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.

São Paulo
2017

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.

Parasitas 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*. Ensaio *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 carga 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 Toll-like 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 of the 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 on the 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.

1 INTRODUÇÃO

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 Mundo 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 morfológicamente 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 flebotomíneo 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 infeccioso, é altamente adaptado para transmissão bem-sucedida 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 metacíclicas (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 diferenciam-se 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 fagocitados 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 *naïve* 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-1 β , 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 (Hurdal, 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 kappa 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 (Fc γ R) 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 microbida (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 células 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 resposta imune do hospedeiro, uma vez que é observado apenas em infecção no modelo de camundongo BALB/c (suscetível 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 exossomos 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 liberadas a partir de brotamentos da membrana plasmática (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 células 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*) (Mihirshahi, Brown, 2010). Então Dok2 fosforila a proteína ativadora GTPase de Ras (RasGAP, do inglês *Ras GTPase-activating 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 Mihirshahi, 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 endotéliais 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 desse 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 nucleicos (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*

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- κ B. 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- κ B; 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 TGF β ; 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 leishmaniovírus (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- κ B, 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- κ B (RANK, do inglês *receptor activator of nuclear factor κ B*).

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 imunomoduladoras de regulação intracelular local, como a indução de CD200 na célula infectada.

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.

Concluimos 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- κ B, ERK, JAK e PKR. Foi possível observar ainda, que os níveis intracelulares de Ca^{2+} não são importantes para a indução de CD200 no macrófago. Além disso, concluimos 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 10 - 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- κ B. Além disso, também pode haver a ativação de **(IV)** PKR durante a infecção, capaz de fosforilar I κ B, deixando NF- κ B ativo. **(V)** ERK e **(VI)** JAK também são acionadas neste processo, podendo junto

com NF- κ B 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.

Andreaskos 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 leishmaniasis: 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, Rölinghoff 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- γ 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 I κ B 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.
- Hurdal 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, Rensing 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 Leishmaniasis 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-1 β 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 leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev*. 2004; 201: 206-24.
- Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997; 9: 4-9.
- Mehrshahi 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, Akin 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, Wanaseen 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-1 α . *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- κ B 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. Distinct roles for 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) I α 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.