ALBERT BRESSAN

**Expressão da proteína imunomodulatória CD200 em macrófagos murinos
infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

ALBERT BRESSAN

Expressão da proteína imunomodulatória CD200 em macrófagos murinos infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de 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 total

Bressan, Albert da Silva.

Expressão da proteína imunomodulatória CD200 em macrófagos murinos com *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* / Albert da Silva Bressan. -- 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: Interação patógeno-hospedeiro; Imunobiologia de parasitas.

Versão do título para o inglês: Expression of immunomodulatory protein CD200 in murine macrophages infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi*.

1. *Leishmania infantum* 2. Leishmaniose visceral 3. Macrófagos I. Véliz, Prof. Dr. Mauro Javier Cortez II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB031/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Albert da Silva Bressan.

Título da Dissertação: Expressão da proteína imunomodulatória CD200 em
macrófagos murinos com *Leishmania (Leishmania)*
infantum chagasi.

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 **023** nas fls. **03** 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 "*Imunobiologia de Leishmania spp: Estudo do papel de CD200 e biogênese do vacúolo parasitóforo em células fagocíticas infectadas por Leishmania*" do qual participam o(s) aluno(s), **Albert Bressan, Andreas Duva**, 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 **23.04.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 25 de abril de 2013.

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

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

AGRADECIMENTOS

É chegado o momento de registrar todo o meu agradecimento a estes que se mostraram muito importantes ao longo dessa "caminhada". A tarefa não é fácil, e não por considerar difícil o ato de agradecer, mas por não ter a certeza de possuir a devida sensibilidade. Dedico essas palavras àqueles que se fizeram presentes, direta ou indiretamente nesse período da minha vida.

Aos meus pais, Nereu e Cleusa, seres iluminados e de muito amor. Agradeço a vocês o exemplo que sempre foram, cada esforço, cada oração, cada conversa, cada carinho. Definitivamente, vocês foram motivadores e grandes responsáveis por eu ter persistido até o fim.

Ao Rafael, meu companheiro de longa data, dono de um coração enorme e de uma alma linda. Obrigado por cada palavra mencionada e também por cada minuto de silêncio. Obrigado por me acompanhar nos momentos de euforia e por me sustentar nos momentos de desespero. Difícil ser sensível o suficiente para descrever toda a minha gratidão! Agradeço, acima de tudo, por você fazer parte da minha vida.

Ao meu irmão Robert e à família que ele compôs, muito obrigado pela torcida e pelo incentivo. Ganhar meu sobrinho (e afilhado!) durante o Mestrado foi um incentivo ainda maior para chegar até o fim.

À "Pepê" e à "Madá", duas gatinhas lindas. Pequenas responsáveis por momentos de alegria, aconchego e companhia em casa.

Aos meus amigos de longa data, definitivamente vocês são a família que a gente escolhe. Obrigado a todos pelo apoio e amizade! E aos amigos mais recentes, obrigado pelos papos, pelas experiências, pelas festas, pelas dicas, pelas acolhidas. Vocês foram muito importantes!

À USP, pela oportunidade da pós-graduação, por me permitir conhecer o mundo da ciência. Agradeço a todo o pessoal que fez parte dessa história. Começo pelo pessoal da segurança e recepção, os primeiros a dizer um "bom dia!". Ao pessoal da limpeza, em especial à Dona. Maria, sempre com um sorriso no rosto e um "papinho" no início do dia. Aos funcionários Manoel, Marta e Marinete e também ao pessoal do Biotério, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado também às três grandes "meninas" da secretaria, Dalva, Sabrina e Sílvia, sempre pude contar com vocês!

Obrigado aos professores do departamento e às suas respectivas equipes. Em especial à professora Tânia e sua equipe, que no início compartilharam conosco um pouco do seu espaço, de reagentes, de conhecimentos, de atenção e de companhia. Às professoras Andréa e Sirlei, e às meninas que com elas trabalham, pela amizade, e também por terem cedido seu espaço e reagentes, pelos almoços e festas, papos e discussões. Ao laboratório da professora Silvia Uliana, por também nos ter cedido atenção, espaço e material. Foram sem dúvidas grandes companheiros da sala de cultura. Às meninas do laboratório do professor Marcelo Urbano, pela amizade e almoços. Aos demais laboratórios, que de uma forma ou de outra foram importantes, tanto pelos "auxílios" quanto pelas amizades.

Ao laboratório do meu orientador, que incrivelmente só saiu do papel quando eu já havia partido. Obrigado Mauro pela oportunidade de aprender. Esse período do mestrado foi importantíssimo, principalmente por me fazer lidar com limitações e desafios. Também agradeço à "Ju", pessoa com quem "troquei" muitas coisas (de brigas a "papos-cabeça"), e sem dúvidas alguém muito importante para a estruturação do laboratório. Também gostaria de lembrar os primeiros alunos de iniciação científica, Andreas e Karen, por terem participado de todo o início do processo comigo. À Vivi, por ter sido minha "pequena" pupila e ao Isma, nosso primeiro doutorando, por toda a sua energia e colaboração, risadas e momentos depressão (risos). Aos demais membros do laboratório, obrigado por de uma forma ou de outra terem me proporcionado crescimento.

Aos professores Beatriz Stolf, Danilo Ciccone e Silvia Uliana, por suas contribuições no desfecho desse trabalho.

À professora Clara, à Simone e ao Adilson, da UNIFESP, pela solicitude, pelos reagentes e por cederem espaço para nossos Hamsters.

À CAPES, por financiar minha bolsa de pesquisa durante o mestrado.

A Deus, e a todos aqueles que, por um deslize meu, talvez não tenham sido citados.

MUITO OBRIGADO!

*“Un peu de science éloigne de Dieu,
beaucoup de science y ramène.”*

Louis Pasteur

Resumo

BRESSAN, A. **Expressão da proteína imunomodulatória CD200 em macrófagos murinos infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi***. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

A leishmaniose é um termo global para doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, que afeta cerca de 2 milhões de pessoas por ano em todo o mundo. A Leishmaniose Visceral (LV), considerada a forma mais grave da doença, é causada no Brasil pelo parasita *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. A fim de garantir a sua sobrevivência, alguns parasitas são capazes de manipular as respostas de defesa das células do sistema imune pela inibição de mecanismos microbicidas. Recentes estudos tem demonstrado a participação da proteína imunomodulatória CD200 no processo de infecção de *L. (L.) amazonensis*, causadora da Leishmaniose Cutânea. Apesar dos recentes avanços na caracterização dos mecanismos de escape de *Leishmania* do sistema imune do hospedeiro, pouco ainda se sabe a respeito desse assunto em espécies causadoras da LV. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar se diferentes formas biológicas de *L. (L.) infantum chagasi* são capazes de induzir a expressão da proteína CD200 em infecções de macrófagos oriundos da medula óssea de camundongos (MMO). Em ensaios de infecção *ex vivo*, não foi observado um aumento no número de parasitas intracelulares em macrófagos infectados tanto com formas promastigotas quanto com formas amastigotas axênicas. Apesar da ausência de proliferação, *L. (L.) infantum chagasi* foi capaz de induzir a expressão do gene *CD200*. De maneira interessante, diferente de infecções por *L. (L.) amazonensis*, a indução de *CD200* em macrófagos murinos foi observada em tempos mais tardios de infecção. Ensaios de imunoprecipitação e *Western blot* indicaram que a indução da expressão do gene foi acompanhada da síntese da proteína, que atingiu os seus maiores níveis a 120 horas pós-infecção. A presença de CD200 em MMO infectados sugere o envolvimento dessa molécula em tempos mais tardios de infecção por *L. (L.) infantum chagasi*

Palavras-chave: *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, Leishmaniose Visceral, Interação patógeno-hospedeiro, CD200, Macrófago.

Abstract

BRESSAN, A. **Expression of the CD200 immunomodulatory protein in murine macrophages infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi***. 2015. 67 p. Masters thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Leishmaniasis is a general term for diseases caused by parasites of the genus *Leishmania*, which affects about 2 million people per year worldwide. Visceral Leishmaniasis (VL), considered the most severe form of this disease, is caused in Brazil by the species *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. In order to ensure its own survival, some parasites are able to manipulate the defense responses of the immune system by the inhibition of host antimicrobial mechanisms. Recent studies have evidenced the role of the immunomodulatory protein CD200 in the infective process of *L. (L.) amazonensis*, which causes cutaneous leishmaniasis. Despite recent advances on the characterization of the mechanisms involved in *Leishmania* evasion of host immune system, little is known about this subject in species that cause VL. In this context, the goal of the present study was to investigate whether different biological forms of *L. (L.) infantum chagasi* are able to induce the expression of the CD200 protein in bone marrow macrophages (BMM). In *ex vivo* infections, it was not observed an increase in the number of intracellular parasites in BMM infected neither by promastigotes nor by axenic amastigotes. Despite the absence of proliferation, *L. (L.) infantum chagasi* was able to induce the expression of the *CD200* gene. Interestingly, different from infections caused by *L. (L.) amazonensis*, the induction of *CD200* in BMM was observed at late times of infection. Immunoprecipitation and Western blot assays demonstrated that the induction of the *CD200* gene was accompanied by protein synthesis, which reached its highest levels at 120 hours post-infection. The presence of CD200 in infected BMM suggests the involvement of this molecule in late times of infections by *L. (L.) infantum chagasi*.

Keywords: *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, Visceral Leishmaniasis, Host-pathogen interaction, CD200, Macrophage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

- Figura 01** | Regiões endêmicas e casos reportados de leishmaniose no ano de 2012. (A) Leishmaniose cutânea. (B) Leishmaniose visceral (“WHO | Leishmaniasis,” 2015). 17
- Figura 02** | Ciclo biológico de *Leishmania*. (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006). 18
- Figura 03** | Manifestações clínicas da leishmaniose. (A) Leishmaniose cutânea. (B) Leishmaniose mucocutânea. (C) Leishmaniose visceral. (D) Leishmaniose cutânea pós-Calazar (Adaptado de CHAPPUIS et al., 2007). 20
- Figura 04** | Via de sinalização da proteína imunomodulatória CD200 e do seu receptor CD200R. (Adaptado de HOLMANNOVÁ et al., 2012a)..... 28
- Figura 05** | Curva de crescimento em cultura de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. 40
- Figura 06** | Crescimento intracelular de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em macrófagos murinos a 2, 24 e 48 hpi. 41
- Figura 07** | Crescimento intracelular de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em macrófagos murinos a 2, 72 e 120 hpi. 42
- Figura 08** | Macrófagos de medula óssea infectados pela forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi* e analisados a 2 hpi (A – E) e 120 hpi (F - J). 43
- Figura 09** | Crescimento intracelular de formas amastigotas axênicas de *L. (L.) infantum chagasi* em macrófagos murinos a 1, 24 e 48 hpi. 44

Figura 10 Crescimento intracelular de formas amastigotas axênicas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> em macrófagos murinos a 1, 72 e 120 hpi.	45
Figura 11 Expressão relativa dos níveis de transcritos de CD200 quantificados por RT-qPCR em MMO a 2 e 120 hpi com formas promastigotas do parasito <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	46
Figura 12 Expressão relativa dos níveis de transcritos de CD200 quantificados por RT-qPCR em MMO a 1 e 120 hpi com formas amastigotas axênicas do parasito <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	47
Figura 13 Níveis da proteína CD200 em MMO não infectados (NI) ou infectados (I) por 2 h com parasitos promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> processados imediatamente ou 120 hpi pela técnica de <i>Western blot</i>	49

TABELAS

Tabela 01 Patógenos que exploram a via CD200/CD200R. (Adaptado de VAINE; SOBERMAN, 2014)	29
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina do soro bovino
°C	Graus Celsius
cDNA	DNA complementar ao RNA mensageiro
CD200	<i>Cluster of Differentiation 200</i>
CD200R	Receptor de CD200
CR1	Receptor de complemento 1
CR3	Receptor de complemento 3
g	Grama
gp63	Glicoproteína 63
h	Hora
hpi	horas pós-infecção
I	Infectado(s)
IFN	Interferon
IgSF	Superfamília das imunoglobulinas
IL	Interleucinas
iNOS	enzima óxido nítrico sintase
IP	Imunoprecipitação
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose visceral
M	Molar
min	Minuto
MMO	Macrófagos de medula óssea
mRNA	RNA mensageiro
µm	Micrômetro
NI	Não infectado(s)
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade ótica
PBS	Tampão salina fosfato

PFA	Paraformaldeído
RPMI	Meios <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF	Fator de transformação do crescimento
s	Segundo
SFB	Soro fetal bovino
V	Volt
xg	Força gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A leishmaniose e seus agentes etiológicos	16
1.2 O sistema imune do hospedeiro frente à infecção por <i>Leishmania</i>	22
1.2.1 A <i>Leishmania</i> e os mecanismos de evasão do sistema imune	24
1.3 A proteína imunomodulatória CD200	26
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i>	32
3.2.1 Obtenção e cultivo do parasito	32
3.2.2 Curva de crescimento das formas promastigotas	33
3.3 Macrófagos de medula óssea (MMO)	33
3.4 Infecção experimental de macrófagos com <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	34
3.5 Produção de soro anti- <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	34
3.6 Imunofluorescência indireta	35
3.7 Análises de expressão gênica	35
3.7.1 Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)	35
3.7.2 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	36
3.8 Detecção da proteína CD200	36
3.8.1 Extração e quantificação de proteínas totais	36
3.8.2 Imunoprecipitação	37
3.8.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page)	37
3.8.4 Western blot	37
3.9 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)	38
3.10 Análise estatística	38

4 RESULTADOS	39
4.1 Crescimento em cultura de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	39
4.2 Crescimento intracelular de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> em macrófagos murinos	40
4.3 Expressão gênica de <i>CD200</i> em macrófagos infectados por <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	46
4.4 Presença da proteína <i>CD200</i> em macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	48
4.5 Produção de óxido nítrico	49
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 A leishmaniose e seus agentes etiológicos

A leishmaniose compreende um conjunto de manifestações causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidas ao hospedeiro vertebrado por meio da picada de um artrópode vetor, chamado de flebotomíneo (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Essa doença pode atingir diferentes hospedeiros mamíferos, incluindo o homem, sendo endêmica em pelo menos 98 países (CECILIO et al., 2014). A leishmaniose está presente em regiões tropicais, subtropicais e no sudeste europeu, em regiões que variam de florestas tropicais nas Américas até desertos na Ásia ocidental, englobando tanto zonas rurais quanto regiões periurbanas (**Figura 01**) (HERWALDT, 1999). Ela é considerada uma doença negligenciada por acometer principalmente populações menos favorecidas. Uma estimativa global indicou que anualmente podem surgir pelo menos 2 milhões de novos casos e que 350 milhões de pessoas estejam sob risco de infecção (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014)

Os protozoários do gênero *Leishmania*, agentes etiológicos da leishmaniose, são parasitas obrigatórios pertencentes à família Trypanasomatidae da ordem Kinetoplastida. Esse grupo é composto por mais de 30 espécies, das quais 11 têm significativa importância médica e veterinária (CECILIO et al., 2014; ELMAHALLAWY et al., 2014). Os parasitos *Leishmania* possuem um complexo ciclo de vida digenético, alternando entre um hospedeiro vertebrado suscetível (mamíferos), e um artrópode vetor permissível (insetos flebotomíneos) (CECILIO et al., 2014). Os insetos responsáveis pela transmissão desses parasitos no “Velho Mundo” são flebotomíneos do gênero *Phlebotomous* e, no “Novo Mundo”, do gênero *Lutzomyia*.

Figura 01 | Regiões endêmicas e casos reportados de leishmaniose no ano de 2012. (A) Leishmaniose cutânea. (B) Leishmaniose visceral

WHO | Leishmaniasis,(2015).

O parasito *Leishmania* apresenta-se sob duas principais formas morfológicas durante o seu ciclo de vida: a forma amastigota e a forma promastigota. As formas amastigotas são ovoides (2 a 4 µm de diâmetro) e possuem, além de um núcleo, um

cinetoplasto (mitocôndrias especializadas de protozoários da ordem Kinetoplastida) e um flagelo internalizado não funcional, sendo imóveis. Estão presentes no interior de células do hospedeiro mamífero e são altamente infectivas. As formas promastigotas são alongadas (15 a 28 μm de comprimento) e possuem, além do característico cinetoplasto, um flagelo visível (15 a 28 μm de comprimento), o que lhes permite mobilidade. Estão presentes no trato digestivo do inseto vetor e apresentam dois estágios, um estágio não infectivo, porém com alta taxa de multiplicação (promastigotas procíclicos) e outro altamente infectivo (promastigotas metacíclicos) (BATES; ROGERS, 2004; HERWALDT, 1999).

Conforme o local do desenvolvimento do parasito no trato digestivo do flebotomíneo, o gênero *Leishmania* pode ser ainda classificado em dois subgêneros: *Leishmania* (*Viannia*) e *Leishmania* (*Leishmania*). Enquanto *Leishmania* (*Viannia*) tem o seu desenvolvimento nas três porções do intestino (anterior, média e posterior), *Leishmania* (*Leishmania*) tem seu desenvolvimento restrito às regiões anterior e média (DEPLEDGE et al., 2010).

Figura 02 | Ciclo biológico de *Leishmania*.

Os hospedeiros reservatórios da maioria das espécies de *Leishmania*, a partir do qual os parasitas são transmitidos aos seres humanos, são roedores e cães (leishmaniose zoonótica); apenas para algumas espécies (por exemplo, *L. (L.) tropica* em áreas urbanas) a transmissão ocorre diretamente de um ser humano infectado para outro não infectado.

(leishmaniose antroponótica). Parasitas de *Leishmania* são transmitidos pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectados, que injetam formas promastigotas metacíclicas na pele do mamífero. As formas promastigotas infectam os macrófagos, onde se transformam em formas amastigotas, formas que replicam intracelularmente. Numa nova picada do flebotomíneo, macrófagos infectados são ingeridos pelo vetor e parasitas contidos no sangue atingem o intestino onde se transformaram na forma promastigota procíclica que replicara várias vezes até transformar em promastigota metacíclica que migrará à parte anterior do intestino esperando um novo repasto sanguíneo. (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006).

Durante o ciclo de vida desses protozoários, as formas promastigotas infectivas, chamadas metacíclicas, são introduzidas na pele do hospedeiro durante o processo de repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectados. As células de defesa imunológica do hospedeiro fagocitam esses parasitos e, uma vez internalizados, transformam-se na forma amastigota. A partir desse momento, eles estão aptos à proliferação intracelular e disseminação. Os insetos flebotomíneos que picarem um mamífero infectado irão ingerir células infectadas ou formas amastigotas livres do parasito. No trato digestivo desse inseto, os parasitos passarão por processos de diferenciação até que assumam a forma promastigota e estejam aptos para um novo ciclo (**Figura 02**) (BATES; ROGERS, 2004; CECILIO et al., 2014).

Normalmente, a transmissão natural do parasito para humanos se dá pela picada de fêmeas infectadas. Apesar disso, também pode ocorrer, embora mais raramente, transmissões horizontais por meio do compartilhamento de seringas entre os usuários de drogas intravenosas, transfusão sanguínea e infecções venéreas e também transmissões verticais da mãe para filho durante a gestação (ELMAHALLAWY et al., 2014).

As três principais formas de manifestação da leishmaniose no homem são: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucocutânea (LM) e Leishmaniose Visceral (LV), sendo esta última a forma mais grave da doença. Outra manifestação secundária da doença pode ainda ocorrer após uma forma visceral, denominada Leishmaniose cutânea pós-Calazar (**Figura 03**) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Essas variações se diferem principalmente em razão da espécie do parasito envolvido, mas também devido a outros fatores, como estado nutricional, susceptibilidade do hospedeiro (incluindo fatores genéticos), o vetor de transmissão, bem como o meio ambiente e outros fatores sociais (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006).

Figura 03 | Manifestações clínicas da leishmaniose. (A) Leishmaniose cutânea. (B) Leishmaniose mucocutânea. (C) Leishmaniose visceral. (D) Leishmaniose cutânea pós-Calazar.

Adaptado de CHAPPUIS et al.,(2007).

A LC é a forma mais branda da doença e pode ser classificada como localizada ou difusa. Na forma localizada, a doença se manifesta por úlceras únicas ou lesões nodulares locais ou próximas ao local da picada do inseto. Geralmente, ocorrem em áreas descobertas do corpo, como a face, antebraços e pernas. Normalmente, os sinais clínicos desaparecem em alguns meses, evoluindo para a cura. Várias espécies estão associadas à LC, como *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica* no “Velho Mundo” e *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) braziliensis* no “Novo Mundo” (DAVID; CRAFT, 2009).

A forma difusa da LC manifesta-se por lesões nodulares e de diferentes tamanhos em locais diversos do corpo, normalmente distantes do local da picadura. Diferente da doença causada por *L. (L.) amazonensis*, que em alguns casos pode evoluir para a cura, a doença causada por *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) braziliensis* pode progredir para uma forma ainda mais grave da doença, a leishmaniose mucocutânea. A LM, causada principalmente pelo parasito *L. (V.) braziliensis*, é

caracterizada por causar lesões destrutivas de mucosas e cartilagens, principalmente na região da boca e do nariz (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A LV, também conhecida como Calazar, é certamente a manifestação mais grave da doença e é causada pelos parasitos *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*. Em países do “Novo Mundo” como o Brasil, a forma visceral é associada ao parasito *L. (L.) infantum*, também conhecido como *L. (L.) chagasi* ou *L. (L.) infantum chagasi* (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012), foco de estudo do presente trabalho.

Nas Américas, a LV é uma doença zoonótica, que tem a raposa e o gambá como potenciais reservatórios silvestres e os cães como principais reservatórios urbanos. O principal vetor é o flebótomo *Lutzomyia longipalpis*, embora existam registros de outros vetores que contribuam para a transmissão, como *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia evansi* (BELO et al., 2013).

As manifestações clínicas da doença podem variar de formas assintomáticas até o comprometimento de órgãos viscerais, como o baço e o fígado. Outros órgãos podem ser ainda comprometidos, como os nódulos linfáticos, a medula óssea, os pulmões e, em casos raros, o cérebro (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006). O período de incubação da doença pode variar de meses a anos, podendo levar a óbito principalmente se associada a coinfeções ou a complicações hemorrágicas (BELO et al., 2013; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Pacientes com LV apresentam febre de início insidioso, perda de peso e organomegalia, sendo a esplenomegalia mais evidente que a hepatomegalia. A linfadenopatia pode ser observada em pessoas infectadas no Sudão, mas é rara em outras regiões endêmicas. O escurecimento da pele é descrito principalmente no Sul da Ásia (local de origem do nome Calazar, que significa febre negra em hindi). Anemia, trombocitopenia e neutropenia são geralmente remarcadas, refletindo supressão das funções da medula óssea e do baço. Os pacientes passam a correr alto risco de infecções adicionais, o que pode complicar muito o quadro da doença, que se não tratada pode ser fatal (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Finalmente, outra forma de manifestação da doença é a leishmaniose cutânea pós-Calazar. Não é uma das formas presentes no Brasil, pois está associada ao parasito *L. (L.) donovani*. Ela se manifesta por erupções cutâneas crônicas que aparecem após o tratamento de LV (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

1.2 O sistema imune do hospedeiro frente à infecção por *Leishmania*

Após a deposição de formas promastigotas infecciosas na derme, o sistema imune inato do hospedeiro detecta a invasão parasitária e, além de recrutar células inflamatórias para o local num curto espaço de tempo, também promove a indução da imunidade adaptativa. A detecção inicial do parasito envolve receptores de reconhecimento e componentes do sistema complemento, além de diferentes tipos de células do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (KHADEM; UZONNA, 2014).

A entrada das formas promastigotas nos macrófagos ocorre após a opsonização dos parasitas, via receptor de complemento 1 (CR1) ou 3 (CR3), mas outros receptores podem estar envolvidos (LODGE; DESCOTEAUX, 2005). Receptores do tipo Toll (TLR, do inglês *Toll like receptor*), como TLR2, TLR3 (FLANDIN; CHANO; DESCOTEAUX, 2006), TLR4 (MUKHERJEE et al., 2012), TLR7 (PAUN et al., 2011) e TLR9 (MUKHERJEE et al., 2012) estão relacionados com o processo sensorial da imunidade inata e do reconhecimento da *Leishmania*. Esse reconhecimento conduz à ativação de vias de sinalização intracelulares, relacionados principalmente a produção de citocinas inflamatórias e Interferon-gamma (IFN- γ) (FARIA; REIS; LIMA, 2012), necessárias para o início de respostas inflamatórias e o controle da proliferação dos parasitas (KHADEM; UZONNA, 2014).

Durante a leishmaniose, as interações microbicidas entre o parasita e as células do hospedeiro ocorrem em duas etapas. Primeiro, durante a fagocitose, os parasitos promastigotas podem ser submetidos aos efeitos de reações oxidativas oriundas do processo da fagocitose mediada pelos macrófagos. A segunda etapa envolve a ativação de respostas intracelulares contra as formas amastigotas (GANTT et al., 2001).

A ativação de respostas oxidativas pela produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são os maiores mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares (SANTOS et al., 2012). Duas respostas oxidantes derivadas de macrófagos são identificadas como críticas no controle da infecção por *Leishmania*. Durante as primeiras fases da infecção, é produzido ânion superóxido (O_2^-) como parte do estresse respiratório de macrófagos em resposta à fagocitose, e ao qual o parasito promastigota é sensível. Um segundo oxidante leishmanicida produzido por macrófagos é o óxido nítrico (NO). Ao contrário do O_2^- , que é gerado

durante a fagocitose do parasita, o NO é formado após a ativação dos macrófagos por IFN- γ e o Fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α), sendo mais relevante na eliminação de formas amastigotas (GANTT et al., 2001).

A maioria das pessoas infectadas numa doença visceral tem uma infecção assintomática, mas os mecanismos pelos quais o controle da doença é realizado são relativamente desconhecidos. Uma intensa produção de citocinas é induzida durante a doença visceral. A produção de IFN- γ parece ser crucial para o controle dos parasitas e para o desenvolvimento de resistência à infecção (SQUIRES et al., 1989). Contudo, múltiplas citocinas e quimiocinas são detectadas no sangue de pacientes com leishmaniose visceral. Em resposta a esse tipo de infecção, são produzidas elevadas quantidades de IFN- γ , TNF e interleucinas (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-33). Sendo assim, a infecção ativa não ocorre devido à ausência de citocinas pró-inflamatórias, mas pela presença de ambas, citocinas pró e anti-inflamatórias (KURKJIAN et al., 2006).

Em infecções por *Leishmania*, considera-se que os linfócitos B não desempenham um papel protetor significativo, ao contrário, têm sido implicadas na exacerbação da doença visceral (BÖHME et al., 1986). Em contraste, os linfócitos T são de suma importância para o desenvolvimento de respostas leishmanicidas eficazes. As células T CD4⁺ são responsáveis pela produção de citocinas importantes para a ativação de macrófagos e para o início de uma resposta protetora eficaz. As células T CD8⁺ citotóxicas também desempenham um papel protetor e são necessárias para a eliminação efetiva de parasitas e para a geração de respostas de memória imunológica (STERN et al., 1988).

Embora estudos clínicos utilizando amostras de sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral sejam informativos, eles não refletem necessariamente os eventos ou mecanismos imunes que ocorrem em órgãos infectados. Estudos em modelos experimentais demonstram que as respostas imunes específicas de órgãos desempenham um papel significativo na defesa do hospedeiro, com padrões de tropismo e respostas diferenciadas no fígado e baço (ENGWERDA; KAYE, 2000).

No entanto, os parasitas *Leishmania* desenvolveram, ao longo da evolução, diversos mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Esses incluem a indução de moléculas imunossupressoras, interrupção de vias de sinalização celular, assim como a indução de células T reguladoras. Esses

mecanismos ajudam o parasita a evitar a sua eliminação e a aumentar as chances de sucesso na transmissão para um novo hospedeiro (KEDZIERSKI; EVANS, 2014).

1.2.1 A *Leishmania* e os mecanismos de evasão do sistema imune

O parasito *Leishmania* tem a habilidade de entrar nos macrófagos dos hospedeiros mamíferos de maneira segura para si, além de se replicar em células que são recrutadas para destruí-lo (SHIO et al., 2012). Esses parasitos desenvolveram mecanismos adaptativos únicos para assegurar a sua sobrevivência em ambientes adversos durante o seu ciclo de vida, pois eles não somente devem lidar com o ambiente hostil encontrado no trato digestivo do inseto vetor como também devem evitar a sua destruição e eliminação pelo sistema imune do hospedeiro vertebrado (CUNNINGHAM, 2002).

Para o sucesso no processo de infecção, são necessárias várias modificações e adaptações do parasito, que se iniciam antes mesmo do contato com o hospedeiro vertebrado, ainda no inseto-vetor. Uma das mais importantes alterações ocorre na expressão de moléculas de sua superfície celular, como o lipofosfoglicano (LPG) e a metaloprotease gp63, entre outras proteínas. Os parasitos promastigotas procíclicos, diferentemente dos amastigotas, expressam em sua superfície grandes quantidades de LPG e de gp63, o que os protege de enzimas hidrolíticas no trato digestivo do flebotomíneo e facilitam a sua adesão ao epitélio intestinal (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999).

Durante a transformação da forma promastigota procíclica para a forma metacíclica, mudanças na estrutura do LPG, assim como o aumento da expressão de gp63 ajudam o parasito no processo de infecção por protegê-lo do sistema complemento do hospedeiro (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999). A alteração da estrutura do LPG, assim como o aumento da expressão de gp63, inibe a lise mediada pelo complemento. Esse processo, além de protegê-lo do sistema complexo de ataque à membrana, favorece a sua interiorização devido à opsonização do parasito com produtos da clivagem de C3b, que vão se ligar a receptores específicos no macrófago. Associado a esses mecanismos, existem outros receptores que contribuem para a interiorização dos parasitos promastigotas, como os receptores de manose-fucose, receptores de fibronectina, entre outros (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999).

Uma vez no interior do macrófago, o parasito é protegido da degradação no fagolisossomo por uma variedade de adaptações para inibir os mecanismos de defesa celulares. Entre elas estão a inibição da formação completa do fagolisossomo, a resistência a enzimas hidrolíticas, alterações de vias de sinalização celular, assim como a inibição da produção de NO (CUNNINGHAM, 2002).

Enquanto as formas amastigotas conseguem sobreviver em ambientes inóspitos como vacúolos de pH ácido, as formas promastigotas tiveram que desenvolver estratégias para sobreviver até a sua transformação para a forma amastigota. Uma dessas maneiras se dá pela inibição da fusão entre fagossomos e lisossomos. Alguns parasitos, como *L. (L.) donovani*, utilizam o seu LPG para a inibição dessa fusão, criando repulsão entre as membranas dessas vesículas (DESCOTEAUX; TURCO, 1999).

Por sua vez, as formas amastigotas presentes nos fagolisossomos são capazes de suportar ou inibir enzimas hidrolíticas do hospedeiro. O LPG, resistente a essas enzimas lisossomais, pode agir como uma barreira física de degradação (DESCOTEAUX; TURCO, 1999). Outra forma de inibição dessas enzimas se dá pela gp63, que tem ótima atividade sob as condições ácidas dos fagolisossomos, podendo inibir as enzimas lisossomais (CUNNINGHAM, 2002).

Parasitos *Leishmania* também podem atuar prejudicando algumas vias de sinalização dos macrófagos. Dessa maneira algumas funções celulares podem ser perturbadas, como a capacidade de resposta ao IFN- γ . Essas perturbações podem ocorrer por alteração da transdução de sinal, por meio do rompimento da fosforilação intracelular, alteração de quinases e fosfatases ou ainda por fosfatases do próprio parasito (KANE; MOSSER, 2000). Num estudo realizado por Nandam e colaboradores (1999) os resultados obtidos indicaram que a infecção de macrófagos por *L. (L.) donovani* atenua a sinalização intracelular pela ativação de tirosino-fosfatases. Olivier e colaboradores (1998) verificaram que os parasitos não só podem perturbar eventos de fosforilação da célula, como também podem modificar ativamente fosfoproteínas de macrófagos por expressarem a sua própria fosfatase.

Outra maneira desenvolvida por *Leishmania* para garantir a sua sobrevivência se dá pela modulação da produção de citocinas nos macrófagos. Ambos, parasitos promastigotas e amastigotas, conseguem modular negativamente respostas citotóxicas pela diminuição da produção de IL-12. Ligações a receptores de macrófagos, incluindo receptores para o complemento e receptores do fragmento Fc

de imunoglobulinas, que mediam a fagocitose de promastigotas e amastigotas, respectivamente, mostraram-se responsáveis pela supressão de IL-12. A ligação do receptor Fc também induz a produção de IL-10, que é associada à supressão da atividade antimicrobiana de macrófagos (CUNNINGHAM, 2002).

A ativação de respostas oxidativas, como espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, é o maior mecanismo de defesa celular contra patógenos intracelulares (SANTOS et al., 2012). Os macrófagos sintetizam NO pela ação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em resposta a sinais extracelulares, como IFN- γ e LPS (CUNNINGHAM, 2002). Embora esse seja um método eficaz de controle de patógenos intracelulares, existem patógenos que podem apresentar resistência natural ao NO, como já relatado para a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (FANG, 1997) e os protozoários *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* (GIUDICE et al., 2007) e *L. (L.) chagasi* (SANTOS et al., 2012).

Além de alguns patógenos terem adquirido resistência a esse importante agente microbicida, Cortez e colaboradores (2011) demonstraram que o parasito *L. (L.) amazonensis*, ao infectar macrófagos, tem a capacidade de inibir a produção de NO por um mecanismo mediado pela proteína imunomodulatória CD200 (do inglês, *Cluster of Differentiation* 200). A indução de CD200 inibe a ativação dos macrófagos e a produção de NO, garantindo a sobrevivência e a replicação do parasita no interior dessas células (CORTEZ et al., 2011).

1.3 A proteína imunomodulatória CD200

A principal função do sistema imunológico é proteger o organismo contra danos, garantindo uma resposta adequada contra agentes patogênicos (vírus, bactérias, fungos e parasitas), estímulos ambientais e também contra danos que podem resultar da ativação inadequada do sistema imunológico. O sistema imunológico, conseqüentemente, deve compreender mecanismos que mantêm a homeostase, o que inclui mecanismos de ativação e inibição (HOLMANNOVÁ et al., 2012a).

As respostas imunológicas de células mielóides podem ser controladas por uma grande quantidade de receptores inibitórios (RAVETCH; LANIER, 2000). A proteína CD200 e o seu receptor CD200R constituem um dos pares ligante-receptor melhor caracterizados e estão envolvidos na regulação negativa de células mielóides

e linfóides (HOLMANNOVÁ et al., 2012a). Juntas elas produzem efeitos imunomoduladores capazes de induzir tolerância imunológica, regular a diferenciação, adesão e quimiotaxia de várias populações celulares, assim como a liberação de citocinas e mediadores, como IL10 e TGF- β (JENMALM et al., 2006).

A molécula CD200, cuja expressão não está presente em todos os tipos celulares, contém dois domínios IgSF (superfamília das imunoglobulinas) e uma região transmembrana única, um tipo de estrutura particularmente comum em proteínas que medeiam interações célula-célula. O receptor CD200R também foi identificado e, assim como a CD200, também apresentou uma estrutura constituída por dois domínios IgSF (BARCLAY et al., 2002).

As moléculas CD200 e CD200R são glicoproteínas transmembrana de passagem única, estruturalmente semelhantes a imunoglobulinas. O domínio extracelular de ambas contém regiões do tipo C (domínios constantes) e do tipo V (domínios variáveis, que conferem a capacidade de ligar-se a antígenos específicos) (HOLMANNOVÁ et al., 2012a). Essas glicoproteínas são idênticas em suas regiões extracelulares, mas diferem na sua cauda citosólica. A CD200 tem uma região intracelular mínima que não tem a capacidade de transmitir os sinais de ativação ou inibição. Em contrapartida, o receptor CD200R contém três resíduos citoplasmáticos de tirosina, se diferenciando também da maioria dos receptores imunológicos inibitórios, que contêm um domínio inibitório ITIM (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine - based Inhibitory Motif*) (BARCLAY et al., 2002).

A CD200 é expressa em diferentes tipos celulares, tanto de origem hematopoiética, como as células mielóides (mastócitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas) e as células linfóides (células T e B), e de origem não hematopoiética, como os neurônios, células cardíacas, células endoteliais, células dos trofoblastos, células da retina e nervo óptico (DICK et al., 2001; ROSENBLUM et al., 2004a; WEBB; BARCLAY, 1984). A expressão de CD200 é induzida em resposta à ativação do sistema imunológico durante uma resposta inflamatória, aumentando rapidamente na presença de TNF- α e IFN- γ . Além da modulação da expressão de CD200, células em apoptose têm uma elevada quantidade de CD200 na sua superfície, o que impede o desenvolvimento de doenças autoimunes (ROSENBLUM et al., 2004b).

A sinalização resultante da ligação entre CD200 e CD200R ocorre após uma série de fosforilações desencadeadas no receptor (BARCLAY et al., 2002). Os

resíduos de tirosina de CD200R são fosforilados e induzem as proteínas inibidoras adaptadoras Doks (Dok 1 e Dok 2). As Doks estão envolvidas na fosforilação e ativação de RasGAP (*RAS p21 protein activator 1*) e recrutamento da fosfatase SHIP (*Inositol 5' phosphatase*). A ativação de RasGAP e SHIP conduz à inibição das vias MAPK (Proteíno-quinases ativadas por mitógenos) e NF- κ B (fator nuclear kappa B) (**Figura 04**). Os resultados dessa interação culminam na diminuição da degranulação de mastócitos, diminuição da síntese de citocinas, como TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-17, IL-6 e IL-8, diminuição da atividade de iNOS e aumento da síntese de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β (HOLMANNOVÁ et al., 2012a). A regulação da sinalização CD200R pode ocorrer por modificações pós-traducionais, como a fosforilação de tirosinas da cauda citoplasmática de CD200R ou pela indução da expressão ou a regulação negativa de qualquer um dos componentes do par de ligantes CD200R/CD200 (VAINE; SOBERMAN, 2014).

Figura 04 | Via de sinalização da proteína imunomodulatória CD200 e do seu receptor CD200R.

A sinalização resultante da ligação entre CD200 e CD200R ocorre após uma série de fosforilações desencadeadas no receptor. Os resultados dessa interação culminam com a

ativação ou inibição de diferentes respostas imunológicas. Adaptado de HOLMANNOVÁ et al. (2012a).

A via de sinalização inibidora resultante da ligação entre CD200 e CD200R tem um importante papel de limitação da resposta inflamatória numa ampla gama de doenças inflamatórias (HERNANGÓMEZ et al., 2012; VAN DEN BORNE et al., 2014; WALKER et al., 2009; WANG et al., 2007). Sendo assim, patógenos tem encontrado maneiras de explorar essa via de sinalização a seu favor, seja pela alteração da expressão de CD200 e/ou CD200R, ou pela mimetização de CD200 para se ligar ao CD200R do hospedeiro (**Tabela 01**) (VAINE; SOBERMAN, 2014).

Tabela 01 | Patógenos que exploram a via CD200/CD200R.

Patógeno	Efeito na expressão de CD200/CD200R	Gravidade da doença (Em nocautes ou tratados com CD200 recombinante)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Aumenta CD200 e CD200R	Diminui (CD200 ^{-/-})
<i>Leishmania amazonensis</i>	Aumenta CD200	Diminui (CD200 ^{-/-})
<i>Neisseria meningitidis</i>	Aumenta CD200	Aumenta (CD200 ^{-/-})
<i>Schistosoma mansoni</i>	Aumenta CD200 e CD200R	-
<i>Salmonella enterica</i>	Aumenta CD200 e CD200R	-
<i>Schistosoma haematobium</i>	Aumenta CD200R	-
Mouse Hepatitis corona Virus (MHV)	-	Diminui (CD200 ^{-/-})
Influenza virus A	-	Aumenta (CD200 ^{-/-}) Diminui (CD200 Fc)
		Diminui (CD200R ^{-/-})
Herpes Simplex Virus – 1 (HSV-1) - ocular	Aumenta CD200R	Diminui (CD200 Fc)
Herpes Simplex Virus – 1 (HSV-1) - cerebro	-	Diminui (CD200R ^{-/-})

Adaptado de VAINE; SOBERMAN, (2014).

O envolvimento da sinalização imunomodulatória de CD200 em leishmaniose foi estudada pela primeira vez na interação macrófago - *L. (L.) amazonensis* (CORTEZ et al., 2011). Cortez e colaboradores (2011) verificaram que *L. (L.) amazonensis*, parasito responsável por graves manifestações da LC, induz a expressão de CD200 em macrófagos da medula óssea de camundongos C57BL/6

selvagens. Foi observado que a indução de CD200 nessas células foi ponto chave para o sucesso do processo infeccioso desse parasito. Quando a infecção foi testada em camundongos mutantes para a CD200, a replicação e virulência diminuíram significativamente, sendo novamente restauradas por meio do tratamento com a proteína recombinante CD200. No entanto, nem todas as espécies de *Leishmania* utilizam esse mecanismo, como é o caso de *L. (L.) major* (CORTEZ et al., 2011). Diferente de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* não é capaz de induzir a expressão de CD200, porém em tratamentos com CD200 recombinante, o perfil de virulência dessa espécie é comparável ao de *L. (L.) amazonensis*. A indução de CD200 compromete tanto a indução de iNOS quanto a produção de NO, garantindo a sobrevivência e replicação do parasito nos macrófagos (CORTEZ et al., 2011).

Contudo, até o momento a participação da via imunomodulatória mediada por CD200 foi somente investigada em espécies causadoras de LC. Haja vista a gravidade e a importância epidemiológica da LV, a manifestação mais grave da leishmaniose, estudos a respeito da interação dos parasitos causadores dessa doença com o sistema imunológico dos hospedeiros tornam-se imprescindíveis. Nesse contexto, o presente trabalho investigou o envolvimento dessa molécula durante a infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, responsável pela LV no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a expressão e o efeito imunomodulador da proteína CD200 em macrófagos murinos infectados experimentalmente por formas promastigotas e amastigotas axênicas do parasito *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.

2.2 Objetivos específicos

1. Analisar o perfil de proliferação intracelular de formas promastigotas e amastigotas axênicas em macrófagos murinos por ensaios *ex vivo*;
2. Quantificar a expressão do gene *CD200* em macrófagos experimentalmente infectados com formas promastigotas e amastigotas axênicas;
3. Detectar a presença da proteína CD200 em macrófagos experimentalmente infectados com formas promastigotas e amastigotas axênicas;
4. Comparar a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados ou não com *L. (L.) infantum chagasi*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos isogênicos fêmeas da linhagem C57BL/6, entre dez e doze semanas de idade, foram obtidos e mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo (USP). Hamsters dourados adultos machos foram obtidos do biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do ICB da USP (Protocolo nº 023 da folha 03 do livro 03, aprovado em 23 de abril de 2013).

3.2 *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

3.2.1 Obtenção e cultivo do parasito

Neste trabalho, foram utilizados parasitos *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* da cepa MHOM/BR/1972/LD. As formas amastigotas foram obtidas a partir de macerados de baço de hamsters previamente infectados. Após lavagem em PBS (137 mM NaCl, 10 mM Fosfato, 2,7 mM KCl, pH 7,4), o número de amastigotas foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Para a manutenção e obtenção de novos parasitos, formas amastigotas recém-isoladas foram novamente inoculadas no peritônio de hamsters.

Formas promastigotas do parasito foram obtidas a partir da diferenciação de parasitos amastigotas cultivadas em meio 199 (Invitrogen) suplementado com 5% penicilina/streptomicina, 0,1% de hemina, 10 mM de adenina, 2% de urina humana e 10% de soro fetal bovino (SFB), pH 7,2 a 26 °C. A manutenção das culturas foi realizada através de repiques semanais, até o prazo máximo de oito semanas, quando então eram substituídas por novas culturas.

Formas amastigotas axênicas foram obtidas a partir da diferenciação de culturas em fase estacionária de formas promastigotas em cultivo em meio 199 modificado para formas axênicas (meio 199 suplementado com 5%

penicilina/streptomicina, 0,1% de hemina, 10 mM de adenina, 2% de urina humana e 10% de SFB, pH 5,2). Para isso, culturas de promastigotas em meio 199 foram transferidas para garrafas de 75 cm² contendo meio 199 modificado para formas axênicas, na proporção 1:1. As culturas foram inicialmente mantidas por 16 h a 26 °C e então incubadas a 32 °C por três dias. Após esse período, as culturas foram transferidas para garrafas de 75 cm² contendo apenas meio 199 modificado para formas axênicas e repicadas semanalmente para manutenção dos estoques.

3.2.2 Curva de crescimento das formas promastigotas

As curvas de crescimento das formas promastigotas foram obtidas a partir de culturas de 5 mL de meio 199 com um inóculo inicial de 1×10^6 parasitos/mL. As culturas foram incubadas a 26 °C e os parasitos contados, em câmara de Neubauer, a cada 24 h até a estabilização do crescimento do número de parasitos (fase estacionária de crescimento).

3.3 Macrófagos de medula óssea (MMO)

Os macrófagos foram obtidos a partir da diferenciação de células extraídas da medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6. Após coletados, os ossos foram lavados em etanol 70 °GL por 2 min e imersos em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de SFB, 2 mM L-glutamina e 100 U/mL de penicilina G. As duas epífises de cada osso foram cortadas e pelas extremidades foram injetados 5 mL de meio RPMI. O volume coletado foi centrifugado (1500 $\times g$, 4 °C, 5 min.) e o precipitado celular resultante suspenso em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% de SFB e 20% de sobrenadante de culturas de células L929 (BECKER et al., 2009).

Para a diferenciação em macrófagos, 4×10^6 células, num volume de 10 mL, foram semeadas em placas de Petri a 37 °C por quatro dias na presença de 5% CO₂. Após esse período, foram adicionados mais 10 mL de meio RPMI suplementado por placa. A viabilidade das células foi determinada em câmara de Neubauer pela contagem de suspensões celulares diluídas em azul de Trypan 5%. Foram consideradas células viáveis aquelas não coradas em azul.

3.4 Infecção experimental de macrófagos com *L. (L.) infantum chagasi*

Para as infecções experimentais, macrófagos de medula óssea foram semeados em placas estéreis de seis poços (Easypath) contendo 2 mL de meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB e 5% de sobrenadante de células L929. Nos poços para a contagem de parasitos, as células foram semeadas sobre lamínulas de 13 mm. As células foram incubadas por 24 h a 37 °C na presença de 5% CO₂ e posteriormente infectadas com formas amastigotas por 1 h (2:1; parasita:célula) ou com formas promastigotas em fase estacionária por 2 h (10:1; parasita:célula). Os parasitos não interiorizados foram removidos após lavagem do poço com PBS. Em seguida, um novo meio RPMI-1640 (suplementado com 10% de SFB e 5 % de sobrenadante de células L929) foi adicionado e as culturas mantidas a 37 °C na presença de 5% de CO₂. Amostras de células foram coletadas nos tempos iniciais de infecção (1 h para amastigota e 2 h para promastigota) e 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-infecção (hpi).

3.5 Produção de soro anti- *L. (L.) infantum chagasi*

Para a produção dos soros anti-*Leishmania*, cinco camundongos fêmea foram inoculados no peritônio com uma suspensão de 200 µL de PBS contendo 2×10⁶ formas amastigotas axênicas de *L. (L.) infantum chagasi* fixadas em 4% de paraformaldeído (PFA) em PBS. Após 2 semanas da primeira imunização, as doses seguintes foram realizadas a cada sete dias durante três semanas. Após o período de imunizações, os camundongos foram sacrificados e o sangue foi coletado por punção cardíaca. O sangue total, aproximadamente 2,5 mL, foi incubado por 30 min a 37 °C e então centrifugado a 1000 xg por 10 min à temperatura ambiente. O soro resultante foi transferido para um novo microtubo onde foi adicionado 0,05% de azida sódica. A avaliação dos soros dos camundongos foi realizada por imunofluorescência indireta de formas promastigotas em cultura ou de parasitos infectando MMO, conforme método descrito no item 3.6.

3.6 Imunofluorescência indireta

Monocamadas de macrófagos contendo 1×10^6 células foram lavadas com PBS e fixadas em 4% de PFA em PBS. Após novas lavagens em PBS, as lamínulas foram incubadas por 15 min em solução de cloreto de amônia (50 mM NH_4Cl) e então em solução de permeabilização/bloqueio (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1% de BSA, 0,05% de azida sódica, 0,1% de saponina) por 1 h à temperatura ambiente. Após bloqueio, as amostras foram lavadas em PBS e incubadas por 2 h à temperatura ambiente com soro anti-*L. (L.) infantum chagasi* (1:200) diluído em solução de permeabilização/bloqueio. As monocamadas foram então lavadas e incubadas por 1 h no escuro em câmara úmida com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa-fluor 488 (1:1000) contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para a marcação fluorescente dos núcleos. Após lavagem em PBS e água destilada, as lamínulas foram montadas com o reagente ProLong[®] Gold Antifade[®] (Invitrogen) sobre lâminas de vidro.

Após estarem secas, as lâminas foram analisadas ao microscópio de fluorescência e as imagens adquiridas em sistema fotográfico (Olympus BX51). Todas as lâminas foram mantidas a 4 °C e ao abrigo da luz até o momento da análise. Uma quantidade mínima de 300 células, em triplicata, foi analisada em cada tempo pós-infecção. O número de parasitos intracelulares foi expresso pela razão de parasitos por 100 macrófagos. Macrófagos não infectados foram utilizados como controle para a verificação da especificidade dos anticorpos anti-*L. (L.) infantum chagasi*.

3.7 Análises de expressão gênica

3.7.1 Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA total de macrófagos infectados ou não com *L. (L.) infantum chagasi* (2×10^6 células) foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. Para tal, as amostras armazenadas no reagente foram homogeneizadas e submetidas à extração por clorofórmio (5:1; Trizol:clorofórmio), e após centrifugação (12000 $\times g$, 15 min, 4 °C), o RNA obtido foi precipitado em isopropanol (2:1; Trizol:isopropanol) e hidratado com etanol 75 °GL. O pellet de RNA

precipitado foi então suspenso em água livre de RNase e as amostras posteriormente tratadas com DNase I (Invitrogen). Após a inativação da DNase (15 min a 65 °C), as amostras foram quantificadas espectrofotometricamente (NanoDrop ND-1000). Para a síntese de cDNA, 1 µg de RNA total foi reversamente transcrito utilizando-se a enzima *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), na presença de 0,5 mM de cada dNTP, 20 µM de iniciador oligo(dT) e inibidor de RNase (1 U/µL).

3.7.2 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

A quantificação dos transcritos de *CD200* (CD200-Fw: 5'- GAA TCA AAC AAT ACA GAA TG -3'; CD200-Rv: 5'- TGC CCC CCA CCA GTA ACA TGG -3') foi realizada por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems), na presença de 1 µL de cDNA, 0,4 µM de cada iniciador e 5 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas). As reações foram realizadas em triplicata de acordo com as seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e hibridização e extensão a 60 °C por 1 min. Os dados foram normalizados com o gene de referência *HPRT1* (HPRT1-Fw: 5'-TCA GTC AAC GGG GGA CAT AAA-3'; HPRT1-RV: 5'-GGG GCT GTA CTG CTT AAC CAG-3') e os níveis de expressão calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

3.8 Detecção da proteína CD200

3.8.1 Extração e quantificação de proteínas totais

Extratos proteicos totais de macrófagos infectados ou não com *L. (L.) infantum chagasi* (2×10^6 células) foram obtidos a partir da homogeneização das células em tampão de lise (Kit Pierce Crosslink IP, Thermo Scientific). A quantificação das proteínas totais foi realizada pelo método do ácido bicinonínico (Pierce BCA® Protein Assay Kit, Thermo Scientific), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 no comprimento de onda de 562 nm.

3.8.2 Imunoprecipitação

A proteína CD200 foi detectada por imunoprecipitação com o uso do Kit Pierce Crosslink IP (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Amostras contendo 100 µg de extrato total de proteína foram adicionadas a colunas contendo anticorpos anti-CD200 (R&D Systems) ligados a micropartículas associadas à proteína G/A. Após uma série de lavagens, as proteínas foram eluídas da coluna e então resolvidas em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes.

3.8.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras de proteína foram solubilizadas em tampão de amostra (Kit Pierce Crosslink IP - Thermo Scientific) e aquecidas a 95 °C durante 5 min. Após esse processo, as amostras foram resolvidas por eletroforese em géis de poliacrilamida sob condições desnaturantes (10-12%). As amostras migraram a uma voltagem de 80-120 V por 2 h em tampão de migração (124 mM Tris, 1 M glicina, 0,5% SDS, pH 8,3). A massa molecular das proteínas de interesse foi estimada utilizando-se o marcador de peso molecular PageRuler Plus Prestained Protein (Thermo Scientific) com padrões de 10 a 250 kDa.

3.8.4 *Western blot*

As amostras resolvidas em gel SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose Hybond-ECL[®] (GE Healthcare, Life Sciences) durante 2 h a 240 mA. Após confirmação da transferência das proteínas pela coloração com Ponceau 1%, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em tampão TBS-Tween20 (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 0,05 % Tween20) durante 1 h à temperatura ambiente sob agitação. Após lavagem em TBS-Tween20, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-CD200 (1:500 diluído na solução de bloqueio) por 16 h a 4 °C sob agitação. Terminado o período de incubação, as membranas foram lavadas em TBS-Tween20 e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:3000 diluído na solução de bloqueio) por 1 h à temperatura ambiente e sob agitação. Finalmente, após as lavagens, as membranas foram reveladas utilizando-se o reagente *SuperSignal*[®]

West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) no sistema de aquisição de imagens ChemiDoc XRS+ da BioRad. As imagens foram analisadas no programa Image Lab (BioRad).

3.9 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

Para a determinação dos níveis de NO, 50 µL de sobrenadante da cultura de macrófagos infectados ou não com *L. (L.) infantum chagasi* foram incubados por 10 min à temperatura ambiente na presença de 50 µL da solução de Griess, constituída pela mistura 1;1 (v:v) das soluções: 0,1 M sulfanilamida, 30% ácido orto-fosfórico; e 7,7 mM enediamina, 60% ácido orto-fosfórico. O conteúdo de nitrito foi determinado utilizando-se uma curva de nitrito de sódio (NaNO₂) como padrão e a leitura da absorbância foi realizada a 550 nm em leitora de microplacas.

3.10 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo Teste T de Student, utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 5.01. As diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Crescimento em cultura de *L. (L.) infantum chagasi*

Inicialmente, curvas de crescimento foram preparadas para a determinação do perfil de proliferação e diferenciação em cultura de *L. (L.) infantum chagasi*. Tais curvas foram importantes para a determinação do período da fase estacionária de crescimento, a qual foi utilizada para a obtenção de uma cultura com maior quantidade de formas metacíclicas e também para a diferenciação de formas promastigotas em amastigotas axênicas, para posterior realização dos ensaios de infecção experimental. As cinéticas foram iniciadas com inóculos de 1×10^6 parasitos/mL em garrafas de cultura contendo 5 mL de meio 199, sendo o acompanhamento realizado diariamente até atingirem a fase estacionária de crescimento.

A **Figura 05**, representativa da média de três experimentos independentes, mostra o crescimento de *L. (L.) infantum chagasi* durante sete dias. Nas primeiras 24 h, ocorreu uma diminuição de cerca de quatro vezes no número inicial, seguido de uma recuperação do número de parasitos no segundo dia. A partir desse tempo, a quantidade de parasitos aumentou exponencialmente até o quinto dia de acompanhamento, quando alcançou a quantidade de 3×10^7 parasitos/mL. A partir do sexto dia, a cultura atingiu a fase estacionária, com a média de $3,5 \times 10^7$ parasitos/mL (**Figura 05**).

Com base nos resultados das curvas de crescimento, o tempo de seis dias foi escolhido para a diferenciação de formas promastigotas em amastigotas axênicas e para os ensaios de infecção experimental utilizando-se macrófagos murinos.

Figura 05 | Curva de crescimento em cultura de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

Inóculo inicial de 1×10^6 parasitos/mL em garrafas de 75 cm² contendo 5 mL de meio 199. As contagens foram realizadas durante sete dias (diariamente) até atingirem a fase estacionária de crescimento. Resultado representativo da média aritmética de três experimentos independentes.

4.2 Crescimento intracelular de *L. (L.) infantum chagasi* em macrófagos murinos

Uma etapa importante deste trabalho consistiu na caracterização do perfil de infecção de formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) infantum chagasi* em macrófagos de medula óssea (MMO) de camundongos da linhagem C57BL/6. A partir desses ensaios, foi possível avaliar se os parasitos eram capazes de infectar e se proliferar nessas células.

Para a identificação e contagem dos parasitos intracelulares, foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta com um soro anti-*L. (L.) infantum chagasi* produzido em camundongo e preparado no nosso laboratório. Para a confirmação da especificidade do soro policlonal anti-*Leishmania*, foram preparadas lâminas contendo formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e amostras de MMO infectados ou não pelo parasito. O soro anti-*L. (L.) infantum chagasi* reconheceu especificamente tanto os parasitos promastigotas quanto aqueles presentes em

MMO infectados. Nenhuma marcação foi observada em MMO não infectados. Esses resultados foram similares aos obtidos em testes realizados com um anticorpo anti-*Leishmania* comercial (dados não mostrados). Devido a sua especificidade, esse soro foi utilizado nas detecções do parasito por imunofluorescência.

Num primeiro momento, foi avaliado o perfil de infecção das formas promastigotas em diferentes tempos de infecção. Para isso, MMO foram infectados na proporção de 10 parasitos por célula e acompanhados 2, 24 e 48 horas pós-infecção (hpi). Embora tenham sido inoculados 10 parasitos por célula, no tempo de 2 hpi foram contados 89 parasitos para cada 100 células, o equivalente a menos de um parasito por MMO (**Figura 06**). No tempo de 24 hpi, esse número caiu para um terço, ficando na margem de 29 parasitos para cada 100 células. Em 48 hpi, o número de parasitos se manteve próximo ao contabilizado no tempo anterior, com a média de 21 parasitos para cada 100 células (**Figura 06**).

Figura 06 | Crescimento intracelular de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em macrófagos murinos a 2, 24 e 48 hpi.

Os resultados estão expressos como número de parasitos por 100 macrófagos, os quais correspondem à média de triplicatas técnicas. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tais resultados motivaram a análise de outros tempos de infecção, a fim de investigar se o parasito é capaz de se proliferar ou se é eliminado pelos macrófagos. Sendo assim, foi avaliado o perfil de infecção das formas promastigotas em tempos mais tardios de infecção (72, 120 e 144 hpi). Da mesma forma que nos experimentos precedentes, nesses experimentos os MMO foram infectados na proporção de 10 parasitos por célula. No tempo de 2 hpi, foram contados 132 parasitos para cada 100 células (**Figura 07**). Nos tempos posteriores, o número de parasitos não passou de um terço desse total, sendo contados 41 e 40 parasitos para cada 100 células a 72 e 120 hpi, respectivamente (**Figura 07**). No tempo 144 hpi, a maior parte dos MMO, infectados ou não pelas formas promastigotas, desprenderam-se das lamínulas e foram desconsiderados desse experimento. Na **Figura 08** está ilustrado o perfil das infecções por parasitos promastigotas, onde é possível verificar a distribuição dos parasitos nos MMO em 2 e 120 hpi.

Figura 07 | Crescimento intracelular de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em macrófagos murinos a 2, 72 e 120 hpi.

Os resultados estão expressos como número de parasitos por 100 macrófagos, os quais correspondem à média de triplicatas biológicas. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Figura 08 | Macrófagos de medula óssea infectados pela forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi* e analisados a 2 hpi (A – E) e 120 hpi (F - J).

(A e F) Contraste de fase. (B e G) Núcleo dos MMO marcado na cor azul (DAPI). (C e H) Parasitos marcados na cor verde (anti-*Leishmania* + anti-IgG conjugado à Alexa 488). (D) Sobreposição das imagens (B e C). (E) Sobreposição das imagens (A e D). (I) Sobreposição das imagens (G e H). (J) Sobreposição das imagens (F e I). Escala = 10 μ m.

Concluiu-se com esses ensaios de infecção que formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* não são capazes de se proliferar a ponto de aumentar a sua quantidade no interior de MMO. No entanto, mesmo com um número mais reduzido, houve uma persistência dos parasitos intracelulares até tempos bem superiores ao início da infecção.

Da mesma forma que realizado com as formas promastigotas, foi avaliado o perfil de infecção de formas amastigotas axênicas. Para isso, MMO foram infectados na proporção de 2 parasitos por célula e analisados a diferentes hpi. Diferente das infecções com formas promastigotas, o tempo de incubação das formas amastigotas axênicas foi de 1 h. Nos tempos mais precoces de infecção (1, 24 e 48 hpi), os números obtidos nas contagens de parasitos foram muito próximos. Na primeira hora pós-infecção, foram contados em média, 211 parasitos para cada 100 células. No tempo de 24 horas, foram contados 201 parasitos e com 48 hpi a quantidade de parasitos para cada 100 células foi de 215 (**Figura 09**).

Figura 09 | Crescimento intracelular de formas amastigotas axênicas de *L. (L.) infantum chagasi* em macrófagos murinos a 1, 24 e 48 hpi.

Os resultados estão expressos como número de parasitos por 100 macrófagos, os quais correspondem à média de triplicatas técnicas.

Os ensaios de infecção com amastigotas axênicos demonstraram que o número de parasitos intracelulares após a primeira hora de infecção se manteve praticamente constante até às 48 hpi. Sendo assim, também foi avaliado o perfil de infecção de MMO em 72 e 120 hpi. Após a primeira hora de infecção, foram contabilizados em media 181 parasitos para cada 100 células. Em de 72 hpi, foram

contados 179 parasitos e, 120 hpi, foram totalizados 162 parasitos para cada centena de células (**Figura 10**).

Figura 10 | Crescimento intracelular de formas amastigotas axênicas de *L. (L.) infantum chagasi* em macrófagos murinos a 1, 72 e 120 hpi.

Os resultados estão expressos como número de parasitos por 100 macrófagos, os quais correspondem à média de triplicatas biológicas.

Concluiu-se com esses ensaios que o número de parasitos totais não aumentou no decorrer da infecção, mas assim como já observado com a infecção de macrófagos pela forma promastigota, também houve uma persistência do mesmo até tempos bem superiores ao início da infecção (120 hpi). A partir dos resultados obtidos nos ensaios de infecção experimental, o tempo inicial (2 h para formas promastigotas e 1 h para formas amastigotas axênicas) e o mais tardio de infecção (120 h para ambas as formas) foram escolhidos para os experimentos subsequentes.

4.3 Expressão gênica de *CD200* em macrófagos infectados por *L. (L.) infantum chagasi*

Os níveis de expressão do gene *CD200* foram quantificados em MMO infectados pelas duas formas biológicas de *L. (L.) infantum chagasi* por PCR quantitativa em tempo real. A expressão gênica foi avaliada em tempos mais precoces (2 hpi para formas promastigotas e 1 hpi para formas amastigotas) e mais tardios (120 hpi para ambas as formas) de infecção em comparação ao grupo controle (MMO não infectado). Três experimentos independentes foram realizados com cada forma biológica do parasito.

Nas infecções com formas promastigotas, não foram encontradas diferenças nos níveis de expressão de *CD200* em 2 hpi. No entanto, em 120 hpi, ocorreu um aumento de 1,65 vezes ($p=0,002$) no número de transcritos de *CD200* em MMO infectados, em relação a MMO não infectados (**Figura 11**).

Figura 11 | Expressão relativa dos níveis de transcritos de *CD200* quantificados por RT-qPCR em MMO a 2 e 120 hpi com formas promastigotas do parasito *L. (L.) infantum chagasi*.

Os resultados correspondem à média de três experimentos independentes. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas ($p<0,05$).

Da mesma forma que nas infecções com formas promastigotas, não foram encontradas diferenças nos níveis de expressão dos transcritos de *CD200* a 1 hpi de infecção com formas amastigotas axênicas. Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas ($p=0,07$), um aumento de 1,73 vezes nos níveis de transcritos de *CD200* foi observado em MMO infectados no tempo de 120 hpi (**Figura 12**). Além disso, foi observado um aumento significativo (3,34 vezes; $p=0,01$) no número de transcritos de *CD200* em MMO não infectados mantidos em cultura de 1 a 120 hpi (**Figura 12**).

Figura 12 | Expressão relativa dos níveis de transcritos de *CD200* quantificados por RT-qPCR em MMO a 1 e 120 hpi com formas amastigotas axênicas do parasito *L. (L.) infantum chagasi*.

Os resultados correspondem à média de três experimentos independentes. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas ($p<0,05$).

Com base nas análises de expressão gênica, pode-se concluir que o gene *CD200* é induzido em MMO em 120 hpi com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi*. No entanto, em infecções com a forma amastigota axênica, não foram observadas diferenças estatísticas na modulação desse gene. Finalmente, em

tempos mais precoces, nenhuma diferença na expressão do transcrito de *CD200* foi observada em infecções com ambas as formas biológicas do parasito.

4.4 Presença da proteína CD200 em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum chagasi*

Após a determinação da presença de transcritos de *CD200* em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum chagasi* no tempo de 120 hpi, foi investigada a presença da proteína por técnicas de Imunoprecipitação (IP) e *Western blot*. Os ensaios foram realizados exclusivamente em infecções experimentais com as formas promastigotas, onde foi observada a expressão do gene *CD200*.

Nas 2 h seguintes à infecção, nenhum sinal de CD200 foi observado em macrófagos não infectados. Por outro lado, nesse mesmo tempo de infecção, um discreto sinal foi observado em MMO infectados. No tempo de 120 hpi, foi observada a presença de CD200 em amostras proteicas de ambas as condições experimentais (**Figura 13**). Assim como nos ensaios de expressão gênica, a marcação de CD200 em MMO infectados com *L. (L.) infantum chagasi* foi maior do que em MMO não infectados (**Figura 13**). A presença da proteína CD200 em MMO infectados sugere a participação desta molécula no processo infectivo de *L. (L.) infantum chagasi*, em tempos posteriores de infecção.

Figura 13 | Níveis da proteína CD200 em MMO não infectados (NI) ou infectados (I) por 2 h com promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* processados imediatamente ou 120 hpi pela técnica de *Western blot*.

4.5 Produção de óxido nítrico

Finalmente, foi avaliada a produção de NO nos sobrenadantes das culturas de MMO infectados ou não com as duas formas evolutivas do parasito. Para isso, foi utilizado o Método de Griess, técnica que possui um limite inferior de detecção de 2,5 μM e um limite superior de 100 μM . Utilizando-se essa metodologia, não foi possível detectar a presença de NO nas amostras analisadas.

5 DISCUSSÃO

A leishmaniose compreende um grupo diverso e complexo de doenças antroponozoonóticas distribuídas mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, cujas manifestações clínicas variam desde lesões cutâneas até sérias lesões mucocutâneas mutilantes ou viscerais. A Leishmaniose Visceral (LV) é considerada a manifestação mais grave da doença, sendo frequentemente fatal quando não tratada (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Além disso, os tratamentos convencionais atualmente utilizados são ainda ineficientes e não muito específicos para as diferentes manifestações da doença (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Recentemente, a LV foi categorizada pela Organização Mundial da Saúde como uma das prioridades de investigação (“WHO | Leishmaniasis,” 2015), mas o seu estudo é ainda muito incipiente quando comparado a outras enfermidades como a aids, câncer e outras doenças prevalentes em países desenvolvidos. Por se tratar de uma doença causada por parasitas de ciclo complexo e que possuem como alvo as células de defesa do hospedeiro, é de suma importância estudos acerca das bases celulares e moleculares envolvidas nessa interação.

Alguns efetores e mecanismos implicados na infectividade, patogenicidade e virulência de certas espécies de *Leishmania* têm sido recentemente descritos (SIBLEY, 2011; WALKER et al., 2014). Entre os efetores implicados na relação *Leishmania*-hospedeiro está a glicoproteína imunomodulatória CD200 (BARCLAY et al., 2002; CASERTA et al., 2012; HOLMANNOVÁ et al., 2012a). Foi demonstrado que *L. (L.) amazonensis*, agente etiológico da Leishmaniose Cutânea (LC), é capaz de inibir as respostas de defesa de macrófagos, sobreviver e se multiplicar no interior dessas células por meio da indução da expressão de CD200 (CORTEZ et al., 2011). Tendo em vista a complexidade que envolve a infecção causada por *L. (L.) infantum chagasi* e a escassez de dados a respeito da relação desse parasito com as células de defesa do hospedeiro, o presente trabalho investigou a participação da proteína CD200 na interação *L. (L.) infantum chagasi*-macrófago em um modelo murino C57BL/6, tradicionalmente relacionado a resistência à infecção (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

Uma das etapas fundamentais para o entendimento dessa interação foi determinar o perfil de infecção da cepa MHOM/BR/1972/LD em macrófagos oriundos da medula óssea (MMO) de camundongos da linhagem C57BL/6. As infecções

experimentais foram realizadas a partir de culturas em fase estacionária de formas promastigotas, mas também a partir de culturas de formas amastigotas axênicas. Enquanto o número de parasitos na forma amastigota axênica se manteve constante durante todo o período de infecção, em infecções com a forma promastigota o número de parasitos diminuiu para um terço nas primeiras 24 hpi, o qual se manteve inalterado até tempos mais tardios (Figuras 06 – 10).

A diminuição na quantidade de parasitas deve ter ocorrido devido ao fato de a cultura utilizada não conter exclusivamente formas promastigotas metacíclicas, sabendo-se que formas procíclicas são menos resistentes à ação microbicida dos macrófagos (PUENTES et al., 1988). Esse padrão de crescimento de promastigotas de cultura em fase estacionária também foi evidenciado em outros trabalhos (RODRÍGUEZ et al., 2011). Esses resultados sugerem que o parasita *L. (L.) infantum chagasi* apresenta um crescimento lento no interior de macrófagos de camundongos C57BL/6, o que pode significar uma baixa virulência nessas células ou nesse modelo murino ou ainda, possuir diferir por outras características, discutidas a seguir.

Muitos estudos têm demonstrado que a resistência/suscetibilidade de *Leishmania* aos modelos murinos normalmente utilizados pode depender das condições de cultivo (meio de cultura, pH, temperatura, entre outros) e da cepa e/ou espécie utilizada (DEY et al., 2002; MÉNDEZ; NELL; ALUNDA, 1996). Méndez e colaboradores (1996) mostraram, por exemplo, que culturas axênicas de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* são menos infectivas para macrófagos peritoniais murinos que formas promastigotas de *L. (L.) donovani*. Outro fator determinante no processo infectivo pode ser ainda o tipo celular utilizado nas infecções experimentais. Dias Costa e colaboradores (2009) avaliaram o perfil de infecção de formas promastigotas da cepa MCAN/BR/2000/CNV-FEROZ de *L. (L.) infantum chagasi* em duas populações de células fagocíticas de camundongos: macrófagos peritoniais e células de Kupffer. Nesse trabalho, os autores mostraram que essa cepa é mais suscetível a macrófagos peritoniais que a células de Kupffer (fagócitos presentes no fígado). Tais diferenças de suscetibilidade podem estar relacionadas ao tipo de resposta que cada uma dessas células é capaz de ativar frente a uma infecção por esse parasito (DIAS COSTA et al., 2009).

Além disso, vários estudos têm demonstrado a importância do modelo *in vivo* utilizado para explicar os fenótipos de virulência em *Leishmania*, como no caso do

modelo Balb/c (relacionado à suscetibilidade) e C57BL/6 (relacionado à resistência) nas infecções por *L. (L.) major* (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Um outro dado importante que pode explicar o baixo crescimento de *L. (L.) chagasi* no macrófago é a disponibilidade de nutrientes para o parasita no ambiente inóspito do vacúolo parasitóforo (ANDREWS, 2012; SANS-FONS et al., 2013).

Em nossa experiência, mesmo não sendo capaz de se proliferar no interior dos macrófagos, o número de parasitos *L. (L.) infantum chagasi* (das duas formas evolutivasbiológicas testadas) que conseguiu infectar os MMO manteve-se até o final das infecções experimentais (**Figuras 06 a 10**). Esses resultados apontam para a presença de mecanismos de evasão da resposta imunológica dos macrófagos, responsáveis por garantir a sobrevivência dos parasitos no interior dessas células. Na literatura, diferentes mecanismos de evasão da resposta imune têm sido descritos na relação patógeno-hospedeiro nas espécies de *Leishmania* mais estudadas, os quais incluem a manipulação da maturação dos fagossomos (MATHEOUD et al., 2013; RODRÍGUEZ; GAUR; WILSON, 2006; UENO et al., 2009; WILSON et al., 2008), indução de processos de morte celular programada como autofagia e apoptose (SCHAIBLE et al., 1999; SRIVASTAV et al., 2014), mas também a inibição da produção de moléculas citotóxicas e leishmanicidas (BOGDAN, 2008; GREGORY; OLIVIER, 2005).

Entre as moléculas citotóxicas, produzidas pelo sistema imune do hospedeiro e que possuem uma importante ação leishmanicida, estão os produtos gerados a partir do sistema redox (radical superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e o óxido nítrico) (HORTA et al., 2012; VAN ASSCHE et al., 2011). A produção de NO, em especial, é considerada um dos mecanismos de defesa mais eficazes contra patógenos intracelulares como *Leishmania* (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; INIESTA; GÓMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001; MÜLLER et al., 2013). Haja vista a importância desse efector, algumas espécies de *Leishmania*, em particular aquelas que causam as formas mais severas da doença, têm desenvolvido ao longo da evolução diferentes mecanismos de escape da produção de NO (DA SILVA; FLOETER-WINTER, 2014; WILKINS-RODRÍGUEZ et al., 2010).

Cortez e colaboradores (2011) mostraram de maneira inequívoca que a inibição da produção de NO por *L. (L.) amazonensis* é capaz de promover o seu crescimento, virulência e sobrevivência no interior de MMO de camundongos C57LB/6. Foi demonstrado que a inibição da produção de NO por *L. amazonensis*

ocorre devido à inibição da expressão e síntese da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) nos macrófagos logo após a entrada dos parasitos nessas células. Esse mecanismo de evasão da resposta imune de macrófagos tem como principal protagonista a sinalização intracelular mediada pela proteína imunomodulatória CD200 do próprio hospedeiro. Como modulador negativo da resposta imune, a indução de CD200 tem como consequência o bloqueio da produção de NO, o que favorece o desenvolvimento do parasito (CORTEZ et al., 2011). A importância desse efector na relação *L. (L.) amazonensis*-macrófago foi confirmada em experimentos realizados com camundongos mutantes para CD200 (*CD200^{-/-}*), onde a replicação e a virulência desses parasitos são seriamente comprometidas (CORTEZ et al., 2011). No entanto, a virulência de *L. (L.) amazonensis* em MMO de camundongos *CD200^{-/-}* pode ser restaurada em células tratadas com a proteína recombinante CD200-Fc (CORTEZ et al., 2011).

Nem todas as espécies de *Leishmania* são capazes de induzir a expressão e síntese de CD200 em macrófagos. Esse é o caso do parasito *L. (L.) major*, agente etiológico da LC, mas que causa apenas lesões cutâneas brandas e não sistêmicas como *L. (L.) amazonensis*. Normalmente, *L. (L.) major* apresenta baixa virulência para MMO de camundongos C57LB/6. Contudo, o tratamento de MMO com a proteína recombinante CD200-Fc torna o parasito *L. (L.) major* tão patogênico quanto *L. (L.) amazonensis* nesse modelo (CORTEZ et al., 2011).

Entretanto, até o presente momento, a participação de CD200 nas relações patógeno-hospedeiro só foi estudada em espécies de *Leishmania* causadoras de lesões cutâneas. Assim, o presente estudo representa o primeiro relato da participação desse modulador do sistema imune em infecções causadas por parasitos causadores da LV, a forma mais grave dessa doença. Assim como evidenciado para *L. (L.) amazonensis*, o parasito *L. (L.) infantum chagasi* também é capaz de induzir a expressão e a síntese do imunomodulador CD200 em MMO murinos (**Figuras 11 e 13**).

Porém, de maneira interessante, a indução da expressão de CD200 por *L. (L.) infantum chagasi* em MMO de C57LB/6 foi observada em tempos mais tardios de infecção (**Figuras 11 e 13**), diferente de *L. (L.) amazonensis* que é capaz de induzir a expressão e síntese dessa proteína já na primeira hora após a sua interiorização nessas células (CORTEZ et al., 2011). No entanto, foram observadas diferenças estatísticas na indução de *CD200* apenas em infecções realizadas com as formas

promastigotas. Haja vista a grande variabilidade de expressão observada nas infecções por formas amastigotas (**Figura 12**), experimentos adicionais, incluindo análises de imunoprecipitação e *Western blot* (que não foram realizados), são ainda necessários para a confirmação desses resultados.

Os resultados obtidos sugerem a participação de mecanismos de infecção e evasão da resposta imune em *L. (L.) infantum chagasi* diferentes daqueles observados para outras espécies de *Leishmania* nesse modelo. Esses mecanismos podem ter uma relação direta com a virulência dessa espécie para esses macrófagos. Ou seja, assim como *L. major*, *L. (L.) infantum chagasi* não apresenta uma alta patogenicidade para macrófagos de C57LB/6. Além disso, apesar de inicialmente infectar as células de defesa, o parasito *L. (L.) infantum chagasi* tem como alvo ainda as células de órgãos viscerais do hospedeiro, como medula óssea, fígado e baço (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Pelo fato de não se manifestarem de uma forma altamente virulenta para esses macrófagos, pode-se sugerir que nesse modelo, além de hospedeiras, essas células também sejam utilizadas como “veículo” para a disseminação em outros sítios-alvo, como observado para outras células da linhagem mieloide. John e Hunter (2008) suportam a conclusões de um outro grupo de pesquisadores, confirmando que a presença de neutrófilos durante o processo infeccioso em modelo experimental com *L. (L.) major* proporciona a entrada do parasito na célula hospedeira, de acordo com a teoria do “Cavalo de Tróia”. Nesse caso, essas células são utilizadas como uma maneira de entrada silenciosa dos parasitos no macrófago.

Mesmo não se proliferando no interior dos macrófagos, os parasitos *L. (L.) infantum chagasi* continuam vivos até alcançar os órgãos viscerais, onde são capazes de se disseminar e provocar graves lesões nos tecidos (KUMAR; NYLÉN, 2012). De maneira interessante, um estudo realizado por Erin e colaboradores (2014) sugere que os efeitos da interação entre CD200-CD200R na progressão tumoral em modelos de câncer de mama podem refletir diferenças na imunogenicidade e potencial metastático das células tumorais, além da capacidade de induzirem inflamação crônica. Belkin e colaboradores (2013), num estudo realizado sobre uma forma frequente de neoplasia de pele, o carcinoma espinocelular, verificaram que fatores tumorais podem induzir a expressão de CD200 na superfície de células do endotélio vascular. Essa ação sobre os vasos sanguíneos locais está associada a progressão do tumor devido a supressão do

CD200R de células mielóides durante diapedese. Sendo assim, diferente de *L. (L.) amazonensis*, que manipula a síntese de CD200 em tempos mais iniciais de infecção para escapar das respostas de defesa e se proliferar no interior dos macrófagos, o parasito *L. (L.) infantum chagasi* a utiliza em tempos mais tardios de infecção (**Figuras 06 a 08**), sugerindo-se que esse mecanismo seja utilizado posteriormente como forma de garantir a sua disseminação.

Seria interessante verificar o efeito da presença de CD200 na virulência e proliferação de *L. (L.) infantum chagasi* em tempos mais precoces de infecção. Para isso, são necessários ainda experimentos utilizando-se a proteína CD200 purificada na sua forma nativa ou produzida em sistema heterólogo (CD200-Fc), como realizado por Cortez e colaboradores (2011). Esses resultados poderão auxiliar sobremaneira no entendimento da participação de CD200 na proliferação dos parasitos em macrófagos, como observado em *L. (L.) amazonensis*. Em camundongos *CD200^{-/-}*, o parasito *L. (L.) amazonensis* não é capaz de se proliferar e sobreviver em MMO quando comparado a camundongos selvagens, porém sua virulência pode ser completamente restaurada na presença da proteína recombinante CD200-Fc (CORTEZ et al., 2011). Na presença de CD200-Fc os macrófagos são incapazes de produzir NO, favorecendo o desenvolvimento do parasita.

Além dos macrófagos, outras células fagocíticas da linhagem mieloide que não foram exploradas neste trabalho, como basófilos, neutrófilos e células dendríticas, podem estar implicadas na infecção e no desenvolvimento do parasito no hospedeiro. Experimentos *in vivo* demonstraram que os neutrófilos representam um dos tipos celulares mais importantes no período inicial de infecções com *L. (L.) infantum chagasi* (THALHOFER et al., 2011). Assim, seria de suma importância verificar o perfil de infecção da cepa MHOM/BR/1972/LD em outras células da linhagem mieloide, assim como avaliar a expressão e síntese de CD200 em diferentes tempos após uma infecção experimental com esse parasito.

Por se tratar de um modulador negativo do sistema imunológico, a proteína CD200 pode influenciar outras respostas de defesa além da produção de NO, como a produção de citocinas (interleucinas, interferons, TNF- α) e outros compostos microbicidas e citotóxicos (VAINE; SOBERMAN, 2014). Ao interagir com o receptor transmembrana CD200R, a glicoproteína CD200 bloqueia as funções imunológicas de células mieloides por intermédio da ativação de uma cascata de sinalização

celular mediada por tirosina-quinases (MIHRSHAH; BARCLAY; BROWN, 2009). Para um melhor entendimento do envolvimento dessa via na interação *Leishmania*-macrófago, faz-se necessários estudos sobre os mecanismos utilizados na indução da síntese endógena desse efector nos macrófagos pelo parasita, cuja expressão basal nessas células é normalmente indetectável (MUKHOPADHYAY et al., 2010).

A função da sinalização inibitória mediada pela via CD200:CD200R tem sido confirmada em diferentes processos biológicos (HERNANGÓMEZ et al., 2012; HOLMANNOVÁ et al., 2012b; VAN DEN BORNE et al., 2014), mas também em doenças degenerativas e tumores (RYGIEL et al., 2012; WALKER et al., 2009; WANG et al., 2007). Mais recentemente, a participação desse mecanismo tem sido investigada em doenças infecciosas causadas por diferentes patógenos, como vírus (KARNAM et al., 2012; SHIRATORI et al., 2005), bactérias (MUKHOPADHYAY et al., 2010), protozoários (CORTEZ et al., 2011; DECKERT et al., 2006) e vermes (CASERTA et al., 2012).

Além de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, outros patógenos também utilizam a via CD200:CD200R em benefício próprio por meio da manipulação da expressão de CD200 e/ou do receptor CD200R. O parasito *Toxoplasma gondii*, por exemplo, é capaz de induzir a expressão de CD200R e CD200 em células da glia e nos endotélios de vasos sanguíneos, respectivamente (DECKERT et al., 2006). Foi demonstrado que camundongos *CD200^{-/-}* são mais resistentes a infecções por *T. gondii* por apresentarem uma maior expressão de *MHC II*, *TNF α* e *iNOS*, quando comparado a infecções com camundongos selvagens (DECKERT et al., 2006). De maneira semelhante, camundongos mutantes para o receptor CD200R (*CD200R^{-/-}*) também são mais resistentes a infecções pelo Herpes simplex virus 1 (HSV-1) (SOBERMAN et al., 2012).

Nas infecções por *Leishmania*, uma das respostas de defesa mais afetadas pela sinalização mediada por CD200:CD200R, induzida pelo parasito, é a geração de metabólitos do sistema redox. Os efeitos da inibição da produção de NO em MMO de C57BL/6 pela cepa MHOM/BR/1972/LD de *L. (L.) infantum chagasi* ainda precisam ser melhor explorados. Nos experimentos realizados neste trabalho não foram incluídos inibidores de NO, limitando assim as conclusões a serem formuladas a respeito da participação da produção de NO no controle de *L. (L.) infantum chagasi*. Da mesma forma, seria de suma importância a realização de experimentos com camundongos *CD200^{-/-}* e com outros métodos de quantificação de NO (como

sondas fluorescentes) para se confirmar a relação da indução de CD200 e a inibição da produção de NO em MMO, como comprovado para *L. (L.) amazonensis* (CORTEZ et al., 2011).

Finalmente, os resultados oriundos deste trabalho contribuíram para ampliar o nosso conhecimento sobre o envolvimento da proteína imunomodulatória CD200 na leishmaniose, assim como *L. (L.) amazonensis*, o parasito *L. (L.) infantum chagasi* também é capaz de induzir a expressão de CD200 em macrófagos murinos. Em conjunto, tais evidências sugerem que esse mecanismo de manipulação da resposta imune do hospedeiro seja conservado entre as espécies que causam as manifestações mais graves da leishmaniose, uma vez que em *L. (L.) major* (causador de manifestações mais brandas da doença) esse mecanismo não foi observado.

Estudos dessa natureza abrem novas possibilidades para a realização de trabalhos futuros a cerca da identificação de novos efetores e mecanismos envolvidos na relação patógeno-hospedeiro em doenças tropicais negligenciadas, como a leishmaniose. Além disso, o conhecimento dessas relações reveste-se da maior importância para a busca de compostos que possam interferir nesses processos, mas também no desenvolvimento de estratégias que possam auxiliar em programas de controle da doença em todo o mundo.

6 CONCLUSÕES

- As duas formas biológicas de *L. (L.) infantum chagasi* não são capazes de se proliferar no interior de MMO, porém conseguem resistir no interior dessas células;
- O gene *CD200* é induzido em MMO em 120 hpi pela forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi*;
- A presença da proteína CD200 foi confirmada em amostras de MMO infectados por *L. (L.) infantum chagasi* no tempo de 120 hpi.

REFERÊNCIAS*

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of cell science**, v. 112 Pt 18, p. 2993–3002, 1999.

ANDREWS, N. W. Oxidative stress and intracellular infections: more iron to the fire. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 7, p. 2352–4, 2012.

BARCLAY, A. N. et al. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. **Trends in immunology**, v. 23, n. 6, p. 285–90, 2002.

BATES, P. A; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. **Current molecular medicine**, v. 4, p. 601–609, 2004.

BECKER, S. M. et al. Differential role of the Ca(2+) sensor synaptotagmin VII in macrophages and dendritic cells. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 495–505, 2009.

BELKIN, D. A et al. CD200 upregulation in vascular endothelium surrounding cutaneous squamous cell carcinoma. **JAMA dermatology**, v. 149, p. 178–86, 2013.

BELO, V. S. et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, 2013.

BOGDAN, C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1221–34, 2008.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological reviews**, v. 173, n. 1, p. 17–26, 2000.

BÖHME, M. W. et al. Occurrence of autoantibodies to intermediate filament proteins in human visceral leishmaniasis and their induction by experimental polyclonal B-cell activation. **Immunology**, v. 59, p. 583–588, 1986.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

CASERTA, S. et al. Chronic infection drives expression of the inhibitory receptor CD200R, and its ligand CD200, by mouse and human CD4 T cells. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35466, 2012.

CECILIO, P. et al. Deception and Manipulation: The Arms of Leishmania, a Successful Parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. p. 1–16, 2014.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, p. 873–882, 2007.

CORTEZ, M. et al. Leishmania promotes its own virulence by inducing expression of the host immune inhibitory ligand CD200. **Cell host & microbe**, v. 9, n. 6, p. 463–71, 2011.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Experimental and molecular pathology**, v. 72, p. 132–141, 2002.

DA SILVA, M. F. L.; FLOETER-WINTER, L. M. Arginase in Leishmania. **Sub-cellular biochemistry**, v. 74, p. 103–17, 2014.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, p. 491–502, 2009.

DECKERT, M. et al. Regulation of microglial cell responses in murine Toxoplasma encephalitis by CD200/CD200 receptor interaction. **Acta neuropathologica**, v. 111, n. 6, p. 548–58, 2006.

DEPLEDGE, D. P. et al. Leishmania-specific surface antigens show sub-genus sequence variation and immune recognition. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1455, p. 341–352, 1999.

DEY, T. et al. Infectivity and virulence of Leishmania donovani promastigotes: a role for media, source, and strain of parasite. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 49, n. 4, p. 270–4, 2002.

DIAS COSTA, J. et al. Fast high yield of pure Leishmania (Leishmania) infantum axenic amastigotes and their infectivity to mouse macrophages. **Parasitology research**, v. 105, n. 1, p. 227–36, 2009.

DICK, A. D. et al. Distribution of OX2 antigen and OX2 receptor within retina. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 42, p. 170–176, 2001.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, p. 961–972, 2014.

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

ERIN, N. et al. Bidirectional effect of CD200 on breast cancer development and metastasis, with ultimate outcome determined by tumor aggressiveness and a cancer-induced inflammatory response. **Oncogene**, p. 1–11, 2014.

FANG, F. C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 2818–2825, 1997.

FARIA, M. S.; REIS, F. C. G.; LIMA, A. P. C. A. Toll-like receptors in Leishmania infections: Guardians or promoters? **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

FLANDIN, J. F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of Leishmania donovani promastigotes by interferon- γ -primed macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 36, p. 411–420, 2006.

GANTT, K. R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of Leishmania chagasi. **Journal of immunology**, v. 167, p. 893–901, 2001.

GIUDICE, A. et al. Resistance of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC infectious diseases**, v. 7, p. 7, 2007.

GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite Leishmania. **Parasitology**, v. 130 Suppl, p. S27–35, 2005.

HERNANGÓMEZ, M. et al. CD200-CD200R1 interaction contributes to neuroprotective effects of anandamide on experimentally induced inflammation. **Glia**, v. 60, n. 9, p. 1437–50, 2012.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191–1199, 1999.

HOLMANNOVÁ, D. et al. CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part I: CD200/CD200R structure, activation, and function. **Acta medica**, v. 55, p. 12–7, 2012a.

HOLMANNOVÁ, D. et al. CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part II: CD200/CD200R potential clinical applications. **Acta medica**, v. 55, n. 2, p. 59–65, 2012b.

HORTA, M. F. et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. **Journal of parasitology research**, v. 2012, p. 203818, 2012.

INIESTA, V.; GÓMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 6, p. 777–784, 2001.

JENMALM, M. C. et al. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. **Journal of immunology**, v. 176, p. 191–199, 2006.

JOHN, B.; HUNTER, C. A. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? **Science**, v. 321, n. August, p. 917–918, 2008.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current opinion in hematology**, v. 7, p. 26–31, 2000.

KARNAM, G. et al. CD200 receptor controls sex-specific TLR7 responses to viral infection. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002710, 2012.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, p. 1–19, 2014.

KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future microbiology**, v. 9, n. 7, p. 901–15, 2014.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 251, 2012.

KURKJIAN, K. et al. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 69, p. 353–358, 2006.

LIPOLDOVÁ, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nature reviews. Genetics**, v. 7, n. April, p. 294–305, 2006.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania. **Clinical Immunology**, v. 114, p. 256–265, 2005.

MATHEOUD, D. et al. Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. **Cell host & microbe**, v. 14, n. 1, p. 15–25, 2013.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM : monthly journal of the Association of Physicians**, v. 107, n. Figure 1, p. 7–14, 2014.

MÉNDEZ, S.; NELL, M.; ALUNDA, J. M. Leishmania infantum: infection of macrophages in vitro with promastigotes. **International journal for parasitology**, v. 26, n. 6, p. 619–22, 1996.

MIHRSHAHI, R.; BARCLAY, A. N.; BROWN, M. H. Essential roles for Dok2 and RasGAP in CD200 receptor-mediated regulation of human myeloid cells. **Journal of immunology**, v. 183, n. 8, p. 4879–86, 2009.

MUKHERJEE, A. K. et al. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: Role of TLR4 and TLR9. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 565–572, 2012.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Immune inhibitory ligand CD200 induction by TLRs and NLRs limits macrophage activation to protect the host from meningococcal septicemia. **Cell host & microbe**, v. 8, n. 3, p. 236–47, 2010.

MÜLLER, A. J. et al. Photoconvertible pathogen labeling reveals nitric oxide control of leishmania major infection in vivo via dampening of parasite metabolism. **Cell Host and Microbe**, v. 14, p. 460–467, 2013.

NANDAN, D.; LO, R.; REINER, N. E. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and

nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. **Infection and immunity**, v. 67, n. 8, p. 4055–4063, 1999.

OLIVIER, M. et al. Modulation of Interferon gamma induced Macrophage Activation by. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 22, p. 13944–13949, 1998.

PAUN, A. et al. Critical role of IRF-5 in the development of t helper 1 responses to *Leishmania donovani* infection. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2011.

PUENTES, S. M. et al. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. **The Journal of experimental medicine**, v. 167, n. 3, p. 887–902, 1988.

RAVETCH, J. V; LANIER, L. L. Immune inhibitory receptors. **Science**, v. 290, p. 84–89, 2000.

RODRÍGUEZ, N. E. et al. Stage-specific pathways of *Leishmania infantum* chagasi entry and phagosome maturation in macrophages. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e19000, 2011.

RODRÍGUEZ, N. E.; GAUR, U.; WILSON, M. E. Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1106–20, 2006.

ROSENBLUM, M. D. et al. Expression of CD200 on epithelial cells of the murine hair follicle: A role in tissue-specific immune tolerance? **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, p. 880–887, 2004a.

ROSENBLUM, M. D. et al. CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. **Blood**, v. 103, n. 7, p. 2691–8, 2004b.

RYGIEL, T. P. et al. CD200-CD200R signaling suppresses anti-tumor responses independently of CD200 expression on the tumor. **Oncogene**, v. 31, n. 24, p. 2979–88, 2012.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–58, 2002.

SANS-FONS, M. G. et al. Arginine transport is impaired in C57Bl/6 mouse macrophages as a result of a deletion in the promoter of *Slc7a2* (CAT2), and

susceptibility to *Leishmania* infection is reduced. **The Journal of infectious diseases**, v. 207, n. 11, p. 1684–93, 2013.

SANTOS, P. L. et al. *Leishmania chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 27, n. May, p. 67–71, 2012.

SCHAIBLE, U. E. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. **Journal of cell science**, v. 112 (Pt 5, p. 681–93, 1999.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SHIO, M. T. et al. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.

SHIRATORI, I. et al. Down-regulation of basophil function by human CD200 and human herpesvirus-8 CD200. **Journal of immunology**, v. 175, n. 7, p. 4441–9, 2005.

SIBLEY, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 72–91, 2011.

SOBERMAN, R. J. et al. CD200R1 supports HSV-1 viral replication and licenses pro-inflammatory signaling functions of TLR2. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47740, 2012.

SQUIRES, K. E. et al. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN in host defense and tissue granulomatous response. **The journal of immunology**, n. 18, p. 4244–4249, 1989.

SRIVASTAV, S. et al. *Leishmania donovani* prevents oxidative burst-mediated apoptosis of host macrophages through selective induction of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 2, p. 1092–105, 2014.

STERN, J. J. et al. Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of immunology**, v. 140, p. 3971–3977, 1988.

THALHOFER, C. J. et al. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum* chagasi. **Infection and immunity**, v. 79, n. 1, p. 108–17, 2011.

UENO, N. et al. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum* chagasi promastigotes. **Cellular microbiology**, v. 11, n. 12, p. 1827–41, 2009.

VAINE, C. A.; SOBERMAN, R. J. The CD200-CD200R1 inhibitory signaling pathway: immune regulation and host-pathogen interactions. **Advances in immunology**, v. 121, p. 191–211, 2014.

VAN ASSCHE, T. et al. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 2, p. 337–51, 2011.

VAN DEN BORNE, P. et al. The CD200-CD200 receptor inhibitory axis controls arteriogenesis and local T lymphocyte influx. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98820, 2014.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012.

WALKER, D. G. et al. Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: a potential mechanism leading to chronic inflammation. **Experimental neurology**, v. 215, n. 1, p. 5–19, 2009.

WALKER, D. M. et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 71, n. 7, p. 1245–63, 2014.

WANG, X.-J. et al. CD200-CD200R regulation of microglia activation in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, v. 2, n. 3, p. 259–64, 2007.

WEBB, M.; BARCLAY, A. N. Localisation of the MRC OX-2 glycoprotein on the surfaces of neurones. **Journal of neurochemistry**, v. 43, n. 4, p. 1061–7, 1984.

WHO | Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

WILKINS-RODRÍGUEZ, A. A. et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 3, p. 426–34, 2010.

WILSON, J. et al. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 10, p. e1000179, 2008.