LINA BORDA SAMPER

Envolvimento de CD200 na infectividade de
isolados de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
associados à leishmaniose cutânea localizada e
leishmaniose cutânea difusa

Dissertação apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

São Paulo
2015

LINA BORDA SAMPER

Envolvimento de CD200 na infectividade de
isolados de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
associados à leishmaniose cutânea localizada e
leishmaniose cutânea difusa

Dissertação apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Mauro Javier Cortez Veliz

Versão original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Samper, Lina Borda.

Envolvimento de CD200 na infectividade de isolados de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* associados à leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose cutânea difusa / Lina Borda Samper. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Javier Cortez Veliz.

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

Versão do título para o inglês: Involvement of CD200 in the infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolates associated with localized cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis.

1. *Leishmania* 2. Macrófagos 3. Leishmaniose cutânea 4. Leishmaniose cutânea difusa 5. CD200 6. CD200R I. Cortez Veliz, Prof. Dr. Mauro Javier II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0151/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lina Borda Samper.

Título da Dissertação: Envolvimento de CD200 na infectividade de isolados de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* associados à leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose cutânea difusa.

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

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **56** nas fls. **06** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Mauro Javier Cortez Veliz**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Envolvimento de CD200 na infectividade de isolados de L (L.) amazonensis associados à Leishmaniose cutânea (LCL) e Leishmaniose cutânea difusa (DCL)*" do qual participam o(s) aluno(s) **Lina Borda Samper**, 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 **21.05.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 22 de maio de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

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

Aos meus pais por todo o apoio incondicional, por me tornarem
o que sou agora. Sem vocês nada disto seria possível

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Mauro Cortez, pela oportunidade de trabalhar no laboratório. Por todos os aprendizados, experiências e motivação de continuar trabalhando e aprendendo. Principalmente, obrigada por acreditar em mim e no meu trabalho. Eu serei sempre grata por esta oportunidade.

Sempre é bom contar com o apoio de pessoas que chegam sem prévio aviso e que facilmente tornam-se parte fundamental de sua vida. Jê, Sandra e Danilo: quem iria imaginar que num estágio de graduação há 5 anos eu conheceria pessoas tão incríveis como vocês.

À Jê, obrigada pelo apoio sempre. Pelas ajudas, empréstimos de material, horas no café, desabafos e risadas sem fim. Acho que meu tempo aqui no ICB não seria o mesmo sem ter você. A Japa mais linda, mais legal e mais especial do mundo!

À Sandra (mensis), obrigada por todo o apoio nos momentos mais difíceis. Por me tirar um sorriso do rosto sempre! Obrigada por cada risada, cada desabafo. Você não tem ideia o quão especial e importante que você é na minha vida.

Ao Danilo, meu primeiro “orientador” que logo mais tornou-se meu amigo. Obrigada por todos os conselhos, por todas as palavras que precisava escutar no momento certo. Graças a você voltei ao ICB para continuar com minha formação profissional. Agora é um orgulho ter você como parte das pessoas que contribuem para que eu continue crescendo profissionalmente. Te admiro imensamente, e se algum dia conseguir chegar à metade do que você é, já ficarei feliz!

Ismael, não poderia pedir por uma melhor pessoa para dividir meu dia a dia. Mais que um colega, você se tornou um amigo para mim. Obrigada por toda a ajuda nos momentos bons e não tão bons, por todas as ideias e o apoio nos experimentos quando sempre precisei. O laboratório não seria o mesmo sem seu sorriso, risada, histórias e atitude positiva sempre. Acho que as palavras ficam curtas para descrever o quão agradecida estou por você!

À Janaina, minha amiguinha e vizinha. Obrigada por tudo! Por todas as caronas, por dividir o táxi comigo todos os dias, por todas as ajudas sempre que precisei. Pelas risadas, conversas, conselhos. Vou sentir muitas saudades da minha vizinha.

Aos demais colegas que passaram pelo laboratório ou ainda estão. Especialmente, à Natália Soares pela ajuda com os experimentos e apoio sempre!

Ao laboratório da Professora Silvia Uliana por todo o apoio e empréstimo de material e reagentes sempre que precisamos. À Silvia, obrigada por me dar a oportunidade de fazer estágio em seu laboratório quando ainda estava na graduação. Foi uma experiência única que fez com que eu quisesse voltar. Sempre ficarei grata por isso.

Ao laboratório das Professoras Sirlei Daffre e Andrea Fogaça pela possibilidade de usar o nanodrop, termociclador, qPCR. Por todas as ajudas e conselhos profissionais sempre úteis.

Ao laboratório do Professor Anderson de Sá Nunes pela ajuda e empréstimo de material para realização das técnicas de ELISA e CBA. Obrigada especialmente à Michele Barros e à técnica Andrea Glatt pela boa disposição sempre que precisei da ajuda de vocês!

Ao laboratório do Professor Gerhard pelas análises de citometria.

À FAPESP pelo apoio financeiro por meio da bolsa de Mestrado e da reserva técnica que me permitiu participar de congressos internacionais.

À Nilton e Maria Helena, por ser esse apoio incondicional e se tornarem parte essencial da minha vida aqui no Brasil. Por serem meus amigos, minha família. Não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês têm feito por mim. Obrigada de coração!

À minha família: Mami, Papi, Cami, Enano, Abuela. Só basta um OBRIGADA, porque vocês sabem o quão importantes são na minha vida. Por todo o apoio, amor incondicional e torcida à distância durante esses anos.

*“The secret of change is to focus all of your energy,
not on fighting the old, but on building the new”*

Socrates

RESUMO

Borda SL. Envolvimento de CD200 na infectividade de isolados de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* associados à leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose cutânea difusa. [Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Leishmania (*Leishmania*) *amazonensis* é uma das espécies de *Leishmania* associadas à leishmaniose tegumentar americana. No Brasil, é a única espécie vinculada à leishmaniose cutânea difusa (DCL) e em alguns casos, à leishmaniose cutânea localizada (LCL). Enquanto LCL se apresenta como uma lesão localizada com cura espontânea, DCL é caracterizada por apresentar nódulos não ulcerativos que se espalham pela pele. Esta manifestação da leishmaniose tegumentar americana é de difícil tratamento, apresentando um alto número de recidivas nos pacientes infectados. Até o momento não se conhecem os fatores que influenciam na apresentação destas manifestações. Por outro lado, a virulência do parasito tem sido associada com a capacidade de sobreviver no ambiente intracelular do macrófago ativado utilizando diferentes estratégias de evasão da resposta imune. CD200 é uma glicoproteína com capacidade reguladora que ao ligar-se ao receptor CD200R, gera uma cascata de sinalização que termina com a inibição da resposta pró-inflamatória do macrófago. Recentemente foi demonstrado que no processo de infecção por *L. (L.) amazonensis*, há indução de CD200 no começo da infecção, o que resulta na inibição da produção de óxido nítrico (NO) no macrófago, aumentando a sobrevivência intracelular dos amastigotas. Conhecendo a importância da expressão de CD200 na infectividade de *L. (L.) amazonensis*, o objetivo principal do projeto foi determinar a associação da expressão de CD200 na infecção de macrófagos com isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL ou DCL. Foram feitas infecções de macrófagos com as distintas formas dos parasitos em diferentes tempos para analisarmos o papel da CD200. Observamos que o aumento da expressão da proteína nos tempos avançados de infecção está relacionado com um aumento na infectividade dos isolados e um maior número de parasitos por célula infectada. No entanto, CD200 não está relacionada à forma da doença, mas sim à capacidade infectiva dos isolados em macrófagos de camundongos C57BL/6.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea localizada. Leishmaniose cutânea difusa. CD200. *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos.

ABSTRACT

Borda SL. Involvement of CD200 in the infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolates associated with localized cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis. [Masters thesis (Biology of the host-pathogen interaction)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Leishmania (Leishmania) amazonensis is one of the etiologic agents of two different forms of leishmaniasis. In Brasil, *L. (L.) amazonensis* is the only specie associated with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) and in some of the cases with localized cutaneous leishmaniasis (LCL). While LCL is characterized by presenting one unique ulcerated lesion that in most of the cases cures spontaneously, DCL is characterized by having multiple non ulcerative nodules in different parts of the body that disseminate throughout the skin. DCL patients are difficult to treat because of the high number of relapses. Until now, it is not well understood which factors that influence the development of the different forms of cutaneous leishmaniasis. On the other hand, the parasites virulence has been associated with the ability to survive in the intracellular environment of the activated macrophage, using different strategies for evading the host immune response. CD200 is a cell surface glycoprotein that is expressed in several cell types. When interacting with CD200R, a cell surface receptor present in all the myeloid cell types, CD200 triggers a signaling pathway that ends with the inhibition of the proinflammatory response of the cell. Recently it was revealed during the infection process in macrophages *L. (L.) amazonensis* enhances CD200 expression in the early stages of infection, thus resulting in the inhibition of nitric oxide (NO) production and an increase in the intracellular survival of amastigotes. Knowing the importance of CD200 during *L. (L.) amazonensis* infection, the aim of this study was to determine the association between the induction of CD200 during infection with *L. (L.) amazonensis* isolates associated with LCL or DCL. Macrophages were infected with different forms of the parasite and in various intervals so we could understand the importance of CD200. An increase in CD200 expression was noteworthy in the late stages of infection, which was also related to a higher infectivity rate of *L. (L.) amazonensis* isolates. Nevertheless, we could not associate the increased expression of CD200 glycoprotein with the clinical form of the disease associated with the isolates, perhaps the higher amounts of CD200 were related to the infectivity capacity in the C57BL/6 mice.

Keywords: Localized cutaneous leishmaniasis. Diffuse cutaneous leishmaniasis. CD200. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de novos casos reportados de Leishmaniose visceral e Leishmaniose cutânea durante o ano de 2013	22
Figura 2 - Mapa da incidência (2007) de leishmaniose cutânea no Brasil	23
Figura 3 - Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i> evidenciando as duas fases do ciclo; no vetor e no hospedeiro mamífero	24
Figura 4 - Infiltrado imunológico nas lesões causadas por <i>Leishmania</i> nas diferentes formas da leishmaniose cutânea	27
Figura 5 - Imunomodulação mediada pela proteína CD200R	33
Figura 6 - Multiplicação de amastigotas axênicos dos isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> em macrófagos de camundongos C57BL/6	50
Figura 7 - Imagens representativas de macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados com amastigotas axênicos de <i>L. (L.) amazonensis</i> PH8, BA125 e BA336	51
Figura 8 - Multiplicação de amastigotas de lesão de <i>L. (L.) amazonensis</i> PH8, BA125 e BA336 em macrófagos de camundongos C57BL/6	52
Figura 9 - Multiplicação de promastigotas da fase estacionária em macrófagos de camundongos C57BL/6	53
Figura 10 - Infecção de amastigotas de lesão de isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> dentro de macrófagos de camundongos C57BL/6	55
Figura 11 - Capacidade infectiva de isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i>	56
Figura 12 - Viabilidade de isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> dentro do vacúolo parasitóforo de macrófagos de C57BL/6 96 h após a infecção.....	57
Figura 13 - Infecção com isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> associados à LCL e DCL	58
Figura 14 - Cinética da expressão gênica de <i>cd200</i> durante a infecção de macrófagos com isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i>	59
Figura 15 - Expressão gênica de <i>cd200</i> na infecção com isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i>	61
Figura 16 - Expressão de <i>cd200</i> na infecção de macrófagos com amastigotas de lesão de diferentes isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i>	62

Figura 17 - Expressão de CD200 em 6 h de infecção de macrófagos com isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> associados à LCL ou DCL	63
Figura 18 - Expressão de CD200 em 9 h de infecção de macrófagos com isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> associados à LCL ou DCL	64
Figura 19 - Expressão de CD200 em 96 h de infecção de macrófagos com isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> associados à LCL ou DCL	65
Figura 20 - Produção de citocinas na infecção de macrófagos com isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i>	67
Figura 21 - Infecção <i>in vivo</i> em camundongos C57BL/6 com isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> PH8, BA125 (LCL) e BA336 (DCL)	69
Figura 22 - Infecção <i>in vivo</i> em camundongo BALB/c com isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> ..	70
Figura 23 - Externalização de PS na membrana de amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> recuperados de camundongos BALB/c	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Modulação de infecções pela sinalização da via CD200:CD200R	35
Tabela 2 -	Isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> associados a pacientes com LCL e DCL	41
Tabela 3 -	Lista de primers utilizados na reação de PCR em tempo real	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células apresentadoras de antígeno
BCA	Ácido bicinconínico
BMM	Macrófago derivado de medula óssea
BSA	Albumina sérica bovina
C3b	Componente 3 do sistema complemento
C3bi	Proteína C3b inativa
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CD200	Glicoproteína OX2 de membrana (<i>cluster of differentiation 200</i>)
CD200R	Receptor da proteína OX2
cDNA	DNA complementar
CNS	Sistema Nervoso Central
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
DC	Célula Dendrítica
DCL	Leishmaniose cutânea difusa (<i>difused cutaneous leishmaniasis</i>)
DL	Leishmaniose disseminada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DOK1/2	<i>Downstream of tyrosine kinase 2</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	Sotiocianato de fluoresceína
GP63	Glicoproteína 63
HPRT1	hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-2	Interleucina 2

IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido Nítrico sintase induzível
IP	Imunoprecipitação
JAK	Janus quinase
JAK-STAT	Via de sinalização composta por um receptor, JAK e STAT.
KCl	Cloreto de potássio
KO	<i>Knockout</i>
LAMP-1	Proteína de membrana associada à lisossoma 1
LC	Leishmaniose cutânea
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
MAC	Complexo de ataque à membrana
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCL	Leishmaniose muco-cutânea
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NK	Células <i>natural</i> killer
NO	Óxido nítrico
NP-40	Nonyl phenoxypolyethoxylethanol
ODC	Ornitina descarboxilase
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-T	PBS com Tween 20
PCR	Reação em cadeia de Polimerase
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PH8	L. (L.) amazonensis IFLA/BR/67/PH8
PI	Iodeto de Propídio

PKC	Proteína kinase C
PMN	Células Polimorfonucleadas (Neutrófilos)
PS	Fosfatidilserina (fosfolipídios que ligam à anexina-V)
qPCR	Reação em cadeia da Polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB	Soro fetal bovino
STAT	Transdutores de sinais e ativadores de transcrição
TBS	Tampão salina Tris
TBS-T	TBS com Tween-20
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametilnodiamina
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
Th1	Resposta celular Th1
Th2	Resposta celular Th2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UbH	Ubiquitina
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
g	gramas
h	hora
kDa	kilodaltons
L	litro
M	molaridade
mA	miliampères
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanómetro
°C	graus Celsius
pg	picograma
pH	potencial de hidrogênio
s	segundo
V	voltagem
x g	gravidade
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrometro
µM	micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Aspectos gerais	21
1.2 A leishmaniose no Brasil	23
1.3 Biologia da <i>Leishmania</i>	24
1.4 Características da leishmaniose cutânea localizada (LCL) e difusa (DCL): Imunopatologia e perfil imunológico	25
1.4.1 Modelos de infecção com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	29
1.5 Evasão da resposta imune por <i>Leishmania</i>	30
1.6 Proteína CD200 e sua capacidade imunomoduladora	32
1.6.1 CD200 na infecção por <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	35
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos Específicos	38
3 METODOLOGIA	39
3.1 Parasitos	40
3.2 Cultura de macrófagos e infecção <i>in vitro</i>	42
3.3 Imunofluorescência indireta	43
3.4 PCR em Tempo Real (qPCR)	43
3.5 Imunoprecipitação	44
3.6 Gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) e <i>Western Blot</i>	45
3.7 Infecção <i>in vivo</i>	45
3.8 Exposição de ligantes de anexina-V por FACS	46
3.9 Perfil imunológico: detecção de citocinas e nitrito	47
3.10 Análise estatística	47
4 RESULTADOS	49
4.1 Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos com isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i>	49
4.1.1 Infecção com isolados representativos de LCL e DCL	49
4.1.2 Infecção com diferentes isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> associados à LCL e DCL	54
4.2 Envolvimento de CD200 na infecção por isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i>	58

4.2.1 Cinética da expressão gênica de <i>cd200</i> na infecção com PH8, BA125 e BA336	58
4.2.2 Expressão gênica de <i>cd200</i> na infecção com diferentes isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> ...	60
4.2.3 Níveis protéicos de CD200 na infecção de macrófagos com isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i>	63
4.3 Avaliação do perfil de citocinas produzido na infecção por isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i>	66
4.4 Infecção <i>in vivo</i> com diferentes isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i>	68
4.4.1 Infecção em camundongos C57BL/6 com BA125, BA336 e PH8.....	68
4.4.2 Infecção em camundongos BALB/c com isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i>	69
4.4.3 Avaliação da exposição de PS em amastigotas recuperados de lesão de camundongos BALB/c.....	71
5 DISCUSSÃO	73
5.1 Processo infectivo de isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> em macrófagos de camundongos C57BL/6	75
5.2 Associação de infectividade de isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> com o aumento da expressão de CD200	77
5.3 Resposta imune de macrófagos C57BL/6 à infecção por isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> associados à DCL e LCL	79
6 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	84
APÊNDICES	93
APÊNDICE A - Coluna de Ficoll 400 para purificação de promastigotas metacíclicos	94
APÊNDICE B - Curva de crescimento de isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> em cultura com meio Grace suplementado com 10% de SFB	95
APÊNDICE C - Porcentagem de promastigotas metacíclicos no sétimo dia de cultura.....	96
APÊNDICE D - Expressão gênica de <i>ama2</i> em 6 h de infecção com promastigotas de fase estacionária de <i>L. (L.) amazonensis</i>	97
APÊNDICE E - Infecção <i>in vivo</i> em camundongo BALB/c com todos os isolados de <i>L. (L.) amazonensis</i> (Tabela 2)	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A leishmaniose é uma doença negligenciada com distribuição tropical e subtropical. Embora a leishmaniose esteja entre as dez doenças infecciosas de maior incidência no mundo, ainda não é considerada uma das doenças tropicais de maior importância. A epidemiologia, complexidade do ciclo biológico e dificuldade no tratamento fazem com que ainda não haja eficácia necessária no controle da doença (1-3).

A leishmaniose abrange um espectro amplo de manifestações clínicas as quais dependem da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e da resposta imune do hospedeiro (4-6). As manifestações clínicas incluem a leishmaniose cutânea localizada (LCL), cutânea difusa (DCL, *diffuse cutaneous leishmaniasis*), muco-cutânea (MCL), disseminada (DL) e visceral (LV) (4, 7). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*), anualmente são reportados cerca de 300 mil casos de leishmaniose visceral e com mais de 20 mil mortes (90% dos casos ocorrem em 6 países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Sudão e Sudão do Sul); 1 milhão de casos de leishmaniose cutânea (LC) (75% dos casos reportados incidem principalmente em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Norte de Sudão, Síria e Perú); e 300 milhões de pessoas estão em zonas de risco de contágio da doença (2, 8) (**Figura 1**).

A.

B.

Figura 1 - Mapa de casos reportados de Leishmaniose cutânea (A) e Leishmaniose visceral (B) durante o ano de 2013. Mapas adaptados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013) (8).

1.2 A leishmaniose no Brasil

O Brasil é o país que apresenta o maior número de casos de leishmaniose cutânea na América do Sul. Anteriormente era uma doença de transmissão silvestre e os casos apresentavam-se nas áreas rurais. Na atualidade, a leishmaniose no Brasil é considerada uma doença suburbana por causa do desmatamento florestal e da migração dos vetores às regiões urbanas (2, 14). As formas clínicas da doença também dependem da espécie de *Leishmania* envolvida. *L. (L.) infantum chagasi* é o agente etiológico da LV, enquanto a leishmaniose cutânea (com suas diversas formas da doença) pode ser causada por diferentes espécies. A LCL é a manifestação clínica mais comum no Brasil, com distribuição por todo o país e prevalência nas regiões norte e nordeste (**Figura 2**) (2). *L. (V.) braziliensis* é o principal agente etiológico desta forma clínica, embora também esteja associada aos casos de MCL e DL (em 5% e 0,2% dos casos, respectivamente) (**Figura 4**) (2, 15). Por outro lado, *L. (L.) amazonensis* também associada à LCL (em menor incidência que *L. (V.) braziliensis*), é a única espécie associada a DCL (2). A maior incidência de casos de DCL é na região nordeste, embora já tenham sido reportados casos no sudeste (16, 17).

Figura 2 - Mapa da incidência (2007) de leishmaniose cutânea no Brasil. Mapa adaptado de Alvar et al. 2012 (PLoS ONE, vol 7) (2).

1.3 Biologia da *Leishmania*

Os agentes etiológicos da leishmaniose são protozoários flagelados e dimórficos, pertencentes ao gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida, os quais são caracterizados pela presença de cinetoplasto (organela especializada contendo uma rede de DNA mitocondrial na forma de maxicírculos e minicírculos localizado na região adjacente ao bolso flagelar) (9).

O ciclo biológico completo da *Leishmania* apresenta duas fases: promastigotas extracelulares no hospedeiro invertebrado (fêmea de insetos flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* no velho mundo, e *Lutzomyia* no novo mundo) e amastigotas intracelulares no hospedeiro vertebrado (diferentes espécies de mamíferos e répteis) (4, 10, 11). Durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo no hospedeiro vertebrado, são ingeridas células infectadas com amastigotas (formas replicativas e infectivas) os quais diferenciam-se em promastigotas procíclicas (formas replicativas, flageladas e não infectivas) no intestino do inseto vetor (**Figura 3**).

Figura 3 - Ciclo biológico da *Leishmania* evidenciando as duas fases do ciclo: no inseto vetor e no hospedeiro mamífero. Figura obtida de Kayne & Scott, 2011 (Nature Reviews; vol. 9)(6).

Durante a replicação, os promastigotas procíclicos sofrem mudanças morfológicas transformando-se em promastigotas metacíclicos (forma infectiva, flagelada e não replicativa). Entre as mudanças morfológicas está a modificação do LPG (lipofosfoglicano) na membrana dos parasitos, levando à perda de adesão da parede intestinal e migração até a parte anterior do intestino. Este fenômeno de transformação de promastigota procíclico em metacíclico é conhecido como metaciclogênese (10, 12).

Um alto número de promastigotas metacíclicos na região anterior do intestino, válvula estomodeal e até sua presença na probóscide não é suficiente para garantir a inoculação no hospedeiro vertebrado. Por isso, os promastigotas metacíclicos formam um “plugue” para impedir a ingestão de sangue e fazer com que o flebotomíneo regurgite os promastigotas metacíclicos durante o repasto sanguíneo (10). Após a picada do vetor, os promastigotas metacíclicos tem que subverter a resposta imune do hospedeiro até serem fagocitados por células fagocíticas profissionais do sistema imune. Já dentro do vacúolo parasitóforo (estrutura formada por membranas e vesículas da célula hospedeira contendo o parasita) os promastigotas metacíclicos transformam-se em amastigotas (13) (**Figura 3**).

Existem aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* que estão divididas nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Cada subgênero está dividido em complexos: o complexo *braziliensis* pertence ao subgênero *Viannia* enquanto os complexos *donovani*, *tropica* e *mexicana* pertencem ao subgênero *Leishmania* (4). Na América do Sul, as espécies do subgênero *Viannia* são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*, enquanto o subgênero *Leishmania* é composto por *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (L.) amazonensis* (2, 4).

1.4 Características da leishmaniose cutânea localizada (LCL) e difusa (DCL): Imunopatologia e perfil imunológico

A capacidade do hospedeiro em montar uma resposta capaz de controlar a doença e a parasitemia depende da população de células que são recrutadas ao local da infecção. A população de células presentes no infiltrado celular inicial e o perfil de quimiocinas e citocinas liberadas são fundamentais para determinar o curso da doença (18, 19).

A LCL é a forma mais comum entre as leishmanioses cutâneas. O desenvolvimento da lesão tem um curso agudo (com período de incubação de duas semanas até meses) e caracteriza-se por apresentar uma única lesão no local da picada do flebotomíneo com morfologia papular e

posterior ulceração (**Figura 4**). A parasitemia aumenta consideravelmente no começo da infecção e apresenta uma queda conforme se desenvolve a úlcera (18). Contudo, a formação de lesão varia entre os hospedeiros: lesão rápida (formada antes de um mês após o inóculo) e lesão tardia (mais de um mês após o inóculo) (5). A LCL é de fácil tratamento e em muitos casos chega à cura espontânea (18). No entanto, a DCL é uma forma rara da doença cutânea caracterizada pela presença de múltiplas lesões nodulares não ulcerativas em diferentes regiões do corpo (**Figura 4**). O curso da infecção da DCL é crônico, desenvolvendo as lesões meses após o inóculo. Estas diferenciam-se das LCL pela presença de muitos macrófagos altamente parasitados. Contrário à LCL, os casos de DCL são negativos para o teste intradérmico de Montenegro e não respondem favoravelmente ao tratamento com drogas anti-*Leishmania*, gerando uma alta frequência de recidivas durante o curso de infecção (5, 17, 18).

Figura 4 - Infiltrado celular nas lesões causadas por *Leishmania* nas diferentes formas da leishmaniose cutânea. (A) presença de células do sistema imune no tecido subcutâneo em condições de esterilidade. (B) lesão única de LCL com formação de úlcera, aumento do infiltrado inflamatório e células ativadas que levam a formação da úlcera e diminuição da carga parasitária. (C) lesão de DCL em forma de nódulo não ulcerativo com grande número de macrófagos altamente parasitados, ausência de células ativadas e pouco infiltrado inflamatório que levam a formação de nódulo sem úlcera. Figura adaptada de Nylén & Eidsmo, 2012 (Parasite Immunology, vol 34) (18).

As infecções agudas de leishmaniose cutânea (LCL) caracterizam-se por apresentar um perfil inflamatório, com aumento de células de resposta do tipo *T-helper 1* (Th1) e aumento na população de células responsáveis pela produção de interleucina 12 (IL-12) e interferon gama (IFN- γ) (5). IL-12 é uma citocina liberada principalmente por macrófagos e é conhecida por seu importante papel na imunopatologia de *Leishmania*, já que recruta tanto células T quanto células *natural killer* (NK) (20). Esse tipo de resposta favorece a diminuição da carga parasitária, resultando na resolução da infecção (18). A IL-1 β também é uma citocina característica de uma resposta pró-inflamatória. Lima-Junior e colaboradores (2013) mostraram que a produção de IL-

1 β como resultado da ativação de inflamassoma dependente de caspase-1 é muito importante para o controle da infecção, já que esta via ativa iNOS e como consequência a produção de óxido nítrico (NO) (21). No caso das lesões crônicas (DCL), a carga parasitária elevada está associada à presença de células produtoras de IL-10, favorecendo o recrutamento de células T reguladoras (Treg) e como consequência, uma resposta anérgica de células T (ausência da resposta antígeno específica). O perfil na infecção crônica de DCL caracteriza-se pela presença de células com resposta Th2 e aumento na produção de citocinas como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), levando a uma resposta anti-inflamatória (5, 19, 20, 22, 23) e favorecimento da disseminação da doença a outros locais (18).

O Macrófago é a célula hospedeira mais importante na infecção por *Leishmania*, porém as outras células da resposta imune inata (neutrófilos e células dendríticas) tem um papel importante no curso da infecção (6, 24, 25).

Após o repasto sanguíneo do flebotomíneo, os neutrófilos (PMN) infiltram-se no local da picada. Os promastigotas metacíclicos presentes no tecido dérmico são rapidamente fagocitados, sendo o PMN a primeira célula hospedeira da *Leishmania*. Ensaios feitos com microscopia intravital, evidenciaram o rápido recrutamento de PMN ao local da picada assim como a fagocitose dos promastigotas metacíclicos (13). Ainda foi observado que o fagossomo do neutrófilo não é leishmanicida e a *Leishmania* consegue sobreviver dentro do vacúolo até chegar ao macrófago. A importância do neutrófilo no começo da infecção foi confirmada por Peters e colaboradores (2008). Em ensaios *in vivo*, observou-se que em camundongos que tiveram os neutrófilos depletados antes da infecção por *Leishmania (L.) major*, o parasito possuía capacidade reduzida de estabelecer a infecção e desenvolver a doença (13). Assim, sugeriu-se que os neutrófilos infectados estariam entrando em processo de apoptose e sendo fagocitados por macrófagos, evitando a ativação dos mesmos e favorecendo a entrada dos parasitos à célula hospedeira definitiva. Esse processo é conhecido como o modelo de “cavalo de Troia” (13, 24, 26, 27).

Macrófagos e DCs são as células mais importantes para controlar a infecção. Os macrófagos sendo a célula hospedeira definitiva, encarregados de fagocitar parasitos extracelulares ou PMN apoptóticos, são os responsáveis pela eliminação e destruição dos parasitos intracelulares. O macrófago pode ser ativado tanto pela forma clássica quanto a alternativa. A forma clássica é mediada pela resposta Th1, especialmente envolvendo IFN- γ e

óxido nítrico sintase induzível (iNOS - a enzima que catalisa a conversão de L-arginina para gerar L-citrulina e NO), os grandes responsáveis pela morte de parasitos intracelulares. Por outro lado, a ativação alternativa do macrófago envolve a resposta Th2, com produção de citocinas anti-inflamatórias, favorecendo a sobrevivência dos parasitos no macrófago.

As DCs são a conexão entre a imunidade inata e adaptativa, e por isso a resposta efetiva dessas células é muito importante. As DCs são células apresentadoras de antígeno (APCs), as quais migram do local inflamatório ao linfonodo para apresentar o antígeno aos linfócitos T e assim conseguir uma resposta imune protetora (28). A produção da citocina IL-12 é indispensável para a polarização de células T *naive* na subpopulação Th1 e transformação das células *naive* em células efectoras. Para isso é necessário a presença da DCs (24). Isto foi confirmado por Contreras e colaboradores (2014), onde observaram que na infecção por *Leishmania (L.) mexicana* (outra espécie relacionada com casos de DCL), o parasito interfere na maturação das DCs e como consequência afeta na resposta celular e imunológica efetiva favorecendo a propagação da doença (28, 29).

Nas infecções por LCL, um alto número de células dendríticas (DCs) maduras estão presentes, com capacidade migratória ao linfonodo para polarizar os linfócitos T CD8 e CD4. A atividade citotóxica dos linfócitos T CD8 nos macrófagos infectados, eliminando os parasitos dentro das células, está associada ao dano no tecido levando à necrose e formação de úlcera. No entanto, nas infecções crônicas (DCL) tem sido evidenciado que os linfócitos T são anérgicos, gerando uma ausência de atividade citotóxica, favorecendo a multiplicação dos parasitos dentro dos macrófagos e a propagação da doença (18). Pacientes com LCL infectados com *L. (L.) mexicana* apresentam maior número de linfócitos T CD8 antígeno-específicos, com maior citotoxicidade e produção de IFN- γ quando comparado com os pacientes de DCL (30) os quais apresentam exaustão celular, com presença de linfócito T não específico e baixa citotoxicidade.

1.4.1 Modelos de infecção com *Leishmania (L.) amazonensis*

Já foi demonstrado que existem diferenças no curso da infecção da leishmaniose cutânea dependendo do modelo animal utilizado. As diferenças na infecção de *L. (L.) major* em camundongo C57BL/6 (resistente) e BALB/c (suscetível) e o tipo de resposta envolvida (Th1 ou Th2, respectivamente) têm sido amplamente estudados (31). Porém, o perfil imunológico na

infecção de *L. (L.) major* não pode ser extrapolada aos modelos de infecção com outras espécies de *Leishmania*.

Diferentes modelos de infecção têm sido utilizados na infecção por *L. (L.) amazonensis*. Dependendo do modelo, o perfil e curso da infecção variam, assim como a carga parasitaria na lesão. A infecção em camundongos CBA com isolados de *L. (L.) amazonensis* de diferentes formas clínicas (LCL e DCL) não tem diferenças no perfil infectivo (progressão da lesão e formação de úlcera), assim como no perfil imunológico (32). O contrario é observado em camundongos F1 (BALB/c x C57BL/6) onde os isolados DCL apresentam um maior índice de infecção e tamanho de vacúolo parasitóforo comparado com os isolados de LCL. O perfil imunológico é diferente entre os isolados, evidenciando o perfil inflamatório na infecção com LCL e anti-inflamatório com DCL (33). Diferenças também foram observadas na exposição extracelular de fosfolipídios que ligam a anexina-V (PS) na membrana de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, dependendo do modelo utilizado. Amastigotas recuperados da lesão de BALB/c têm maior exposição de PS na membrana comparado com os amastigotas da lesão de C57BL/6 (34, 35).

1.5 Evasão da resposta imune por *Leishmania*

Leishmania apresenta diferentes mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro para estabelecer a infecção (24). Uma vez que os promastigotas metacíclicos são inoculados durante o repasto sanguíneo, primeiro eles subvertem a resposta imune extracelular antes de serem fagocitados pelas células hospedeiras. Um dos mecanismos conhecidos é a capacidade dos promastigotas de inibir o sistema complemento. A molécula do parasito encarregada deste processo é o LPG, inibindo a formação do complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês *membrane attack complex*). Além disso, a glicoproteína de membrana GP63, uma protease do parasito considerada um fator de virulência importante durante o ciclo da infecção, cliva a proteína do complemento C3b na sua forma inativa (C3bi) (36). A opsonização do parasito com a proteína C3bi, ajuda ainda na fagocitose mediada pelos receptores específicos do complemento, evitando a ativação da célula fagocítica no processo de internalização da *Leishmania* (37).

Uma vez dentro da célula hospedeira, a *Leishmania* consegue modular o ambiente intracelular para sua sobrevivência e propagação (6, 38). O LPG da membrana dos promastigotas

metacíclicos é responsável por inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo do macrófago (6). Isto foi confirmado com estudos que mostram que parasitos deficientes em LPG não inibem a fusão, afetando sua sobrevivência intracelular (39). Os parasitos também têm a capacidade de regular diferentes fatores e proteínas envolvidas nos processos celulares como proteína quinase C (PKC), via JAK-STAT (do inglês, *Janus kinase-signal transducers and activators of transcription*) e NF- κ B (fator nuclear kappa B) para controlar a resposta do macrófago. A *L. (L.) amazonensis* consegue promover a atividade do complexo repressor de NF- κ B resultando na regulação negativa da expressão de iNOS e controlando a resposta leishmanicida. Adicionalmente, a GP63 do parasito cliva o fator NF- κ B, modulando o processo imune do hospedeiro (6). A *Leishmania* também tem a capacidade de inibir a via JAK-STAT, que está envolvida em diversas respostas do macrófago. Entre elas está a indução de produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, a principal citocina encarregada de induzir a produção de IFN- γ por células T (40). Além disso, foi demonstrado que algumas espécies de *Leishmania* conseguem reprimir a sinalização mediada por IFN- γ no macrófago pela inibição das proteínas STATs (do inglês, *signal transducers and activators of transcription*). A alteração da via é mediada pela degradação de STAT-1 ou inativação de JAK2 (Janus kinase) (40).

Estudos feitos com amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* sugerem que estas formas possuem mecanismos exclusivos para evadir a resposta microbicida estabelecida por macrófagos e DCs (41), conseguindo sobreviver no interior destas células (40). Um dos mecanismos utilizados por amastigotas de *L. (L.) amazonensis* para inibir a resposta do macrófago é o mimetismo apoptótico descrito por Wanderley e colaboradores (2006). Eles sugerem que amastigotas de *L. (L.) amazonensis* expõem PS na membrana extracelular do parasito, modulando a resposta imune da célula (34, 35, 42, 43). Um estudo realizado em 2012 por França-Costa e colaboradores sugere que o aumento na exposição de PS na membrana dos amastigotas está associado à capacidade de infecção e à forma da doença. Utilizando camundongos F1 (C57BL/6 x BALB/c), foi demonstrado que parasitos isolados de pacientes com DCL apresentam uma maior exposição de PS na membrana do que os parasitos associados à LCL (33), levando à maior índice de infecção, tamanho de vacúolo parasitóforo e produção de citocinas com perfil anti-inflamatório. Estudos realizados em pacientes com LCL ou DCL evidenciaram o aumento de fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), arginase I, ornitina descarboxilase (ODC) e prostaglandina E₂ (PGE₂) no plasma e na biopsia da lesão dos pacientes com DCL comparado

com os LCL e os pacientes não infectados. Isto sugere que esses marcadores imunológicos podem favorecer a um ambiente permissivo para a proliferação do parasito e progressão da infecção crônica (23). Ainda, a inibição de arginase I e ODC impede a proliferação intracelular da *Leishmania* no macrófago, ajudando na resposta imune efetiva para o controle da infecção (23). Portanto a virulência da *Leishmania* está relacionada com a capacidade de evadir e modular a resposta imune e de sobreviver no ambiente intracelular do macrófago ativado para conseguir propagar a doença (11, 44).

1.6 Proteína CD200 e sua capacidade imunomoduladora

No ambiente natural da célula, existem mecanismos imunomoduladores que evitam a ativação contínua da resposta imune celular. A molécula CD200R é uma glicoproteína de membrana da superfamília das imunoglobulinas (Ig), constitutivamente expressa em células mielóides e em algumas subpopulações de linfócitos T. CD200R é o receptor específico da glicoproteína de membrana CD200 (OX2), também pertencente à superfamília das Ig. No entanto, a proteína CD200 é constitutivamente expressa em uma variedade de células que incluem neurônios, células endoteliais e epiteliais, fibroblastos, astrócitos e células linfóides, embora sua expressão possa ser induzida em células mielóides como macrófagos e DCs. Na região citoplasmática de CD200R há três resíduos de tirosina os quais são fosforilados após a interação entre CD200 e CD200R. Uma vez que os resíduos de tirosina são fosforilados, a proteína adaptadora DOK1/2 liga-se ao receptor, inibindo a cascata das MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinases*) e evitando a ativação pró-inflamatória da célula (**Figura 5**) (45, 46).

Figura 5 - Imunomodulação mediada pela proteína CD200R: A proteína CD200 expressa na superfície de diversos tipos celulares liga-se de forma específica à CD200R expressa em células mielóides. A região citoplásmica do receptor é fosforilada, ativando a via de sinalização, recrutando a proteína adaptadora DOK-2 e inibindo a via das MAPK modulando a resposta celular. Figura adaptada de Lloyd et al. 2013; (Front. Immunol).

A importância da via de CD200:CD200R tem sido descrita em diversos processos biológicos. Um dos processos mais estudados é a osteoclastogênese (homeostase óssea). A comunicação entre osteoclastos (células encarregadas da degradação, absorção e remodelação óssea) e osteoblastos (células encarregadas na formação do osso) ocorre a través de contato célula-célula, interação célula-osso e secreção de fatores solúveis como a CD200, expressa nas células tronco mesenquimais (MSC, do inglês *mesenchymal stem cells*). A ausência de CD200, a diferenciação de osteoclastos é reduzida, tendo aumento de massa óssea e prejudicando o processo de osteoclastogênese (47, 48). No entanto, a CD200 expressa na MSCs também tem a capacidade de regular a formação de osteoclastos, controlando o processo de reabsorção e fisiologia do osso (49).

Além de participar na osteoclastogênese, CD200 tem um papel muito importante no sistema nervoso central (CNS) controlando a ativação da microglia (macrófagos residentes do

CNS). A CD200 expressa na membrana de neurônios liga-se à CD200R da microglia ativando a cascata inibitória. Na ausência de CD200, a microglia apresenta características de célula ativada resultando na agregação celular levando à inflamação e neurodegeneração. A ausência da via CD200:CD200R pode levar à susceptibilidade de doenças autoimunes e inflamatórias (50).

Existem evidências de diversos patógenos com capacidade de controlar a regulação da via de sinalização CD200:CD200R, favorecendo sua infectividade e sobrevivência no hospedeiro. A presença desta via determina a evolução de infecções virais (51, 52), fazendo o hospedeiro mais resistente na ausência de CD200 e de CD200R. No caso de infecções bacterianas, *Neisseria meningitidis* tem a capacidade de induzir a expressão de CD200. No mesmo processo infectivo, *N. meningitidis* regula a expressão de CD200R nos macrófagos infectados, modulando a resposta imune do hospedeiro (53). Além disso, existem evidências que confirmam o aumento de expressão de CD200R1 na membrana de linfócitos T CD4 em processos de infecções crônicas por bactérias (*Salmonella entérica*) e helmintos (*Schistosoma haematobium*). O estímulo constante durante a infecção crônica é indispensável para manter a expressão de CD200R, favorecendo a perda de funcionalidade de células T efectoras (54) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Modulação de infecções pela sinalização da via CD200:CD200R. Tabela adaptada de Vaine & Soberman, 2014 (Advances in Immunology, Volume 121).

Patógeno	Efeito da expressão de CD200:CD200R	Severidade da doença	Referência
<i>T. gondii</i>	Aumenta CD200 e CD200R	Diminui (CD200 KO)	Deckert et al. (2006)
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Aumenta CD200	Diminui (CD200 KO)	Cortez et al. (2011)
<i>N. meningitidis</i>	Aumenta CD200	Aumenta (CD200 KO)	Mukhopadhyay et al. (2010)
<i>S. mansoni</i>	Aumenta CD200 e CD200R		Caserta et al. (2012)
<i>S. enterica</i>	Aumenta CD200 e CD200R		Caserta et al. (2012)
<i>S. haematobium</i>	Aumenta CD200R		Caserta et al. (2012)
MHV		Diminui (CD200 KO)	Kamam et al. (2012)
Influenza A		Aumenta (CD200 KO) Diminui (CD200-Fc e CD200R KO)	Snelgrove et al. (2008) Goulding et al. (2011) Kamam et al. (2012)
HSV-1	Aumenta CD200R	Diminui (CD200-Fc e CD200R KO)	Sarangi et al. (2009) Soberman et al. (2012)

1.6.1 CD200 na infecção por *Leishmania (L.) amazonensis*

Alguns estudos evidenciam a importância da proteína CD200 na infecção de diversos patógenos. No entanto, o papel que a CD200 tem no processo infectivo de *Leishmania spp.* é pouco conhecido. Os estudos que mostram a dinâmica de CD200 com outros patógenos confirmam a importância de estudar o papel da via CD200:CD200R na infecção por *Leishmania*. Cortez e colaboradores (2011) demonstraram que amastigotas de *L. (L.) amazonensis* induzem a expressão de CD200 no início da infecção inibindo a ativação dos macrófagos infectados. O aumento de CD200 é indispensável para a multiplicação intracelular de *L. (L.) amazonensis*, já que na infecção em macrófagos *knockout* (KO) para a proteína, o parasito não consegue estabelecer a infecção e a multiplicação dele é controlada.

O mecanismo utilizado na via imunomoduladora de CD200 na infecção por *L. (L.) amazonensis* é a regulação negativa da produção de NO mediada pela iNOS, resultando na

sobrevivência intracelular dos amastigotas (44). Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a expressão de CD200 em macrófagos infectados é crítica para o aumento da infectividade de *L. (L.) amazonensis*. No entanto, nem todas as espécies de *Leishmania* induzem a expressão de CD200. Isso foi evidenciado quando Cortez e colaboradores verificaram que *L. (L.) major* não tem capacidade de induzir a expressão de CD200 durante o processo infectivo. Porém, quando administrou-se CD200 solúvel *in vitro*, a capacidade de infecção de *L. (L.) major* aumentou consideravelmente, apresentando uma cinética de infecção semelhante à *L. (L.) amazonensis* (44).

Desta forma, conhecendo a importância do envolvimento de CD200 na interação de *L. (L.) amazonensis* com o macrófago e as diferenças que existem na imunopatologia de parasitos associados às doenças LCL e DCL, estudou-se a associação de CD200 com a capacidade infectiva dos diferentes isolados de *L. (L.) amazonensis* associados às duas patologias cutâneas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi investigar a associação da expressão de CD200 em macrófagos infectados com isolados de *L. (L.) amazonensis* obtidos de pacientes com LCL ou DCL.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a multiplicação *in vitro* de formas amastigotas axênicas e promastigotas dos isolados LCL e DCL de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos de camundongos C57BL/6.
2. Analisar o perfil de expressão de CD200 em macrófagos experimentalmente infectados com formas promastigotas dos isolados LCL e DCL de *L. (L.) amazonensis*;
3. Avaliar as respostas imunológicas de macrófagos infectados com os isolados LCL e DCL de *L. (L.) amazonensis*.
4. Comparar o processo de infecção *in vivo* em camundongos C57BL/6 infectados com os isolados LCL e DCL de *L. (L.) amazonensis*.

3 METODOLOGIA

3.1 Parasitos

L. (L.) amazonensis (IFLA/BR/67/PH8) e isolados de *L. (L.) amazonensis* (**Tabela 2**) obtidos de pacientes com LCL ou DCL (França-Costa et al., 2012), cedidos pela Professora Dra. Valeria de Matos Borges (Fiocruz, Salvador-Bahia, Brasil), foram cultivados na forma promastigota em meio Grace suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 25 °C. A manutenção das culturas foi feita com repique semanal (4-7 dias).

A cultura de amastigotas axênicos foi feita com cultura estacionária tardia (7 dias) onde foi acrescentado meio 199 (relação 1:1) suplementado com 2.5 mg/ml hemina, 10 mM adenina, 1% penicilina/estreptomicina, tampão succinato pH 4,5, 20% SFB e 200 mM de glutamina. Após 16 horas (h) de incubação a 25 °C, a cultura foi incubada a 32 °C e utilizada no quinto dia de cultura.

A recuperação de amastigotas de lesão foi feita após a inoculação de 1×10^6 promastigotas de fase estacionária na pata posterior de camundongos BALB/c fêmeas. Após 7 semanas de infecção, os camundongos foram sacrificados e a lesão foi processada com homogenizador. Os parasitos foram obtidos após lavagens e incubação em meio RPMI suplementado com 10% SFB por 16 h para retirar o excesso de células.

Tabela 2 - Isolados de *L. (L.) amazonensis* associados a pacientes com LCL e DCL. Tabela adaptada de França-Costa et al. (2012) (PLoS ONE vol. 7)

Cepa	Código internacional	Origem (Estado)	Patología
BA69	MHOM/BR/1985/BA 69	Bahia	LCL
BA73	MHOM/BR/1985/BA 73	Bahia	LCL
BA113	MHOM/BR/1987/BA113	Bahia	LCL
BA115	MHOM/BR/1987/BA115	Bahia	LCL
BA125	MHOM/BR/1987/BA125	Bahia	LCL
BA106	MHOM/BR/1986/BA106	Bahia	DCL
BA199	MHOM/BR/1989/BA199	Maranhão	DCL
BA276	MHOM/BR/1989/BA276	Maranhão	DCL
BA336	MHOM/BR/1990/BA336	Maranhão	DCL
BA700	MHOM/BR/1997/BA700	Maranhão	DCL
BA760	MHOM/BR/1999/BA760	Maranhão	DCL
BA820	MHOM/BR/2002/BA820	Maranhão	DCL

Os promastigotas metacíclicos foram purificados por centrifugação com gradiente de Ficoll 400 como descrito por E. de Almeida Marques-da-Silva e colaboradores (2008). Brevemente, os parasitos de cultura estacionária (6-7 dias) foram lavados 2 vezes em PBS 1X a 1388 x g por 10 min. No máximo 5×10^8 parasitos foram ressuspensos em 2 ml de RPMI. Paralelamente, a coluna de Ficoll foi preparada adicionando 3 mL de Ficoll 20% e 4 mL de Ficoll 10% em tubo de tipo FALCON. Os 2 mL de parasitos foram adicionados sobre a coluna de Ficoll 10% evitando que as fases misturassem (**Apêndice A**). A coluna de Ficoll foi centrifugada a 1070 x g por 15 min a temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fração que permaneceu em cima e entre o Ficoll 10% foi coletada (máximo 3 mL para evitar contaminação com promastigotas procíclicos) e lavada 3 vezes com PBS 1X a 1889 x g por 10 min. Após a última lavagem, os

parasitos foram contados em câmara de Neubauer para confirmar o rendimento da purificação (55).

3.2 Cultura de macrófagos e infecção *in vitro*

Macrófagos utilizados nos ensaios de infecção *in vitro* foram obtidos como descrito por Cortez e colaboradores (2011). Para isso, camundongos fêmeas C57BL/6 foram sacrificados e o fêmur e a tibia recuperados para a diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea. O lavado foi feito com seringa de 5 mL e agulha 24G com meio RPMI. Uma vez completa a extração total da medula óssea, o conteúdo foi filtrado com filtro de 70 μ m e posteriormente lavado a 347 x g por 10 min. As células totais obtidas na extração foram contadas com câmara de Neubauer e ressuspensas em meio RPMI suplementado com 20% de SFB e 15% de sobrenadante de cultura de fibroblastos (linhagem celular L929). Foram semeadas 4×10^6 células totais por placa de petri em 10 ml de meio e mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após 4 dias de incubação, foi acrescentado o volume equivalente de meio RPMI suplementado e no dia 7 de cultura, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e descoladas com raspador de células em 5 mL de PBS. Os macrófagos recuperados foram lavados uma vez por centrifugação a 347 x g por 10 min, contados em câmara de Neubauer e semeados em lâminula circular de vidro em placas de 24 poços (2×10^5 células por poço) e em placas de 6 poços (2×10^6 células por poço). Os macrófagos foram incubados por 24 h em estufa de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ antes de serem usados nos ensaios de infecção *in vitro* (44).

Os macrófagos derivados de medula óssea foram infectados com amastigotas (axênicos ou de lesão) ou promastigotas de isolados de *L. (L.) amazonensis* em proporção (MOI do inglês *multiplicity of infection*) de 2:1 ou 5:1, respectivamente. As infecções foram realizadas com meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 5% de sobrenadante de L929. Para as infecções com amastigotas foi feita infecção a 33 °C com 5% de atmosfera de CO₂ por 1 h enquanto com promastigotas a infecção foi feita por 2 h nas mesmas condições. Após o tempo de infecção as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e acrescentado meio RPMI suplementado. As células foram incubadas a 33 °C com 5% de atmosfera de CO₂ por diferentes tempos (3, 6, 9, 12, 48 e 96 h). Depois de cada tempo de infecção, as células nas placas de 24 poços com lâminulas foram fixadas com metanol puro (para imunofluorescência) por 5 min e incubadas com solução de

bloqueio e permeabilização {Saponina 0,1%, albumina sérica bovina (BSA) 1%, azida sódica 1% em TBS 1X}. As células nas placas de 6 poços foram lisadas para obtenção de proteína total ou RNA.

3.3 Imunofluorescência indireta

Após a fixação das células nas lamínulas circulares com metanol e permeabilização das mesmas, prosseguiu-se à imunofluorescência indireta para marcar as células e os parasitos com anticorpos específicos e assim poder determinar o perfil de infecção dos isolados em macrófagos. Os anticorpos utilizados foram: anticorpo policlonal anti-*Leishmania* obtido do soro de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis* BA125 e BA336, e anticorpo policlonal anti-LAMP1 (proteína 1 associada à membrana lisossomal) utilizado para marcar lisossomo e evidenciar a presença do vacúolo parasitóforo. O anticorpo anti-LAMP1 foi incubado por 16 h a 4 °C em uma diluição de 1:50 com solução permeabilizadora. Após a incubação com o anticorpo primário, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado à Alexa 568 (marcação vermelha) por 1 h. Posteriormente, as células foram lavadas 5 vezes com PBS 1X e 1 vez com água deionizada e incubadas em câmara úmida a temperatura ambiente com o anticorpo anti-*Leishmania* em uma diluição de 1:200. Depois de 2 h, as células foram lavadas como descrito anteriormente e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à FITC ou Alexa 488 (marcação verde) e DAPI (marcador nuclear fluorescente que liga-se à sequências de DNA enriquecidas de adenina e timina) em diluição 1:1000 por 1 h. As lamínulas foram conservadas por no máximo 3 semanas em *Prolong* (Life Technologies). Foram contadas mínimo 300 células totais, células infectadas e total de parasitos utilizando o microscópio DMI6000B/AF6000 (Leica) acoplado a um sistema de câmera digital (DFC 365 FX) e analisadas no programa incorporado ao sistema Leica AF6000 e no programa *Image J*. Para cada infecção foram contadas 3 lamínulas.

3.4 PCR em Tempo Real (qPCR)

O RNA total das células infectadas com os isolados de *L. (L.) amazonensis* foi extraído com o kit *DirectZol* (Zymo Research) ou *Quick-RNA MiniPrep* (Zymo Research). Após a

extração, o RNA foi ressuspensionado em água livre de RNase e quantificado no NanoDrop (Thermo Scientific). Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), na presença de 0,5 mM dNTP e 20 µM oligo(dT). A amplificação dos transcritos foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems* - Life Technologies) de qPCR, com 30 ng de cDNA, 0,6 µM de cada primer (*forward* e *reverse*) (**Tabela 3**), utilizando *Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Scientific). Cada reação foi feita em triplicata. O programa completo de qPCR utilizado foi um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s; anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s. Os dados finais foram normalizados segundo os níveis de expressão dos genes controle (HPRT1 e UbH) pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_q}$ descrito por Livak e colaboradores (2001) (56).

Tabela 3 - Lista de primers utilizados na reação de PCR em tempo real

Gene	Primer <i>Forward</i>	Primer <i>Reverse</i>
CD200	5' AACCTTGATTGTGACATGGC 3'	5' AGGATAAATGTCACAGAGCTGGG 3'
CD200R1	5' AGGAGGATGAAATGCAGCCTTA 3'	5' TGCCTCCACCTTAGTCACAGTATC 3'
HPRT1	5' TCAGTCAACGGGGGACATAAA 3'	5' GGGGCTGTACTGCTTAACCAG 3'
iNOS	5' CAGCTGGGCTGTACAAACCTT 3'	5' CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG 3'
IL-1β	5' TGGTGTGTGGACGTTCCCATTA 3'	5' CAGCACGAGGCTTTTTTGTG 3'
LYST	5' AGCAGAAGGTGATAGACCAGAA 3'	5' CCCACACTTGGATCATCAATGC 3'
AMA2	5' CATCTTCGTGTACGGCTTTGCGTT 3'	5' TTCGGTAAGTCACCACCATGAGCA 3'
UbH	5' AACGTGAACAACCTGGATGTGCGTC 3'	5' ATGGTACCAAGCTTGACACATGCC 3'

3.5 Imunoprecipitação

O protocolo de Imunoprecipitação foi feito com o kit *Pierce Crosslink Immunoprecipitation* (Thermo Scientific) de acordo com o fabricante. Inicialmente foram preparadas as resinas com proteína A/G ligada a anticorpos específicos (CD200 e CD200R) numa concentração total de 2 µg por coluna.

A proteína total das células infectadas com isolados de *L. (L.) amazonensis* foi recuperada utilizando tampão de lise e lavado (*lysis/wash buffer*: 0,025 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,001 M

EDTA, 1% NP-40 e 5% glicerol a pH 7,4) e 1X de inibidor de protease sem EDTA (*Halt protease inhibitor cocktail*; Thermo Scientific). O lisado foi centrifugado a 13.000 x g por 10 min e a amostra pré-lavada por 1 h a 4 °C. Posteriormente a amostra foi incubada em agitação na resina com anticorpo por 16 h a 4 °C ou 2 h a temperatura ambiente. Em seguida foi feita a eluição do antígeno com tampão de eluição a pH 2,8 e resultado foi analisado por SDS-PAGE e *Western Blot*.

3.6 Gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) e *Western Blot*

A quantificação de proteína foi feita pelo *BCA Protein Assay kit* (Pierce). A separação das proteínas totais foi realizada em gel de poliacrilamida 12% com 0,4% de SDS (SDS-PAGE) em tampão contendo Tris, glicina e SDS no Sistema de eletroforese Mini-Protean (BioRad) a 80 V por 30 min e posteriormente a 120 V. Foi utilizado 2 µL de marcador de peso *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). O gel foi transferido a membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences) a 250 mA por 2 h em tampão com Tris, glicina e 20% de metanol. Posteriormente as membranas foram bloqueadas com 5% leite desnatado em TBS-T 0,1% por 1 h a temperatura ambiente ou 16 h a 4 °C. Os anticorpos primários foram incubados por 2 h e os secundários por 1 h em 2% de leite e TBS-T 0,1%. Finalmente, as membranas foram reveladas utilizando o kit de quimiluminescência *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific) e o equipamento *ChemiDoc™ XRS+* (BioRad).

O *Western Blot* das membranas com amostras de imunoprecipitação foram bloqueadas com 2% de leite e os anticorpos incubados com 0,2% de leite por 16 h a 4 °C (anticorpo primário) e 1 h a temperatura ambiente (anticorpo secundário).

3.7 Infecção *in vivo*

Para o ensaio de infecção *in vivo* foram utilizados cinco camundongos C57BL/6 fêmeas de 8-10 semanas de idade para cada grupo. Os animais foram infectados via subcutânea na pata posterior com 1×10^6 promastigotas da fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* PH8, BA125 e BA336. Foi medida a espessura e largura da pata infectada e não infectada (controle)

semanalmente até a nona semana pós-infecção onde todos os camundongos foram sacrificados. O tecido da lesão foi processado como descrito anteriormente com algumas modificações (57). Brevemente, as lesões foram lavadas 3 vezes em álcool 70% por 10 min e maceradas em homogeneizador com meio RPMI. O conteúdo foi filtrado em filtro de 70 μ m, lavado por centrifugação a 1388 x g por 10 min e ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI. Para fazer a quantificação de parasitos na lesão, placas de 96 poços foram previamente semeadas com meio 199. No primeiro poço foi adicionado o macerado da lesão e foi feita a diluição limitante com fator de diluição de 10 até o último poço. A placa foi incubada a 25 °C por 7 dias para a confirmação da presença de promastigotas. A análise de quantificação foi realizada utilizando o programa ELIDA (ELIDA software Carl Tarswel). A quantificação de cada lesão foi realizada por quadruplicata.

Camundongos BALB/c foram infectados com isolados de *L. (L.) amazonensis* até a lesão atingir tamanho máximo de 6 mm. Os amastigotas foram recuperados como descrito anteriormente, e processados para verificar a exposição de ligantes de anexina-V na membrana. Parte dos amastigotas de lesão recuperados foram utilizados em ensaios de infecção *in vitro* em macrófagos de medula óssea de camundongo C57BL/6.

3.8 Exposição de ligantes de anexina-V por FACS

A detecção da exposição de ligantes de anexina-V na membrana dos amastigotas de lesão foi feita como descrito por de Freitas Balanco e colaboradores (2001) com algumas modificações. Brevemente, os amastigotas de lesão foram incubados por 16 h a 33 °C em meio Grace suplementado com 10% SFB, lavados duas vezes em PBS e ressuspensionados em tampão de ligação à anexina pH 7,4 (100 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂ e 1 mM MgCl₂). Para cada 100 μ L de suspensão de amastigotas foi utilizado 5 μ L de anticorpo anexina-V conjugado com FITC e 10 μ g/ml de iodeto de propídio (PI). A incubação foi feita a temperatura ambiente por 15 min. Os amastigotas foram lavados acrescentando 400 μ L de tampão de ligação à anexina e incubados em gelo para posterior leitura por citometria de fluxo (Guava Easycyte mini System/ programa Guava CytoSoft 4.2). Como controle negativo foi utilizado anticorpo anexina-V conjugado com biotina sem a posterior incubação com estreptavidina (58).

3.9 Perfil imunológico: detecção de citocinas e nitrito

Para avaliar o perfil imunológico das infecções *in vitro* de macrófagos derivados de medula óssea com isolados de *L. (L.) amazonensis*, foi coletado o sobrenadante das infecções dos tempos de 24 e 96 h de infecção.

Para quantificar a produção de IL-1 β foi utilizado o kit mouse IL-1 β (BD). Durante todo o protocolo foi utilizado o tampão carbonato de sódio pH 9,5 e PBS com 10% SFB para a preparação dos anticorpos e da enzima. PBS-T 0,05% foi utilizado para fazer as lavagens entre as diferentes incubações. O anticorpo de captura foi incubado por 16 h a 4 °C em placa de 96 poços. Após o período de incubação, o anticorpo foi bloqueado com PBS e 10% de SFB por 1 h a temperatura ambiente. Uma vez bloqueado o anticorpo de captura, a curva da cinética de concentração de citocina (começando com uma concentração de 2 ng/ml e diluindo 10 vezes) e as amostras foram incubados por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente foi incubado o anticorpo de detecção por 1 h e a enzima por 30 min. Por último, a solução TMB (Substrate Reagent Set; BD Opt EIA) foi incubada para reagir com o anticorpo de detecção conjugado com peroxidase. A reação foi parada com ácido fosfórico e a leitura da absorbância foi feita numa longitude de onda de 450 nm.

Para a quantificação de IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, TNF e IFN- γ foi utilizado o CBA (Cytometric Bead Array) *Mouse inflammation kit* (BD) como descrito pelos fabricantes. A curva standard utilizada foi de 5 ng/mL até 20 pg/mL. A análises da presença de citocinas pelo CBA foi feita no FACSDiva.

A quantificação de nitrito foi feita unicamente com sobrenadante de 96 h de infecção utilizando o Measure-iTTM High-Sensitivity Nitrite Assay kit (Invitrogen). A leitura foi feita por fluorescência com uma excitação e emissão de 365/450 nm respectivamente no aparelho SpectraMax i3.

3.10 Análise estatística

Todos os ensaios de infecção *in vitro* foram feitos por triplicata biológica, e os ensaios *in vivo* com um n=5. As análises estatísticas foram feitas com teste *t-student* pareado no programa *GraphPad prism* 5.01. Valores estatisticamente significativos foram considerados com valor P < 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Infecção *in vitro* de macrófagos com isolados de *L. (L.) amazonensis*

4.1.1 Infecção com isolados representativos de LCL e DCL

Resultados publicados por França-Costa e colaboradores (2012) mostraram que o fenótipo de infecção *in vitro* de macrófagos F1 (BALB/c x C57BL/6) com isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL e DCL é claramente diferente entre estes dois grupos. Com o propósito de confirmar as diferenças na infectividade destes parasitos, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram infectados por 1, 48 e 96 h com amastigotas axênicos, amastigotas de lesão e promastigotas de fase estacionária. Independente da forma do parasito utilizada, os resultados confirmaram as diferenças na capacidade infectiva dos isolados BA125 (LCL) e BA336 (DCL) de *L. (L.) amazonensis*. Contrário ao observado anteriormente, o isolado BA125 apresentou uma maior infectividade que o isolado BA336 comparando com a cepa controle PH8. Como mostrado na **figura 6**, os amastigotas axênicos dos três isolados foram fagocitados de forma semelhante 1 hora após a infecção. No entanto, o isolado BA336 conseguiu sobreviver dentro do vacúolo parasitóforo sem multiplicar-se até 96 h de infecção. O perfil infectivo do isolado BA125 foi parecido ao da cepa PH8, os quais mostraram um aumento na carga parasitária ao longo do tempo.

Figura 6 - Multiplicação de amastigotas axênicos dos isolados de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos de camundongos C57BL/6. Macrófagos derivados de medula (BMM) no sétimo dia de cultura foram semeados e infectados com amastigotas axênicos de PH8, LCL (BA125) e DCL (BA336) em proporção 2:1. Após 1 h, a infecção foi interrompida. Parte dos macrófagos foram mantidos a 33 °C por 48 e 96 h pós-infecção. Ao finalizar cada tempo de infecção, as células foram processadas para imunofluorescência, para posterior contagem do número de parasitos em macrófagos totais. Os resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de triplicatas. Diferenças significativas foram analisadas pelo método *t de student* e consideradas significativas com valor * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ comparando cada tempo em relação à infecção com PH8.

Além do aumento no número de parasitos por células totais, o tamanho do vacúolo parasitóforo foi diretamente proporcional à carga parasitária. A cepa PH8 e o isolado BA125 tiveram um maior número de amastigotas e uma maior expansão do vacúolo parasitóforo (96 h após a infecção) comparado com BA336 que não teve multiplicação intracelular, e portanto o vacúolo parasitóforo permaneceu reduzido (**Figura 7**). O fenótipo de infecção com amastigotas axênicos em macrófagos C57BL/6 foi confirmado mediante a realização de três ensaios biológicos independentes onde teve variações no número total de parasitos intracelulares. No

entanto, foi muito importante conseguir observar que o fenômeno biológico da capacidade de multiplicação de BA125 e a inabilidade de BA336 manteve-se nos três experimentos.

Figura 7 - Imagem representativa de macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados com amastigotas axênicos dos isolados PH8, BA125 e BA336 de *L. (L.) amazonensis*. As imagens representam os tempos de infecção de 1 e 96 h. As imagens foram obtidas por microscopia de contraste de fase (Fase) e microscopia de imunofluorescência, combinando (Merge) as marcações dos anticorpos e sonda utilizados. Azul: DAPI para marcação do núcleo; Vermelho: anticorpo anti-LAMP1 para marcação de lisossomos; e Verde: anticorpo policlonal anti-*Leishmania* obtido do soro de camundongos C57BL/6 infectados com cada isolado.

Já que os amastigotas axênicos foram obtidos através da diferenciação de promastigotas em cultura, quisemos confirmar o perfil de multiplicação observado utilizando amastigotas de lesão. Para isso, foram infectados camundongos BALB/c com promastigotas de fase estacionária. Após 7 semanas de infecção os amastigotas foram recuperados e utilizados para infectar os macrófagos

de camundongos C57BL/6. Como mostrado na **figura 8**, e confirmando o observado anteriormente com amastigotas axênicos, os isolados BA125 e BA336 tiveram um padrão de infecção diferente. Enquanto BA125 permaneceu com um perfil semelhante ao da cepa PH8 evidenciando multiplicação intracelular ao longo do tempo, BA336 teve a capacidade infectiva reduzida, mantendo constante o número total de parasitos no vacúolo parasitóforo. Isto ajudou a confirmar que os amastigotas axênicos utilizados nos ensaios eram amastigotas bem diferenciados em cultura. Este ensaio foi realizado só uma vez já que o padrão de infecção foi semelhante ao observado nos outros experimentos.

Figura 8 - Multiplicação de amastigotas de lesão de *L. (L.) amazonensis* PH8, BA125 e BA336 em macrófagos de camundongos C57BL/6. Amastigotas de lesão (MOI 2:1) foram utilizados para infectar macrófagos derivados de medula (BMM) de camundongos C57BL/6 por 1 h a 33 °C. Parte dos macrófagos foram processados para imunofluorescência e a outra parte foi mantida a 33 °C por 48 e 96 h para posterior processamento por imunofluorescência. Os resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de triplicatas. Diferenças significativas foram analisadas pelo método *t de student* ** $p < 0,005$ comparando cada isolado entre 1 e 96 h.

O perfil infectivo de amastigotas no modelo de camundongo C57BL/6 foi bem estabelecido mostrando claramente as diferenças existentes entre diferentes cepas de *L. (L.) amazonensis*. Entretanto, ainda não estava claro se o fenótipo de infecção observado com as formas amastigotas do parasito mudava utilizando as formas promastigotas de fase estacionária. Para isso, foi feito um experimento preliminar onde foram infectados macrófagos de camundongo C57BL/6 por 2 h e mantidos até 96 h. Pela contagem de parasitos em células totais foi avaliado o perfil infectivo, mostrando resultados muito semelhantes ao visto anteriormente nas **figuras 6 e 8 (Figura 9)**.

Figura 9 - Multiplicação de promastigotas da fase estacionária em macrófagos de camundongos C57BL/6. Promastigotas dos isolados PH8, BA125 (LCL) e BA336 (DCL) de *L. (L.) amazonensis* foram mantidos em cultura em meio Grace suplementado com 10% de SFB, a 25 °C por 6 dias até atingirem a fase estacionária. Macrófagos derivados de medula (BMM) foram infectados com MOI 2:1 por 2 h a 33 °C e depois foram mantidos na mesma temperatura até 96 h. Os resultados correspondem à média $\pm$

desvio padrão de triplicata técnica. Diferenças significativas foram analisadas pelo método *t de student* $**p < 0,005$, sempre comparando os isolados com a cepa controle (PH8).

Portanto, foi comprovado que independente da forma do parasito utilizada na infecção experimental em macrófagos de camundongos C57BL/6, o perfil infectivo dos isolados BA336 (DCL) e BA125 (LCL), e da cepa PH8 (utilizada como controle) é semelhante, mostrando as mesmas diferenças no fenótipo entre BA336 e BA125.

4.1.2 Infecção com diferentes isolados de L. (L.) amazonensis associados à LCL e DCL

Uma vez avaliado o perfil de infecção com dois isolados representativos de LCL e DCL, foram feitos experimentos com um maior número de isolados (**Tabela 2**). Inicialmente foram infectados camundongos BALB/c com promastigotas de fase estacionária. Após a formação da lesão, os amastigotas foram recuperados e infectados em macrófagos C57BL/6 até 96 h (**Figura 10**). O resultado do número de parasitos por célula infectada evidencia as diferenças observadas anteriormente com BA125 e BA336. Da mesma forma, foi possível observar diferenças na multiplicação intracelular dos parasitos de BA115 (LCL) e BA760 (DCL) com BA125 (LCL). No entanto, o resultado observado com BA760 mostra o contrário do esperado, já que anteriormente havia sido observado que este isolado associado à DCL tem uma capacidade infectiva semelhante à BA125 e BA276. Isolados associados à LCL ou DCL apresentam perfis de infecção diferentes entre eles e não é possível agrupar o fenótipo infectivo em macrófagos de C57BL/6 com a doença da qual os parasitos estão associados.

Figura 10 - Multiplicação de amastigotas de lesão de isolados de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos de camundongos C57BL/6. Amastigotas de lesão de camundongos BALB/c infectados com os diferentes isolados (Tabela 2) de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL (vermelho) e DCL (azul) foram recuperados e utilizados para infectar macrófagos derivados de medula (BMM) de camundongos C57BL/6 (MOI de 2:1). A infecção foi mantida até 96 h a 33 °C e depois processada para determinar o número de amastigotas no total de macrófagos infectados. Foi feita imunofluorescência com anticorpos anti-LAMP1, anti-*Leishmania* e marcação com DAPI. Os resultados correspondem à média ± desvio padrão de triplicata técnica. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com valor * $p < 0.05$ e ** $p < 0.005$ comparados com os resultados da infecção do isolado BA125 (LCL).

Já que que o fenótipo de infecção não varia dependendo da forma do parasito utilizada e a transformação de amastigotas axênicos a partir de uma cultura enriquecida em promastigotas metacíclicos com os isolados de *L. (L.) amazonensis* não foi bem sucedida, decidimos continuar trabalhando com promastigotas de fase estacionária. Desta forma foi possível comparar o perfil infectivo de um maior número de isolados de *L. (L.) amazonensis*. Para isto, foram feitas duas infecções independentes em macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 por 2 h

e mantidas até 96 h. Além disso, para confirmar que a proporção de parasitos da infecção fosse semelhante, analisamos a taxa de promastigotas metacíclicos pela purificação dos mesmos com gradiente de Ficoll a partir da cultura de fase estacionária utilizada para a infecção (**Apêndice B e C**). Como mostra a **figura 11**, independente da doença da qual os parasitos são associados, há diferenças no fenótipo de infecção até 96 h. Com este resultado foi possível separar os isolados em parasitos muito infectivos (BA125, BA276 e BA760) e pouco infectivos (BA115, BA336 e BA106). Contudo, os isolados BA760 e BA115 mostraram resultados conflitantes já que o padrão de infecção destes parasitos não foi constante nas diferentes infecções tanto com promastigotas de fase estacionária como com amastigotas. Além disso, os isolados pouco infectivos não apresentaram multiplicação dentro do vacúolo parasitóforo. Por isso foi analisada a viabilidade destes parasitos dentro do macrófago. Isto confirmou que estes parasitos não tem a capacidade de multiplicar-se, mas sim de sobreviver dentro da célula (**Figura 12**).

Figura 11 - Capacidade infectiva de isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL e DCL. Macrófagos derivados de medula (BMM) de camundongos C57BL/6 foram infectados com promastigotas de fase estacionária de diferentes isolados (Tabela 2) de LCL (vermelho) e DCL (azul) por 2 h e incubados até 96 h. Por microscopia de imunofluorescência foram contados o número total de

parasitos e o total de células infectadas. O gráfico corresponde à média $\pm$ desvio padrão de triplicata técnica e representativo de dois ensaios biológicos independentes.

Figura 12 - Viabilidade de isolados de *L. (L.) amazonensis* dentro do vacúolo parasitóforo de macrófagos 96 h após a infecção. Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 foram infectados com promastigotas de fase estacionária dos isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL (vermelho) e DCL (azul). Após 96 h de infecção, as células foram incubadas a 25 °C em meio Grace suplementado com 10% SFB e 3 dias depois os promastigotas foram contados, obtendo uma estimativa da viabilidade dos amastigotas dentro do vacúolo. O gráfico representa a média de duplicatas $\pm$ desvio padrão e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com valor * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$ sempre comparando os valores com o isolado BA125 (LCL).

Em uma infecção realizada com 11 isolados LCL e DCL, observou-se que mais uma vez que agrupando os isolados pela doença associada não é possível observar diferenças significativas na multiplicação intracelular após 96 h de infecção (**Figura 13**). Curiosamente, foi possível observar dois isolados associados à DCL com um perfil menos infectivo comparado aos outros isolados tanto LCL quanto DCL, onde a infectividade é maior.

Figura 13 - Infecção com isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL e DCL. Macrófagos derivados de medula (BMM) de camundongos C57BL/6 foram infectados por 2 h com promastigotas de fase estacionária de 11 isolados associados à LCL (n=6) e DCL (n=5) numa proporção de 5:1. Após 96 h de infecção, foi contado o número total de parasitos por macrófago infectados. O gráfico representa um ensaio biológico que evidencia o perfil infectivo de isolados de *L. (L.) amazonensis*.

4.2 Envolvimento de CD200 na infecção por isolados de *L. (L.) amazonensis*

4.2.1 Cinética da expressão gênica de *cd200* na infecção com PH8, BA125 e BA336

Como visto anteriormente por Cortez e colaboradores (2011), a indução de CD200 é importante na infecção de macrófagos com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Por isso, após determinar experimentalmente a capacidade infectiva dos isolados de *L. (L.) amazonensis*, fomos verificar se havia diferenças no perfil de indução de CD200 entre os diferentes isolados. Inicialmente foram realizados ensaios com a cepa controle PH8 e os isolados BA125 (LCL) e

BA336 (DCL) para estabelecer os níveis de expressão gênica de *cd200* no processo infectivo. Para isto, foram infectados macrófagos derivados de medula (BMM) de camundongos C57BL/6 com promastigotas de fase estacionária por 2, 6, 12, 24 e 96 h, e os níveis de transcritos foram analisados por qPCR. Nossos resultados mostraram que 2 h após a infecção os parasitos de *L. (L.) amazonensis* não tem a capacidade de induzir a expressão de *cd200*. No entanto, depois de 6 h de infecção os três parasitos apresentaram indução do transcrito em diferentes níveis (**Figura 14**). Curiosamente, 6 h após a infecção os promastigotas já estão transformando-se em amastigotas. Isto foi confirmado pela quantificação da expressão do gene *ama2* (*amastin-like 2*) que codifica a proteína amastina, uma proteína de superfície específica de amastigotas (**Apêndice D**). Nos outros tempos foi evidenciada uma queda na indução da expressão, com um aumento novamente após 96 h de infecção (**Figura 14**).

Figura 14 - Cinética da expressão gênica de *cd200* durante a infecção de macrófagos com isolados de *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula (BMM) de camundongos C57BL/6 foram infectados com promastigotas de fase estacionária dos isolados BA125 (LCL), BA336 (DCL) e PH8 com MOI 5:1. A infecção foi feita por 2 h e mantida até 6, 12, 24 ou 96 h e os níveis de expressão gênica de *cd200* foram analisados por qPCR. Os resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de um ensaio biológico com triplicata técnica. Os resultados foram calculados utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$. *HPRT1* foi utilizado como gene controle. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com valor * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ e *** $p < 0.0005$ comparando os isolados BA125 ou BA336 com PH8.

Já que não se conhecia que promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tinham a capacidade de induzir a expressão de *cd200* durante a infecção em macrófagos, foi importante estabelecer pela primeira vez, a cinética de modulação deste gene comparando entre os isolados representativos (BA125 e BA336) e a cepa controle (PH8) para posteriormente comparar com todos os isolados. Além do mais, foi importante determinar as diferenças na capacidade de indução gênica entre BA125 e BA336 no começo da infecção já que isto pode estar relacionado às diferenças na capacidade infectiva dos isolados.

4.2.2 Expressão gênica de *cd200* na infecção com diferentes isolados de *L. (L.) amazonensis*

Uma vez verificado que promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tem a capacidade de induzir a expressão de *cd200* em diferentes tempos de infecção (exceto no primeiro momento - 2 h), foi importante analisarmos o perfil de expressão com os diferentes isolados de *L. (L.) amazonensis*. Para isto, escolhemos 3 tempos de infecção: 6, 9 e 96 h. Tempos mais curtos não foram avaliados já que só se observou a importância de *cd200* a partir de 6 h de infecção quando os promastigotas estão transformando-se em amastigotas. Contrário ao esperado, os isolados BA125 e BA336 foram os únicos isolados que tiveram capacidade de modular positivamente a expressão de *cd200* (**Figura 15**), mostrando resultados parecidos ao observado anteriormente (**Figura 14**). Independente da associação dos parasitos com o tipo de doença, os isolados BA115 (LCL), BA276 (DCL), BA760 (DCL) e BA106 (DCL) mantiveram níveis de expressão semelhantes ao das células não infectadas. No entanto, após 96 h de infecção com o isolado BA276, foi possível observar um aumento da expressão do transcrito, embora fosse menor que os níveis na infecção com BA125 e BA336. Este resultado não suporta a ideia de que *cd200* é importante para a infectividade e multiplicação intracelular do parasito. Contudo, para poder confirmar isto, é importante verificar a presença da proteína nas infecções.

Figura 15 - Expressão gênica de *cd200* na infecção com isolados de *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos foram infectados com promastigotas de fase estacionária de isolados associados à LCL (vermelho) e DCL (azul), por 2 h com MOI 5:1, e incubados até 6, 9 ou 96 h. Os resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de dois ensaios biológicos com triplicata técnica. Os resultados foram calculados utilizando o método de $2^{-\Delta \Delta Cq}$. *HPRT1* foi utilizado como gene controle.

A associação entre a infectividade e a capacidade de induzir *cd200* na infecção com promastigotas não foi evidenciada. Assim decidiu-se avaliar a modulação do transcrito na infecção com amastigotas de lesão. Para isso, foram infectados camundongos BALB/c com promastigotas de fase estacionária e mantidos por 6 semanas até o aparecimento da lesão. Após recuperar os amastigotas, macrófagos derivados de medula (BMM) de camundongos C57BL/6 foram infectados por 1 h e mantidos até 96 h para avaliar os níveis de expressão gênica de *cd200*. Como a **figura 16** mostra, todos os isolados induziram o mesmo nível de transcrito em 1 h de infecção sem ter diferença significativa em relação as células não infectadas. No entanto, em 96 h após a infecção foi possível visualizar as diferenças na capacidade de indução de *cd200* entre os isolados.

Figura 16 - Expressão de *cd200* na infecção de macrófagos com amastigotas de lesão de diferentes isolados de *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados de medula (BMM) de camundongos C57BL/6 foram infectados com amastigotas recuperados das lesões de camundongos BALB/c infectados com os diferentes isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL (vermelho) e DCL (azul) por 1 h e mantidos até 96 h, e os níveis de transcrito de *cd200* na infecção foram avaliados. Os resultados correspondem a média $\pm$ desvio padrão de triplicata técnica, calculados utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$. *HPRT1* foi utilizado como gene controle. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com valor $**p < 0.005$ e $***p < 0,0005$ comparados com o tempo de 1 hora entre cada isolado.

Embora todos os isolados aumentaram os níveis de transcrito em 96 h comparado com 1 h de infecção, os isolados BA115 (LCL) e BA336 (DCL) (pouco infectivos) tiveram um aumento de *cd200* significativamente menor ao comparado com o nível de BA125 (LCL), BA276 (DCL) e BA760 (DCL) (isolados muito infectivos). Analisando este resultado se é possível sugerir que a presença de *cd200* na infecção de macrófagos com amastigotas de lesão de isolados de *L. (L.) amazonensis* favorece a capacidade infectiva dos parasitos.

4.2.3 Níveis protéicos de CD200 na infecção de macrófagos com isolados de *L. (L.) amazonensis*

Após verificado um aumento nos níveis de transcritos de *cd200* durante a infecção por isolados de *L. (L.) amazonensis*, fomos verificar os níveis protéicos de CD200 durante o processo infectivo com os isolados. Para isso, macrófagos de medula de camundongos C57BL/6 foram infectados com promastigotas de fase estacionária de diferentes isolados de *L. (L.) amazonensis* por 2 h, e mantidos até 6, 9 e 96 h. A indução de expressão da proteína CD200 nas células infectadas com os diferentes parasitos foi confirmada por imunoprecipitação e *Western Blot*. Uma vez que os isolados BA125, BA336 e PH8 apresentaram um aumento na expressão gênica após 6 hora de infecção, os níveis proteicos de CD200 foram avaliados após este tempo. Os resultados mostram que todos os isolados possuem capacidade de induzir CD200 em 6 h de infecção, de forma semelhante (**Figura 17**).

Figura 17 - Expressão de CD200 na infecção de macrófagos com isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL ou DCL. Ensaio de imunoprecipitação de macrófagos derivados de medula (BMM) de camundongos C57BL/6 infectados por 2 h e mantidos até 6 h, com promastigotas de fase estacionária de BA125 (1); BA276 (2); BA760 (3); BA336 (4); BA106 (5); e BA115 (6). As amostras foram analisadas por *Western Blot* (WB), comparando a presença de banda (47 kDa) na

infecção com os isolados e no controle de macrófagos não infectados (**NI**). Extrato total de esplenócito (**S**) foi utilizado como controle positivo da técnica. Actina foi utilizado como controle de quantidade de proteína utilizada na imunoprecipitação (**input**).

É interessante observar que assim como nos níveis de expressão gênicos, a expressão da proteína aumenta ao mesmo tempo que os promastigotas estão transformando-se em amastigotas. Isto corrobora com o que já havia sido evidenciado por Cortez e colaboradores (2011): que as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* têm a capacidade de induzir CD200 no processo infectivo.

Uma vez que todos os isolados associados à LCL ou DCL são de *L. (L.) amazonensis*, é importante estudar tempos mais avançados onde possivelmente consiga-se observar diferenças no perfil de modulação da CD200. Portanto, em 9 h após a infecção começaram a ser visíveis as diferenças na expressão de CD200 no processo infectivo (**Figura 18**). Os isolados BA125 (LCL), BA276 (DCL) e BA336 (DCL) continuaram tendo níveis de expressão semelhantes aos observados em 6 h de infecção. Contudo, os outros isolados (BA760, BA115, BA106) diminuíram a capacidade de expressão de CD200 comparado ao tempo anterior.

Figura 18 - Expressão de CD200 na infecção de macrófagos com isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL ou DCL. Ensaio de imunoprecipitação de macrófagos derivados de medula (BMM) de camundongos C57BL/6 infectados por 2 h e mantidos até 9 h, com promastigotas de

fase estacionária de BA125 (1); BA276 (2); BA760 (3); BA336 (4); BA106 (5); e BA115 (6). As amostras foram analisadas por *Western Blot* (WB), comparando a presença de banda (47 kDa) na infecção com os isolados e no controle de macrófagos não infectados (NI). Extrato total de esplenócito (S) foi utilizado como controle positivo da técnica. Actina foi utilizado como controle de quantidade de proteína utilizada na imunoprecipitação (input).

Similar ao observado em 9 h, após 96 h de infecção só foi possível observar um aumento da expressão da proteína no processo infectivo com BA125 e BA276, que ao mesmo tempo são os isolados muito infectivos (**Figura 19**). Apesar de ser um isolado pouco infectivo, BA115 (LCL) apresentou um aumento na expressão de CD200 enquanto BA760 (DCL), que é um isolado muito infectivo, não modulou a expressão da proteína. Isto nos leva a confirmar mais uma vez que os isolados BA115 e BA760 mostram resultados conflitantes e o perfil infectivo e processo biológico envolvido na infecção não é constante.

Figura 19 - Expressão de CD200 na infecção de macrófagos com isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL ou DCL. Ensaio de imunoprecipitação de macrófagos derivados de medula (BMM) de camundongos C57BL/6 infectados por 2 h e mantidos até 96 h, com promastigotas de fase estacionária de BA125 (1); BA276 (2); BA760 (3); BA336 (4); BA106 (5); e BA115 (6). As amostras foram analisadas por *Western Blot* (WB), comparando a presença de banda (47 kDa) na

infecção com os isolados e no controle de macrófagos não infectados (**NI**). Extrato total de esplenócito (**S**) foi utilizado como controle positivo da técnica. Actina foi utilizado como controle de quantidade de proteína utilizada na imunoprecipitação (**input**).

É importante observar que todos os isolados de *L. (L.) amazonensis* tem a capacidade de induzir a expressão de CD200 no processo de infecção em macrófagos, mas que só alguns conseguem manter essa expressão ao longo do tempo. Por isso, 96 h é o tempo mais importante, sugerindo que a expressão de CD200 em um tempo tardio de infecção pode estar favorecendo a infectividade do isolado.

4.3 Avaliação do perfil de citocinas produzido na infecção por isolados de *L. (L.) amazonensis*

Para avaliar se os isolados LCL e DCL de *L. (L.) amazonensis* modulam a atividade inflamatória de macrófagos, foram quantificados experimentalmente os níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, MCP-1, IFN- γ e IL-10 no processo infectivo. Para isso, macrófagos foram infectados com promastigotas de fase estacionária dos diferentes isolados de *L. (L.) amazonensis* por 2 h. Após 24 h foi recuperado o sobrenadante da cultura e a presença das citocinas foi avaliada pelo *mouse inflammation Cytometric Bead Array (CBA) kit* (BD), sendo a produção de IL-1 β quantificada por ELISA. Não foram verificadas diferenças claras na produção de citocinas pelos macrófagos infectados, já que estes não foram pré-estimulados anteriormente. IFN- γ , IL-12p70 e IL-10 não tiveram nenhum aumento após 24 h de infecção (dados não mostrados). As citocinas IL-6 e TNF- α apresentaram aumento após a infecção com os isolados BA125 (LCL) e BA336 (DCL), onde os valores considerados significativos oscilam entre 200 a 500 pg/mL (59). No entanto, este resultado não foi reproduzível em outros ensaios com os mesmos parasitos (**Figura 20A e 20B**). Além disso, já foi observado por de Souza Carmo e colaboradores (2010) que os picos de produção dessas duas citocinas são em 72 h após a infecção.

A avaliação da produção da proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) (**Figura 20C**) mostrou um aumento durante a infecção, indicando ativação das células por um estímulo externo. Isto condiz com o descrito anteriormente (59), onde foi evidente que só a *L. (L.) amazonensis* tem a capacidade de ativar o macrófago e induzir a produção de MCP-1 sem precisar de um pré-estímulo como LPS ou IFN- γ .

Figura 20 - Produção de citocinas na infecção de macrófagos com isolados de *L. (L.) amazonensis*. O sobrenadante de 24 h da infecção de macrófagos de medula de camundongos C57BL/6 com promastigotas de fase estacionária de isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL (vermelho) e DCL (azul) foi analisado por citometria de fluxo utilizando o kit CBA para a detecção das citocinas IL-6 (A), TNF-α (B) e MCP-1 (C); ou por ELISA para a detecção de IL-1β (D). Os resultados correspondem a um ensaio biológico.

Além disso, foi feito um ensaio preliminar para avaliar a ativação da resposta próinflamatória pela quantificação da citocina IL-1β. Para isso, foi recuperado o sobrenadante das infecções anteriores. A presença desta citocina foi avaliada por ELISA (BD). Os resultados mostraram a liberação desta citocina na infecção pelos isolados BA125 (LCL), BA336 (DCL) e BA106 (DCL) de *L. (L.) amazonensis* (Figura 20D). Interessantemente, os isolados com maior produção de IL-1β foram os isolados com menor taxa de multiplicação *in vitro* (BA106 e BA336) enquanto o isolado mais infectivo (BA125) apresentou uma produção baixa desta citocina. No

entanto, é preciso repetir este ensaio para poder entender com maior clareza a associação de infectividade dos isolados com a ativação do inflamassoma e a indução da expressão de CD200.

Os níveis de NO produzidos pelos macrófagos infectados com os diferentes isolados também foram analisados. Após 96 h de infecção, analisou-se os níveis de nitrito (produto estável da oxidação de NO) por método fluorimétrico. Contudo, não foi possível detectar alguma diferença na produção de NO (dados não mostrados), já que os macrófagos não foram pré-estimulados.

4.4 Infecção *in vivo* com diferentes isolados de *L. (L.) amazonensis*

4.4.1 Infecção em camundongos C57BL/6 com BA125, BA336 e PH8

Após determinar o fenótipo de infecção *in vitro* em macrófagos C57BL/6 com a cepa PH8 e os isolados representativos (BA125 e BA336), foi realizada uma infecção em camundongos C57BL/6 para estabelecer se o perfil infectivo destes parasitos era semelhante ao observado em cultura. Inicialmente, camundongos C57BL/6 foram infectados com promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* (PH8, BA125 e BA336). O aparecimento das lesões foi acompanhado semanalmente até a semana 9 quando os camundongos foram sacrificados para a quantificação da carga parasitária. Nossos resultados mostraram que o perfil infectivo *in vivo* foi semelhante ao observado anteriormente com os ensaios *in vitro*. Embora o tamanho das lesões (que reflete a inflamação no local), não tenha mostrado diferenças significativas entre os grupos (**Figura 21A**), a carga parasitária calculada por diluição limitante mostrou uma diferença significativa comparando o isolado BA336 (DCL) com BA125 (LCL) e a cepa PH8 (**Figura 21B**). No entanto, a carga parasitária do linfonodo foi analisada e evidenciou-se presença de parasitos no linfonodo mais próximo à lesão independente do isolado envolvido na infecção (**Figura 21C**).

Figura 21 - Infecção *in vivo* em camundongos C57BL/6 com isolados de *L. (L.) amazonensis* PH8, BA125 (LCL) e BA336 (DCL). Camundongos fêmeas de 8-10 semanas foram infectados com 1×10^6 promastigotas da fase estacionária de PH8, BA125 e BA336. Foi quantificado o aumento da lesão semanalmente até a nona semana (A) quando os camundongos foram sacrificados. As lesões das patas foram processadas para determinar a carga parasitaria no local da infecção pelo método de diluição limitante (B). Adicionalmente, foi determinada a carga parasitaria do linfonodo mais próximo à lesão (C) por diluição limitante. Os gráficos representam a média de cada grupo $\pm$ o desvio padrão (n=5). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com valor $**p < 0.0005$.

4.4.2 Infecção em camundongos BALB/c com isolados de *L. (L.) amazonensis*

Após observar o perfil de infecção em camundongos C57BL/6 com os isolados representativos, analisamos o fenótipo infectivo dos isolados de *L. (L.) amazonensis* associado tanto à LCL quanto à DCL. Para isso, infectamos promastigotas de fase estacionária na pata posterior de camundongos BALB/c e acompanhamos a evolução da lesão por 6 semanas. A **figura 22** mostra o desenvolvimento da lesão de 4 isolados nesse período de tempo (**Apêndice E**

mostra a figura com todos os isolados). Mais uma vez como observado nas outras infecções, os isolados associados a uma mesma manifestação clínica não apresentam um perfil infectivo semelhante. Ao invés disso, só foi possível separar os isolados pela capacidade infectiva dos mesmos, embora isto não se relacione à doença.

Figura 22 - Infecção *in vivo* em camundongo BALB/c com isolados de *L. (L.) amazonensis*. Camundongos BALB/c foram infectados com 1×10^6 promastigotas de fase estacionária na pata posterior esquerda. O progresso da lesão foi acompanhado semanalmente até a sexta semana após a infecção quando os camundongos foram sacrificados. Foram utilizados dois camundongos por cada isolado e a infecção foi feita por duplicata biológica. O gráfico representa a média da espessura da lesão $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatísticas foram comparadas com o isolado BA125 (LCL) e consideradas significativas com valor * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

4.4.3 Avaliação da exposição de PS em amastigotas recuperados de lesão de camundongos BALB/c

França-Costa e colaboradores (2012) sugeriram que isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à DCL tem uma maior infectividade que isolados de LCL. Além do mais, eles propõem que a infectividade destes parasitos está relacionada com a capacidade de externalizar PS. Contudo, também foi descrito por Wanderley e colaboradores (2006) que esta exposição de PS na membrana é modulada e dependente do hospedeiro, mostrando que a exposição de PS em amastigotas recuperados de camundongos C57BL/6 era menor a dos parasitos recuperados de BALB/c. Segundo estas informações, nossos resultados (**Figura 23**) confirmam o observado já que a externalização de PS avaliada por FACs não teve diferença entre os isolados DCL e LCL embora as lesões fossem diferentes evidenciando a maior infectividade de alguns isolados.

Figura 23 - Externalização de PS na membrana de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* recuperados de camundongos BALB/c. Camundongos BALB/c foram infectados com 1×10^6 promastigotas de fase estacionária na pata posterior esquerda. O progresso da lesão foi acompanhado semanalmente até a sexta semana após a infecção quando os camundongos foram sacrificados. Os amastigotas das lesões foram recuperados e a exposição de PS na membrana dos amastigotas foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico representa a exposição de PS na membrana de amastigotas tanto de isolados LCL (BA125) quanto DCL (BA199).

5 DISCUSSÃO

Os fatores implicados no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana ainda são pouco conhecidos. No entanto, acredita-se que o perfil imunológico e genético do hospedeiro, assim como a espécie de *Leishmania spp.* envolvida na doença são fundamentais para às manifestações clínicas da mesma (60-62). *L. (L.) amazonensis* é a única espécie associada aos casos de DCL no Brasil e é o principal agente etiológico desta forma da doença na América do Sul. *L. (L.) mexicana*, também tem uma grande importância na América Central já que esta é a responsável pelos casos de DCL nesta região do continente americano (30). Por mais que estas espécies sejam importantes pela sua capacidade de manifestar-se como doença difusa, elas também estão associadas às formas menos graves da leishmaniose cutânea (LCL) (4, 30, 33).

Nas infecções experimentais com modelos murinos, independente da linhagem utilizada, *L. (L.) amazonensis* é capaz de formar lesões não auto-curáveis ao contrário do observado com outras espécies de *Leishmania* como *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major*. Diversos estudos já mostraram os diferentes mecanismos de evasão utilizados por *L. (L.) amazonensis* que favorecem a progressão da doença (38, 40). Como discutido por Wanderley e colaboradores em 2006, amastigotas de *L. (L.) amazonensis* são capazes de fazer um mimetismo apoptótico expondo fosfolípidios semelhantes a PS na membrana plasmática e favorecendo o estabelecimento da infecção nas células do hospedeiro mamífero (34). Contudo, foi também descrito pelo mesmo grupo, que a externalização de PS na membrana dos amastigotas depende do *background* genético do hospedeiro (43). Além disso, França-Costa e colaboradores em 2012 mostraram a relação entre a presença de PS na membrana dos amastigotas e a severidade da doença apresentada, mostrando que parasitos isolados de pacientes LCL e DCL por mais que sejam a mesma espécie, tem um padrão diferente no momento de infecção no mesmo hospedeiro.

Por outro lado, também foi demonstrado que amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tem a capacidade de manipular o ambiente intracelular do hospedeiro para sua sobrevivência. Cortez e colaboradores (2011) apontaram que esta espécie de *Leishmania* consegue modular a expressão da proteína CD200, encarregada de suprimir as respostas inflamatórias das células mielóides (44). Contudo, ainda não está claro se a capacidade de modular positivamente a expressão desta proteína imunossupressora pela *L. (L.) amazonensis* estaria associada ao desenvolvimento da forma clínica da doença. Então, neste projeto foi possível sugerir por primeira vez a possível relação que existe entre a infectividade de diferentes isolados de *L. (L.) amazonensis* de pacientes

com manifestações clínicas associadas à LCL ou DCL, com o aumento da expressão da proteína supressora CD200 no modelo murino da linhagem C57BL/6.

5.1 Processo infectivo de isolados de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos de camundongos C57BL/6

L. (L.) amazonensis tem a característica de apresentar uma multiplicação exponencial ao longo do tempo no processo infectivo com expansão do vacúolo parasitóforo (63). Este fenótipo de infecção característico de todas as espécies do complexo mexicana pode ser observado na maioria dos modelos murinos (64-66). No entanto, utilizando C57BL/6 como modelo de infecção em este estudo, foi possível evidenciar as diferenças na capacidade infectiva de isolados de *L. (L.) amazonensis*. Teve alguns isolados mais infectivos (com vacúolo parasitóforo grande e carga parasitaria alta) e outros pouco infectivos (vacúolo parasitóforo reduzido e carga parasitaria baixa). Diferente à hipótese inicial e ao observado por França-Costa e colaboradores (2012) na linhagem F1, os isolados mais infectivos não necessariamente foram associados à DCL. Este fenótipo de infecção foi observado e confirmado com as diferentes formas infectivas do parasito (**Figuras 5 e 6**). Já que alguns isolados (por exemplo; BA336 e BA106) não apresentaram multiplicação intracelular ao longo do tempo, foi importante confirmar se estes parasitos ainda continuavam viáveis. Para isso foi observada a viabilidade dos isolados após 96 h de infecção (**Figura 7**). Este resultado suporta o achado, que no modelo C57BL/6 os isolados não tem a mesma capacidade infectiva e a sua supervivência também é diferente.

Os resultados observados neste trabalho diferem ao esperado inicialmente, já que acreditávamos que parasitos associados à DCL (a forma da doença mais grave e caracterizada pela presença de macrófagos altamente vacuolizados com carga parasitaria elevada) teriam uma infectividade mais elevada que os isolados associados à LCL. Além disso, os resultados obtidos também foram contrários ao descrito em camundongos F1, onde a capacidade infectiva do parasito está estritamente relacionada à exposição de fosfolipídios semelhantes a PS que ligam à Anexina-V (33). No entanto, a exposição de PS na membrana extracelular depende do modelo de camundongo utilizado. Em camundongos C57BL/6, esta externalização é significativamente menor que em camundongos BALB/c (34). Por isto, é possível acreditar que o mecanismo de virulência utilizado por parasitos associados à DCL em camundongos F1 não influencie a

infectividade quando utilizado o modelo C57BL/6. Além do mais, isto foi confirmado analisando a presença de fosfolípidios semelhantes a PS na membrana de amastigotas recuperados de camundongos BALB/c onde não houve diferenças entre os parasitos LCL e DCL. Por consequência, é possível descartar a variável de mimetismo apoptótico (exposição de PS na membrana extracelular) quando são utilizados camundongos C57BL/6, explicando as diferenças observadas no fenótipo de infecção com os parasitos associados à LCL e DCL.

Por outro lado, de Souza e colaboradores (2011) revelaram resultados importantes que ajudam a entender o perfil infectivo que nos observamos. Eles demonstraram que o padrão de infecção de isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL (BA125), DCL (BA276) e VL (BA109) é diferente quando utilizado o camundongo CBA como modelo de infecção. Os resultados obtidos por este grupo revelam que a multiplicação intracelular ao longo do tempo de BA125 e BA276 é semelhante embora o tamanho do vacúolo parasitóforo seja maior na infecção com o isolado LCL (32).

Contrário ao observado em camundongos F1 onde o processo infectivo (tamanho de lesão e carga parasitária) *in vivo* é diferente entre os isolados DCL e LCL (33), e em camundongos CBA onde a carga parasitária é semelhante mas o tamanho da lesão é diferente entre os parasitos associados à LCL e DCL (32), nos conseguimos ver resultados parecidos ao observado *in vitro*. Embora o tamanho da lesão fosse semelhante entre os isolados BA125 (LCL), BA336 (DCL) e PH8 (controle), a carga parasitária foi significativamente menor no grupo de camundongos infectados com BA336 (**Figura 21**). Isto é mais uma evidência que mostra que o *background* genético do modelo murino utilizado durante as infecções tem um papel fundamental para o desenvolvimento e progressão da doença (67).

No caso do modelo suscetível (BALB/c) também foi observada diferença no perfil infectivo com os isolados *in vitro* e *in vivo*. Na infecção em cultura de macrófagos derivados de medula óssea com BA125 (LCL) e BA336 (DCL) não foi observada uma diferença significativa na capacidade infectiva e carga parasitária, assim como no tamanho do vacúolo parasitóforo. No entanto, *in vivo* foram observadas diferenças no tamanho da lesão até 6 semanas após infecção (**Figura 22**). Contudo, não foi quantificada a carga parasitária das lesões. Como mostrado em outros estudos (68), as infecções em camundongos BALB/c com isolados de pacientes geralmente levam à infecções altamente virulentas com tamanhos de lesão maiores que as outras

cepas de camundongos e a carga parasitária elevada com possibilidade de metástase a linfonodo e baço.

5.2 Associação de infectividade de isolados de *L. (L.) amazonensis* com o aumento da expressão de CD200

Após mostrarmos as diferenças na infectividade dos isolados de *L. (L.) amazonensis* utilizando camundongos C57BL/6, foi importante confirmar se a diferença na capacidade infectiva também estava associada à indução de CD200 durante a infecção. Como foi mostrado por Cortez e colaboradores (2011), a ausência desta proteína no começo da infecção com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* impossibilita o parasita a desenvolver o curso natural de infecção, fazendo com que a célula hospedeira controle sua multiplicação e mantenha o vacúolo parasitóforo reduzido (44). Isto pode sugerir que os isolados com baixa infectividade que não conseguem multiplicar-se dentro da célula hospedeira ao longo do tempo não tenham a mesma capacidade de induzir CD200 durante todo o curso da infecção.

A expressão de *cd200* durante a infecção com amastigotas de lesão dos diferentes isolados condiz com o descrito anteriormente (44). 1 hora após a infecção com amastigotas todos os isolados induzem o aumento do transcrito embora seja em menor quantidade ao observado por Cortez e colaboradores utilizando a cepa PH8 de *L. (L.) amazonensis*. Contudo, foi evidente o aumento da expressão de *cd200* após 96 h de infecção especialmente nos isolados que apresentaram uma maior infectividade (observado pelo número de parasitos por célula infectada) (**Figura 11**). Isto é um dado novo que não foi estudado por Cortez e colaboradores e que possivelmente indica que a indução do transcrito nos tempos tardios de infecção favorece a infectividade dos parasitos isolados de pacientes. No entanto, não foi possível confirmar se os níveis gênicos eram compatíveis com os níveis de proteína para assim poder confirmar o efeito biológico do aumento do transcrito em 96 h após a infecção.

Por outro lado, Cortez e colaboradores discutiram que só os amastigotas tinham a capacidade de induzir a expressão de CD200 e que a indução no primeiro tempo de infecção era importante para a progressão da infecção. Seguindo esta ideia, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* não tem a capacidade de induzir esta expressão no começo da infecção como foi visto com amastigotas (44). No entanto, mostramos que promastigotas de fase estacionária têm a capacidade de induzir

a expressão de CD200, 6 h após infecção (**Figura 12**). Diferente ao mostrado com amastigotas em 96 h, todos os isolados de *L. (L.) amazonensis* tiveram a capacidade de aumentar a expressão da proteína em níveis semelhantes entre eles. Contudo, os níveis de *cd200* observados pelo resultado de qPCR mostrou diferenças entre os isolados (**Figura 10**). Isto pode ser explicado pelas diferenças na taxa de transcrição do gene enquanto os mesmos níveis de transcrito estão sendo traduzidos em proteína. Para mais, em 6 h de infecção foi observado também que os promastigotas fagocitados pelas células hospedeiras estão começando a transformação em amastigotas. Isto foi confirmado pelos níveis de transcrito de AMA2; proteína de superfície específica de amastigotas. Estudos mostram que os promastigotas demoram até 12 h para conseguir a transformação total em amastigotas, embora possa ser evidente o começo desta mudança morfológica em tempos menores (69, 70).

Além disso, após 9 h de infecção começou a ser evidente a diferença na capacidade de induzir a expressão de CD200 ao longo do tempo. Só os isolados mais infectivos que apresentaram resultados constantes no fenótipo de infecção e cinética de expressão de *cd200* tiveram a capacidade de manter o aumento da expressão de CD200 comparando com o controle de células não infectadas. BA125 (LCL) e BA276 (DCL) foram isolados que revelaram ser altamente infectivos tendo multiplicação exponencial ao longo do tempo, macrófagos com expansão de vacúolo parasitóforo característico de uma infecção com *L. (L.) amazonensis* e um constante aumento de expressão de CD200. Em 96 h após a infecção estes dois isolados foram os únicos que tiveram indução desta proteína imunossupressora, sugerindo que a presença de CD200 nos tempos tardios da infecção pode ser importante para manter o ambiente intracelular favorável para a multiplicação dos parasitos. No entanto, neste resultado também foi evidente o possível aumento de expressão na infecção com BA115 (LCL); um isolado que mostrou ser pouco infectivo comparado à infecção com BA125 e a falta de capacidade de induzir CD200 na infecção com BA760 (DCL), isolado infectivo. Estes dois isolados não mostraram padrões de infecção constantes nos diferentes ensaios realizados. Por isso, os resultados obtidos com estes parasitos não são confiáveis e não foram levados em consideração para entender a associação da expressão de CD200 com a infectividade dos isolados no modelo C57BL/6. Um estudo mais em detalhe destes isolados poderiam trazer novos dados que contribuiriam no entendimento destas diferenças.

Não obstante, o efeito biológico das diferenças de expressão de CD200 em tempos avançados não foi confirmado, assim como o efeito de todos os isolados terem a mesma capacidade de induzir a proteína 6 h após a infecção. Dado que trata-se de isolados de *L. (L.) amazonensis* e já tendo sido demonstrado que esta espécie possui a capacidade de induzir CD200 (44), foi coerente que no começo do processo infectivo quando os promastigotas começam a transformar-se em amastigotas todos os parasitos apresentaram aumento da expressão de CD200 comparado com os macrófagos não infectados. Contudo, não foi obtido nenhum resultado convincente que evidencie o efeito biológico da indução desta proteína imunossupressora na infecção com *L. (L.) amazonensis*. Para isso, é importante analisarmos a presença do receptor CD200R nos casos onde seja evidente a modulação positiva de CD200. Além da expressão de CD200R que é constitutiva em células mielóides, seria importante observar se existe alguma diferença na ativação do mesmo (ou seja, observar a fosforilação dos resíduos de tirosina na região citoplasmática da proteína) para assim poder entender e relacionar a ativação da via CD200:CD200R com a infectividade dos isolados de *L. (L.) amazonensis*. Um estudo com *Neisseria meningitidis*, uma bactéria patogênica evidenciou a importância de CD200 e CD200R no processo infectivo. Mukhopadhyay e colaboradores (2010) mostraram que *N. meningitidis* tem a capacidade de induzir a expressão de CD200 no macrófago e ao mesmo tempo, consegue modular negativamente a expressão do receptor CD200R ao longo da infecção (53). Isto é mais uma evidencia que mostra a importância de se estudar a cinética e ativação de CD200R ao longo da infecção por *L. (L.) amazonensis*.

Além disso é importante determinar a localização da proteína CD200 nas células infectadas no nível de membrana extracelular ou à presença no vacúolo parasitóforo. Ainda, será importante estudar a solubilidade da CD200, já que a presença desta proteína na sua forma solúvel pode ser importante para atingir e modular a resposta de outras células no local além de macrófagos. Da mesma forma,

5.3 Resposta imune de macrófagos C57BL/6 à infecção por isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à DCL e LCL

Foi analisado o perfil inflamatório dos macrófagos infectados com promastigotas dos isolados de *L. (L.) amazonensis*. Pelo observado nos níveis de MCP-1, 24 h após a infecção comparado com as células não infectadas, os macrófagos infectados estão constantemente ativados. No

entanto, a produção de citocinas como IL-12, IL-6, TNF- α e IL-10 foram liberadas pelos macrófagos infectados em quantidades muito baixas. Este resultado condiz com o descrito anteriormente onde se sugere que a dosagem destas citocinas em macrófagos que não são previamente ativados com LPS ou IFN- γ é difícil e só é possível detectar concentrações muito baixas. MCP-1 é a única quimiocina que é detectada facilmente em macrófagos que não sofreram estímulo prévio (59). Além de tudo, níveis de IFN- γ não foram detectados nos macrófagos de cultura infectados com *L. (L.) amazonensis*. Isto é de esperar já que os macrófagos não são as principais células responsáveis pela produção desta citocina pró-inflamatória (59).

Por outro lado, as citocinas IL-6 e TNF- α foram detectadas durante a infecção com BA125 (LCL) e BA336 (DCL). Contudo, estudos mostram que os picos de produção de estas duas citocinas é em 72 h de infecção e esta liberação aumenta consideravelmente quando os macrófagos são co-cultivados com células PMN (59). Enquanto aos níveis de IL-12, não foram detectados em nenhum caso. Isto é porque as quantidades só são detectáveis quando estão por cima de 60pg/ml e as principais células que produzem esta citocina pró-inflamatória são as células dendríticas para a polarização da resposta de linfócitos T CD4⁺ (71). Tal vez, se os macrófagos fossem pré-estimulados com LPS seria possível visualizar algum aumento de produção de citocinas já que foi mostrado por França-Costa e colaboradores (2012) que os isolados de *L. (L.) amazonensis* têm diferenças no perfil de citocinas liberadas no modelo de camundongo F1 quando pré-ativados com 100 ng/ml de LPS. O perfil observado nestas infecções evidenciou que os macrófagos infectados com isolados associados à LCL é mais pró-inflamatório (aumento maior na produção de TNF- α) que nas infecções com DCL (33).

Por último, será importante se estudar a importância de CD200 durante a infecção de *L. (L.) amazonensis* analisando outras células envolvidas na imunopatologia. Como é conhecido, os linfócitos T não tem uma resposta antígeno específica contra *Leishmania* durante a DCL. Além do mais, foi descrito por Caserta e colaboradores (2012) que durante infecções crônicas bacterianas (*Salmonella entérica*) e parasitárias (*Schistosoma haematobium*) em humanos e camundongos, os linfócitos T CD4⁺ apresentam uma modulação positiva da expressão de CD200 e CD200R (54). Estas evidências podem sugerir que durante a infecção com isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à DCL, a importância de CD200 pode estar relacionada à doença quando analisarmos os linfócitos T e as células dendríticas, encarregadas de apresentar o antígeno específico ao linfócito T.

6 CONCLUSÕES

- Utilizando camundongos C57BL/6 é possível discriminar os isolados de *L. (L.) amazonensis* associados à LCL e DCL pela infectividade *in vitro* e não pela forma da doença da qual são associados.
- A infectividade dos isolados depende do modelo de camundongo, tendo maior capacidade infectiva quando utilizado camundongo BALB/c comparado à C57BL/6.
- Foi confirmado que amastigotas de *L. (L.) amazonensis* expõem PS na membrana extracelular quando recuperados de camundongos BALB/c e em menor quantidade em C57BL/6. E isto é semelhante entre os isolados LCL e DCL.
- Não importa a forma do parasito utilizada no começo da infecção já que o perfil infectivo observado é semelhante entre amastigotas e promastigotas de fase estacionária.
- A transformação de promastigotas de isolados de *L. (L.) amazonensis* em amastigotas axênicos não foi bem sucedida e por isso foi necessário continuar trabalhando só com promastigotas ou amastigotas de lesão.
- A proporção de promastigotas metacíclicos na cultura estacionária dos isolados de *L. (L.) amazonensis* é semelhante entre eles.
- Todos os isolados de *L. (L.) amazonensis* tem a capacidade de induzir a expressão de CD200 em macrófagos 6 h após a infecção quando infectados com promastigotas de fase estacionária.
- Expressão de CD200 em 96 h de infecção está associado à infectividade do isolado de *L. (L.) amazonensis*.

- Não foi possível determinar o perfil imunológico dos macrófagos infectados com os isolados de *L. (L.) amazonensis* já que estes não foram previamente estimulados com LPS.

REFERÊNCIAS¹

¹ De acordo com:

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

1. Kobets T, Grekov I, Lipoldová M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Current Medicinal Chemistry*. 2012;19(10):1443-74.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of Its incidence. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e35671.
3. Hotez PJ, Remme JHF, Buss P, George G, Morel C, Breman JG. Combating tropical infectious diseases: Report of the disease control priorities in developing countries project. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;38(6):871-8.
4. Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007;7(9):581-96.
5. Campanelli AP, Brodskyn CI, Boaventura V, Silva C, Roselino AM, Costa J, et al. Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. *Human Immunology*. 2010;71(12):1220-7.
6. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews*. 2011;9:12.
7. Dantas ML, Oliveira JCd, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Machado P, et al. CD8+ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013;46(6):728-34.
8. World-Health-Organization. Status of endemicity of leishmaniasis. WHO; 2013 [cited 2015 April 10]; Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
9. Shlomai J. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Current Molecular Medicine*. 2004;4(6):623-47.
10. Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*. 2001;55(1):453-83.
11. Gaur U, Roberts SC, Dalvi RP, Corraliza I, Ullman B, Wilson ME. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 2007;179(12):8446-53.

12. Serafim TD, Figueiredo AB, Costa PAC, Marques-da-Silva EA, Gonçalves R, de Moura SAL, et al. Leishmania metacyclogenesis is promoted in the absence of purines. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6(9):e1833.
13. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 2008;321(5891):970-4.
14. Shaw J. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world: a mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(5):541-7.
15. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *Journal of Infectious Diseases*. 2002;186(12):1829-34.
16. Azeredo-Coutinho RBG, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;101(7):735-7.
17. Costa AAUML, Saldanha ACR, Leite BMC, Ramos B, Junior IA, Noronha ALL, et al. Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). *Acta Tropica*. 2005;96(1):9-15.
18. Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology*. 2012;34(12):551-61.
19. Convit J, Ulrich M, Fernandez C, Tapia F, Cáceres-Dittmar G, Castés M, et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1993;87(4):444-8.
20. Valencia-Pacheco G, Loria-Cervera EN, Sosa-Bibiano EI, Canché-Pool EB, Vargas-Gonzalez A, Melby PC, et al. In situ cytokines (IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ) and chemokines (MCP-1, MIP-1 α) gene expression in human *Leishmania (Leishmania) mexicana* infection. *Cytokine*. 2014;69(1):56-61.

21. Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva ALN, Mineo TWP, et al. Inflammasome-derived IL-1[beta] production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nature Medicine*. 2013;19(7):909-15.
22. Díaz NL, Zerpa O, Tapia FJ. Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108(4):446-52.
23. França-Costa J, Van Weyenbergh J, Boaventura VS, Luz NF, Malta-Santos H, Oliveira MCS, et al. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. 2015 February 1, 2015;211(3):426-35.
24. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2012;2.
25. Kulkarni MM, Barbi J, McMaster WR, Gallo RL, Satoskar AR, McGwire BS. Mammalian antimicrobial peptide influences control of cutaneous *Leishmania* infection. *Cellular Microbiology*. 2011;13(6):913-23.
26. Peters NC, Sacks DL. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cellular Microbiology*. 2009;11(9):1290-6.
27. Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008;84(2):389-96.
28. Contreras I, Estrada JA, Guak H, Martel C, Borjian A, Ralph B, et al. Impact of *Leishmania mexicana* Infection on dendritic cell signaling and functions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(9):e3202.
29. Petritus PM, Manzoni-de-Almeida D, Gimblet C, Lombana CG, Scott P. *Leishmania mexicana* induces limited recruitment and activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells early during infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6(10):e1858.

30. Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010;4(11).
31. Tacchini-Cottier F, Weinkopff T, Launois P. Does T helper differentiation correlate with resistance or susceptibility to infection with *L. major*? Some insights from the murine model. *Frontiers in Immunology*. 2012;3:32.
32. de Souza VL, Veras PS, Welby-Borges M, Silva T, Leite BR, Ferraro RB, et al. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106(1):23-31.
33. França-Costa J, Wanderley JLM, Deolindo P, Zarattini JB, Costa J, Soong L, et al. Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e36595.
34. 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. *The Journal of Immunology*. 2006;176(3):1834-9.
35. Mendes Wanderley JL, Costa JF, Borges VM, Barcinski M. Subversion of immunity by *Leishmania amazonensis* parasites: possible role of phosphatidylserine as a main regulator. *Journal of Parasitology Research*. 2012;2012.
36. Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang K-P, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *The Journal of Immunology*. 1995;155(6):3102-11.
37. Da Silva R, Hall BF, Joiner K, Sacks D. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *The Journal of Immunology*. 1989;143(2):617-22.
38. Castellano LRC. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. *VITAE Academia Biomédica Digital*. 2005(25).
39. Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine*. 1997;185(12):2061-8.

40. Shio MT, Hassani K, Isnard A, Ralph B, Contreras I, Gomez MA, et al. Host cell signalling and Leishmania mechanisms of evasion. *Journal of Tropical Medicine*. 2012;2012: 819512.
41. Kima PE. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal for Parasitology*. 2007;37(10):1087-96.
42. Wanderley JLM, da Silva LHP, Deolindo P, Soong L, Borges VM, Prates DB, et al. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. *PLoS ONE*. 2009;4(5):e5733.
43. Wanderley JLM, Barcinski MA. Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010;67(10):1653-9.
44. Cortez M, Huynh C, Fernandes MC, Kennedy KA, Aderem A, Andrews NW. Leishmania promotes its own virulence by inducing expression of the host immune inhibitory ligand CD200. *Cell Host & Microbe*. 2011;9(6):463-71.
45. Vaine CA, Soberman RJ. The CD200-CD200R1 inhibitory signaling pathway: Immune regulation and host-pathogen interactions. *Adv Immunol*. 2014;121:191-211.
46. Lloyd A, Vickery ON, Laugel B. Beyond the antigen receptor: editing the genome of T-cells for cancer adoptive cellular therapies. *Frontiers in Immunology*. [Perspective]. 2013;4.
47. Cui W, Cuartas E, Ke J, Zhang Q, Einarsson HB, Sedgwick JD, et al. CD200 and its receptor, CD200R, modulate bone mass via the differentiation of osteoclasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(36):14436-41.
48. Lee L, Liu J, Manuel J, Gorczynski R. A role for the immunomodulatory molecules CD200 and CD200R in regulating bone formation. *Immunology Letters*. 2006;105(2):150-8.
49. Varin A, Pontikoglou C, Labat E, Deschaseaux F, Sensebé L. CD200R/CD200 inhibits osteoclastogenesis: new mechanism of osteoclast control by mesenchymal stem cells in human. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e72831.

50. Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, et al. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*. 2000;290(5497):1768-71.
51. 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(5):e1002710.
52. Soberman RJ, MacKay CR, Vaine CA, Ryan GB, Cerny AM, Thompson MR, et al. CD200R1 supports HSV-1 viral replication and licenses pro-inflammatory signaling functions of TLR2. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e47740.
53. Mukhopadhyay S, Plüddemann A, Hoe JC, Williams KJ, Varin A, Makepeace K, et al. Immune inhibitory ligand CD200 induction by TLRs and NLRs limits macrophage activation to protect the host from meningococcal septicemia. *Cell Host & Microbe*. 2010;8(3):236-47.
54. Caserta S, Nausch N, Sawtell A, Drummond R, Barr T, MacDonald AS, et al. Chronic infection drives expression of the inhibitory receptor CD200R, and its ligand CD200, by mouse and human CD4 T cells. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35466.
55. de Almeida Marques-da-Silva E, de Oliveira JC, Figueiredo AB, de Souza Lima Júnior D, Carneiro CM, Rangel Fietto JL, et al. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes and Infection*. 2008;10(8):850-7.
56. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
57. Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2008;2(6):e249.
58. de Freitas Balanco JM, Costa Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G, Pirmez C, et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Current Biology*. 2001;11(23):1870-3.
59. de Souza Carmo EV, Katz S, Barbieri CL. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *PLoS ONE*. 2010;5(11):e13815.

60. Bailey MS, Lockwood DNJ. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*. 2007;25(2):203-11.
61. Sinha S, Fernández G, Kapila R, Lambert WC, Schwartz RA. Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *International Journal of Dermatology*. 2008;47(12):1263-70.
62. Leon LL, Machado GMC, de Carvalho Paes LE, Grimaldi Jr G. Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1990;84(5):678-80.
63. Wilson J, Huynh C, Kennedy KA, Ward DM, Kaplan J, Aderem A, et al. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. *PLoS Pathogens*. 2008;4(10):e1000179.
64. Afonso L, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*. 1993;61(7):2952-9.
65. Lipoldová M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7(4):294-305.
66. Jones DE, Ackermann MR, Wille U, Hunter CA, Scott P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infection and immunity*. 2002;70(4):2151-8.
67. de Souza VL, Souza JA, Silva TMC, Veras PST, de-Freitas LAR. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes and infection*. 2000;2(15):1807-15.
68. Almeida RP, Barral-Netto M, de Jesus AMR, de Freitas LAR, Carvalho EM, Barral A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in Balb/C mice. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996;54(2):178-84.
69. Bee A, Culley F, Alkhalife I, Bodman-Smith K, Raynes J, Bates P. Transformation of *Leishmania mexicana* metacyclic promastigotes to amastigote-like forms mediated by binding of human C-reactive protein. *Parasitology*. 2001;122(05):521-9.

70. Prasad A, Kaur S, Malla N, Ganguly N, Mahajan R. Ca^{2+} signaling in the transformation of promastigotes to axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2001;224(1-2):39-44.
71. Coelho ZCB, Teixeira MJ, Mota EF, Frutuoso MS, Silva JSd, Barral A, et al. In vitro initial immune response against *Leishmania amazonensis* infection is characterized by an increased production of IL-10 and IL-13. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(5):476-82.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Coluna de Ficoll 400 para purificação de promastigotas metacíclicos

Montagem da coluna:

APÊNDICE B - Curva de crescimento de isolados de *L. (L.) amazonensis* em cultura com meio Grace suplementado com 10% de SFB

APÊNDICE C - Porcentagem de promastigotas metacíclicos no sétimo dia de cultura

APÊNDICE D - Expressão gênica de *ama2* em 6 h de infecção com promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis*

APÊNDICE E - Infecção *in vivo* em camundongo BALB/c com todos os isolados de *L. (L.) amazonensis* (Tabela 2)