadas pelo epitélio do intestino para envolver o sangue digerido), migrando para colonizar o intestino anterior e se acumulando na válvula estomodeal. A forma nectomônada se desenvolve para promastigota leptomônada e essa inicia um segundo ciclo de multiplicação no flebotomíneo. A forma leptomônada então se fixa à cutícula da válvula estomodeal (Gossage et al., 2003; Kamhawi, 2006). Finalmente o parasito se diferencia mais uma vez, observando-se dois estágios: promastigotas haptomônadas e metacíclicos. A forma haptomônada apenas contribui para a formação de um plugue na válvula estomodeal, ao passo que os promastigotas metacíclicos, o estágio infectivo, é altamente adaptado para transmissão bemsucedida ao hospedeiro mamífero. Os metacíclicos possuem um corpo celular pequeno com um flagelo alongado sendo rápidos e resistentes à lise mediada pelas proteínas do complemento no hospedeiro (Kamhawi, 2006). O tempo necessário para que o parasito complete seu ciclo de vida no flebotomíneo é de aproximadamente 6 a 9 dias, dependendo da espécie (Kamhawi, 2006).

Durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo, são liberados na pele do hospedeiro em torno de 1000 parasitos enriquecidos nas promastigotas metacíclicos (Rogers et al., 2004), que rapidamente são fagocitados por células recrutadas para o local da infecção, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (revisado por Scott, Novais, 2016). No interior dos macrófagos, os promastigotas metacíclicos se diferenciam em amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo (VP), principalmente devido à exposição ao pH ácido do vacúolo (pH 4,5 a 6,0) e à temperatura do hospedeiro que varia de 33 a 37 °C (Zilberstein, Shapira, 1994). É nesse ambiente hostil que o amastigota irá se multiplicar por fissão binária, sendo capaz de romper as células após excessiva multiplicação intracelular. Uma vez liberado no meio extracelular, os parasitos infectam outros macrófagos ou demais fagócitos, assim mantendo a infecção no hospedeiro (Ribeiro-Gomes et al., 2004, Murray et al., 2005; Kobets et al., 2012). Um novo repasto sanguíneo pode ocorrer, infectando o flebotomíneo com células infectadas ou mesmo amastigotas livres. O esquema do ciclo biológico da Leishmania envolvendo o hospedeiro humano está representado na Figura 7.

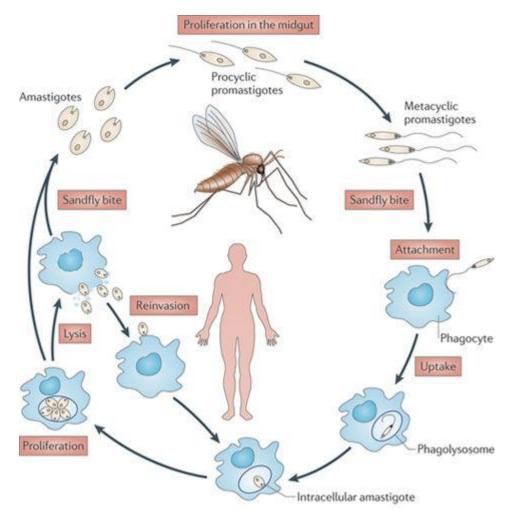


Figura 7 - Ciclo biológico da *Leishmania*. Promastigotas metacíclicos de *Leishmania* são injetados na pele durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea, sendo rapidamente fagocitados pelas células fagocíticas do hospedeiro mamífero. Em seguida, os promastigotas metacíclicos diferenciamse na forma amastigota não flagelada dentro do vacúolo parasitóforo da célula, dividindo-se por fissão binária. Os amastigotas são liberados na ruptura das células infectadas e podem então ser fagocitadados novamente por macrófagos e outras células do hospedeiro, ou ingeridos pelo flebotomíneo durante um novo repasto sanguíneo. Uma vez no inseto vetor, a forma amastigota transforma-se na forma promastigota procíclica e após diferentes estágios, atinge a forma de promastigotas metacíclicos, podendo novamente ser transmitido para outro hospedeiro. Figura obtida da revisão de Kaye, Scott (2011).

1.4 Células envolvidas na infecção por Leishmania

Os momentos iniciais da infecção pela *Leishmania* são cruciais para determinar a evolução da doença (de Almeida et al., 2003). A pele é o principal órgão envolvido na infecção, onde as células residentes e inflamatórias desempenham um papel crucial na resposta imune contra agentes patogênicos por meio da liberação de

citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Fuhlbrigge, Kupper, 2004; Guerra et al., 2010). Diversas células são importantes na imunobiologia da leishmaniose, como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos (Laskay et al., 2003, Kautz-Neu et al., 2012) e até mesmo fagócitos não profissionais, como por exemplo os fibroblastos (Bogdan et al., 2000). Por ser um protozoário intracelular obrigatório, essas células são indispensáveis para a sobrevivência, replicação e diferenciação do parasito (Liu, Uzonna, 2012).

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas ao local da infecção (Ribeiro-Gomes, Sacks, 2012). Acredita-se que eles possam servir como células hospedeiras intermediárias utilizadas pelo parasito para entrar nos macrófagos, que fagocitam neutrófilos em processo apoptótico. Este evento biológico foi denominado o modelo do "cavalo de Tróia" para descrever a entrada silenciosa da *Leishmania* nos macrófagos (Laskay et al., 2003). Além disso, o parasito é capaz de induzir a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*), que são redes compostas por DNA, elastase e histonas capazes de imobilizar o parasito (Guimarães-Costa et al., 2009; Hurrell, Regli, Tacchini-Cottier, 2016).

As células dendríticas são elementos-chave do sistema imunológico, funcionando como sentinelas capazes de alertar as células T CD4+ da infecção pela *Leishmania*, dirigindo sua polarização de modo a montar uma resposta imune eficaz (Kautz-Neu et al., 2012). Essas células também atuam liberando citocinas como a interleucina 12 (IL-12) e interferon (IFN) tipo 1, que induz a diferenciação das células T *naive* em linfócitos T auxiliares do tipo 1 efetores (Th1, do inglês *T helper 1*) importantes no combate a infecção (Mougneau, Bihl, Glaichenhaus, 2011).

Embora as células dendríticas tenham um papel importante na infecção, a principal célula do hospedeiro envolvida na imunobiologia da leishmanose é o macrófago (Handman, Bullen, 2002). Após a absorção inicial e a internalização do parasito pela célula no fagossomo, ocorre a fusão com lisossomos gerando o fagolisossomo – um ambiente hostil onde o parasito terá de sobreviver. Apesar do fagolisossomo ser talvez um dos ambientes mais desafiantes para a maioria dos agentes patogênicos, a *Leishmania* é um dos poucos protozoários capaz de sobreviver e se multiplicar nele (Lipoldová, Demant, 2006).

Quando em contato com a *Leishmania*, os macrófagos são ativados para tentar eliminar o patógeno intracelular. A ativação do macrófago geralmente é dividida em dois espectros funcionalmente distintos: ativação clássica e alternativa. A ativação

clássica é mediada pelos produtos das células Th1 e NK - em particular o IFN-γ, que estimula os macrófagos a produzirem óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Esta enzima é responsável por converter L-arginina e oxigênio em L-citrulina e óxido nítrico (NO), uma molécula importante na destruição de parasitos intracelulares (Kane, Mosser, 2000; Gantt *et al.*, 2001; Liu, Uzonna, 2012; Scott, Novais, 2016). Na ausência de IFN-γ ou de produtos microbianos como o lipopolissacarídeo (LPS), iNOS é indetectável no macrófago (Santos et al., 2006). Além disso, várias outras citocinas inflamatórias, como IL-1β, fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*), IFN-α e IFN-β também estão envolvidas na ativação de macrófagos e na regulação positiva da expressão de iNOS (Bronte, Zanovello, 2005; Liu, Uzonna, 2012; Scott, Novais, 2016).

Em contraste à ativação clássica, a ativação alternativa de macrófagos é induzida por citocinas de uma resposta celular do tipo Th2, como IL-4 e IL-13 que geram um perfil de suscetibilidade à infecção (Hurdayal, Brombacher, 2014; Scott, Novais, 2016). Outras citocinas que afetam negativamente a ativação clássica dos macrófagos são IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF-β, do inglês *transforming growth factor beta*) (Liu, Uzonna, 2012). Elas inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, em particular o TNF (Gordon, 2003), o que prejudica a resposta das células infectadas à *Leishmania*.

1.5 Mecanismo de evasão da resposta imunológica

A persistência do parasito dentro dos macrófagos é determinada pelo balanço entre a habilidade da resposta imune dos macrófagos e a habilidade do parasito em resistir aos mecanismos citotóxicos de ativação destas células fagocitárias. Os lipofosfoglicanos (LPG) e a glicoproteína 63 (GP63) na forma promastigota de *Leishmania* são importantes para a fagocitose e subsequente sobrevivência intracelular do parasito (Yao et al., 2003; Naderer, McConville, 2008). Essas moléculas são alvo de várias opsoninas, como componente do complemento C3 (C3b/iC3b) (Brittingham, Mosser, 1996) e a proteína de ligação à manose (Green et al., 1994), que auxiliam na entrada na célula. Estudos também demonstraram que o LPG é capaz de inibir a formação do complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês *membrane attack complex*) (Liu, Uzonna, 2012; Gupta, Oghumu, Satoskar, 2013), bem como

inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo do macrófago (Kaye, Scott, 2011). Concomitante a isto, a GP63 cliva o fator nuclear κB (NF- κB, do inglês *nuclear factor κappa B*), modulando a resposta imune do hospedeiro (Kaye, Scott, 2011).

No estágio amastigota, demonstrou-se que os parasitos revestidos com imunoglobulina G (IgG) do hospedeiro se ligam aos receptores Fc (FcγR) nos macrófagos, facilitando a fagocitose (Miles et al., 2005). Além disso, estudos feitos com amastigotas de várias *Leishmania* mostraram que essas formas possuem mecanismos exclusivos para evadir a resposta microbicida (Cunningham, 2002; Kima et al., 2007; Shio et al., 2012). Amastigotas de *L. (L.) amazonensis,* um dos agentes causadores de leishmaniose cutânea no Brasil, são mais resistentes à morte intracelular por macrófagos quando comparadas a outras espécies (Alexander, Kaye,1985; Gomes et al., 2003; Qi et al., 2004; McMahon-Pratt, Alexander, 2004). Esta espécie e outros membros do complexo *L. mexicana* são capazes de formar um vacúolo parasitóforo gigante. Estes vacúolos servem como um "escudo", diluindo os efeitos leishmanicidas das células, como o NO e as espécies reativas de oxigênio (ROS) (Wilson et al., 2008; Scott, Novais, 2016).

Outro mecanismo utilizado por amastigotas de *L. (L.) amazonensis* para inibir a resposta do macrófago é a exposição de fosfolipídios que ligam anexina-V na membrana do parasito, modulando a resposta imune da célula, semelhante ao que acontece com a inibição mediada por celulas apoptóticas (Wanderley et al., 2006). Segundo França-Costa e colaboradores (2012), o aumento na exposição destes fosfolipídios na membrana do amastigota está relacionado com sua capacidade de infecção e com a manifestação clínica da doença. Este mecanismo está associado à respsta imune do hospedeiro, uma vez que é observado apenas em infecção no modelo de camundongo BALB/c (suscetivel à infecção) e não no modelo C57BL/6 (resistente à infecção) (revisado por Scott, Novais, 2016). Além disto, esta espécie também é capaz de induzir a expressão da proteína CD200 no macrófago infectado, modulando a resposta da célula contra o parasito (Cortez et al., 2011). Esse mecanismo de evasão será abordado com mais detalhes posteriormente.

As moléculas da *Leishmania* envolvidas nos mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, como o LPG e a GP63, estão presentes em sua superfície ou podem ser liberadas pelo parasito durante a infecção. Uma das formas de liberação dessas moléculas ocorre via vesículas extracelulares (VEs) produzidas pela *Leishmania* (Silverman et al., 2010).

1.5.1 Vesículas extracelulares (VEs)

As VEs são pequenas vesículas esféricas delimitadas por uma bicamada lipídica semelhante a membrana, conhecidas como exosomos e microvesículas, que podem ser liberadas de quase todos os tipos de células, induzidas por vários estímulos ou espontaneamente (Cai et al., 2016). Os exossomos são pequenos, com um tamanho entre 50 e 100 nm de diâmetro, sendo liberados por exocitose. Já as microvesículas têm um tamanho maior entre 100 nm e 1 µm de diâmetro e são da liberadas partir de brotamentos membrana plasmática а (Cocucci, Racchetti, Meldolesi, 2009). No interior destas vesículas há diversas moléculas bioativas como lipídeos, proteínas, DNA, mRNAs e miRNAs (Kim et al., 2015).

Estudos encontraram VEs no sobrenadante de uma variedade de células cultivadas de mamíferos e patógenos, incluindo a *Leishmania* (Silverman, Reiner, 2011). A análise proteômica destas vesículas liberadas pelo parasito sugere que elas contenham muitas, senão todas as moléculas já funcionalmente descritas como fatores de virulência do parasito (Silverman et al., 2010; Silverman, Reiner, 2011). Portanto, é possível que as VEs representem veículos que permitam a entrada desses fatores de virulência no citoplasma das células do hospedeiro, por meio da fusão com a membrana plasmática celular ou com a membrana do fagolisossoma.

1.6 Glicoproteína de superfície CD200

Uma série de reguladores negativos controlam a ativação excessiva de várias vias imunes adaptativas e inatas no macrófago (Liew et al., 2005). A CD200 (originalmente OX2) é uma glicoproteína de membrana pertencente à superfamília das imunoglobulinas que é expressa em vários tipos celulares, principalmente em células linfoides, neurônios e células endoteliais (Barclay *et al.*, 2002), mas não se encontra expressa em macrófagos (Hoek *et al.*, 2000). Ela possui um domínio intracelular curto (19 aa), sem nenhum motivo de sinalização conhecido. No entanto, seu receptor

CD200R, presente em celulas da linhagem mielóide como o macrófago, tem um domínio citoplasmático maior (67 aa) contendo três resíduos de tirosina (Wright et al., 2000).

Em comparação com outras moléculas inibitórias, a via CD200-CD200R se destaca por suas características particulares. Ao contrário da maioria dos receptores inibitórios que sinalizam via motivos de inibição do imunorreceptor baseado em tirosina (ITIMs) e recrutamento de fosfatases, o CD200R utiliza uma via distinta. Uma vez ativado o receptor (Figura 8), ocorre a fosforilação dos resíduos de tirosina presentes em sua porção citoplasmática, recrutando a proteína adaptadora Dok2 (do inglês downstream of tyrosine kinase 2) (Mihrshahi, Brown, 2010). Então Dok2 fosforila a proteína ativadora GTPase de Ras (RasGAP, do inglês Ras GTPaseactivating protein) que bloqueia a quinase regulada por sinal extracelular (ERK, do inglês extracellular signal-regulated kinase) e as proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK, do inglês mitogen-activated protein kinase) p38 e c-Jun N-terminal quinase (JNK, do inglês JUN N-terminal kinase) (Hussell, Bell, 2014).

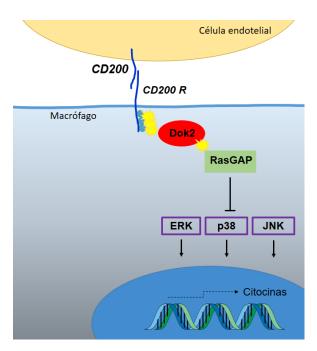


Figura 8 - Modelo de imunomodulação por CD200-CD200R. Quando a CD200 expressa na membrana de uma célula endotelial entra em contato com seu receptor CD200R presente na membrana do macrófago, ocorre a fosforilação dos resíduos de tirosina presentes na cauda citoplasmática do receptor. Em seguida, a proteína Dok2 se liga à terceira fosfotirosina ativando a proteína RasGAP. RasGAP por sua vez inibe a via de ERK, p38 e JNK, e consequentemente a produção de citocinas pró-inflamatórias (adaptado do trabalho de Mihrshahi, Brown, 2010).

A via CD200-CD200R tem sido descrita por participar de diversos processos biológicos. Na osteoclastogênese, a fusão de macrófagos é indispensável para a diferenciação de osteoclastos (células encarregadas em absorver, degradar e remodelar os ossos). Durante essa fusão, os macrófagos expressam CD200. Contudo, na sua ausência a diferenciação de osteoclastos é reduzida, havendo um aumento de massa óssea, prejudicando o processo de osteoclastogênese (Lee et al., 2006; Cui et al., 2007).

Outro papel importante ocorre no sistema nervoso central (SNC) onde CD200-CD200R controla a ativação da microglia (macrófagos residentes do SNC). Os neurônios expressam CD200 na membrana, que ligado ao CD200R da microglia, ativa a via inibitória. Na ausência de CD200 no neurônio, a microglia fica ativada resultando na agregação celular e levando à inflamação e neurodegeneração. Ademais, a ausência da via CD200-CD200R pode levar à susceptibilidade de doenças autoimunes e inflamatórias (Hoek et al., 2000).

A sinalização inibitória de CD200-CD200R também tem sido associada ao modelo de formação de tumores e câncer. Estudos mostram que a ativação desta via pode tanto estimular respostas antitumorais quanto suprimí-las, contribuindo para a progressão do tumor e/ou formação de metástases (Gorczynski et al., 2010, 2011, 2013; Erin et al. 2014). A supressão da resposta antitumoral regulada por CD200 pode não só ser mediada pelo próprio tumor, mas também pela expressão de CD200 em células de tecidos saudáveis (Rygiel et al., 2011). Além disso, a ação da sinalização gerada por CD200-CD200R provavelmente não esteja limitada apenas ao local de crescimento do tumor, afetando também a tolerância a antígenos tumorais em outros tecidos (Kretz-Rommel et al., 2007). Portanto, o bloqueio de CD200R pode ser um tratamento anticancerígeno altamente eficaz mesmo no caso de tumores negativos para CD200 (revisado em Rygiel, Meyaard, 2012).

Estudos têm mostrado que alguns patógenos possuem a capacidade de controlar a regulação da via de sinalização inibitória de CD200-CD200R, favorecendo sua infectividade e sobrevivência no hospedeiro. O *Toxoplasma gondii* induz o aumento da expressão superficial de CD200R na microglia e de CD200 em células endotélias dos vasos sanguíneos (Deckert et al., 2006). Em camundongos deficientes em CD200, as células microgliais exibiram um aumento da ativação, proliferação e maior expressão do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II, do inglês *major histocompatibility complex II*), TNF-α e iNOS durante a infecção crônica por *T.*

gondii. Além disso, os camundongos selvagens apresentaram maior carga parasitária e mortalidade comparados aos camundongos deficientes em CD200 (Deckert et al., 2006). Na infecção por *Neisseria meningitidis*, foi demonstrado que células do hospedeiro induzem CD200, limitando dessa forma a ativação do macrófago como uma forma de se proteger frente à ação da infecção sistêmica (Mukhopadhyay et al., 2010). Além desses patógenos, outras bactérias (Chen, Marsden, Gorczynski, 2009), vírus (Karnam et al., 2012) e protozoários como a *Leishmania* (Cortez et al., 2011) também já foram descritos por modular essa via.

1.6.1 CD200 e Leishmania

Em 2011, Cortez e colaboradores demonstraram que amastigotas de *L. (L.)* amazonensis induzem no macrófago a expressão da proteína CD200, capaz de modular a resposta imunológica da célula e consequentemente, prolongar a sobrevivência do parasito intracelular. Concomitante ao aumento da expressão de CD200 nos macrófagos infectados com *L. (L.)* amazonensis, o estudo mostrou haver uma inibição da expressão de iNOS e diminuição da produção de NO, o que favorece a multiplicação do parasito. O mesmo estudo também apontou que camundongos deficientes em CD200 (*CD200*-/-) são mais resistentes a uma infecção por *L. (L.)* amazonensis.

No entanto, nem todas as espécies de *Leishmania* induzem a expressão de CD200. Isso foi evidenciado quando Cortez e colaboradores mostraram que *L. (L.) major* não tem a capacidade de induzir a expressão desta proteína durante o processo infectivo. Porém, quando se administrou CD200 solúvel *in vitro*, a capacidade de infecção de *L. (L.) major* aumentou consideravelmente, apresentando uma cinética de infecção semelhante à *L. (L.) amazonensis* (Cortez et al., 2011).

Também é importante ressaltar que a expressão de CD200 ocorre de forma precoce na infecção de macrófagos por *Leishmania* (1 h após a infecção). Isso significa que os eventos iniciais como adesão e fagocitose possam participar do processo de indução desta molécula. Ademais, receptores no macrófago que participam do reconhecimento de patógenos poderiam também ser importantes para este evento. Até então, este é o único trabalho relacionando esta glicoproteína de membrana com infecções por *Leishmania*, o que torna muito importante o estudo e entendimento desde mecanismo.

1.7 Receptores do tipo Toll (TLRs)

A interação inicial entre macrófagos e patógenos invasores como *Leishmania* acontece por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) presentes na célula, capazes de reconhecer estruturas/antígenos específicos e ativar vias de transdução de sinal intracelulares. Existem muitas famílias de PRRs, algumas que estão ligadas à membrana citoplasmática e endossomal, tais como receptores tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll like receptors*) e outros que são citosólicos, como receptores tipo NOD (NLRs, do inglês *NOD-like receptors*) (Macleod, Bryant, 2017).

Os TLRs são glicoproteínas transmembrana que regulam a resposta da imunidade inata de mamíferos identificando padrões moleculares associado à patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*) como proteínas, ácidos nucléicos (DNA/RNA), glicolipídeos, peptidoglicanos e lipopeptídeos, encontrados em microrganismos (Medzhitov, Janeway, 1997; Kumar et al., 2011). Além dos PAMPs, estes receptores também são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a dano celular (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*). Os DAMPs são moléculas liberadas por células estressadas ou necróticas e atuam como sinais de perigo endógeno para promover e exacerbar a resposta inflamatória (Sachet, Liang, Oehler, 2017).

Os perfis de expressão dos TLRs variam de acordo com os tecidos e tipos celulares. Até então são descritos treze TLRs em mamíferos, sendo dez deles no homem (TLR1 ao TLR10) e doze em camundongos (TLR1 ao TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13) (Saitoh, Miyake, 2009; O'Neill, Golenbock, Bowie, 2013). Em sua maioria estão localizados na membrana plasmática, com exceção de TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 e TLR13 que estão localizados em compartimentos endossomais (Iwasaki, Medzhitov, 2004; O'Neill, Golenbock, Bowie, 2013).

A sinalização utilizada pelos TLRs consiste de duas vias distintas, uma via dependente da proteína de diferenciação mieloide 88 (MyD88, do inglês *myeloid differentiation primary response gene 88*), que leva à produção de citocinas inflamatórias, e uma via independente de MyD88, associada à indução de interferon (IFN). A via dependente de MyD88 é comum a todos os TLRs, exceto TLR3 (via independente de MyD88), que utiliza a proteína adaptadora que contém o domínio TIR indutor de interferon β (TRIF, do inglês *TIR-domain-containing adapter-inducing*

interferon-β). TRIF também pode ser recrutada por TLR4, que é capaz de utilizar ambas as vias (Fournieri, Philpott, 2005; West et al., 2006; Sasai, Yamamoto, 2013). Após o reconhecimento de antígenos específicos, o complexo receptor/proteína adaptadora ativa a transdução de sinal via essas moléculas adaptadoras e desencadeia a ativação de fatores de transcrição, como a proteína ativadora 1 (AP-1, do inglês activator protein 1), os fatores reguladores de interferon (IRFs, do inglês interferon-regulatory factors), a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB, do inglês cyclic AMP-responsive element-binding protein) e o NF-κB. Esses fatores de transcrição irão ao núcleo e ativarão a transcrição de genes de diversas citocinas como o TNF e IFN (Dalton et al., 1993; Fournieri, Philpott, 2005), assim como a indução da expressão de iNOS (Kane, Mosser, 2000; Gantt et al., 2001). Essa via de sinalização está detalhada na figura 9.

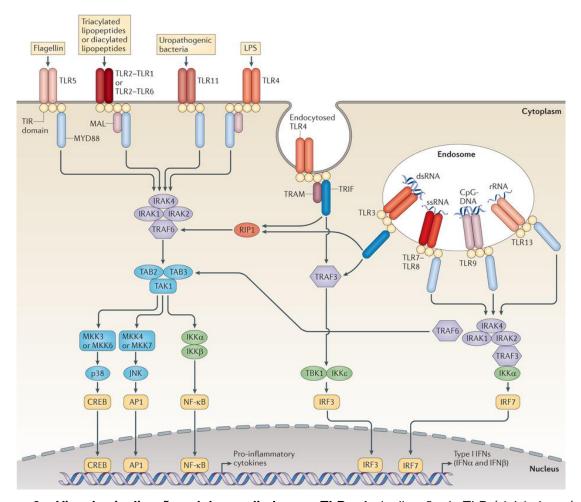


Figura 9 – Vias de sinalização celular mediadas por TLRs. A sinalização de TLR é iniciada após o reconhecimento de seu ligante específico, induzindo a dimerização de receptores. Depois disso, o domínio de homologia do receptor de Toll-IL-1 (TIR, do inglês *Toll-IL-1-receptor*) se liga ao domínio TIR das proteínas adaptadoras MyD88 e proteína adaptadora tipo MyD88 (MAL, do inglês *MyD88-*

adaptador-like protein), ou ao domínio TIR das proteínas TRIF e da molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM, do inglês *TRIF-related adaptor molecule*). Estas proteínas adaptadoras ativam a transdução de sinal envolvendo interações entre as quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAKs, do inglês *IL-1R-associated kinases*) e a molécula adaptadora dos fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs, do inglês *TNF receptor-associated factors*), levando à ativação de JNK e p38, e consequentemente o direcionamento ao núcleo de fatores de transcrição como AP1, CREB, IRFs e NF-κB. Uma consequência importante da sinalização da via de TLR é a indução de citocinas pró-inflamatórias e de IFN. Siglas: dsRNA, RNA dupla fita; IKK, quinase de inibidor da NF-kB; MKK, MAP quinase quinase; RIP1, proteína 1 de interação com o receptor; rRNA, RNA ribossômico; ssRNA, RNA fita simples; TAB, proteína de ligação a TAK1; TAK, quinase ativada por TGFβ; TBK1, quinase 1 de ligação à TANK. Figura obtida da revisão de O'Neill, Golenbock, Bowie (2013).

1.7.1 TLR e Leishmania

Na imunobiologia da *Leishmania*, vários TLRs têm sido estudados e implicados tanto na resistência quanto na susceptibilidade ao parasito (Tuon et al., 2008; Soong, 2012). Os TLRs primeiramente foram associados ao controle da infecção, onde se verificou a importância de TLR2 e TLR4, bem como da molécula adaptadora MyD88 no desenvolvimento da resposta pró-inflamatória contra o parasito (Hawn et al., 2002; Debus et al., 2003; de Veer et al., 2003; Li et al., 2004). Posteriormente também foi mostrado que TLR3 participa tanto do reconhecimento de promastigotas de *L. (L.) donovani* por macrófagos ativados por IFN (Flandin, Chano, Descoteaux, 2006) como também no reconhecimento de dsRNA viral de leishmaniavirus (LRV) em *L. (V.) guyanensis* (Hartley et al., 2012).

No estudo de Franco e colaboradores (2017) foi mostrado que a *Leishmania* é capaz de induzir a autofagia na célula infectada via TLRs. O grupo mostrou que *L.* (*L.*) major necessita dos TLRs endossomais (TLR3, 7 e 9) e de MyD88 para induzir a autofagia no macrófago. Além disso, a ausência desses TLRs também implicou em um aumento na multiplicação intracelular do parasito. Em outro trabalho mostrou-se que ao reconhecer o DNA de *Leishmania* o TLR9 induz o aumento a produção de IL-12 e da lise específica de células alvo por meio da ativação de células NK (Liese et al., 2007, Schleicher et al., 2007). Além disso, camundongos deficientes em TLR9 são mais suscetíveis à infecção por *Leishmania*, apresentando aumento no tamanho da lesão e na carga parasitária (Liese et al., 2007, Weinkopff et al., 2013).

A *Leishmania* ainda utiliza várias outras proteínas do hospedeiro para regular a sinalização dos TLRs. O estudo de Gupta e colaboradores (2014) mostrou que *L.* (*L.*) donovani inibe a degradação TRAF3, um passo importante e necessário para a sinalização de TLR4. Além disso, *L.* (*L.*) amazonensis regula negativamente a

sinalização de TLR4 degradando proteínas da via de sinalização intracelular, como STAT, ERK e IRF (Xin et al., 2008), enquanto que o inibidor de serino peptidase 2 (ISP2, do inglês *inhibitor of serine peptidase 2*) de *L. (L.) major* mostrou inibir a ativação de TLR4 pela elastase de neutrófilos (Faria et al., 2011).

Contudo, a *Leishmania* também possui a capacidade de utilizar a resposta imune inata do hospedeiro a seu próprio favor. Estudos revelaram que o TLR2 favorece a infecção por *L. (V.) braziliensis e L. (L.) amazonensis* (Vargas-Inchaustegui et al., 2009; Guerra et al., 2010). A deleção do receptor permite uma maior ativação de células dendríticas e linfócitos T CD4+, assim como um aumento da produção de interleucinas como IL-12, IL-10 e também de IFN-γ. Além disso, camundongos TLR2- apresentaram lesões atenuadas após a infecção por *L. (V.) braziliensis* (Vargas-Inchaustegui et al., 2009) e *L. (L.) amazonensis* (Guerra et al., 2010). Já em outro estudo, a infecção com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* levou à ativação da expressão da proteína quinase dependente de dsRNA (PKR, do inglês *dsRNA-dependent protein kinase*), uma proteína antiviral clássica. O tratamento de macrófagos com dsRNA sintético poly (I:C), um agonista de TLR3 e potente indutor de PKR, aumentou o crescimento intracelular do parasito via um mecanismo mediado por IL-10 (Pereira et al., 2010).

1.7.2 TLR e CD200

A molécula CD200 já foi descrita ser induzida via TLRs e NLRs em macrófagos. Em um estudo de Mukhopadhyay e colaboradores (2010) mostrou-se que CD200, juntamente com seu receptor CD200R, apresenta um papel chave na inibição da ativação de macrófagos em um contexto de infecção por *Neisseria meningitidis*. A bactéria induz a expressão de CD200 em macrófagos de maneira dependente de TLR4 e MyD88, bem como de NOD2, da proteína 3 que contém os domínios NACHT, LRR e PYD (NALP3, do inglês *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*) e de NF-κB, evitando uma resposta imunológica exacerbada (Mukhopadhyay *et al.*, 2010).

Em outro estudo, Sato e colaboradores (2004) mostraram, em um modelo de osteoclastogênese, que a ativação de TLR2/6 e TLR4, bem como do receptor de IL-1 (IL-1R), com posterior ativação da via MyD88–PKC–MEK/ERK, induz a expressão do receptor ativador de NF-κB (RANK, do inglês *receptor activator of nuclear factor κB*).

Ademais, quando macrófagos são tratados com o ligante de RANK (RANKL), ativando o receptor, as células expressam CD200 de forma dose dependente (Cui et al., 2007). Isso sugere que a via de TLRs, juntamente com a via de RANK, poderiam estar envolvidas na indução de CD200 por *L. (L.) amazonensis*.

Apesar da via de TLRs ter sido descrita como importante na modulação da resposta à *Leishmania*, a direta relação entre a ativação destes receptores e a indução de CD200 por *L. (L.) amazonensis* não havia sido investigada. Nossa hipótese é que se os TLRs são receptores importantes para o reconhecimento de patógenos pela célula hospedeira (eventos iniciais na infecção), então estes receptores sinalizadores poderiam ter alguma participação na indução de moléculas imunomodularoras de regulação intracelular local, como a indução de CD200 na célula infectada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel dos Receptores do Tipo Toll (TLRs) na indução de CD200 em macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis*.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil de indução e identificar a localização celular de CD200 em macrófagos infectados com L. (L.) amazonensis.
- Avaliar se a via de indução de CD200 é dependente de TLRs em macrófagos infectados com L. (L.) amazonensis.
- Avaliar a importância dos TLRs envolvidos na indução de CD200 na infecção de camundongos com L. (L.) amazonensis.
- Identificar a molécula de L. (L.) amazonensis responsável pela indução CD200 em macrófagos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de Leishmania

Leishmania (Leishmania) amazonensis (IFLA/BR/67/PH8) foi mantida sob a forma promastigota em meio Grace (Vitrocell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Vitrocell). As culturas foram mantidas em garrafas de 25 cm² contendo 5 mL de meio, a 25 °C, em estufa para demanda bioquímica de oxigênio (BOD). A manutenção das culturas foi feita por meio de repiques semanais, com um número inicial de 5 x 10⁵ promastigotas por garrafa, respeitando o número máximo de sete passagens. Curvas de crescimento foram feitas para monitorar o crescimento do parasito, realizando a contagem do número de promastigotas em câmara de Neubauer durante todos os sete dias (Figura 10).

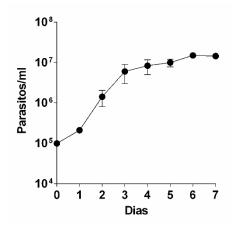


Figura 10 - Curva de crescimento em meio de cultura de promastigotas de *L. (L) amazonensis*. Os promastigotas foram lavados 2 vezes com PBS, contados e 1 x 10⁵ parasitos foram adicionados a 5 mL de meio Grace suplementado com 10% de SFB, mantidos a 25 °C. Foram realizadas contagens diárias ao longo de sete dias. Cada ponto da curva representa o valor de parasitos/mL resultante da contagem no dia indicado. Os resultados correspondem à média e desvio padrão. (n = 3).

Para gerar amastigotas axênicos de *L. (L.) amazonensis*, culturas de fase estacionária enriquecidas em formas promastigotas metacíclicas (culturas do sétimo dia nas condições do laboratório) em meio Grace foram colocadas em igual proporção (1:1) com meio amastigota (AA) composto de meio M199 (Cultilab) suplementado com glicose (0,25%), tripticase (0,5%), adenina (0,1 mM), hemina (2,5 mg/L), tampão succinato de sódio (40 mM, pH 4,5), L-glutamina (2mM), SFB (20%) e penicilina/estreptomicina (5%), com pH final de 5,2. A cultura foi mantida a 25 °C e, após 16-18 h, a cultura foi colocada em estufa de 33 °C para transformação completa das formas amastigotas axênicas.

Para obtenção de amastigotas de lesão, camundongos isogênicos C57BL/6 foram infectados na pata traseira esquerda (coxim plantar) com 1 x 10⁶ promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis*. Os animais infectados foram acompanhados uma vez por semana, sendo a lesão medida com um paquímetro. Após 5 semanas, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, segundo as diretrizes de prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), a lesão foi retirada da pata, e os amastigotas purificados e utilizados para os ensaios.

Para purificar os amastigotas, a pata foi retirada e imergida em álcool 70 °GL por 10 min. Após, a pata foi colocada por 2 min em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4, e em seguida a lesão foi retirada e colocada em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). Com o auxílio de um macerador de tecido potter-elvehjem, as células contendo os parasitos foram dissociadas e passadas por uma peneira celular com poro de 70 μm. Em seguida o conteúdo foi submetido a uma centrifugação inicial a 2095 x g por 10 min. Após descartar o sobrenadante, o material centrifugado foi ressuspendido em PBS, centrifugado a 60 x g por 10 min e o sobrenadante foi submetido a 3 centrifugações de 2095 x g por 10 min. Entre cada centrifugação, o conteúdo foi homogeneizado em agitador vortex por 15 seg. No final, os amastigotas foram ressuspendidos em meio RPMI 1640 e utilizados para infectar os macrófagos.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 8 a 12 semanas de idade. Para alguns experimentos, camundongos C57BL/6 deficientes para as proteínas TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, MyD88 e TRIF foram utilizados. Os animais foram mantidos sem restrição hídrica ou dietética, em ciclos claro/escuro sob temperatura de 22 a 25 °C, no Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia. O protocolo para o uso de animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), registrado sob o nº 95 nas fls. 03 do livro 09 para uso de animais em experimentação, em 13/08/2013.

3.3 Cultivo de células L929 e obtenção do sobrenadante

Os fibroblastos pertencentes a linhagem celular L929 são conhecidos por secretarem o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), um fator importante para a diferenciação dos macrófagos derivados de medula óssea. Para obtenção do sobrenadante de cultura enriquecido do fator, as células foram cultivadas em 15 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB, em garrafa de 75 cm². As células foram mantidas a 37 °C, na presença de 5% CO₂, por 7 dias ou até atingirem máxima confluência. Após, a cultura foi lavada 2 vezes com PBS e 3 mL de tripsina 0,05% foram adicionados mantendo as células por 5 min a 37 °C, para soltar as células da garrafa. A reação foi bloqueada após adicionar 7 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, parando a ação da enzima. As células foram ressuspendidas e divididas em 20 garrafas de cultura celular de 175 cm² contendo 40 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB. Após 14 dias mantidas a 37 °C, na presença de 5% CO₂, o sobrenadante das culturas foi coletado, centrifugado a 524 x g por 10 min, filtrado em filtro de 0,2 μm e conservado em alíquotas a -20 °C até o momento do uso.

3.4 Macrófagos

Células isoladas da medula óssea de camundongos foram diferenciadas em macrófagos, segundo protocolos previamente publicados (Lutz et al., 1999; Cortez et al., 2011). Brevemente, os camundongos C57BL/6 *Wild Type* (WT), TLR2-/-, TLR3-/-, TLR4-/-, TLR9-/-, MyD88-/- e TRIF-/- foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os fêmures e tíbias foram então retirados e imergidos em álcool 70 °GL por 2 min, seguido por imersão em PBS. As duas epífises foram cortadas, nas quais injetou-se pelas extremidades 5 mL de meio RPMI 1640 para lavagem e obtenção de celulas da medula óssea. A suspensão de células foi centrifugada a 230× g por 10 min a 4 °C e após ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB, HEPES (1 mM), bicarbonato de sódio (0,4 g/L), piruvato de sódio (100 μM), L-glutamina (2 mM), Penicilina G (100 U/mL) / Estreptomicina (100 μg/mL). Para diferenciar em macrófagos, adicionou-se 20% de sobrenadante de células L929. As células foram cultivadas em placas de Petri a uma concentração de 4 × 10⁶ células em um volume

de 10 mL e incubadas a 37 °C por 4 dias na presença de 5% CO₂. No quarto dia foram adicionados mais 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB e 20% de sobrenadante de células L929 à placa. No sétimo dia de cultura, os macrófagos aderidos foram removidos por raspagem e utilizados para os ensaios. A viabilidade das células foi avaliada utilizando azul de tripan (0,04%) (Sigma-Aldrich), em câmara de Neubauer. As células apresentando coloração azul foram consideradas inviáveis, não sendo contadas.

3.5 Infecção experimental in vitro

Os ensaios de infecção *in vitro* foram realizados em placas de 6 poços contendo 2 x 10⁶ macrófagos por poço em 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 5% de sobrenadante de células L929. As células foram então incubadas por 24 h, a 37 °C, na presença de 5% CO₂. Após, os macrófagos foram infectados por 1 h, a 33 °C, na presença de 5% CO₂, com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, na proporção de 2 parasitos por célula (MOI 2, do inglês *multiplicity of infection*). Ao final, o meio foi retirado e os macrófagos foram lavados 2 vezes com PBS para remover os parasitos não fagocitados. As células então foram tratadas com tampão de lise celular [Tris (25 mM), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM), NP-40 (1%), glicerol (5%), pH 7,4] (Thermo Fisher Scientific), suplementado com coquetel de inibidores de proteases (*Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail*, P78430, Thermo Fisher Scientific), para a extração de proteínas.

Para os ensaios de quantificação da infecção *in vitro*, 2 x 10⁵ macrófagos em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 5% de sobrenadante de células L929, foram colocados em cada poço contendo lamínulas de vidro redondas de 13 mm em placas de 24 poços. As células foram então infectadas com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* por 1 h. A seguir, foram lavadas e meio novo foi adicionado, mantendo a infecção até 96 h. Ao final de cada tempo de infecção, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e preparadas para microscopia de imunofluorescência. A quantificação da infecção foi feita a partir da contagem mínima de 300 células por lamínula, com triplicatas técnicas e biológicas. Nos ensaios onde foi verificada a importância da fagocitose para indução de CD200, foi realizada uma contagem

diferencial, quantificando o número de parasitos internalizados e/ou apenas associados (em contato) com célula.

Em alguns ensaios os tempos de infecção variaram. Para sincronizar a infecção, as células com os parasitos foram mantidas 30 min em gelo, antes de serem colocadas a 33 °C. As diferentes MOIs também foram avaliadas, utilizando 2, 5, 10 e 20 amastigotas por macrófago. Os ensaios que utilizaram tratamentos prévios à infecção estão descritos a seguir.

3.6 Incubação de macrófagos

Em todos os ensaios, os macrófagos foram mantidos em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Os tratamentos foram sempre realizados a 37 °C, na presença de 5% de CO₂. Os ensaios onde houve a infecção dos macrófagos com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram feitos a 33 °C, na presença de 5% de CO₂, utilizando um MOI 2.

3.6.1 Avaliação da importância da fagocitose na indução de CD200

Para verificar a importância da internalização (fagocitose) dos amastigotas na indução de CD200, os macrófagos foram pré-tratados por 30 min com Citocalasina D, 2 μM (Sigma-Aldrich). A seguir, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para retirada da droga e então infectadas com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Após 1 h, as células foram lavadas com PBS e preparadas para extração de proteínas e/ou para a técnica de imunofluorescência.

3.6.2 Avaliação da importância da viabilidade do amastigota na indução de CD200

Nos ensaios para verificar a importância da viabilidade do amastigota no processo de indução de CD200 em macrófagos, os parasitos (após extraídos da lesão) foram fixados com paraformaldeído 4% por 10 min; ou inativados por calor, a 65 °C, por 45 min (Lima-Junior et al., 2013). Em seguida, foram lavados com PBS 2 vezes, contados e utilizados para infectar os macrófagos por 1 h. Ao final, as células

foram lavadas com PBS e preparadas para extração de proteínas e/ou para a técnica de imunofluorescência.

3.6.3 Avaliação da indução de CD200 por agonistas de TLRs e DNA de L. (L.) amazonensis

Nos ensaios utilizando diferentes agonistas de TLRs, os macrófagos foram incubados por 1 h em meio contendo 1 μg/mL de: peptideoglicano (PGN, *Staphylococucs aureus*), LPS (*Escherichia coli* cepa O111:B4), ácido poli-inosínico (poly I:C, análogo de dsRNA) ou dinuceotídeos citosina-fosfato-guanina (ODN CpG classe A). Todas os agonistas foram obtidos da empresa InvivoGen.

Os macrófagos também foram incubados na presença de DNA de amastigotas axênicos, extraído com o kit GenElute™ (Sigma-Aldrich) de acordo com protocolo do fabricante e quantificado em espectômetro NanoDrod 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). As concentrações de DNA utilizadas foram de 0,1 a 1 µg/mL, como descrito nos resultados.

Após 1 h de incubação, as células foram lavadas com PBS e preparadas para extração de proteínas.

3.6.4 Avaliação da participação de diferentes vias de sinalização celular na indução de CD200 por L. (L.) amazonensis

Nos ensaios utilizando diferentes inibidores das vias de sinalização relacionadas aos TLRs, os macrófagos foram pré-tratados por 1 h com Triptolide (100 nM), Z-VAD-FMK (10 μ g/mL), 2-Aminopurina (5 mM), AZD1480 (3,5 μ g/L), PD98059 (50 μ M). Todas as drogas foram obtidas da empresa InvivoGen.

Para verificar a importância do cálcio na indução de CD200 por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, os macrófagos foram pré-tratados por 1 h com BAPTA (10 μM) ou Tapsigargina (1 μM) (ambas drogas da Sigma-Aldrich).

Nos ensaios de inibição de vias relacionadas ao processamento do conteúdo no interior do fagolisossoma dependendo de lisossoma, proteassoma ou autofagia, os macrófagos derivados de medula óssea foram pré-tratados por 1 h com os inibidores Bafilomicina A1 (50 nM) com Leupeptina (50 μ M), 3-Metiladenina (3MA) (50 μ M) e MG132 (10 μ M), respectivamente. Todas as drogas obtidas da Sigma-Aldrich.

Após os tratamentos, as células foram infectadas por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis*, e em seguida, lavadas com PBS e preparadas para extração de proteínas como já descrito.

3.6.5 Modulação dos níveis proteicos de iNOS e da produção de NO

Para verificar a modulação nos níveis proteicos de iNOS, bem como da produção de NO nas células infectadas por *L. (L.) amazonensis*, os macrófagos foram pré-tratados por 6 h com LPS 500 ng/mL (InvivoGen), lavados 3 vezes com PBS e infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MOI 2) por 1 h; ou tratados com CD200-Fc 4 μg/mL (R&D); ou tratados com DNA de amastigotas axênicos (1 μg/mL). As células foram mantidas a 33 °C, na presença de 5% de CO₂, por 42 h. Ao final, o sobrenadante foi utilizado para quantificar os níveis de nitrito (NO₂-) e a proteína total utilizada para analisar os níveis de expressão de iNOS.

3.7 Western blot e imunoprecipitação

As amostras de proteínas dos ensaios foram quantificadas pela técnica BCA-Pierce e 20 μg de proteína foram analisadas em gel de poliacrilamida-SDS 12% por eletroforese no Sistema BioRad. Após migração, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, incubadas com anticorpo primário específico para as proteínas de interesse – CD200R (R&D Systems), NF-κB (Abcam), ERK (Cell Signaling Technology), iNOS (Abcam) e Actina (Imuny-VBP Biotecnologia) - e em seguida tratadas com anticorpos secundários específicos (anti-IgG de cabra, anti-IgG de camundongo e anti-IgG de coelho) conjugado à peroxidase (Imuny-VBP Biotecnologia). As membranas foram tratadas com o kit de quimioluminescência (Thermo Fisher Scientific) e então reveladas em sistema ChemiDoc (BioRad), utilizando software ImageLab (BioRad).

A detecção da proteína CD200 foi feita utilizando o kit de imunoprecipitação Pierce Crosslink como descrito pelo fabricante (Thermo Fisher Scientific). Para a técnica, foram utilizados 100 µg de proteína total de cada amostra, sendo incubadas em colunas contendo proteína A/G ligada ao anticorpo CD200 (R&D Systems). Após, as amostras foram analisadas por *Western blot*, utilizando anticorpo anti-CD200 feito

em cabra (R&D Systems), seguido de incubação com anticorpo secundário (anti-IgG de cabra) conjugado à peroxidase (Imuny-VBP Biotecnologia). Antes da imunoprecipitação, 20 µg de cada amostra foram separados para realizar um *Western blot* contra Actina, a fim de verificar se a mesma quantidade de proteína total foi colocada em cada coluna (INPUT).

3.8 Imunofluorescência

As lamínulas de vidro contendo os macrófagos infectados foram fixadas por 10 min em 4% de paraformaldeído/PBS, lavadas 3 vezes com PBS e tratadas com 50 mM NH₄Cl por 15 min. Após o tratamento, as células foram lavadas 5 vezes com PBS, permeabilizadas e bloqueadas com uma solução de saponina (0,1%) / albumina bovina sérica (0,1%), contendo azida de sódio (0,1%) em tampão Tris salina (TBS). As células foram incubadas com solução de permeabilização e bloqueio por 2 h na presença de anticorpos primários: anti-LAMP-1 de camundongo produzido em rato (e anti-*Leishmania* produzido em coelho. Após foi feita a incubação por 1 h com os respectivos anticorpos secundários: Alexa-Fluor 568 e Alexa-Fluor 488 (Invitrogen). O material genético da célula hospedeira e do parasito foi marcado com DAPI 10 μg/mL (Sigma-Aldrich) por 1 h. As lamínulas foram montadas em lâminas contendo ProLong Diamond (Thermo Fisher Scientific).

Nos ensaios realizados para verificar a importância da fagocitose na indução de CD200 nos macrófagos infectados, as células foram apenas bloqueadas com uma solução de albumina bovina sérica (0,1%), contendo azida sódica em tampão Tris salina (TBS). Para a marcação com os anticorpos, as lamínulas foram incubadas com esta solução de bloqueio por 2 h na presença do anticorpo primário anti-*Leishmania* produzido em coelho. Após foi feita a incubação por 1 h com o respectivo anticorpo secundário Alexa-Fluor 488. O material genético da célula hospedeira e do parasito foi marcado com DAPI 10 μg/mL por 1 h, junto com faloidina conjugada com Texas Red-X (Thermo-Scientific) - utilizada para a marcação de actina. A seguir, as lamínulas foram montadas em lâminas contendo ProLong Diamond e visualizadas por microscopia de fluorescência.

As imagens foram adquiridas em um microscópio de fluorescência DMI6000B/AF6000 (Leica) acoplado a um sistema de câmera digital (DFC 365 FX) e analisadas com o programa Image J.

Para avaliar a indução de CD200 nos macrófagos infectados, as células foram incubadas *overnight* (12 – 18 h) a 4 °C, com anticorpo monoclonal anti-CD200 conjugado ao fluorocromo BV421 (BD Biosciences) e incubadas por 2 h com o anticorpo policlonal anti-CD200R produzido em cabra, seguido do respectivo anticorpo secundário Alexa-Fluor 488 (Invitrogen). O material genético da célula hospedeira e do parasito foi marcado com iodeto de propídeo 10 μg/mL (Sigma-Aldrich) por 1 h. As lamínulas foram montadas em lâminas contendo ProLong Diamond (Thermo Fisher Scientific). As imagens foram adquiridas em um microscópio Confocal Zeiss LSM 780-NLO, no Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa (CEFAP-USP).

3.9 Produção de Óxido Nítrico

Para avaliar a produção de óxido nítrico (NO) celular durante a infecção e/ou os tratamentos, o sobrenadante das culturas foi utilizado para a quantificação de nitrito (produto da reação de NO com oxigênio) utilizando kit específico (Measure-iT High-Sensitivity Nitrite Assay Kit - Molecular Probes). A emissão da fluorescência foi medida em 450 nm após excitação em 365 nm. A concentração de nitrito de cada amostra foi calculada a partir da curva padrão provida pelo fabricante e os resultados expressos em μΜ.

3.10 Análise da produção de vesículas extracelulares (VEs)

Um total de 1 x 10⁹ amastigotas axênicos foram lavados 2 vezes com PBS e incubados por 2 h a 33 °C, em 1 mL de meio de cultura para amastigotas (pH 5,2) (Figura 11). O meio utilizado foi previamente centrifugado a 100.000 x g, por 1 h em ultracentrífuga (Rotor 70.1T, XL-100K Ultracentrifuge - Beckman) para eliminar completamente qualquer microvesícula existente, proveniente do SFB. Após a incubação, os parasitos foram centrifugados a 1000x g por 10 min, ressuspendidos em glutaraldeído (2,5 %) e colocados em lamínulas previamente tratadas com poli-L-

Lisina (Sigma-Aldrich). As lamínulas contendo os amastigotas foram encaminhadas para o Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de São Paulo - CEME/UNIFESP - para serem analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

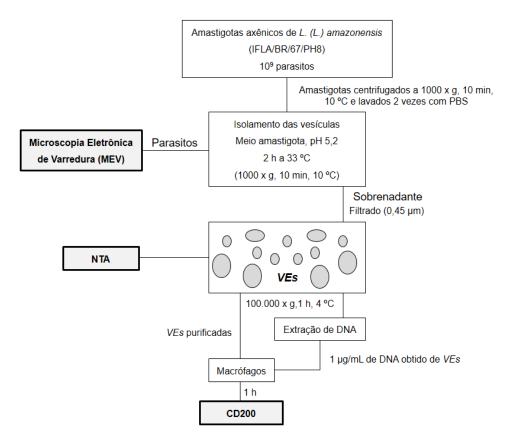


Figura 11 - Procedimentos utilizados para obtenção de Vesículas Extracelulares (VEs). Os amastigotas axênicos foram mantidos a 33 °C, por 2 h, em meio de cultura de amastigotas (pH 5,2). Após os parasitos foram centrifugados e encaminhados para análise de microscopia de varredura (MEV). O sobrenadante foi filtrado e as VEs obtidas foram analisadas por NTA. O conteúdo total de VEs e/ou o DNA obtido das VEs, foram utilizados para estimular os macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6. Os níveis de CD200 foram analisados por imunoprecipitação e *Western blot*.

O sobrenadante obtido após a centrifugação dos amastigotas foi filtrado (0,45 µm) e submetido à análise de nanopartículas, utilizando o aparelho Nanosight NS300 (Malvern Instruments Ltd), equipado com laser de 405 nm acoplado a uma câmera CCD. Os dados foram analisados utilizando o *software* para análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) (versão 2.3). Para realizar as análises, as amostras foram diluídas 100 vezes em PBS. As leituras (capturas) tiveram duração de 30 s, com 20 quadros por segundo (Nogueira et al., 2015).

As microvesículas totais obtidas da incubação dos amastigotas também foram utilizadas para estimular os macrófagos. O sobrenadante foi centrifugado (100.000 x g, 1 h) e o material contendo as *VE*s foi ressuspendido em meio RPMI 1640 suplementado com SFB (10%). Após 1 h de incubação, as células foram lavadas 1 vez com PBS e então tratadas com tampão de lise celular (Thermo Fisher Scientific), suplementado com coquetel de inibidores de proteases (Thermo Fisher Scientific). As proteínas extraídas foram submetidas a imunoprecipitação e *Western blot* para detecção dos níveis de indução de CD200.

As *VEs* concentradas após centrifugação (100.000 x g, 1 h) também tiveram o DNA extraído com o kit GenEluteTM (Sigma-Aldrich), de acordo com as especificações do fabricante (incluindo tratamento com RNAase), e 1 μg/mL de DNA foi utilizado para estimular os macrófagos por 1 h, com posterior extração proteica e análise da indução de CD200 por imunoprecipitação e *Western blot*.

3.11 Infecção in vivo e quantificação da carga parasitária

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 WT e camundongos TLR9-¹gerados em C57BL/6, foram criados e utilizados de acordo com o protocolo aprovado
pela Comissão de Ética. Os animais foram infectados com 8 semanas de idade, no
coxim plantar da pata posterior esquerda com 1 x 10⁶ promastigotas de fase
estacionária de *L. (L.) amazonensis*. A progressão da lesão foi acompanhada ao longo
de cinco semanas, por meio da medição da largura da pata utilizando um paquímetro.

O número total de parasitos nas patas infectadas foi estimado pelo ensaio de diluição limitante, como previamente descrito (Cortez et al., 2011), com algumas modificações. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, as patas foram removidas, pesadas e o tecido foi dissociado por meio de incubação por 2 h, a 37 °C, com colagenase (Sigma-Aldrich) 2 mg/mL, em tampão Tyrode – NaCl (140 mM), KCl (5 mM), CaCl₂ (2,5 mM), Hepes (10 mM), MgCl₂ (2 mM), pH 7,2. Após, o homogenato foi filtrado em peneira celular com poro de 70 μm (Falcon Products, Inc.), centrifugado a 230 x g por 10 min e lavado 2 vezes com PBS (230x g, 10 min). O material centrifugado foi então ressuspendido em 1 mL de PBS, dos quais 50 μl foram utilizados para diluição limitante e 950 μl foram utilizados para a técnica de citometria de fluxo.

Para a diluição limitante dos parasitos, a suspensão de células obtidas da lesão foi diluída 100 vezes em meio Grace. Após foi realizada uma diluição seriada de 10 vezes em placas de 96 poços. O número de parasitos viáveis foi calculado a partir da maior diluição em que foi observado o crescimento de promastigotas após 10 dias de incubação a 25 °C. Os resultados foram apresentados em logaritmo na base 10 (Log10), de acordo com a diluição (Cortez et al., 2011).

3.12 Citometria de fluxo

As células obtidas das lesões dos camundongos infectados foram centrifugadas (230 x g, 10 min) e lavadas 1 vez com PBS (230 x g, 10 min). Em seguida, as células foram ressuspendidas em tampão para citometria (PBS + SFB, 1%) e contadas em câmara de Neubauer para estimar o número de células presentes nas amostras. Em seguida, as suspensões celulares foram incubadas por 30 min a 4 °C, em tampão para citometria, com os anticorpos específicos e mantidas sob proteção da luz. Os anticorpos utilizados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais utilizados na Citometria de Fluxo.

Anticorpo	Fluorocrômo	Clone	Diluição	Fabricante
Anti-CD45	APC	30-F11	1:200	Biolegend
Anti-CD19	PE	1D3	1:200	BD Biosciences
Anti-CD11b	PE-Cy7	M1/70	1:1600	BD Biosciences
Anti-F4/80	FITC	BM8	1:100	eBioscience TM
Anti-CD200	BV421	OX-90	1:50	BD Biosciences

Decorrido o tempo de incubação com os anticorpos, as células foram centrifugadas (230 x g, 10 min) e ressuspendidas em tampão para citometria. As amostras foram então adquiridas no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Bioscience) e 100.000 eventos de cada amostra foram obtidos. A análise após aquisição foi realizada no programa FlowJo, versão 10.0.7. A estratégia de análise escolhida (Figura 12) foi: 1) exclusão de agregados celulares (doublets), utilizando os

parâmetros de tamanho FSC-A e FSC-H; **2)** seleção da população celular leucocitária (CD45+); **3)** seleção da população celular monocítica (CD19-CD11b+); **4)** seleção da população de macrófagos (F4/80+); **5)** avaliação da porcentagem de células CD200+ [a janela para seleção de células CD200+ foi estrategicamente posicionada baseandose no controle de fluorescência menos um (FMO, do inglês *fluorescence minus one* para o anticorpo anti-CD200)].

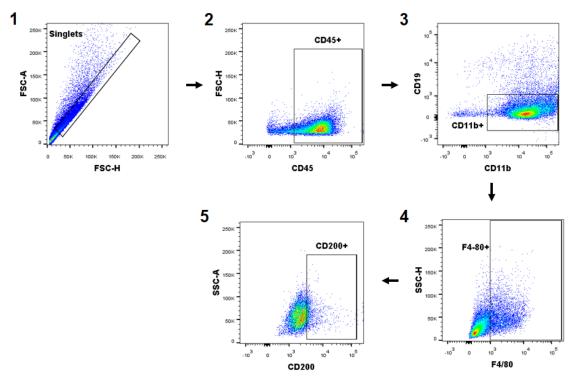


Figura 12 - Estratégia da análise utilizada para avaliar a população de células F4/80+ CD200+ nas lesões. Após a seleção de singlets por FSC-A e FSC-H, foi selecionada a população CD45+. Após foi selecionada a população celular monocítica (CD19-CD11b+) e em seguida a população de macrófagos (F4/80+) dentro desta população. A porcentagem de macrófagos CD200+ (F4/80+CD200+) baseou-se no controle FMO para o anticorpo.

3.13 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média ± desvio padrão e submetidos a análise estatística, utilizando o programa GraphPad Prism 6.0. Para avaliar a significância dos resultados, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias para diferenças estatísticas entre três ou mais médias. Uma vez detectada diferença significativa, foi aplicado o teste de Tukey ou de Sidak. Também foram

utilizados Teste t de Student e ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% (p<0,05).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do processo de indução de CD200 em macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*

4.1.1 Padronização da indução de CD200 em macrófagos infectados com L. (L.) amazonensis

O macrófago é uma das principais células envolvidas na defesa inata contra patógenos. Contudo, a espécie *L. (L.) amazonensis* tem a habilidade de sobreviver dentro de macrófagos ativados, estabelecendo a infecção (Stafford et al., 2002; Van Assche et al., 2011). Como já mencionado anteriormente, em 2011, Cortez e colaboradores mostraram que amastigotas de *L. (L.) amazonensis* são capazes de induzir a expressão de CD200 - uma molécula imunomoduladora que inibe a ativação de macrófagos. Neste trabalho, o processo de indução de CD200 em macrófagos foi apresentado pela primeira vez, mostrando que a expressão da proteína no início da infecção (60 min) é crucial para a sobrevivência do parasito.

Para caracterizar o processo de indução da proteína CD200 em macrófagos, decidimos avaliar tempos menores de infecção, bem como a capacidade de indução relacionada a MOI. Primeiramente, infectamos macrófagos murinos diferenciados de medula óssea por diferentes tempos com amastigotas obtidos de lesão. A proteína CD200 foi então imunoprecipitada e os seus níveis avaliados por *Western blot*. Nossos resultados mostram que, após 30 min de infecção, o macrófago infectado (mas não o macrófago não infectado) começa a expressar CD200 (Figura 13). Contudo, 60 min após, os níveis da proteína estão mais altos, confirmando os resultados apresentados no estudo de Cortez e colaboradores (2011).

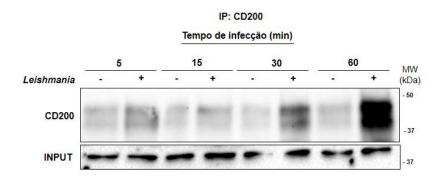


Figura 13 - Indução de CD200 em macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.)* **amazonensis.** Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) foram infectados por 5, 15, 30 ou 60 min com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis*. Para sincronizar a infecção, as células com os parasitos foram mantidas por 30 min em gelo, antes de serem colocadas

a 33 °C. Imagem de Western blot após a imunoprecipitação da proteína CD200 em diferentes tempos de infecção. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). Repetições biológicas: 3.

A MOI utilizada tanto nestes ensaios quanto no estudo mencionado foi de 2 parasitos por célula. Desta forma, ao infectarmos os macrófagos por 1 h com diferentes quantidades de amastigotas, foi possível observar uma indução de CD200 com os diferentes MOIs (Figura 14).

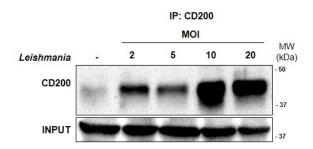


Figura 14 - Indução de CD200 em macrófagos infectados com diferentes MOI de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) foram infectados por 1 h com diferente número de amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis* por célula (MOIs). Imagem de *Western blot* após a imunoprecipitação da proteína CD200 em 1 h infecção. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). Repetições biológicas: 3.

Com base nestes resultados, optamos por realizar todos os demais ensaios do estudo no tempo de 1 h, sendo as infecções feitas com 2 amastigotas por célula. Apesar te obtermos níveis mais altos de indução com MOI 10 ou 20, seria necessário infectar mais camundongos para obtenção de amastigotas de lesão suficientes para os ensaios. Além disso, maiores quantidades de parasitos geram maior estresse no macrófago, levando a morte celular (dados obtidos no laboratório).

4.1.2 Análise da importância da fagocitose e da viabilidade do parasito para a indução de CD200 em macrófagos

A entrada da *Leishmania* no macrófago ocorre pelo processo de fagocitose, no qual a célula é capaz de expandir sua membrana plasmática e envolver o parasito, fazendo com que ele fique isolado dentro de um vacúolo (Love et al., 1998). Dando continuidade a avaliação do processo de indução de CD200 nos macrófagos

infectados por amastigotas de *L. (L.) amazonensi*s, analisamos a importância da entrada do parasito na célula para a indução da proteína.

Para identificarmos se o sinal responsável pela indução de CD200 ocorre pelo contato do amastigota com a superfície externa do macrófago ou se este sinal ocorre após sua entrada na célula (ativando TLRs de membrana plasmática ou endosomais), inibimos a fagocitose do parasito. Desta forma, macrófagos foram previamente tratados por 30 min com Citocalasina D (2 µM), capaz de inibir a polimerização de actina (Casella et al., 1981) e consequentemente inibir a fagocitose. Após 1 h de infecção, a proteína CD200 foi imunoprecipitada e seus níveis de indução avaliados por Western blot. Nossos resultados mostram que em macrófagos previamente tratados com Citocalasina D há menor indução de CD200 após 1 h de infecção (Figura 15A). Para analisarmos o número de amastigotas fagocitados neste tempo (1 h), as células não foram permeabilizadas durante a marcação com anticorpo anti-Leishmania, marcando assim apenas os parasitos não fagocitados. A marcação com DAPI permitiu quantificar o número de amastigotas que estavam internalizados [distinguindo parasitos internalizados ou apenas associados a célula (Figura 15B)]. Os resultados das quantificações mostram que o tratamento com Citocalasina D reduziu a fagocitose do amastigota (Figura 15C). Também é possível observar que não há diferenças na porcentagem de macrófagos que apresentavam qualquer interação com o parasito (infectados ou em contado, nomeados Macrófago-Leishmania) (Figura 15D). Estes resultados de infecção mostram que o tratamento com o inibidor teve efeito em grande parte das células, impedindo a fagocitose. Estes resultados demonstram a importância da entrada do parasito no interior do macrófago para a indução de CD200.

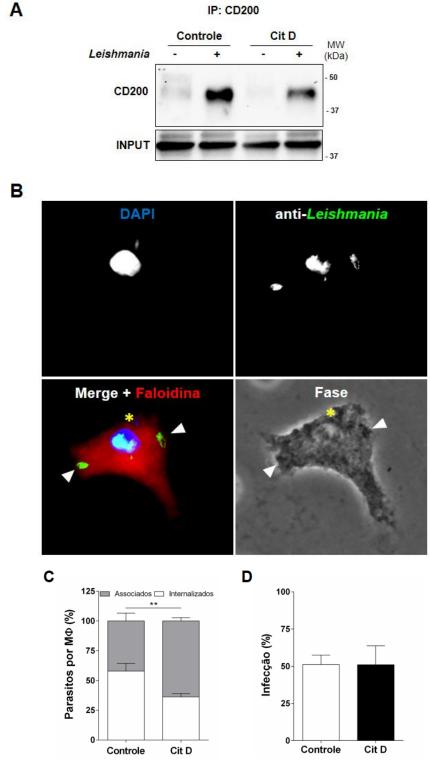


Figura 15 - Importância da fagocitose de *L. (L.) amazonensis* para a indução de CD200 em macrófagos. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT), tratados ou não previamente com Citocalasina D (Cit D) 2 μM, foram infectados por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis* (MOI 2). (A) Imagem de *Western blot* após imunoprecipitação da proteína CD200 em 1 h de infecção. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). (B) Imagem representativa do ensaio de fagocitose. As células não foram permeabilizadas, possibilitando apenas a marcação dos amastigotas não internalizados. Amastigota de *L. (L.) amazonensis* associado ao macrófago marcado com anticorpo anti-*Leishmania* (verde); Actina marcada com *Faloidina* (vermelho); Núcleo da célula e do parasito internalizado marcado com *DAPI* (azul); O asterisco (amarelo) indica o parasito fagocitado. Flechas (brancas)

indicam parasito não fagocitado. **(C)** Porcentagem de parasitos internalizados ou associados a macrófagos (ΜΦ) após 1 h de infecção. **(D)** Porcentagem de macrófagos infectados após 1 h. Resultados correspondem a média ± desvio padrão de triplicatas biológicas. **p<0,01. Repetições biológicas: 3. (Barra = 10 μm).

Uma vez observada a importância da fagocitose para a expressão de CD200, decidimos avaliar também a importância da viabilidade do amastigota neste processo de indução. Para isto, os amastigotas obtidos de lesão foram submetidos a diferentes processos de inativação: inativação por calor (45 min, 65 °C) ou fixados com paraformaldeído 4% (10 min, 33 °C). Após isso, macrófagos foram incubados por 1 h com os diferentes parasitos em diferentes condições, a proteína CD200 foi imunoprecipitada e os níveis de indução avaliados por *Western blot*. Os resultados mostram que a viabilidade do amastigota é importante para a indução da proteína (Figura 16A), visto que apesar dos diferentes amastigotas tratados terem sido fagocitados da mesma forma (Figura 16B), apenas os parasitos viáveis foram capazes de induzir CD200 no macrófago.

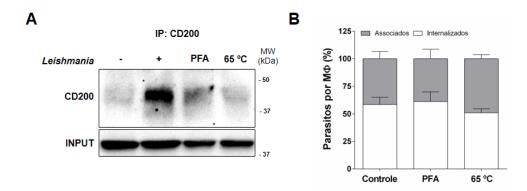


Figura 16 - Importância da viabilidade da *L. (L.) amazonensis* para a indução de CD200 em macrófagos. Amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram isolados de lesão e então fixados com paraformaldeído 4% por 10 min (PFA) ou inativados por calor, a 65 °C por 45 min (65 °C). Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) foram então infectados por 1 h com os amastigotas (MOI 2). (A) Imagem de *Western blot* após imunoprecipitação da proteína CD200 em 1 h de infecção. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). (B) Porcentagem de parasitos internalizados ou associados a macrófagos (MΦ) após 1 h de infecção. Resultados correspondem a média ± desvio padrão de triplicatas biológicas. Repetições biológicas: 3.

Estes resultados sugerem que o sinal responsável pela indução de CD200 no macrófago ocorre após a fagocitose do amastigota, já dentro do vacúolo parasitóforo.

Além disso, apenas parasitos viáveis são capazes de induzir a proteína, possivelmente devido a fatores relacionados a virulência da *L. (L.) amazonensis*.

4.1.3 Análise da localização celular de CD200 no macrófago durante a infecção por L. (L.) amazonensis

A proteína CD200 é uma glicoproteína de superfície, constitutivamente expressa em células epiteliais, linfócitos e neurônios (Barklay et al., 2002), mas ausente em macrófagos (Hoek et al., 2000). Como já mencionado, Mukhopadhyay e colaboradores (2010) mostraram, em uma análise por citometria de fluxo, que *Neisseria meningitidis* é capaz de induzir a expressão de CD200 na superfície de diferentes populações de macrófagos, mas em contrapartida reduz a expressão do receptor CD200R.

No estudo de Cortez e colaboradores (2011), a indução de CD200 por *L. (L.)* amazonensis foi mostrada por Western blot e PCR em Tempo Real, enquanto que a expressão de CD200R não foi avaliada. Sabendo que macrófagos possuem CD200R e que o parasito induz CD200, decidimos analisar a localização destas proteínas no macrófago durante a infecção. Para isto, os macrófagos foram infectados por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.)* amazonensis, fixados, permeabilizados e marcados com anticorpo anti-CD200 e anti-CD200R, como descrito em Material e método.

A fim de otimizar a visualização das marcações, após a obtenção das imagens em microscópio confocal, alteramos as cores referentes à alguns dos canais. Devido ao anticorpo anti-CD200 estar acoplado a um fluorocromo violeta, o sinal de colocalização entre CD200 e CD200R (azul e verde, respectivamente) ficava baixo. Por isso, as imagens apresentadas mostram a coloração vermelha para CD200 e azul para iodeto de propídeo. Além disso, optamos também por incubar os macrófagos não infectados (NI) apenas com o anticorpo secundário anti-cabra (Figura 17A), servindo como controle para a marcação de CD200R observada nos macrófagos infectados (INF) (Figura 17B). Utilizamos esta abordagem, pois estávamos interessados inicialmente em comparar apenas a expressão de CD200 entre células NI e INF.

Nossos resultados mostram que enquanto as células não infectadas nao apresentam marcação para CD200 (Figura 17A), a infecção com o parasito aumenta o sinal de CD200 nos macrófagos (Figura 17B). Observamos também que na figura 15B há três células das quais podemos perceber alguns detalhes importantes: dois

macrófagos infectados apresentando um sinal maior de CD200 e menor de CD200R, e um macrófago não infectado apresentando maior sinal de CD200R e menor de CD200. Este resultado sugere que a infecção de macrófagos por amastigotas de *L.* (*L.*) amazonensis é capaz de induzir CD200 na célula, mas que também pode, eventualmente, modular os níveis do receptor.

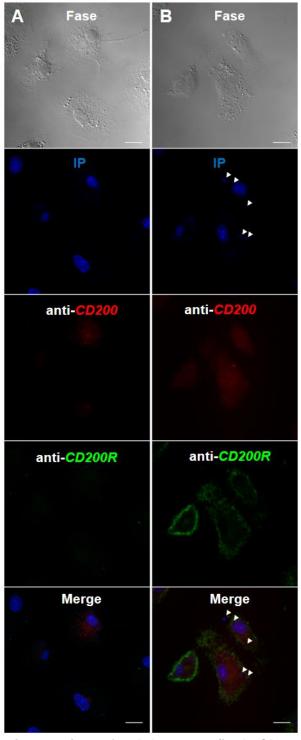


Figura 17 - Análise por microscopia confocal da expressão de CD200 durante a infecção por amastigotas *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) foram infectados por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis* (MOI 2). As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpos específicos. O núcleo das células e dos amastigotas foi marcado com iodeto de propídeo (IP) (azul); O receptor CD200R foi marcado com anticorpo anti-CD200R, seguido de anticorpo secundário anti-IgG de cabra acoplado a Alexa-Fluor 488 (verde); A proteína CD200 foi marcada com anticorpo anti-CD200 acoplado ao fluorocromo BV421 (vermelho). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal e editadas no *software* Zen. Na parte superior (A), células não infectadas (NI) e não incubadas com anticorpo secundário anti-cabra. Na parte inferior (B), células infectadas (INF). As setas indicam os amastigotas dentro da célula. (Barra = 10 μm). Repetições biológicas: 2.

Podemos observar que a marcação para CD200 está amplamente distribuída pelo macrófago infectado (Figura 18A). Porém, quando analisado o corte transversal das células, percebe-se que a proteína é encontrada majoritariamente na região citoplasmática do macrófago, ao contrário de CD200R que se encontra na superfície celular externa (Figura 18B – CD200 citoplasmática indicada por um asterisco).

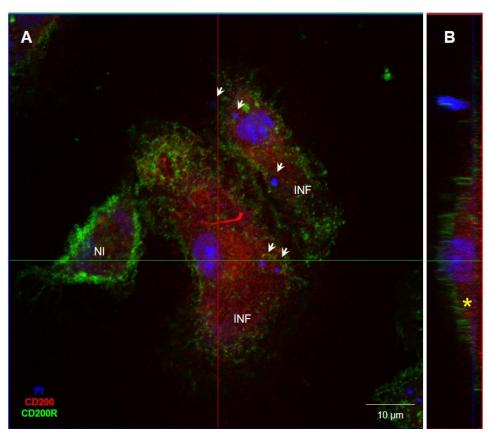


Figura 18 - Análise da localização celular de CD200 durante a infecção por amastigotas *L. (L.)* amazonensis. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) foram infectados por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.)* amazonensis (MOI 2). As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpos específicos. O núcleo das células e dos amastigotas foi marcado com iodeto de propídeo (IP) (azul); O receptor CD200R foi marcado com anticorpo anti-CD200R, seguido de anticorpo secundário anti-cabra acoplado a Alexa-Fluor 488 (verde); A proteína CD200 foi marcada com anticorpo anti-CD200 acoplado ao fluorocromo BV421 (vermelho). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal e editadas no software Zen. (A) Imagem das células infectadas expressando CD200. As setas indicam os amastigotas dentro da célula. (B) Corte transversal da imagem A, mostrando a presença de CD200 no citoplasma (indicada pelo asterisco) e de CD200R na superfície externa. NI: não infectado; INF: infectado. (Barra = 10 μm).

Sabe-se que a ativação do receptor CD200R pelo ligante CD200 é responsável por gerar um sinal inibitório, controlando as funções celulares do macrófago. Ao induzir o ligante no próprio macrófago infectado, a *L. (L.) amazonensis* garantiria um

ambiente favorável à sua multiplicação. Por isso, ao analisarmos se o ligante se encontrava junto ao receptor na célula, observamos na imagem de microscopia que houve uma co-localização entre os dois (CD200-CD200R), indicada pela marcação na cor branca (Figura 19).

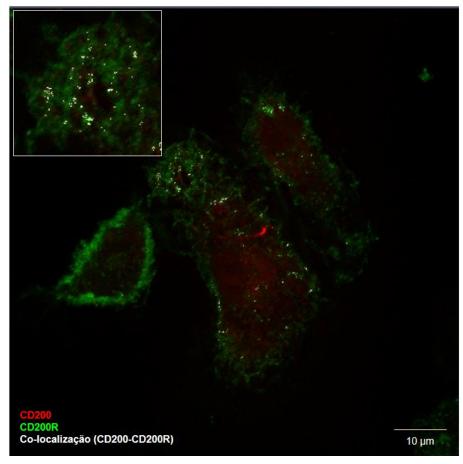


Figura 19 - Análise da co-localização CD200-CD200R durante a infecção por amastigotas *L. (L.)* amazonensis. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) foram infectados por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.)* amazonensis (MOI 2). As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpos específicos. O receptor CD200R foi marcado com anticorpo anti-CD200R, seguido de anticorpo secundário anti-cabra acoplado a Alexa-Fluor 488 (verde); A proteína CD200 foi marcada com anticorpo anti-CD200 acoplado ao fluorocromo BV421 (vermelho). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal e editadas no *software* Zen. A imagem mostra a co-localização CD200-CD200R apresentada na cor branca, calculada pelo *software*. (Barra = 10 μm).

A co-localização, quantificada pelo próprio *software* junto ao microscópio, indicou que houve apenas 0,02% de sinal de CD200 junto a CD200R. Contudo, podemos observar que este sinal de co-localização apenas ocorreu nas células infectadas. Também é importante ressaltarmos que a baixa porcentagem de co-localização observada se deva ao momento da análise, podendo haver um aumento

nesta relação em tempos prévios ou tardios a 1 h. Estes resultados corroboram com a ideia de que o parasito esteja induzindo a proteína, que em contato com seu receptor, iniba a resposta inflamatória da célula, gerando um ambiente menos hostil para *Leishmania*. Porém, mais estudos são necessários para confirmar a forma de ativação de CD200R por CD200 na infecção pelo parasito.

4.2 Avaliação da via de indução de CD200 em macrófagos infectados com *L. (L.)* amazonensis

4.2.1 Análise da participação dos TLRs na indução de CD200 em macrófagos infectados com L. (L.) amazonensis

O estudo realizado por Mukhopadhyay e colaboradores (2010) revelou a participação principalmente de TLR4 e de sua proteína adaptadora MyD88 na via de indução de CD200 em macrófagos. Ao avaliarmos a associação entre a indução de CD200 e a infecção por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, observamos que o simples contato do parasito com a célula não induz níveis de CD200 comparados aos observados quando o mesmo se encontra internalizado, sugerindo que a sua indução utilize TLRs endossomais ou pelo menos que seja dependente de um recrutamento de receptores, posterior à entrada do parasito.

Utilizando macrófagos deficientes nos receptores TLR3 e TLR9 (TLRs presentes em endossomos), bem como deficientes em TLR2 e TLR4 (TLRs presentes na membrana externa da célula), analisamos os níveis de indução de CD200 durante a infecção por amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis*. Nossos resultados revelam que, após 1 h de infecção, não há diferença na indução da proteína entre macrófagos WT, TLR2-/-, TLR3-/- e TLR4-/- infectados com amastigotas de *L (L.) amazonensis* (Figura 20). Contudo, em macrófagos TLR9-/- infectados não foi observada a indução de CD200, o que demonstra a participação deste receptor no processo de indução da molécula na célula hospedeira.

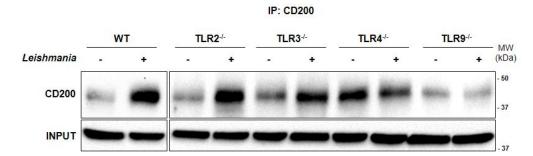


Figura 20 - Importância dos TLRs para a indução de CD200 em macrófagos infectados por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT), TLR2-/-, TLR3-/-, TLR4-/- e TLR9 -/- foram infectados (+) ou não (-) por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis* (MOI 2) e os níveis proteicos de CD200 foram analisados. A imagem mostra o *Western blot* após a imunoprecipitação da proteína CD200 em 1 h de infecção. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). Repetições biológicas: 3.

Como o evento de indução de CD200 no macrófago depende do número de amastigotas que estão sendo fagocitados pela célula, ensaios foram realizados para complementar o experimento anterior. Assim, ao analisarmos o número de parasitos internalizados, verificamos que amastigotas de *L. (L.) amazonensis* infectam semelhantemente os diferentes grupos de macrófagos estudados durante a primeira hora de infecção, não havendo alteração na entrada do parasito decorrente da ausência dos diferentes TLRs (Figura 21A e B).

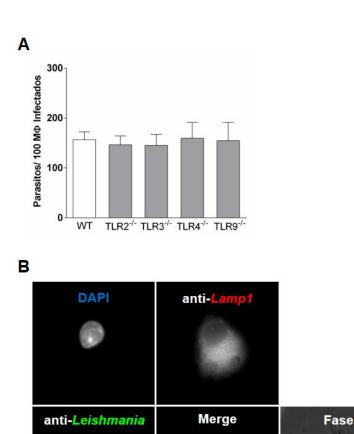


Figura 21 - Infecção *in vitro* de macrófagos TLR^{-/-} por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT), TLR2^{-/-}, TLR3^{-/-}, TLR4^{-/-} e TLR9^{-/-} foram infectados por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis* (MOI 2) e em seguida as células foram processadas para imunofluorescência. (A) Quantificação do número de parasitos por 100 macrófagos (MΦ) infectados após 1 h de infecção. (B) Imagens de microscopia de fluorescência representativa das infecções. Macrófagos WT com amastigotas marcados com anticorpo anti-*Leishmania*, seguido de anticorpo secundário anti-coelho acoplado a Alexa-Fluor 488 (verde); Vacúolo parasitóforo marcado com anticorpo anti-*Lamp1*, seguido de anticorpo secundário anti-rato acoplado a Alexa-Fluor 568 (vermelho); Núcleo da célula marcado com *DAPI* (azul). Flechas brancas na microscopia de contraste de fase indicam o parasito. Repetições biológicas: 3. (Barra = 10 μm).

O TLR9 é classicamente conhecido por reconhecer especificamente dinuceotídeos citosina-fosfato-guanina não metilados (CpG) presentes no DNA de microorganismos (Ohto et al., 2015). Concomitante aos ensaios utilizando macrófagos deficientes para diferentes TLRs, realizamos também ensaios estimulando as células com diferentes agonistas de TLRs. Quando macrófagos WT foram estimuladas por 1 h com CpG (agonista de TLR9), PGN (agonista de TLR2/6), poly I:C (agonista de TLR3) e LPS (agonista de TLR4), observamos um aumento nos níveis de CD200 nos macrófagos tratados com CpG (Figura 22). Estes resultados reforçam a importância

do TLR9 para a indução da proteína CD200 em macrófagos infectados por *L. (L.)* amazonensis.

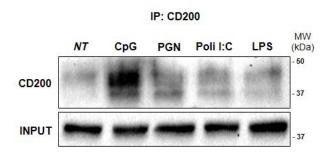


Figura 22 - Indução de CD200 em macrófagos por agonistas de TLRs. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) foram estimulados por 1 h com 1 μg/mL dos diferentes agonistas de TLRs: dinucleotídeos CpG (TLR9), peptideoglicano (PGN, TLR2/6), ácido poli-inosínico (poly I:C, TLR3) e lipopolissacarídeo (LPS,TLR4). Após os níveis proteicos de CD200 foram analisados. A imagem mostra o *Western blot* após a imunoprecipitação da proteína CD200 em 1 h de tratamento. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). Repetições biológicas: 3.

Ao analisarmos os níveis de CD200R após 1 h de infecção com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis*, observamos por *Western blot* que o receptor está presente em todas as células (Figura 23).

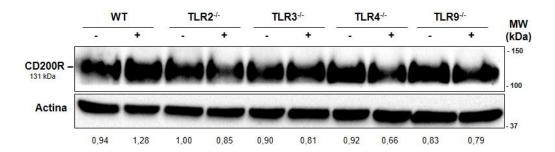


Figura 23 - Avaliação dos níveis de CD200R em macrófagos infectados por amastigotas de *L. (L.) amazonensis.* Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT), TLR2-/-, TLR3-/-, TLR4-/- e TLR9-/- foram infectados (+) ou não (-) por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis* (MOI 2) e os níveis proteicos de CD200R (receptor para a proteína CD200) foram analisados. A imagem mostra o *Western blot* da proteína CD200R em 1 h de infecção. Actina foi utilizada como controle. A razão da densitometria das bandas de CD200R /Actina é mostrada abaixo. (Repetições biológicas: 1).

Estes resultados ainda são inconclusivos, visto que foi apenas realizado um único experimento. Entretanto, sugerem que CD200R não esteja sendo modulado por TLRs durante a primeira hora de infecção por *L. (L.) amazonensis*.

4.2.2 Análise da participação das proteínas adaptadoras das vias de TLRs na indução de CD200 em macrófagos infectados com L. (L.) amazonensis

Como já mencionado anteriormente, o TLR9, assim como TLR2/1, TLR2/6, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 e TLR11, quando em contado com seus ligantes específicos, recrutam a proteína adaptadora MyD88, ativando quinases comuns que participam das vias de sinalização dos TLRs. TLR3, por sua vez, utiliza a proteína adaptadora TRIF, que também pode ser recrutada por TLR4 via a proteína TRAM (O'Neill, Golenbock, Bowie, 2013). Estas proteínas adaptadoras são fundamentais para a via de sinalização destes receptores.

Para avaliar a importância destas proteínas adaptadoras das vias de TLRs na indução de CD200 pelo parasito, macrófagos WT, MyD88-/- e TRIF-/- foram infectados com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis*. Ao analisarmos os níveis proteicos de CD200 por imunoprecipitação e *Western blot*, verificamos que em macrófagos deficientes em MyD88 ou TRIF não houve a indução de CD200 após 1 h de infecção (Figura 24).

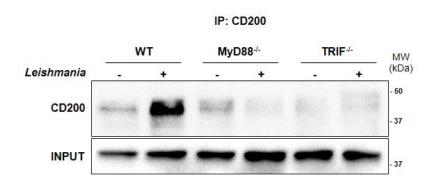
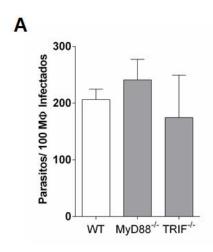


Figura 24 - Importância de MyD88 e TRIF na indução de CD200 em macrófagos infectados por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT), MyD88-/- e TRIF-/- foram infectados (+) ou não (-) por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis* (MOI 2) e o níveis proteicos de CD200 foram analisados. A imagem mostra o *Western blot* após a imunoprecipitação da proteína CD200 em 1 h de infecção. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). Repetições biológicas: 3.

Podemos sugerir que as moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF são utilizadas na via de indução de CD200 pelo parasito no início da infecção. Este resultado chamou-nos a atenção, uma vez que classicamente TLR9 utiliza apenas MyD88 como molécula adaptadora (revisado em O'Neill, Golenbock, Bowie, 2013). Contudo, no estudo de Volpi e colaboradores (2013) foi mostrado pela primeira vez que TLR9 tem a capacidade de recrutar TRIF e induzir NF-κB. Assim, mais estudos são necessários para compreender a relação direta entre *Leishmania*, TRIF e CD200.

A análise da infecção celular pelo parasito mostra que amastigotas de *L. (L.)* amazonensis infectam semelhantemente os diferentes macrófagos após 1 h, não havendo alteração em sua fagocitose, decorrente da ausência das proteínas adaptadoras da via de TLRs (Figura 25A e B).



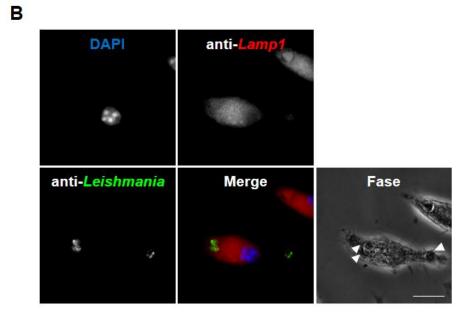


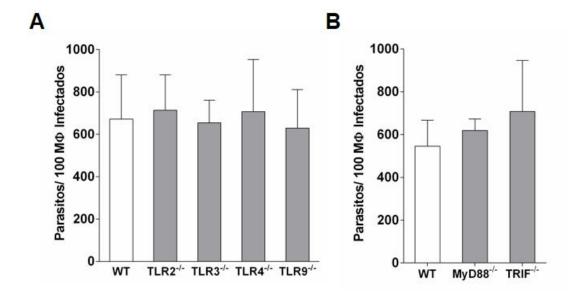
Figura 25 - Infecção *in vitro* de macrófagos MyD88^{-/-} e TRIF^{-/-} por amastigotas de *L. (L.)* amazonensis. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT), MyD88^{-/-} e TRIF^{-/-} foram infectados por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.)* amazonensis (MOI 2) e em seguida as células foram processadas para imunofluorescência. (A) Quantificação do número de parasitos por 100 macrófagos (MΦ) infectados após 1 h de infecção. (B) Imagens de microscopia de fluorescência representativa das infecções. Macrófagos WT com amastigotas marcados com anticorpo anti-*Leishmania*, seguido de anticorpo secundário anti-coelho acoplado a Alexa-Fluor 488 (verde); Vacúolo parasitóforo marcado com anticorpo anti-*LAMP1*, seguido de anticorpo secundário anti-rato acoplado a Alexa-Fluor 568 (vermelho); Núcleo da célula marcado com *DAPI* (azul). Flechas brancas na microscopia de contraste de fase indicam o parasito. Repetições biológicas: 3. (Barra = 10 μm).

4.2.3 Análise da multiplicação intracelular de amastigotas de L. (L.) amazonensis em macrófagos deficientes em TLRs e suas proteínas adaptadoras

Os resultados obtidos por Cortez e colaboradores (2011) revelaram que amastigotas de *L. (L.) amazonensis* não são capazes de se multiplicar dentro de macrófagos deficientes em CD200. Quando macrófagos CD200^{-/-} foram infectados

com o parasito, o número de amastigotas por macrófago inicial se manteve igual até 48 h (sem multiplicação). Contudo, quando estes foram tratados com CD200-Fc solúvel, a multiplicidade da infecção foi recuperada a níveis semelhantes aos macrófagos WT infectados. Uma vez verificada a importância de TLR9, MyD88 e TRIF para a indução de CD200 no início da infecção, decidimos analisar se os amastigotas de *L. (L.) amazonensis* são capazes de multiplicar dentro destes macrófagos. Para observarmos diferenças maiores na infecção dos macrófagos, optamos por quantificar o número de amastigotas por células infectadas após 96 h.

Ao avaliarmos a multiplicação dos parasitos dentro do vacúolo parasitóforo, observamos que apesar de TLR9 e das proteínas adaptadoras MyD88 e TRIF serem importante na indução de CD200 pelo amastigota na primeira hora de infecção, não há diferença no número de parasitos por macrófago após 96 h (Figura 26A e B). Também pode ser observado que, nos demais macrófagos deficientes para os outros TLRs estudados, o parasito também se multiplicou semelhantemente ao WT. Neste tempo de infecção, as células infectadas por *L. (L.) amazonensis* apresentam caracteristicamente um vacúolo único, expandido e com diversos amastigotas dentro (Figura 26C). Podemos observar que a proteína 1 de membrana associada a lisosomo (LAMP1) já se encontra junto ao vacúolo parasitóforo, característico de um vacúolo tardio.



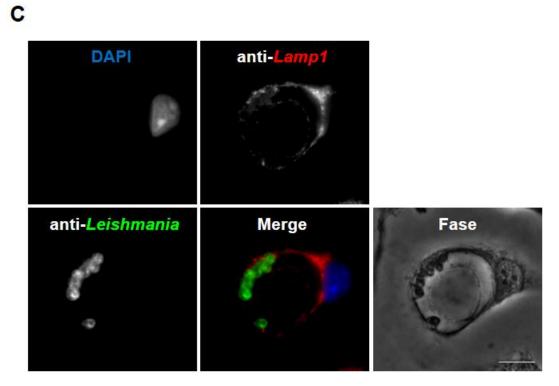


Figura 26 - Multiplicação intracelular de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* em diferentes macrófagos. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT), TLR2-/-, TLR3-/-, TLR4-/-, TLR9-/-, MyD88-/- e TRIF-/- foram infectados com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis* (MOI 2). Após 1 h, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para retirar os parasitos não fagocitados e meio novo (RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 5% de sobrenadante de células L929) foi adicionado. Após 96 h, as células foram processadas para imunofluorescência. (A-B) Quantificação do número de parasitos por 100 macrófagos (MΦ) infectados após 96 h de infecção. (C) Imagens de microscopia de fluorescência representativa da infecção em WT. Amastigotas marcados com anticorpo anti-*Leishmania*, seguido de anticorpo secundário anti-coelho acoplado a Alexa-Fluor 488 (verde); Vacúolo parasitóforo marcado com anticorpo anti-*LAMP1*, seguido de anticorpo secundário anti-rato acoplado a Alexa-Fluor 568 (vermelho); Núcleo da célula marcado com DAPI (azul). Repetições biológicas: 3. (Barra = 10 μm).

A ausência de TLR9, MyD88 e TRIF não permite a indução de CD200 no início da infecção pelo parasito, podendo prejudicar a multiplicação dos amastigotas nos macrófagos. Porém, devido aos TLRs serem uma via importante na indução da resposta pró-inflamatória contra patógenos, na sua ausência, o parasito consegue se multiplicar facilmente nestes macrófagos, como já observado em diversos estudos (Hawn et al., 2002; Debus et al., 2003; de Veer et al., 2003; Li et al., 2004).

4.2.4 Análise dos níveis de CD200 em macrófagos deficientes em MyD88 e TRIF 96 h após a infecção por L. (L.) amazonensis

Ao observarmos não haver diferença na multiplicação dos amastigotas de *L.* (*L.*) amazonensis na infecção após 96 h, decidimos analisar também os níveis da proteína neste tempo tardio. Nossos resultados revelam que, após 96 h de infecção pelo parasito, a proteína passa a ser induzida também nas células deficientes em MyD88 e TRIF (Figura 27). Podemos observar que a infecção por amastigotas de *L.* (*L.*) amazonensis induz CD200 em macrófagos WT, mas que os níveis da proteína são maiores nas células deficientes para a moléculas adaptadoras de TLRs.

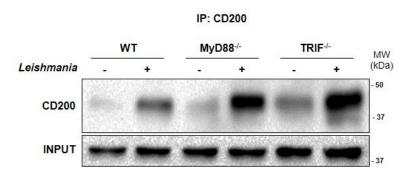


Figura 27 - Importância de MyD88 e TRIF na indução de CD200 em macrófagos 96 h após a infecção por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT), MyD88^{-/-} e TRIF^{-/-} foram infectados (+) ou não (-) com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis* (MOI 2). Após 1 h, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para retirar os parasitos não fagocitados e meio novo (RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 5% de sobrenadante de células L929) foi adicionado. Após 96 h, os níveis proteicos de CD200 foram analisados. A imagem mostra o *Western blot* após a imunoprecipitação da proteína CD200 em 96 h após a infecção. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). Repetições biológicas: 3.

Estes resultados sugerem que a via dos TLRs seja importante apenas no processo de indução de CD200 no início da infecção pelo amastigota. Em tempos

posteriores, a proteína estaria sendo induzida por outra via. Dessa forma, posteriores projetos serão desenvolvidos no laboratório para tentar desvendar a participação de outras moléculas em outras vias de indução de CD200 em tempos tardios da infecção de macrófagos por *L. (L.) amazonensis* ou mesmo em infecções crônicas pelo parasito.

4.3 Avaliação da importância de TLR9 na infecção de camundongos com *L. (L.)* amazonensis

Com base nos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, decidimos avaliar a importância de TLR9 no desenvolvimento de lesão em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Assim, camundongos WT e TLR9-/- foram infectados na pata traseira esquerda, sendo o tamanho da lesão quantificado ao longo de cinco semanas. Os resultados mostram que as lesões desenvolvidas nos camundongos WT cresceram mais rápidas em comparação aos camundongos TLR9-/-, apresentando uma diferença significativa na terceira semana (Figura 28A). Ao final da quinta semana, os grupos não apresentaram diferenças significativas no tamanho das lesões (Figura 28A e B). Contudo, a análise da carga parasitária revelou um maior número de parasitos nos camundongos WT (Figura 28C).

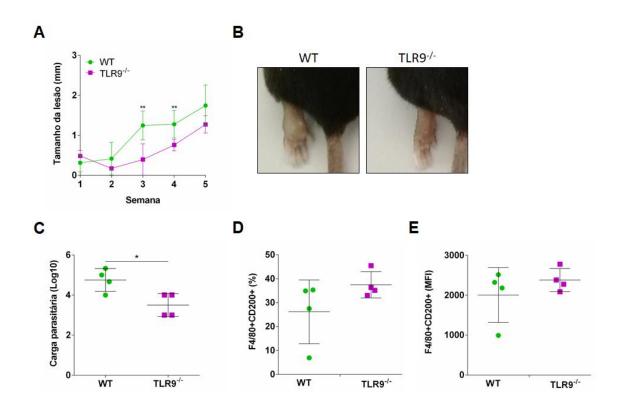


Figura 28 - A importância de TLR9 na infecção de camundongos por *L. (L.) amazonensis*. Camundongos C57BL/6 WT e TLR9-/- foram infectados na pata posterior esquerda com promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* (10⁶/ pata) e o tamanho da lesão foi quantificado ao longo de cinco semanas. (A) Tamanho da lesão em mm ao longo das cinco semanas de infecção. (B) Imagem representativa das lesões observadas na quinta semana após o início da infecção. (C) Quantificação da carga parasitária obtida por meio de diluição limitante das lesões. Resultado expresso em logaritmo na base 10 (Log10). (D) Quantificação de células F4/80+CD200+ presentes nas lesões, expressas em porcentagem (%) – análise por citometria de fluxo. (E) Quantificação da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD200 em células F4/80+CD200+ presentes na lesão – análise por citometria de fluxo. *p<0,05; **p<0,01 (Teste t de Student). (n=4).

Ao analisarmos as células presentes nas lesões ao final da quinta semana, observamos que tanto camundongos WT quanto TLR9-/- apresentaram quantidades semelhantes de células F4/80+CD200+ (macrófagos expressando CD200). Tanto a análise da porcentagem de células F4/80 positivas para CD200 (Figura 28D), quanto a análise da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) (Figura 28E), mostraram não haver diferenças significativas entre as células presentes nas lesões de camundongos WT e TLR9-/-.

Apesar desses resultados ainda serem preliminares e utilizarem um número pequeno de animais, eles sugerem a importância do TLR9 nas primeiras semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*. A ausência de TLR9 acarretou em lesões menores e com menos parasitos. Contudo, a análise das células F4/80+CD200+ revelou não haver diferenças na expressão de CD200. Este ensaio será repetido no intuito de confirmar os resultados encontrados e adicionar à análise de citometria de fluxo o marcador celular CD11c, que possibilita identificar células dendríticas dentro da população celular CD11b+F4/80+. Isso nos ajudará a refinar nossa análise e garantir que apenas macrófagos (CD11b+CD11c-F4/80+) estejam sendo analisados.

4.4 Identificação da molécula efetora de *L. (L.) amazonensis* responsável pela indução de CD200 em macrófagos

Diversos antígenos de *Leishmania* têm sido relatados por ativar TLRs (Faria, Reis, Lima, 2012). Moléculas como o LPG, a GP63, o glicoinositol fosfolipídeo (GIPL), bem como dsRNA e DNA, já foram descritos por serem responsáveis por ativar estes receptores em diferentes modelos celulares (Tuon et al., 2008; Abou Fakher et al., 2009; Hartley et al., 2012; Gupta et al., 2015). Assim, para entender o mecanismo de

indução de CD200 pela *L. (L.) amazonensis* é importante identificar sua possível molécula efetora.

4.4.1 Indução de CD200 em macrófagos por DNA de L. (L.) amazonensis e sua modulação na atividade da enzima iNOS

Nossos resultados utilizando macrófagos deficientes em diferentes TLRs revelaram a importância de TLR9 para a indução de CD200 na infecção por amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Figura 20). O TLR9 é descrito por reconhecer dinucleotídeos CpG não metilados presentes em grande quantidade no DNA de microrganismos. Desta forma, decidimos estimular por 1 h os macrófagos com diferentes concentrações de DNA purificado de amastigotas axênicos de *L. (L.) amazonensis*. Ao analisarmos os níveis proteicos de CD200 por imunoprecipitação e *Western blot*, verificamos que em macrófagos (WT) estimulados com 1 µg/mL de DNA do parasito houve a indução da proteína CD200 (Figura 29). Este resultado sugere que o DNA da *L. (L.) amazonensis* é capaz de induzir CD200 em macrófagos

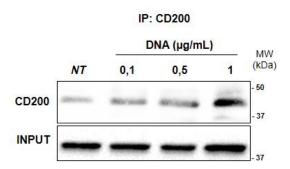


Figura 29 - Indução de CD200 em macrófagos por DNA de *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) foram estimulados por 1 h com diferentes concentrações de DNA obtido de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e em seguida os níveis proteicos de CD200 foram analisados. A imagem mostra o *Western blot* após imunoprecipitação da proteína CD200 em 1 h de incubação. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). *NT*: não tratado. Repetições biológicas: 2.

No trabalho de Cortez e colaboradores (2011) foi mostrado que a proteína CD200 promove a multiplicação intracelular da *L. (L.) amazonensis* por meio da regulação dos níveis de iNOS, concomitante com a diminuição dos níveis de NO durante a infecção. Desta forma, decidimos investigar a possível modulação do DNA do parasito nesta atividade microbicida do macrófago. Para isto, estimulamos as

células por 6 h com LPS (500 ng/mL) a fim de pré-ativar a célula e induzir iNOS. A seguir, lavamos as células com PBS para retirar o LPS e infectamos com amastigotas de lesão (MOI 2, 1 h); ou tratamos as células com CD200-Fc (4 µg/mL) ou com DNA do parasito (1 µg/mL). Após 42 h verificamos os níveis proteicos de iNOS. Como mostra o resultado de *Western blot*, tanto o parasito, quanto seu DNA, foram capazes de reduzir os níveis de iNOS induzidos pelo LPS, de forma semelhante ao tratamento com CD200-Fc (Figura 30A) - observado pela ausência de banda referente a proteína (130 kDa) na imagem de *Western blot*. A razão iNOS/Actina obtida da densitometria das bandas mostra quantitativamente esta diminuição nos níveis de iNOS.

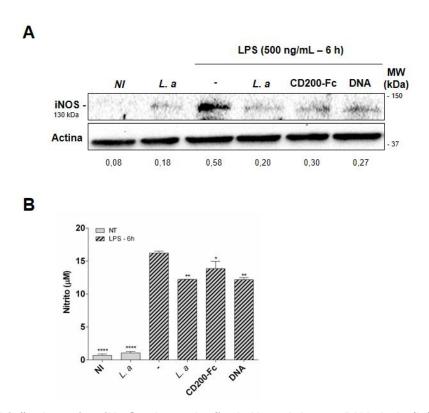


Figura 30 - Inibição da enzima iNOS e da produção de NO celular por DNA de *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) foram estimulados ou não por 6 h com LPS (500 ng/mL) e após infectados com *L. (L.) amazonensis* (MOI 2; 1 h); ou tratados com CD200-Fc (4 μg/mL); ou com DNA de *L. (L.) amazonensis* (extraído de amastigotas axênicos) (1 μg/mL). (A) Imagem de *Western Blot* da proteína iNOS após 42 h de infecção/tratamento. Actina foi utilizada como controle. A razão da densitometria das bandas de iNOS/Actina é mostrada abaixo. (B) Quantificação de nitrito no sobrenadante celular após 42 h de infecção ou tratamento. *NI*: não infectado; *L. a*: amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. * p<0,05; ** p<0,01; **** p<0,0001; (ANOVA 2 vias, seguido de teste de Sidak). Repetições biológicas: 2.

Ao quantificarmos a produção de NO pelos macrófagos, observado pelos níveis de nitrito no sobrenadante celular, verificamos que o amastigota e/ou seu DNA, bem como CD200-Fc, foram capazes de reduzir os níveis de nitrito (Figura 30B).

Esses resultados sugerem que *L. (L.) amazonensis*, bem como seu DNA, são capazes de modular os níveis de iNOS e a produção de NO, possivelmente por um mecanismo relacionado a indução de CD200. Isso reforça a ideia de que o DNA de *L. (L.) amazonensis* esteja induzindo a expressão de CD200, ajudando na infecção.

4.4.2 Indução de CD200 em macrófagos por vesículas extracelulares de L. (L.) amazonensis

Os resultados de indução de CD200 por DNA da *L. (L.) amazonensis* nos fizeram questionar como este material estaria sendo liberado do parasito e entrando em contato com TLR9, para induzir CD200 anteriormente detalhado. Lembrando que o parasito precisa ingressar no macrófago e estar viável, procuramos algum mecanismo descrito na literatura capaz de completar os nossos resultados. Inúmeros trabalhos têm demonstrado a presença e importância de VEs sendo liberadas pela *Leishmania*, carregando fatores de virulência do parasito capazes de modularem a ativação de macrófagos (Silverman et al., 2010; Hassani et al., 2011; Silverman, Reiner, 2012; Atayde et al., 2016). Sabendo que TLR9 reconhece os motivos CpG de DNA não metilado de microorganismos e que o DNA de *L. (L.) amazonensis* é capaz de induzir CD200 na célula, decidimos analisar se o DNA presente em vesículas produzidas pelo amastigota é capaz de induzir CD200 em macrófagos.

Utilizando culturas de amastigotas axênicos mantidas em meio ácido (pH 5,2) e temperatura de 33 °C (condições semelhantes as encontradas no vacúolo parasitóforo do macrófago), analisamos a produção de VEs por *L. (L.) amazonensis*. Por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), obtivemos imagens que demonstram que amastigotas de *L. (L.) amazonensis* produzem e secretam VEs (Figura 31). Como observado nas imagens, todos os amastigotas apresentam vesículas sendo secretadas após 2 h de incubação. A figura 31A mostra que mesmo em divisão celular o amastigota segue liberando VEs.

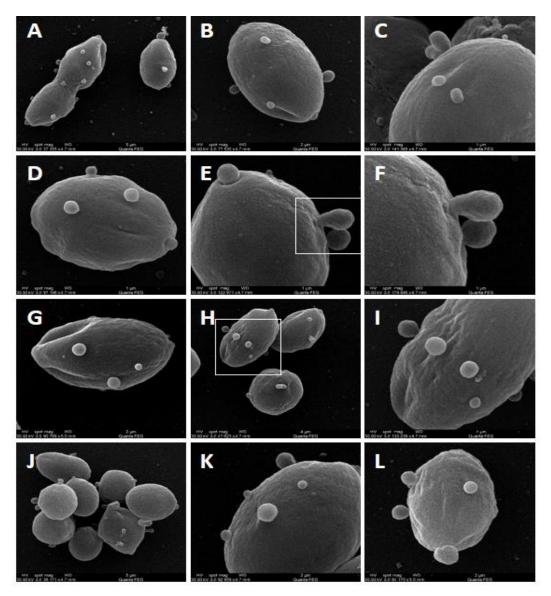


Figura 31 - Vesículas extracelulares liberadas por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Amastigotas axênicos de *L. (L.) amazonenis* foram lavados com PBS e incubados por 2 h, a 33 °C, em meio de cultura de amastigotas livre de vesículas (pH 5,2). Após os amastigotas foram centrifugados e fixados para microscopia (**A-L**) Imagens representativas da microscopia eletrônica de varredura, mostrando as microvesículas produzidas pelo amastigota. **F** e **I** apresentam o aumento das imagens **E** e **H**, respectivamente.

A análise por rastreamento de nanopartículas (NTA, do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*) revelou que o tamanho médio das VEs variou entre 94 e 215,80 nm, e que a concentração obtida foi de 1,96e+009 particulas/mL (Figura 32). Tanto o tamanho das VEs quanto a sua forma de liberação por brotamento na membrana evidenciada na figura 31F são característicos de microvesículas.

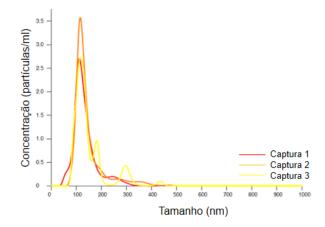
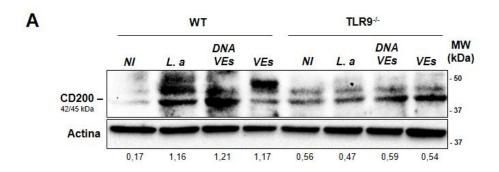


Figura 32 - Caracterização das vesículas extracelulares liberadas por amastigotas de *L. (L.) amazonenis* foram lavados com PBS e incubados por 2 h, a 33 °C, em meio de cultura de amastigotas livre de microvesículas (pH 5,2). Após os amastigotas foram centrifugados e fixados para microscopia; o sobrenadante da incubação foi filtrado e utilizados para análise por rastreamento de nanopartículas (NTA). A imagem mostra a análise das vesículas extracelulares obtidas do sobrenadante dos amastigotas após 2 h de incubação. O resultado apresenta a concentração de partículas por mL e o tamanho das vesículas em nm. Repetições biológicas: 3.

Para avaliar a capacidade das microvesículas produzidase liberadas por amastigotas de *L. (L.) amazonensis* em induzir CD200, decidimos estimular por 1 h os macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6 WT e TLR9-/- com as VEs obtidas no sobrenadante das incubações dos parasitos em meio ácido e temperatura de 33 °C. O DNA presente nas VEs foi extraído e também incubado na concentração de 1 µg/mL. Para garantir a pureza do DNA obtido, as amostras foram incubadas com RNAse durante o protocolo de extração, de acordo com as especificações do fabricante do kit utilizado.

Ao analisarmos os níveis proteicos de CD200 por *Western blot*, observamos a indução da proteína nos macrófagos WT infectados, bem como nos macrófagos tratados com DNA obtido das VEs e/ou tratados com o conteúdo total de VEs obtido das incubações (Figura 31A). É possível verificar a indução da proteína pela presença de duas bandas referentes a CD200 (42/45 kDa). Estas duas bandas são características da marcação do anticorpo em *Western blot* da proteína murina. Também nos chamou a atenção a presença de um padrão distinto de marcação no grupo tratado com VEs, onde foi observada apenas uma banda mais forte na altura de 45 kDa. Em macrófagos TLR9-/- não foi observada a indução de CD200 pelo parasito. Contudo, foram observadas bandas de 42 kDa nos macrófagos TLR9-/- tratados com VEs e/ou DNA obtido das VEs. A razão CD200/Actina obtida da

densitometria das bandas mostra quantitativamente a indução de CD200 nos macrófagos WT, diferentemente de TLR9-/-.



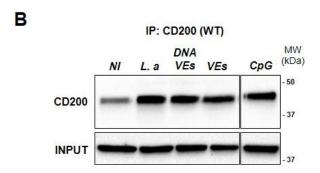


Figura 33 - Indução de CD200 por DNA de vesículas extracelulares liberadas por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Amastigotas axênicos de *L. (L.) amazonenis* foram lavados com PBS e incubados por 2 h, a 33 °C, em meio de cultura de amastigotas livre de microvesículas (pH 5,2). Após, os amastigotas foram centrifugados e o sobrenadante da incubação foi filtrado e utilizado para extração de DNA. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 WT e/ou TLR9-/- foram então infectados com *L. (L.) amazonensis* (MOI 2, 1 h); ou incubados com DNA obtido das vesículas extracelulares (DNA VEs) (1 μg/mL, 1 h); ou incubados com vesículas extracelulares (VEs) (macrófagos foram estimulados com o conteúdo total de VEs recuperadas da incubação em meio ácido de 10° amastigotas, 1 h); ou tratados com o agonista CpG (1 μg/mL, 1 h). (A) Imagem de *Western Blot* da proteína CD200 (42/45 kDa) após 1 h de infecção/tratamento. Actina foi utilizada como controle. A razão da densitometria das bandas de CD200/Actina é mostrada abaixo. (B) Imagem do *Western blot* após imunoprecipitação da proteína CD200 em 1 h de infecção/tratamento. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). *NI*: não infectado. Repetições biológicas: 2.

Como observado nos resultados anteriores, a técnica de imunoprecipitação garante uma melhor análise da expressão de CD200 em macrófagos. Para confirmar os resultados obtidos por *Western blot*, macrófagos (WT) foram infectados com amastigotas axênicos de *L. (L.) amazonensis;* ou incubados na presença de 1 µg/mL de DNA extraído de VEs; ou com as VEs obtidas no sobrenadante das incubações dos amastigotas em meio ácido e temperatura de 33 °C; ou com 1 µg/mL do agonista

de TLR9 (CpG). Os resultados obtidos após a imunoprecipitação de CD200 mostraram mais uma vez que tanto o DNA, quanto a VEs, são capazes de induzir CD200 de forma semelhante ao observado na infecção e/ou tratamento com CpG (Figura 33B).

Estes resultados sugerem que os amastigotas de *L. (L.) amazonensis* estejam liberando VEs dentro do vacúolo parasitóforo do macrófago e que o DNA presente nestas vesículas seja capaz de ativar TLR9/MyD88/TRIF, induzindo CD200. Contudo, mais estudos são necessários para caracterizar as estruturas de DNA presente nelas bem como.a importância dessas vesículas para a indução da proteína durante a infecção.

4.5 Importância de diferentes vias de sinalização celular na indução de CD200 em macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis*

4.5.1 Avaliação das vias de sinalização celular utilizadas por TLRs na indução de CD200 em macrófagos infectados por amastigotas de L. (L.) amazonensis

A sinalização celular clássica mediada por TLR9 recruta as proteínas MyD88, IRAK e TRAF6, ativando fatores de transcrição importantes como NF-κB e AP-1. Estes fatores de transcrição induzem a expressão de citocinas inflamatórias como IL-1β, IL-6, IL-12 e TNF-α (Tsujimura et al., 2004; Kawai, Akira, 2007; Jin, Lee, 2008). Mukhopadhyay e colaboradores (2010), utilizando macrófagos deficientes na proteína c-Rel (membro da família do NF-κB), mostraram a importância do fator de transcrição NF-κB na via de indução de CD200 por LPS em macrófagos. Desta forma, nos questionamos se NF-κB poderia estar envolvido na indução de CD200 por *L. (L.) amazonensis*.

Durante a sinalização de TLRs ocorre a fosforilação de IκB (inibidor de NF-κB), o qual acaba por ser degradado, liberando o dímero NF-κB (p50/p65) para ir ao núcleo e ativar a transcrição de diversos genes (DiDonato et al., 1996; Ghosh, Karin, 2002). Dessa forma, analisamos os níveis de NF-κB citoplasmáticos durante a infecção por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. As amostras de proteína obtidas do ensaio de infecção foram centrifugadas, separando as proteínas citoplasmáticas do material genômico das células, permitindo detectar apenas os níveis do fator de transcrição presentes no citoplasma. Como pode ser observado na figura 34, nossos resultados

sugerem que há um direcionamento do fator de transcrição para o núcleo, visto que ocorreu uma diminuição nos níveis citoplasmáticos da porção p65 (65 kDa) do fator de transcrição durante a infecção, sendo este efeito observado também no estímulo controle com LPS, agonista de TLR4 sabidamente conhecido por induzir a ativação de NF-κB (Andreakos et al., 2004). A razão NF-κB/Actina obtida da densitometria das bandas mostra quantitativamente esta diminuição nos níveis citoplasmáticos de NF-κB.

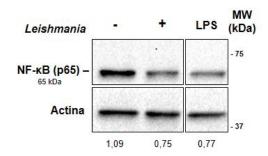


Figura 34 - Níveis citoplasmáticos de NF-κB em macrófagos infectados por amastigotas de *L.* (*L.*) amazonensis. Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 (WT) foram infectados por 1 h com amastigotas de lesão de *L.* (*L.*) amazonensis. As amostras de proteína obtidas foram centrifugadas a 10.000x g, 10 min, a 4° C, para separação do conteúdo nuclear (presente no material centrifugado). Apenas o sobrenadante contendo as proteínas citoplasmáticas teve os níveis proteicos de NF-κB analisados. A imagem mostra o *Western blot* para a porção p65 de NF-κB (65 kDa) após infecção. LPS (1 μg/mL) foi utilizado como controle positivo. A razão da densitometria das bandas de NF-κB/Actina é mostrada abaixo. Repetições biológicas: 3.

A fim de determinar a importância de NF-κB na via de indução de CD200, decidimos inibir o fator de transcrição durante a infecção por *L. (L.) amazonensis*. Além disso, diferentes proteínas pertencentes às vias de sinalização distintas utilizadas por TLRs também foram inibidas. Para isso, macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) foram pré-tratados com os diferentes inibidores: Triptolide (inibidor de NF-κB), Z-VAD-FMK (inibidor de caspases), 2-Aminopurina (inibidor de PKR), AZD1480 (inibidor de janus quinase 1 e 2 – JAK1 e JAK2) e PD98059 (inibidor de ERK). Após o tratamento, os macrófagos foram infectados por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis* e a expressão de CD200 foi analisada por imunoprecipitação. Os resultados mostram que quando inibido NF-κB, PKR, JAK e ERK, há uma diminuição nos níveis de CD200, comparados com o

controle não tratado (Figura 35). Isto sugere a possível participação destas proteínas na via de indução de CD200 gerada pelo parasito.

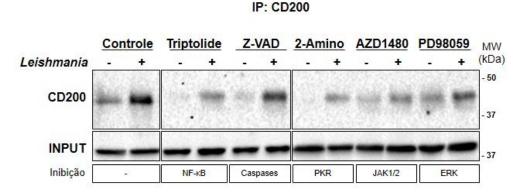


Figura 35 - Participação de NF-κB, JAK, ERK e PKR na indução de CD200 por amastigotas de *L.* (*L.*) amazonensis. Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 (WT) foram infectados por 1 h com amastigotas de lesão de *L.* (*L.*) amazonensis. As células foram tratadas previamente a infecção com os diferentes inibidores: Triptolide (inibidor de NFκB, 100 nM); Z-VAD-FMK (inibidor de pan-caspase, 10 μg/mL); 2-Aminopurina (inibidor de PKR, 5 mM); AZD1480 (inibidor de JAK1 e JAK2, 3,5 μg/mL) e PD98059 (inibidor de ERK, 50 μM). A imagem mostra o *Western blot* após a imunoprecipitação da proteína CD200 em 1 h de infecção. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). Repetições biológicas: 2.

A via de indução de CD200 por *L. (L.) amazonensis* em macrófagos não utiliza caspases. Foi observado em nossos resultados que nas células pré-tratadas com Z-VAD-FMK, o parasito induziu a proteína semelhante ao controle não tratado infectado (Figura 35). Isso sugere que estas proteases importantes no controle da inflamação e morte celular não estão relacionadas com a indução de CD200 por *L. (L.) amazonensis*.

Nossos resultados também mostraram que a inibição de ERK durante a primeira hora de infecção por *L. (L.) amazonensis* diminui os níveis de indução de CD200. Segundo dados da literatura, a ativação da via de ERK que culmina com sua fosforilação já foi relacionada ao aumento de CD200 (Petermann et al., 2007). Ao analisarmos os níveis de fosforilação dessa proteína durante a infecção pelo parasito, observamos que a proteína é rapidamente fosforilada (5 min após a infecção), mas que essa fosforilação desaparece posteriormente (Figura 36).

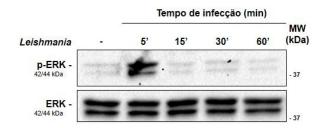


Figura 36 - Fosforilação da proteína ERK em macrófagos durante os diferentes tempos de infecção por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) foram infectados por 5, 15, 30 ou 60 min com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis*. Para sincronizar a infecção, as células com os parasitos foram mantidas por 30 min em gelo antes de serem colocadas a 33 °C. Após cada tempo, as amostras de proteína foram recolhidas e analisadas para p-ERK e ERK. A imagem mostra o *Western blot* dos níveis de fosforilação de ERK (42/44 kDa) nos diferentes tempos de infecção (p-ERK). ERK total (42/44 kDa) foi utilizada como controle. Repetições biológicas: 2.

Em um trabalho de Yang e colaboradores (2007) já havia sido descrita essa capacidade de ativação da via ERK em macrófagos durante a infecção por amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis*, com o mesmo fenótipo de fosforilação nos tempos iniciais por nós observado. Se a ativação de ERK está envolvida diretamente com a indução de CD200, ainda não sabemos. Mais experimentos são necessários para entender melhor este processo, a fim de relacioná-lo com a indução da proteína pelo amastigota.

4.5.2 Avaliação da importância do cálcio na indução de CD200 em macrófagos infectados por L. (L.) amazonensis

O cálcio atua como um segundo mensageiro em diversos tipos celulares, incluindo os macrófagos (Maurya, Subramaniam, 2007). Ele está envolvido em inúmeras funções importantes para a resposta imune, regulando a atividade de proteínas como a calmodulina e a calcineurina (Zhang et al., 2011; Escolano et al., 2014). A fim de analisar se os níveis citoplasmáticos de Ca²⁺ regulam a indução de CD200 por amastigotas de *L. (L.) amazonensis* no macrófago, decidimos modular a presença do íon na célula e avaliar a expressão de nossa proteína de estudo.

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (WT) foram tratados previamente à infecção com BAPTA (quelante de cálcio) e Tapsigargina [inibidor da bomba Ca²⁺-ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) – um transportador de cálcio para o retículo endoplasmático]. Enquanto o primeiro reduz o

íon disponível na célula, o segundo gera um acúmulo do Ca²⁺ no citoplasma. Após 1 h de infecção com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis*, os níveis de indução foram verificados por imunoprecipitação e *Western blot*. Nossos resultados mostram que os níveis de cálcio intracelular não estão envolvidos na indução de CD200 pelo parasito na primeira hora de infecção. Como mostrado na figura 37, tanto nos macrófagos tratados quanto no controle não tratado, o parasito foi capaz de induzir CD200.

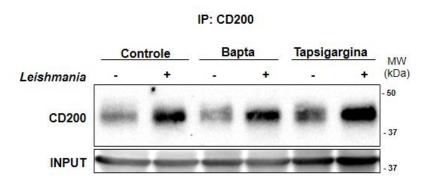


Figura 37 - Importância do cálcio intracelular na indução de CD200 em macrófagos por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 (WT) foram tratadas previamente por 1 h com Bapta (quelante de cálcio, 10 μΜ) e Tapsigargina (inibidor da SERCA - transportador de cálcio para o retículo endoplasmático, 1 μΜ). Após, as células foram infectadas por 1 h com amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis* e em seguida os níveis proteicos de CD200 foram analisados. A imagem mostra o *Western blot* após a imunoprecipitação da proteína CD200 em 1 h de infecção. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). Repetições biológicas: 2.

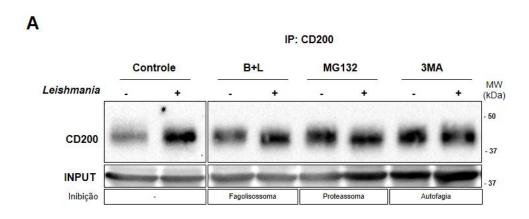
Estes resultados sugerem que a indução de CD200 por amastigotas de *L. (L.)* amazonensis é um processo que independe dos níveis intracelulares de cálcio. Porém, mais estudos são necessários para confirmar estes resultados.

4.5.3 Participação das vias de degradação proteica na indução de CD200 em macrófagos infectados por L. (L.) amazonensis

As duas principais vias de degradação proteica na célula são o sistema ubiquitina-proteasssoma (que degrada principalmente proteínas de vida curta) e a autofagia (capaz de degradar grandes agregados proteicos) (Dikic, 2017). Durante a infecção por *L. (L.) amazonensis*, estes sistemas são ativados como mecanismo de defesa contra o parasito, principalmente na maturação do vacúolo parasitóforo

(McConville et al., 2015). Desta forma, decidimos avaliar se há uma relação entre a indução de CD200 pelo amastigota de *L. (L.) amazonensis* e as vias de autofagia e proteassoma no macrófago.

Para determinar a importância dessas vias de degradação proteica na indução de CD200 pelo parasito, macrófagos foram pré-tratados com diferentes inibidores: Bafilomicina A1 (inibidor da formação do fagolisossoma) com Leupeptina (inibidor de proteases presentes no lisossomo), MG132 (inibidor da subunidade 26S de proteassoma) e 3-Metiladenina (3MA) (inibidor de Fosfatidilinositol 3 quinase – PI3K, componente da via de autofagia). As células foram então infectadas por 1 h com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e após os níveis de indução de CD200 foram analisados por imunoprecipitação e *Western blot.* Nossos resultados mostram que mesmo nos macrófagos tratados houve a indução de CD200 pelo parasito (Figura 38). O que nos chamou a atenção foi que em macrófagos tratados não infectados também houve a indução da proteína, sugerindo que CD200 possa estar sendo expressa e degradada constantemente em condições normais (sem infecção).



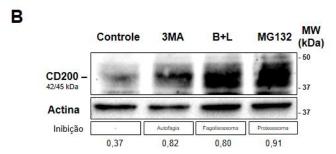


Figura 38 - Regulação dos níveis de CD200 por sistemas celulares de degradação proteica. Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 (WT) foram tratados com os diferentes inibidores: Bafilomicina (inibidor da formação do fagolisossoma, 50 nM) com Leupeptina (inibidor de proteases presentes nos lisossomos, 50 μM) (B+L), MG132 (inibidor de proteassoma, 10 μM) e 3MA (inibidor de autofagia, 50 μM). Após, as células foram infectadas por 1 h com amastigotas de lesão de

L. (L.) amazonensis e em seguida os níveis proteicos de CD200 foram analisados. (A) A imagem mostra o Western blot após a imunoprecipitação da proteína CD200 em 1 h de infecção. Actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína colocada na coluna de imunoprecipitação (INPUT). (B) Imagem do Western blot da proteína CD200 (42/45 kDa) após os diferentes tratamentos (sem infecção). Actina foi utilizada como controle. A razão da densitometria das bandas de CD200/Actina é mostrada abaixo. Repetições biológicas: 3.

Com o intuito de confirmar os resultados encontrados, macrófagos foram tratados com os inibidores, sem a realização posterior de infecção ou de qualquer outro estímulo. Como mostrado na figura 38B, a inibição das vias aumentou os níveis de CD200 na célula. Estes resultados sugerem que o silenciamento da maquinaria de degradação proteica contribua para o aumento dos níveis de CD200. Contudo, mais experimentos são necessários para confirmar se a proteína está sendo constantemente produzida e degradada, e se de fato há uma relação entre a via de indução de CD200 por *L. (L.) amazonensis* e estes mecanismos celulares. Estes resultados estão sendo analisados e processados para um novo projeto que será parte de futuros estudos de nosso grupo de pesquisa.

5 DISCUSSÃO

Os mecanismos de regulação dentro do sistema imunológico são essenciais para prevenir patologias ou danos gerados por uma resposta inflamatória desregulada ou descontrolada contra antígenos próprios e não próprios. A proteína CD200, amplamente expressa e induzida, desempenha um papel importante neste processo, reprimindo a resposta inflamatória sobre células da linhagem mielóide que expressam receptores para CD200 (CD200R) (Barclay et al., 2002).

No trabalho de Cortez e colaboradores (2011) foi demonstrado que a *L. (L.)* amazonensis manipula essa via inibidora, induzindo a expressão de CD200 e favorecendo sua própria infecção. Dessa forma, em nosso estudo, avaliamos o possível mecanismo de indução de CD200 por amastigotas de *L. (L.)* amazonensis em macrófagos. Nossos resultados mostram a importância da via de TLRs, revelando a participação de TLR9 e das proteínas adaptadoras MyD88 e TRIF nesse mecanismo.

Os amastigotas são formas importantes do ciclo biológico da *Leishmania* no contexto da doença. Elas persistem nos tecidos do hospedeiro propagando a infecção de célula para célula e/ou para outros tecidos. Isso ocorre devido à proliferação extensiva dentro do fagolisossoma intracelular, que eventualmente lisa as células infectadas fazendo com que macrófagos vizinhos fagocitem o parasito, dando continuidade à doença (Kaye e Scott, 2011). Durante o processo de fagocitose, o amastigota interage primeiramente com a membrana celular do macrófago, estrutura que contem várias moléculas do tipo receptor que podem ativar vias de sinalização que ajudam a condicionar a resposta contra o parasito, muitas vezes desativando ou silenciando a célula hospedeira (Kima et al., 2007).

Ao avaliarmos a associação entre a indução de CD200 e a entrada do parasito na célula, observamos que a internalização do amastigota de *L. (L.) amazonensis* via fagocitose pelo macrófago é um processo importante na indução da proteína. O simples contato do amastigota com o macrófago (em macrófagos tratados com Citocalasina D) não induz níveis de CD200 semelhantes aos observados quando o parasito está internalizado. Além disso, mostramos que o parasito necessita estar vivo dentro da célula, uma vez que nos testes realizados com os amastigotas inativados por calor ou fixados com paraformaldeído não foi observada a indução de CD200. Isto sugere que condições especiais que acontecem nos primeiros momentos da formação do vacúolo parasitóforo sejam as que promovam um ambiente adequado para a

expressão de CD200 induzida por amastigotas viáveis de *L. (L.) amazonensis* envolvendo o TLR9.

Nesse sentido, um dos fatores que deveriam estar acontecendo na primeira hora de infecção é o recrutamento de endossomos contendo TLR9 no vacúolo parasitóforo nascente. Este fenômeno não é difícil de imaginar, uma vez que tem sido demonstrado que após internalização de *Leishmania* em macrófagos, várias estruturas são recrutadas e participam na biogênese do vacúolo parasitóforo de *Leishmania* (Korner et al. 2006; Canton et al., 2012). Uma das estruturas que tem sido estudadas na formação deste vacúolo é o lisossomo (Antoine et al., 1990; Prina et al., 1990; Courret et al., 2002). Sabe-se que na fagocitose de amastigotas pelo macrófago, o vacúolo parasitóforo nascente é rapidamente acidificado e apresenta marcadores típicos de lisossomos como LAMP-1(Rodriguez et al., 2011; Wilson et al., 2008). Se a acidificação faz parte do processo de indução de CD200 no macrófago, ainda não sabemos, mas poderia ser parte essencial na estimulação do parasito ou no recrutamento de endossomos contendo TLR9.

Outra estrutura candidata para posteriores estudos é o retículo endoplasmático (RE) - estrutura associada também com a biogênese do vacúolo parasitóforo de *Leishmania* (Pimenta, de Souza, 1985; Ndjamen et al., 2010). Durante a formação do vacúolo, há o recrutamento de vesículas ou endossomos a partir do RE, local onde o TLR9 está localizado antes da ativação celular (Leifer et al., 2004). Quando a célula é tratada com CpG, TLR9 é translocado do RE para os endossomos via complexo de Golgi, se juntando ao VP posteriormente (Chockalingman et al., 2009).

Os TLRs são membros de uma família de receptores celulares que ajudam no controle de infecções causadas por *Leishmania* e outros patógenos, sendo essenciais no desenvolvimento da resposta imune inata (Soong, 2012). Sua ativação mediante o reconhecimento de estruturas específicas resulta na geração de mediadores com atividade anti-*Leishmania*, contribuindo para o controle do parasito e ajudando no desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa eficiente (Tuon et al., 2008; Gurung, Kanneganti, 2015).

Em 2010, um estudo revelou pela primeira vez que a indução da molécula imunomoduladora CD200 em macrófagos poderia ocorrer via TLRs (Mukhopadhyay et al., 2010). O trabalho mostrou que CD200, juntamente com seu receptor CD200R, apresenta um papel chave na inibição da ativação de macrófagos em um contexto de infecção por *N. meningitidis*. Para se proteger da septicemia causada pela bactéria,

os macrófagos, ao reconhecer o LPS bacteriano via TLR4, passavam a expressar CD200, controlando a ativação celular e evitando uma resposta imunológica exacerbada.

Em nosso estudo, mostramos a direta participação dos TLRs, bem como de suas proteínas adaptadoras, na indução de CD200 em macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Utilizando animais deficientes em diferentes TLRs, foi possível observar que o TLR9 compõe a via inicial de indução da proteína pelo parasito. O mesmo também foi observado quando analisamos os níveis da proteína na infecção de macrófagos deficientes em MyD88 e TRIF. Entretanto, a indução de CD200 na célula em um tempo posterior utiliza outro mecanismo, uma vez que macrófagos MyD88-/- e TRIF-/- expressaram a proteína após 96 h de infecção. Logo, apesar do amastigota estar utilizando TLR9-MyD88/TRIF para induzir CD200 após ser fagocitado, uma vez estabelecida a infecção, outra via de indução deve estar sendo ativada.

Classicamente, a ativação de TLR9 recruta MyD88, levando a produção de citocinas inflamatórias via NF-κB (Tsujimura et al., 2004; Kawai, Akira, 2007). Apesar da indução de CD200 se mostrar dependente de TLR9-MyD88, observamos que a molécula adaptadora TRIF, surpreendentemente, também é importante para a indução de CD200 por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Em 2013, Volpi e colaboradores (2013) reportaram pela primeira vez um papel para a proteína TRIF na sinalização do receptor TLR9, demonstrando que a associação entre TLR9, TRIF e TRAF6 leva à ativação da sinalização por NF-kB não canônica, induzindo IRF3 e TGF-β. O trabalho também mostrou que, *in vivo*, a via TLR9-TRIF - mas não a sinalização por MyD88 – é necessária para proteção de CpG contra a inflamação alérgica.

Como já mencionado o TLR9 reconhece CpG não metilado (Ohto et al., 2015). Ao estimularmos os macrófagos por 1 h com CpG, observamos um aumento nos níveis de CD200 – o que não foi observado com os agonistas para outros TLRs (TLR2/6, 3 e 4). Além disso, quando os macrófagos foram estimulados também por 1 h com o DNA extraído de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, houve um aumento nos níveis de expressão da proteína. Assim, podemos sugerir que os motivos CpG do DNA do parasito estejam contribuindo para a indução de CD200 no macrófago, durante a infecção.

O genoma da *Leishmania* e de outros Tripanossomatídeos compartilham as mesmas propriedades imunoreguladoras sobre células do sistema imune, sugerindo

que os motivos CpG sejam um traço característico do DNA destes parasitos eucariotos unicelulares (Khan et al., 2014). Embora esteja bem estabelecido que o TLR9 reconheça motivos CpG em genomas microbianos, a especificidade do padrão de CpG do DNA da *Leishmania* que interage com o receptor endossomal ainda é desconhecida. Contudo, Gupta e colaboradores (2015), utilizando como modelo um oligodesoxinucleotídeo contendo CpG conhecido (ODN 2216), encontrou homologia com regiões ricas em CpG no genoma de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) donovani*. Por meio de uma abordagem de imunoinformática foi possível também observar que os motivos CpG do DNA dos parasitos são geometricamente complementares à região rica em leucina 11 (LRR11, do inglês *leucine-rich repeat 11*) de TLR9, uma região crítica para o reconhecimento do ligante, que está conservada em mamíferos. Desta forma, acreditamos que os motivos CpG que podem estar presentes no DNA de *L. (L.) amazonensis* (que pertence ao complexo *Leishmania mexicana*) sejam reconhecidos por TLR9, induzindo CD200 no macrófago.

Ao analisarmos a localização de CD200 nas células infectadas, observamos que a proteína estava principalmente concentrada em seu citoplasma, enquanto que CD200R se encontrava na região da membrana citoplasmática. Pudemos observar, no entanto, que a co-localização de ligante e receptor ocorreu em alguns pontos da membrana citoplasmática dos macrófagos infectados. Esta co-localização indica a ativação da via CD200-CD200R, o que contribuiria para a regulação negativa da resposta inflamatória (Hussell, Bell, 2014). Sendo uma importante via de regulação, não é estranho pensar que a ligação de CD200 (induzida pelo parasito) ao seu receptor seja necessária para controlar a ativação da célula, uma vez que a Leishmania precisa infectar os macrófagos que chegam ao foco inflamatório para manter a infecção.

Apesar da via de TLR ser importante para induzir CD200 e ajudar na infecção por *L. (L.) amazonensis*, na sua ausência observamos que os amastigotas conseguiram se multiplicar dentro da célula de forma semelhante aos parasitos que infectaram macrófagos WT. Isto pode ser explicado pelo fato de os TLRs controlarem a resposta imune inata do hospedeiro contra patógenos (Tuon et al., 2008; Kumar et al., 2011), o que favoreceria a multiplicação dos amastigotas nos macrófagos deficientes em TLRs. Além disso, observamos que a indução de CD200 nos tempos tardios de infecção foi independente de MyD88 e TRIF. Uma vez induzida por outra

via, a proteína pode auxiliar na manutenção da infecção por *L. (L.) amazonensis*, mesmo nos animais deficientes na via de TLRs.

Alguns dados ainda não publicados de nosso grupo mostram que o estímulo de macrófagos com IL-10 e IFN-y é capaz de induzir a expressão de CD200. A IL-10, já caracterizada por possuir uma importante função imunomoduladora na infecção por *Leishmania* (Kane, Mosser, 2001; Yang et al., 2007; Gannavaram et al., 2016), tem a capacidade de inibir a ativação de macrófagos e outras células da imunidade inata, possuindo uma ação parácrina sobre as células adjacentes (Sousa et al., 2014; Verma et al., 2016). Desta forma, além de seu efeito anti-inflamatório já descrito na leishmaniose, essa interleucina pode estar contribuindo para a indução de CD200 em tempos tardios de infecção.

Além dos ensaios *in vitro*, também foi realizado um ensaio *in vivo* comparando o tamanho de lesão e a carga parasitária de camundongos WT e TLR9^{-/-} infectados. Os resultados mostraram a importância de TLR9 nas primeiras semanas de infecção por *L. (L.) amazonensis*, revelando que a ausência do TLR no camundongo acarreta em lesões menores e com menos parasitos. Contudo, observamos por meio da análise de citometria de fluxo, que não há diferença na expressão de CD200 na população de células F4/80+ das lesões dos camundongos WT e TLR9^{-/-}. Esses resultados mostram pela primeira vez que os macrófagos presentes na lesão causada por *L. (L.) amazonensis* expressam CD200. Além disso, a ausência de TLR9 não impediu a indução de CD200 nestas células, o que ajuda a fortalecer a ideia de que esta via seja importante apenas no primeiro momento da infecção.

Os trabalhos realizados com *L. (L.) major* (Fakher et al., 2009; Carvalho et al., 2012), mostraram resultados contrários aos que encontramos com *L. (L.) amazonensis*. Foi observado que na ausência de TLR9, *L. (L.) major* produz uma maior infecção, apresentando maior lesão e carga parasitária em camundongo C57BL/6. De acordo com Cortez e colaboradores (2011), *L. (L.) major* não é capaz de induzir CD200 e apresenta lesões menores e com menor caga parasitária, quando comparada a *L. (L.) amazonensis* neste mesmo modelo animal. Em outro estudo realizado com camundongos TLR9^{-/-} inoculados com *L. (V.) braziliensis* observou-se um aumento temporário no tamanho da lesão e na carga parasitária comparado aos animais WT. Nesse estudo, o perfil de crescimento das lesões nas 5 primeiras semanas foi semelhante ao que nós encontramos em nosso estudo (Weinkopff et al., 2013).

A persistência do parasito e o sucesso da infecção são determinados pelo balanço entre a resposta imune e a habilidade do parasito em resistir aos mecanismos citotóxicos de ativação das células fagocitárias. A produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio e derivados de NO normalmente levam à destruição de patógenos fagocitados. Porém a *Leishmania* é um dos poucos protozoários capazes de sobreviver e replicar-se dentro deste ambiente hostil, subvertendo a resposta imune (Stafford et al., 2002; Van Assche et al., 2011).

O mecanismo exato pelo qual a expressão de CD200 promove a virulência de *L. (L.) amazonensis* precisa ser totalmente elucidado. No entanto, Cortez e colaboradores (2011) mostraram a associação entre a indução de CD200 e a inibição da expressão de iNOS e produção de NO - processo descrito por ser mediado pela ligação da molécula ao receptor CD200R (Banerjee, Dick, 2004; Cameron et al., 2005; Copland et al., 2007). Em nossos resultados, mostramos que tanto os amastigotas de *L. (L.) amazonensis* quanto o seu DNA, são capazes de modular a resposta microbicida induzida por LPS em macrófagos.

A expressão de iNOS em macrófagos pode ser estimulada por diversas citocinas e por produtos microbianos, como o LPS (MacMicking et al., 1997). Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem antígenos capazes de ativarem o macrófago e estimularem a expressão de iNOS. Mas enquanto espécies como a *L.* (*L.*) major, que não induz CD200, acabam sendo mortas pelo NO produzido a partir da iNOS expressa na célula (Liew et al., 1990), a *L.* (*L.*) amazonensis consegue subverter a resposta microbicida do macrófago, inibindo este mecanismo (Cortez et al., 2011). Possivelmente, uma vez dentro do vacúolo parasitóforo, o amastigota de *L.* (*L.*) amazonensis seja capaz de liberar estruturas contendo fragmentos de DNA e assim induzir CD200 via TLR9, inibindo a expressão de iNOS e favorecendo a multiplicação do parasito.

Quando observamos que o DNA de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* era capaz de induzir CD200 e inibir iNOS nos macrófagos, questionamo-nos como ocorreria a liberação deste material pelo parasito. Sabendo que a *Leishmania*, assim como outros tripanossomatídeos, produz e secreta VEs capazes de conter fragmentos de DNA (Silverman et al., 2010; Silverman, Reiner, 2012; Coakley et a., 2015; Nogueira et al., 2015; Atayde et al., 2016), decidimos investigar se as VEs liberadas por amastigotas de *L. (L.) amazonensis* induziam CD200. Nossos resultados mostraram que o parasito libera estas VEs (com tamanho característico de

microvesículas) e que o DNA presente nelas é capaz de induzir CD200 por um mecanismo dependente de TLR9. Contudo, mais estudos são necessários para compreender o mecanismo de liberação das VEs, bem como caracterizar a estrutura do DNA presente nestas vesículas liberadas pelo amastigota no vacúolo parasitóforo. Além disso, será interessante avaliar se a qualidade ou quantidade destas microvesículas liberadas é diferente nas distintas *Leishmania*, o que explicaria a diferença na indução de CD200 ou outras moléculas essenciais para a virulência de cada espécie.

Nosso estudo demonstrou que as VEs de *L. (L.) amazonensis* apresentam uma atividade imunossupressora, assim como já anteriormente visto em outros estudos. A primeira evidência da secreção de VEs por *Leishmania* surgiu a partir da análise de proteínas secretadas por *L. (L.) donovani, L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana*. A análise proteômica dos parasitos mostrou um aumento substancial de proteínas que haviam sido identificadas primeiramente em VEs de outros eucariotos, incluindo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), ciclofilina A e a metaloproteína GP63 (Silverman et al., 2008; Hassani, Olivier, 2013; Hassani et al., 2014).

Em VEs de *L.* (*L.*) donovani foram encontradas várias proteínas imunomoduladoras conhecidas como antígenos de células T, bem como fatores de virulência necessários à sobrevivência durante a invasão de células do hospedeiro (Silverman et al, 2010). Estas vesículas também demonstraram induzir a liberação da citocina imunossupressora IL-10, bem como inibir a produção de TNF-α e IL-8 em monócitos humanos ativados por IFN-y. Nos ensaios *in vivo*, o pré-tratamento dos camundongos com VEs derivadas de *L.* (*L.*) donovani e *L.* (*L.*) major resultou em uma infecção exacerbada, com alta carga parasitária em relação aos controles infectados que não foram pré-expostos às VEs (Silverman et al., 2010).

Além de revelarmos a importância da ativação da via TLR9 pelo DNA presente em VEs liberadas pelo amastigota, também estudamos outros componentes importantes no mecanismo de indução de CD200 por *L. (L.) amazonensis*. Nossos resultados mostraram que a via de sinalização celular para a indução de CD200 pode utilizar as proteínas NF-κB, ERK, JAK e PKR. Nos resultados apresentados por Mukhopadhyay e colaboradores (2010), tanto a indução de CD200 via TLRs quanto a via de NOD2, foi regulada transcricionalmente por NF-κB. Além disso, Petermann e colaboradores (2007) relacionaram a indução de CD200 com a via

RAS/RAF/MEK/ERK, uma via que culmina na fosforilação de ERK levando ao aumento da expressão de CD200.

Em nossos resultados também observamos que os níveis de Ca²+ na célula não interferem na indução de CD200 pelo parasito. O Ca²+ é uma molécula sinalizadora responsável por controlar inúmeros processos intracelulares (Chin, Means, 2000; Zhang et al., 2011), como por exemplo a transdução de sinal em macrófagos induzida por estímulos inflamatórios. A produção de TNF-α induzida por LPS é inibida pela quelação de Ca²+ ou pela e inibição de sua proteína transportadora (CaM - proteína transportadora de Ca²+) (Lo et al., 1996; Chen et al., 2001). Concomitante a isso, outro estudo revelou a capacidade da cascata de proteína quinases dependente de cálcio/calmodulina (CaMK) de regular a ativação de JNK, p38 e ERK1/2, que estão relacionadas com a resposta imune do macrófago (Enslen et al., 1996). Posteriormente, essa cascata também foi relacionada com a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória importante na infecção por *L. (L.) amazonensis* (Padigel et al., 2003; Zhang et al., 2011).

Além das vias clássicas de TLRs e da sinalização mediada por Ca²⁺, também analisamos a relação entre vias proteolíticas e a indução de CD200 por *L. (L.) amazonensis*. A degradação proteica intracelular tem um papel crucial na manutenção da homeostase celular e afeta vários processos essenciais, como a regulação do ciclo celular, o controle transcricional, a transdução de sinal, a apresentação de antígenos e o *turnover* proteico (Pickart, Cohen, 2004). Em nossos resultados, observamos que ao inibirmos as vias de degradação proteica, obtivemos um aumento nos níveis de CD200, independente da infecção por *L. (L.) amazonensis*. Isto sugere que a proteína possa estar sendo regulada por esses mecanismos e que o parasito é capaz de desligar essa maquinaria para induzir CD200.

A abundância, a função e a composição do proteassoma são rigorosamente controladas por (a) fatores que induzem a transcrição de genes que codificam as subunidades proteassômicas e fatores de montagem, (b) fatores que desencadeiam a degradação de proteassomas e (c) modificações pós-traducionais que modulam a capacidade de degradação dos proteassomas (Dikic, 2017). Outra questão importante é que a atividade do proteassoma pode ser comprometida por vários agentes externos e internos, como inibidores químicos, estresse oxidativo e por proteínas do proteassoma defeituosas ao longo do envelhecimento celular (Goldberg, 2003; Baraibar, Friguet, 2012; Schmidt, Finley, 2014). Contudo, se a infecção pela

Leishmania compromete a atividade do proteassoma, ainda não sabemos. Nossos resultados ainda não permitem estabelecer esta associação, mas abrem um importante espaço para mais estudos no entendimento da biologia celular do macrófago durante a infecção.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do nosso estudo permitem concluir que durante o processo de infecção por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, o parasito viável induz CD200 no macrófago via ativação de TLR9, MyD88 e TRIF. Uma vez induzida a expressão de CD200, ela pode se ligar a seu receptor CD200R presente na membrana citoplasmática da célula e inibir a resposta pró-inflamatória contra o parasito.

Concluímos também que fragmentos de DNA liberados em microvesículas de L. (L.) amazonensis são capazes de induzir CD200, modulando a expressão de iNOS e a produção de NO na célula hospedeira.

Os experimentos realizados mostraram a importância de diferentes moléculas pertencentes a vias de sinalização associadas a TLRs para a indução de CD200, como NF-κB, ERK, JAK e PKR. Foi possível observar ainda, que os níveis intracelulares de Ca²+ não são importantes para a indução de CD200 no macrófago. Além disso, concluímos também que as vias de degradação proteica da célula, como o proteassoma, estão relacionadas com os níveis de CD200 intracelulares e que podem estar sendo reguladas pelo parasito no momento da infecção.

O esquema abaixo auxilia na compreensão dos resultados encontrados (Figura 39).

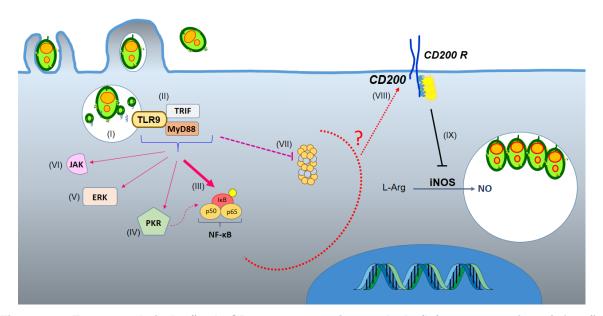


Figura 39 - Esquema de indução de CD200 por amastigotas de *L. (L.) amazonensis* na infecção de macrófagos. (I) Durante o processo de fagocitose pelo macrófago, o DNA do parasito secretado em vesículas extracelulares é reconhecido por TLR9, o que leva ao (II) recrutamento das proteínas adaptadoras MyD88 e/ou TRIF, acionando a via de sinalização (III) capaz de ativar o fator de transcrição NF-κB. Além disso, também pode haver a ativação de (IV) PKR durante a infecção, capaz de fosforilar IκB, deixando NF-κB ativo. (V) ERK e (VI) JAK também são acionadas neste processo, podendo junto

com NF-κB induzir a transcrição de CD200. Além disso, outro possível mecanismo envolve as vias de degradação proteica (VII), como o proteassoma, que ao serem inibidas, aumentam os níveis de CD200 na célula. Uma vez que CD200 é produzida, (VIII) ela liga-se ao seu receptor presente na membrana dos macrófagos, ativando-o. O sinal gerado pela ativação do receptor acarreta no silenciamento da resposta inflamatória do macrófago. Assim, (IX) a enzima iNOS, responsável pela produção de NO (importante molécula microbicida) é inibida, e o parasito é capaz de multiplicar-se dentro do vacúolo parasitóforo e manter a infecção no hospedeiro.

Nosso estudo ajuda a compreender o mecanismo utilizado pelo amastigota de *L. (L.) amazonensis* para induzir a proteína imunorreguladora CD200 em macrófagos, assim como ajuda a elucidar os mecanismos de patogenicidade espécie-específicos que os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam. Entretanto, mais estudos ainda são necessários para entender melhor a complexidade da imunobiologia deste parasito.

REFERÊNCIAS

Abou Fakher FH, Rachinel N, Klimczak M, Louis J, Doyen N. TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. *J Immunol*.2009; 182(3): 1386-96.

Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(3): e0004349.

Alexander J, Kaye PM. Immunoregulatory pathways in murine leishmaniasis: different regulatory control during *Leishmania mexicana* and *Leishmania major* infections. *Clin Exp Immunol*. 1985; 61: 674-82.

Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2006; 61:223–74.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P et al. (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*. 2012; 7: e35671.

Andreakos E, Sacre SM, Smith C, Lundberg A, Kiriakidis S, Stonehouse T, Monaco C, Feldmann M, Foxwell BM. Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood.* 2004; 103(6): 2229-37.

Antoine JC, Prina E, Jouanne C, Bongrand P. Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect Immun.* 1990; 58(3): 779-87.

Atayde VD, Hassani K, da Silva Lira Filho A, Borges AR, Adhikari A, Martel C, Olivier M. Leishmania exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. *Cell Immunol.* 2016; 309:7-18.

Banerjee D, Dick AD. Blocking CD200-CD200 receptor axis augments NOS-2 expression and aggravates experimental autoimmune uveoretinitis in Lewis rats. *Ocul Immunol Inflamm*. 2004; 12: 115–25.

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.* 2007; 64:1–109.

Baraibar MA, Friguet B. Changes of the proteasomal system during the aging process. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012; 109:249–75.

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

Bates, PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007; 37(10): 1097–106.

Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 2007; 37(10): 1063-75.

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

Brittingham A, Mosser DM. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today*. 1996, 12(11): 444-47.

Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 641–54.

Cabanski M, Steinmüller M, Marsh LM, Surdziel E, Seeger W, Lohmeyer J. PKR regulates TLR2/TLR4-dependent signaling in murine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008; 38(1): 26-31.

Cai J, Wu G, Jose PA, Zeng C. Functional transferred DNA within extracellular vesicles. *Exp Cell Res.* 2016; 349(1):179-83.

Cameron CM, Barrett JW, Liu L, Lucas AR, McFadden G. Myxoma virus M141R expresses a viral CD200 (vOX-2) that is responsible for down-regulation of macrophage and T-cell activation *in vivo. J. Virol.* 2005; 79: 6052–67.

Canton J, Ndjamen B, Hatsuzawa K, Kima PE. Disruption of the fusion of Leishmania parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection. *Cell Microbiol.* 2012; 14(6): 937-48.

Cardo LJ. Leishmania: risk to the blood supply. Transfusion. 2006; 46(9): 1641-5.

Carvalho LP, Petritus PM, Trochtenberg AL, Zaph C, Hill DA, Artis D, Scott P. Lymph node hypertrophy following *Leishmania major* infection is dependent on TLR9. *J Immunol*. 2012; 188(3): 1394-401.

Casella JF, Flanagan MD, Lin S. Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature*. 1981; 293(5830): 302-5.

Chen BC, Hsieh SL, Lin WW. Involvement of protein kinases in the potentiation of lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator formation by thapsigargin in peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol.* 2001; 69: 280–88.

Chen Z, Marsden PA, Gorczynski RM. Role of a distal enhancer in the transcriptional responsiveness of the human CD200 gene to interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Mol Immunol.* 2009; 46(10): 1951-63.

Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. Trends Cell Biol. 2000; 10: 322-28.

Chockalingam A, Brooks JC, Cameron JL, Blum LK, Leifer CA. TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA. *Immunol Cell Biol.* 2009; 87(3): 209-17.

Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, Lima Machado PR, Talhari S. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84: 255–60.

Coakley G, Maizels RM, Buck AH. Exosomes and other extracellular vesicles: The new communicators in parasite infections. *Trends Parasitol*. 2015; 31(10): 477-89.

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009; 19: 43-51.

Copland DA, Calder CJ, Raveney BJ, Nicholson LB, Phillips J, Cherwinski H, Jenmalm M, Sedgwick JD, Dick AD. Monoclonal antibody-mediated CD200 receptor signaling suppresses macrophage activation and tissue damage in experimental autoimmune uveoretinitis. *Am J Pathol.* 2007; 171: 580–88.

Cortez M, Huynh C, Fernandes MC, Kennedy KA, Aderem A, Andrews NW. *Leishmania* promotes its own virulence by inducing expression of the host immune inhibitory ligand CD200. *Cell Host Microbe*. 2011; 9: 463-71.

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

Cui W, Cuartas E, Ke J, Zhang Q, Einarsson HB, Sedgwick JD, Li J, Vignery A. CD200 and its receptor, CD200R, modulate bone mass via the differentiation of osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 14436-41.

Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol*. 2002; 72: 132-41.

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

Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-g genes. *Science*. 1993; 259: 1739-42.

Dastgheib L, Naseri M, Mirashe Z. Both combined oral azithromycin plus allopurinol and intramuscular Glucantime yield low efficacy in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a randomized controlled clinical trial. *Int J Dermatol.* 2012; 51: 1508–11.

De Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. Mem. *Inst. Oswaldo Cruz.* 2003; 98: 861–870.

de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TW, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33: 2822–31.

Debus A, Glasner J, Rollinghoff M, Gessner A. High levels of susceptibility and T helper 2 response in MyD88-deficient mice infected with *Leishmania major* are interleukin-4 dependent. *Infect Immun.* 2003; 71: 7215–18.

Deckert M, Sedgwick JD, Fischer E, Schluter D. Regulation of microglial cell responses in murine Toxoplasma encephalitis by CD200/CD200 receptor interaction. *Acta Neuropathologica*. 2006; 111: 548-58.

DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, Karin M. Mapping of the inducible lkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(4): 1295-304.

Dikic I. Proteasomal and autophagic degradation systems. Annu Rev Biochem. 2017; 86: 193-224.

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

Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*. 2012; 5: 276-88.

Enslen H, Tokumitsu H, Stork PJ, Davis RJ, Soderling TR. Regulation of mitogenactivated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 10803-08.

Erin N, Podnos A, Tanriover G, Duymuş Ö, Cote E, Khatri I, Gorczynski RM. Bidirectional effect of CD200 on breast cancer development and metastasis, with ultimate outcome determined by tumor aggressiveness and a cancer-induced inflammatory response. *Oncogene*. 2015; 34(29): 3860-70.

Escolano A, Martínez-Martínez S, Alfranca A, Urso K, Izquierdo HM, Delgado M, Martín F, Sabio G, Sancho D, Gómez-del Arco P, Redondo JM. Specific calcineurin targeting in macrophages confers resistance to inflammation via MKP-1 and p38. *EMBO J.* 2014; 33(10): 1117-33.

Faria MS, Reis FC, Azevedo-Pereira RL, Morrison LS, Mottram JC, Lima AP. *Leishmania* inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages. *J immunol.* 2011; 186:411-22.

Faria MS, Reis FC, Lima AP. Toll-like receptors in *Leishmania* infections: guardians or promoters? *J Parasitol Res.* 2012; 2012: 930257.

Figueiro-Filho EA, Duarte G, El-Beitune P, Quintana SM, Maia TL. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2004; 12(1): 31-40.

Flandin JF, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur J Immunol.* 2006; 36(2): 411-20.

Fournieri B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 521-40.

França-Costa J, Wanderley JLM, Deolindo P, Zarattini JB, Costa J, Soong L, Barcinski MA, Barral A, Borges VM. Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite Infectivity. *PLoS ONE*. 2012; 7: e36595.

Franco LH, Fleuri AKA, Pellison NC, Quirino GFS, Horta CV, de Carvalho RVH, Oliveira SC, Zamboni DS. Autophagy downstream of endosomal Toll-like receptor signaling in macrophages is a key mechanism for resistance to *Leishmania major* infection. *J Biol Chem.* 2017; 292(32): 87-96.

Fuhlbrigge RC, Kupper TS. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 211-22.

Gannavaram S, Bhattacharya P, Ismail N, Kaul A, Singh R, Nakhasi HL. Modulation of Innate Immune Mechanisms to Enhance *Leishmania* Vaccine-Induced Immunity: Role of Coinhibitory Molecules. *Front Immunol.* 2016; 7: 187.

Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SM, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol*. 2001; 167: 893-01.

Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell. 2002; 109: 81-96.

Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 2003 426: 895-99.

Gomes IN, Calabrich AF, Tavares RS, Wietzerbin J, de Freitas LA, Veras PS. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes Infect*. 2003; 5: 251-60.

Gorczynski RM, Chen Z, Khatri I, Podnos A, Yu K. Cure of metastatic growth of EMT6 tumor cells in mice following manipulation of CD200:CD200R signaling. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 142(2): 271-82.

Gorczynski RM, Chen Z, Diao J, Khatri I, Wong K, Yu K, Behnke J. Breast cancer cell CD200 expression regulates immune response to EMT6 tumor cells in mice. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 123:405-15.

Gorczynski RM, Clark DA, Erin N, Khatri I. Role of CD200 in regulation of metastasis of EMT6 tumor cells in mice. *Breast Cancer Res Treatment*. 2011; 130:49-60.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol. 2003; 3(1): 23-35.

Gossage SM. Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol.* 2003; 33: 1027-34.

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

Green PJ, Feizi T, Stoll MS, Thiel S, Prescott A, McConville MJ. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 66(2): 319-28.

Guerra CS, Silva RM, Carvalho LO, Calabrese KS, Bozza PT, Côrte-Real S. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania* (*L.*) amazonensis. Int J Exp Pathol. 2010; 91: 451-59.

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

Gupta CL, Akhtar S, Waye A, Pandey NR, Pathak N, Bajpai P. Cross talk between *Leishmania donovani* CpG DNA and Toll-like receptor 9: an immunoinformatics approach. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 459(3): 424-9.

Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of immune evasion in Leishmaniasis. *Adv App Mmicrobiol.* 2013; 82: 155-84.

Gupta P, Giri J, Srivastav S, Chande AG, Mukhopadhyaya R, Das PK, Ukil A. *Leishmania donovani* targets tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 3 for impairing TLR4-mediated host response. *FASEB*. 2014; 28: 1756-68.

Gurung P, Kanneganti TD. Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cell Microbiol*. 2015; 17(9): 1286-94.

Handman E, Bullen DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 2002; 18(8): 332-4.

Hartley MA, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 2(99): 1-15.

Hassani K, Antoniak E, Jardim A, Olivier M. Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. *PLoS One.* 2011;6: e18724.

Hassani K, Olivier M. Immunomodulatory impact of *Leishmania*-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. *PLoS Negl Trop.* 2013; 7: e2185.

Hassani K, Shio MT, Martel C, Faubert D, Olivier M. Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of *Leishmania* exosomes. *PLoS One*. 2014; 9: e95007.

Hawn TR, Ozinsky A, Underhill DM, Buckner FS, Akira S, Aderem A. *Leishmania major* activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway. *Microbes Infect*. 2002; 4: 763-71.

Hoek RM, Ruuls SR., Murphy CA., Wright GJ., Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*. 2000; 290: 1768-71.

Hu X, Chen J, Wang L, Ivashkiv LB. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(2): 237-43.

Hurdayal R, Brombacher F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous *Leishmaniasis*. *Immunol Lett.* 2014, 161: 179–83.

Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F. Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. *Trends Parasitol.* 2016; 32(5): 392-401.

Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(2): 81-93.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004; 5(10): 987-95.

Jin MS, Lee J-O. Structures of the Toll-like receptor family and its ligand complexes. Immunity. 2008; 29(2): 182–191.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 2006; 22: 439–45.

Kane MM, Mosser DM. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol.* 2000, 7: 26–31.

Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol.* 2001; 166(2): 1141-7.

Karnam G, Rygiel TP, Raaben M, Grinwis GC, Coenjaerts FE, Ressing ME, et al. CD200 receptor controls sex-specific TLR7 responses to viral infection. *PLoS Pathogens*. 2012; 8.

Kaufer A, Ellis J, Stark D, Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1): 287.

Kautz-Neu K, Schwonberg K, Fischer MR, Schermann AI, von Stebut E. Dendritic cells in *Leishmania major* infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. *Med Microbiol Immunol.* 2012; 201(4): 581-92.

Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. Trends Mol Med. 2007; 13(11): 460-9.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev.* 2011; 9: 12. Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. *Dermatol Clin.* 2015; 33(3): 579-93.

Khan ME, Borde C, Rocha EP, Mériaux V, Maréchal V, Escoll P, Goyard S, Cavaillon JM, ManouryB, Doyen N. TLR9 Activation Is Triggered by the Excess of Stimulatory versus Inhibitory Motifs Present in Trypanosomatidae DNA. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(11): e3308.

Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ, Kim JH, Go G, Nhung D, Hong K, Jang SC, et al. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics*. 2015; 31(6): 933-9.

Kima PE. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol.* 2007; 37: 1087-96.

Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Curr Med Chem.* 2012; 19: 1443-74.

Körner U, Fuss V, Steigerwald J, Moll H. Biogenesis of *Leishmania major*-harboring vacuoles in murine dendritic cells. *Infect Immun*. 2006; 74(2): 1305-12.

Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, Ravey EP, McWhirter J, Oltean D, Frederickson S, Maruyama T, Wild MA, Nolan MJ, Wu D, Springhorn J, Bowdish KS. CD200 expression on tumor cells suppresses antitumor immunity: new approaches to cancer immunotherapy. *J Immunol.* 2007; 178: 5595-5605.

Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schönian G. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum reveals* low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(6): e1155.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2011; 30: 16-34.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. 1987 In: The Leishmaniases in Biology and Medicine, Vol. 1 (W. Peters and R. Killick-Kendrick, eds), pp. 1–120. London: Academic Press.

Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*, 2003; 11: 210-14.

Lee L, Liu J, Manuel J, Gorczynski R. A role for the immunomodulatory molecules CD200 and CD200R in regulating bone formation. *Immunol LetT.* 2006; 105: 150-8.

Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol.* 2004; 173(2): 1179-83.

Li Y, Ishii K, Hisaeda H, Hamano S, Zhang M, Nakanishi K, Yoshimoto T, Hemmi H, Takeda K, Akira S, Iwakura Y, Himeno K. IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in *Leishmania major*-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther.* 2004; 11: 941–48.

Liese J, Schleicher U, Bogdan C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol*. 2007; 37:3424-34.

Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of Leishmania parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol.* 1990; 144: 4794-97.

Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(6):446–58.

Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, Mineo TW, Gutierrez FR, Bellio M, Bortoluci KR, Flavell RA, Bozza MT, Silva JS, Zamboni DS. Inflammasome-derived IL-1β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat Med*. 2013; 19(7): 909-15.

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

Liu D, Uzonna JE. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2:83.

Lo CJ, Garcia I, Cryer HG, Maier RV. Calcium and calmodulin regulate lipopolysaccharide-induced alveolar macrophage production of tumor necrosis factor and pro coagulant activity. *Arch Surg.* 1996; 131: 44–50.

Love DC, Mentink Kane M, Mosser DM. *Leishmania amazonensis*: the phagocytosis of amastigotes by macrophages. *Exp Parasitol*. 1998; 88(3): 161-71.

Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 1999; 223: 77-92.

Machado PR, Ampuero J, Guimaraes LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, Sousa RS, Talhari A, Penna G, Carvalho EM. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(12): e912.

Macleod C, Bryant CE. Visualising pattern recognition receptor signalling. *Biochem Soc Trans.* 2017; 24. pii: BST20160459.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*.1997; 15: 323-50.

Maurya MR, Subramaniam S. A kinetic model for calcium dynamics in RAW 264.7 cells: 1. Mechanisms, parameters, and subpopulational variability. *Biophys J.* 2007; 93(3): 709-28.

McConville MJ, Saunders EC, Kloehn J, Dagley MJ. *Leishmania* carbon metabolism in the macrophage phagolysosome- feast or famine? *F1000Res.* 2015; 1: 4938.

McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJ Med.* 2014; 107(1): 7-14

McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol Rev.* 2004; 201: 206-24.

Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Op Immunol.* 1997; 9: 4-9.

Mihrshahi R, Brown MH. Downstream of tyrosine kinase 1 and 2 play opposing roles in CD200 receptor signaling. *J Immunol.* 2010; 185: 7216-22.

Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*. 2005; 201: 747-54.

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

Mukhopadhyay S, Pluddemann A, Hoe JC, Williams KJ, Varin A, Makepeace K, Aknin ML, Bowdish DM, Smale ST, Barclay AN, Gordon S. Immune inhibitory ligand CD200 induction by TLRs and NLRs limits macrophage activation to protect the host from meningococcal septicemia. *Cell Host Microbe*. 2010; 8: 236-47.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005; 366: 1561-77.

Naderer T, McConville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol*, 2008; 10: 301-08.

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

Neves LO, Talhari AC, Gadelha EP, Silva Junior RM, Guerra JA, Ferreira LC, Talhari S. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol*. 2011; 86: 1092-101.

Nogueira PM, Ribeiro K, Silveira AC, Campos JH, Martins-Filho OA, Bela SR, Campos MA, Pessoa NL, Colli W, Alves MJ, Soares RP, Torrecilhas AC. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *J Extracell Vesicles*. 2015; 4: 28734.

Ohto U, Shibata T, Tanji H, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, Miyake K, Shimizu T. Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature*. 2015; 520(7549): 702-5.

O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(6): 453-60.

Padigel UM, Alexander J, Farrell JP. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol*. 2003; 171(7): 3705-10.

Pandey RK, Mehrotra S, Sharma S, Gudde RS, Sundar S, Shaha C. *Leishmania donovani*-induced increase in macrophage Bcl-2 favors parasite survival. *Front Immunol.* 2016; 7: 456.

Pereira RM, Teixeira KL, Barretode-Souza V, Calegari-Silva TC, De-Melo LD, Soares DC, Bou-Habib DC, Silva AM, Saraiva EM, Lopes UG. Novel role for the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR: modulation of macrophage infection by the protozoan parasite Leishmania. *FASEB*. 2010; 24: 617-26.

Petermann KB, Rozenberg GI, Zedek D, Groben P, McKinnon K, Buehler C, Kim WY, Shields JM, Penland S, Bear JE, Thomas NE, Serody JS, Sharpless NE. CD200 is induced by ERK and is a potential therapeutic target in melanoma. *J Clin Invest*. 2007; 117(12): 3922-29.

Pickart CM, Cohen RE. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5: 177-87.

Pimenta PF, De Souza W. Fine structure and cytochemistry of the endoplasmic reticulum and its association with the plasma membrane of *Leishmania mexicana amazonensis*. *J Submicrosc Cytol*. 1985; 17(3): 413-9.

Prina E, Antoine JC, Wiederanders B, Kirschke H. Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. *Infect Immun*. 1990; 58(6): 1730-7. Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2004; 72: 988-95.

Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, Calich VL, Coutinho SG, Lopes MF, Dosreis GA. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 2004; 172: 4454-62.

Ribeiro-Gomes FL, Sacks D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2:59.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perie`res J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Compare´e*, 1990; 65: 111-25.

Rodríguez NE, Gaur Dixit U, Allen LA, Wilson ME. Stage-specific pathways of *Leishmania infantum chagasi* entry and phagosome maturation in macrophages. *PLoS One.* 2011; 6(4): e19000.

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. 2004; 430: 463-67. Sachet M, Liang YY, Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis*. 2017; 31.

Rygiel TP, Karnam G, Goverse G, van der Marel AP, Greuter MJ, van Schaarenburg RA, Visser WF, Brenkman AB, Molenaar R, Hoek RM et al.: CD200–CD200R signaling suppresses antitumor responses independently of CD200 expression on the tumor. Oncogene 2011.

Rygiel TP, Meyaard L. CD200R signaling in tumor tolerance and inflammation: A tricky balance. *Curr Opin Immunol.* 2012; 24(2): 233-8.

Saitoh S, Miyake K. Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors. *Immunol Rev.* 2009; 227(1): 32-43.

Santos JL, Andrade AA, Dias AA, Bonjardim CA, Reis L.F, Teixeira SM, Horta MF. Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN-gamma/LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. *J Interferon Cytokine Res.* 2006; 26, 682–88.

Sasai M, Yamamoto M. Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by Toll-like receptors. *Int Rev Immunol.* 2013; 32: 116-33.

Sato N, Takahashi N, Suda K, Nakamura M, Yamaki M, Ninomiya T, Kobayashi Y, Takada H, Shibata K, Yamamoto M, Takeda K, Akira S, Noguchi T, Udagawa N. MyD88 but not TRIF is essential for

osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide, and IL-1alpha. *J Exp Med.* 2004; 200(5): 601-11.

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

Schleicher U, Liese J, Knippertz I, Kurzmann C, Hesse A, Heit A, et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *J Exp Med.* 2007; 204: 893-906.

Schmidt M, Finley D. Regulation of proteasome activity in health and disease. Biochim. *Biophys Acta.* 2014; 1843:13-25.

Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immun*, 2016; 16: 581-92.

Shio MT, Hassani K, Isnard A, Ralph B, Contreras I, Gomez MA, Abu-Dayyeh I, Olivier M. Host cell signalling and *Leishmania* mechanisms of evasion. *J Trop Med*. 2012; 2012: 819512.

Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, Reiner NE. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol*. 2008; 9 (2): R35.

Silverman JM, Clos J, de'Oliveira CC, Shirvani O, Fang Y, Wang C, Foster LJ, Reiner NE. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci.* 2010; 123: 842-52.

Silverman JM, Reiner NE. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol*. 2011; 13(1): 1-9.

Silverman JM, Reiner NE. *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 1: 26.

Soong L. Subversion and utilization of host innate defense by *Leishmania amazonensis*. *Front Immunol*. 2012; 3: 58.

Sousa LM, Carneiro MB, Resende ME, Martins LS, dos Santos LM, Vaz LG, Mello PS, Mosser DM, Oliveira MA, Vieira LQ. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite Immunol*. 2014; 36(1): 13-31.

Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Veja JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(9): 1266-72.

Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol.* 2002; 28(3): 187-248.

Tsujimura H, Tamura T, Kong HJ, Nishiyama A, Ishii KJ, Klinman DM, Ozato K. Toll-like receptor 9 signaling activates NF-kappaB through IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein in dendritic cells. *J Immunol*. 2004; 172(11): 6820-7.

Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, Almusawi T, Duarte MI, Amato Neto V. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun.* 2008; 76(3): 866-72.

Uliana SR, Trinconi CT, Coelho AC. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology*. 2017; 20: 1-17.

Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51: 337-51.

Vargas-Inchaustegui DA, Tai W, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L. Distinctrolesfor MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infect. Immun.* 2009; 77: 2948-56.

Verma R, Balakrishnan L, Sharma K, Khan AA, Advani J, Gowda H, Tripathy SP, Suar M, Pandey A, Gandotra S, Prasad T, Shankar S. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *J Cell Commun Signal*. 2016; 10(1): 61-7.

Volpi C, Fallarino F, Pallotta MT, Bianchi R, Vacca C, Belladonna ML, Orabona C, De Luca A, Boon L, Romani L, Grohmann U, Puccetti P. High doses of CpG oligodeoxynucleotides stimulate a tolerogenic TLR9-TRIF pathway. *Nat Commun.* 2013; 4: 1852.

Wanderley JLM, Moreira ME, Benjamin A, Bonomo AC, Barcinski MA. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania* (*L*) *amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol.* 2006; 176: 1834-39.

Weinkopff T, Mariotto A, Simon G, Hauyon-La Torre Y, Auderset F, Schuster S, et al. Role of Toll-like receptor 9 signaling in experimental Leishmania braziliensis infection. *Infect Immun*. 2013; 81:1575-84.

West AP, Koblansky AA, Ghosh S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22: 409-37.

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

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

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

Wright GJ, Puklavec MJ, Willis AC, Hoek RM, Sedgwick JD, Brown MH, Barclay AN. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity*. 2000; 13(2): 233-42.

Xin L, Li K, Soong L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by Leishmania amazonensis amastigotes. *Mol Immunol.* 2008; 45(12): 3371-82.

Yang Z, Mosser DM, Zhang X. Activation of the MAPK, ERK, following Leishmania amazonensis infection of macrophages. *J Immunol.* 2007; 178(2): 1077-85.

Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania sp.* Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 132(1): 1-16.

Yardley V, Croft SL, De Doncker S, Dujardin JC, Koirala S, Rijal S, Miranda C, Llanos-Cuentas A, Chappuis F. The sensitivity of clinical isolates of Leishmania from Peru and Nepal to miltefosine. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(2): 272-5.

Zhang X, Guo L, Collage RD, Stripay JL, Tsung A, Lee JS, Rosengart MR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) Iα mediates the macrophage inflammatory response to sepsis. *J Leukoc Biol.* 2011; 90(2): 249-61.

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