Ana Kely de Carvalho

Correlação do perfil das células dendríticas com a resposta imune
celular T CD4⁺ e T CD8⁺ na infecção experimental do
camundongo BALB/c por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
e *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Dalastra Laurenti

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010. A versão
original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2012

Ana Kely de Carvalho

Correlação do perfil das células dendríticas com a resposta imune
celular T CD4⁺ e T CD8⁺ na infecção experimental do
camundongo BALB/c por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
e *Leishmania (Viannia) braziliensis*

(Versão corrigida)

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Dalastra Laurenti

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Ana Kely de

Correlação do perfil das células dendríticas com a resposta imune celular T CD4⁺ e T CD8⁺ na infecção experimental do camundongo BALB/c por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Ana Kely de Carvalho. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Márcia Dalastra Laurenti.

Descritores: 1.Células dendríticas 2.Células de Langerhans 3.Imunidade celular 4. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 5. *Leishmania (Viannia) braziliensis*

USP/FM/DBD-314/12

Dedico este trabalho aos meus pais, **Celso** e **Aliseti**, por todo amor, compreensão, apoio e incentivo. Sem vocês, eu nada seria.

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais. Pela saúde, pela sabedoria e por seu amor inigualável.

À minha família, meu pai **Celso**, exemplo de seriedade e responsabilidade, minha mãe **Aliseti** por sua dedicação e amor incondicional, aos meus irmãos: **Alexandro** e **Polyana**, a minha sobrinha **Júlia** e ao meu cunhado **Maurício**. Obrigada pelo apoio e incentivo, tenham certeza que esta conquista também é mérito de vocês!

Ao meu namorado, **Rômulo** por todo amor, paciência, ausência, dedicação e compreensão! Sobrevivemos à distância! E toda sua família pela compreensão e incentivo.

À minha orientadora **Prof^a Dr^a Márcia Dalastra Laurenti**, pelo acolhimento, ensinamentos, confiança, dedicação e pela amizade conquistada ao longo dos anos, assim como pela paciência nos meus momentos de aflição.

Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett**, por permitir minha entrada no LIM-50.

Ao **Prof. Dr. Esper Georges Kallás**, por abrir as portas de seu laboratório onde os estudos de imunidade envolvendo citometria de fluxo foram feitos; e um “muito obrigado especial” a **Karina Carvalho** por toda

dedicação na análise, interpretação e discussão destes resultados; e a **Bianca Natali** por todo apoio, sem a ajuda de vocês este trabalho não seria possível.

Ao **Dr. Fernando Tobias da Silveira** por sua dedicação, experiência no tema e incentivo, o qual contribuiu substancialmente na realização deste trabalho.

A **Dr^a. Vânia da Matta** e **Dr^a Cláudia Gomes** pela amizade e contribuição na condução experimentos e discussão dos resultados.

A amiga **Prof^a Dr^a. Maria Regina Kreuger**, pelo apoio e confiança na minha capacidade em vencer este desafio.

À **Lia Negrão**, secretária do LIM-50 que me acolheu desde o primeiro dia com muito carinho e atenção.

Ao **Dr. José Angelo Lauletta Lindoso**, **Dr^a Vânia Lúcia Ribeiro da Matta** e **Dr. Fernando Tobias da Silveira** pela contribuição com críticas, sugestões e aprovação para a transferência para o doutorado direto durante o exame de qualificação do mestrado.

Ao **Dr. Francisco Blasquez** e a **Dr^a Miriam Nakagami Sotto** pela contribuição com críticas e sugestões no exame de qualificação de doutorado.

Aos amigos conquistados no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) FMUSP: **Tháise, Edson, Tadeu, Juliano, Carol, Malu,**

Fernanda (Tuga), Felipe, Alexis, Fernanda Francesquini, Joyce, Mariana, Maria Fernanda, Izildinha, Fábio, Bruno, pelos momentos de descontração na hora do café, no Pubmed, congressos, e também pela companhia e colaboração nos experimentos intermináveis e discussões produtivas! Podem ter certeza que com vocês minha vida em São Paulo ficou menos complicada. Assim como a **Marina** e o **Cláudio** da FMVZ-USP.

Às amigas paulistanas: companheiras de pensionato, em especial, **Natalia** e **Giulia** que me acolheram de braços abertos! Não são necessárias palavras, basta um olhar!

Aos amigos catarinenses que por algum motivo viraram paulistanos, **Valdir, Liã, Maiara** e **Rodrigo Barbano**, obrigada por fazer o sul ficar menos distante!

Aos amigos e companheiros de longa data: **Kelly, Jeff, Pati, Fábio, Josi, Aline, Nathália** e **Ludmila** obrigada por fazer parte da minha vida.

A **CAPES** pela concessão da bolsa de estudo e a **FAPESP** pelos recursos destinados ao material consumo imprescindíveis para o desenvolvimento deste projeto (2006/56319-1).

Ao **Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas** (LIM-50 HC-FMUSP) do Departamento de Patologia e ao **Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Experimental** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela oportunidade em executar este projeto.

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Sumário

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Aspectos Gerais das Leishmanioses	2
1.2	Leishmaniose Tegumentar Americana.....	5
1.3	Imunidade na LTA.....	8
1.3.1	Imunidade Inata.....	8
1.3.2	Imunidade adquirida – O papel dos linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ ..	11
1.3.3	Células T Regulatórias	17
1.3.4	Células Dendríticas	19
2.	OBJETIVOS.....	25
2.1.	Objetivo Geral	26
2.2.	Objetivos Específicos.....	26
3.	MÉTODOS.....	28
3.1.	Parasitas	29
3.1.1.	Produção de antígeno total de formas promastigotas de L. (L.) amazonensis e L. (V.) braziliensis para análise da resposta imune celular.	30
3.2.	Animais	30
3.3.	Infecção experimental.....	31
3.4.	Evolução da infecção causada por L. (L.) amazonensis e L. (V.) braziliensis em camundongos BALB/c.....	31
3.4.1.	Avaliação do tamanho da lesão.....	31

3.4.2.	<i>Análise Histopatológica .....</i>	32
3.4.3.	<i>Determinação da carga parasitária.....</i>	32
3.5.	<i>Avaliação da imunidade celular no ponto de inoculação de L. (L.) amazonensis e L. (V.) braziliensis na pele dos camundongos BALB/c.....</i>	33
3.5.1.	<i>Imunomarcção de células dendríticas e linfócitos T .....</i>	33
3.5.2.	<i>Imunomarcção para Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) .....</i>	36
3.6.	<i>Avaliação da imunidade celular no linfonodo de drenagem do ponto de inoculação de L. (L.) amazonensis e L. (V.) braziliensis na pele dos camundongos BALB/c .....</i>	38
3.6.1.	<i>Caracterização de populações de células dendríticas.....</i>	38
3.6.2.	<i>Caracterização da população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de citocinas através da citometria de fluxo .....</i>	41
3.6.3.	<i>Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células totais do linfonodo por ELISA .....</i>	45
3.6.4.	<i>Quantificação de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de células totais do linfonodo .....</i>	46
3.6.5.	<i>Análise da população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados e de memória.....</i>	47
3.6.6.	<i>Análise da população de células T regulatórias .....</i>	49
3.7.	<i>Análise Estatística.....</i>	52
4.	<i>RESULTADOS.....</i>	53
4.1.	<i>Evolução da Infecção.....</i>	54
4.2.	<i>Análise Histopatológica das Lesões.....</i>	55

4.3. <i>Análise do parasitismo e resposta imune celular no ponto de inoculação</i>	56
4.3.1. <i>Análise da carga parasitária</i>	56
4.3.2. <i>Detecção de Células Dendríticas</i>	57
4.3.3. <i>Detecção de Linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺</i>	61
4.3.4. <i>Detecção de iNOS</i>	65
4.4. <i>Análise do parasitismo e da resposta imune celular no linfonodo poplíteo de drenagem</i>	67
4.4.1. <i>Análise da carga parasitária</i>	67
4.4.2. <i>Caracterização da população de DCs totais e ativação</i>	68
4.4.3. <i>Caracterização das células dendríticas dérmicas e das células de Langerhans</i>	71
4.4.4. <i>Caracterização da população de linfócitos T</i>	73
4.4.5. <i>Caracterização dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de citocinas</i>	75
4.4.6. <i>Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células do linfonodo poplíteo</i>	79
4.4.7. <i>Avaliação dos níveis de nitrato no sobrenadante de cultura das células do linfonodo poplíteo</i>	83
4.4.8. <i>Avaliação da ativação e memória dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺</i> .	84
4.4.9. <i>Avaliação da população de células T regulatórias</i>	87
4.5. <i>Análise de Correlação</i>	89
5. <i>DISCUSSÃO</i>	90
6. <i>CONCLUSÕES</i>	107

7.	ANEXOS.....	111
7.1.	Anexo A – Aprovação CAPPesp.....	112
7.2.	Anexo B – Cinética de Produção de Citocinas.....	113
7.3.	Anexo C – Tabela: Coeficientes de correlação de Spearman, na infecção com <i>L. (L.) amazonensis</i>	114
7.4.	Anexo D – Tabela: Coeficientes de Correlação de Spearman, Iná infecção com <i>L. (V.) braziliensis</i>	115
8.	REFERÊNCIAS.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APC - Aloficocianina

APCs – Células apresentadoras de antígenos

CAPPesq – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CD – Grupos de Diferenciação (moléculas de superfície celular que servem como marcadores. Do inglês: *cluster of differentiation*)

DAB - Diaminobenzidina

DCs – Células dendríticas

dDCs – Células dendríticas dérmicas

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FOXP3 – Do inglês: *forkhead box P3*

FSC – Do inglês: forward scatter, dispersão frontal da luz

FSC-H – Do inglês: forward scatter, dispersão frontal da luz que mede a altura

FSC-A – Do inglês: forward scatter, dispersão frontal da luz que mede a área

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo

HCl – Ácido Clorídrico

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

IL – Interleucina

IFN-γ – Interferon gamma

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível

LIM-50 – Laboratório de Investigação Médica 50

LCs – Células de Langerhans

mL – mililitro (unidade de medida)

mg – miligramas (unidade de medida)

mm² – milímetro quadrado (unidade de medida)

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

NaNO₃ – Nitrato de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

nm – nanômetro (unidade de medida)

nM – mili Molar

NO – Óxido nítrico

p – p valor, nível de significância

PBS – tampão salino fosfatado

PBST – tampão salino fosfatado com Tween

PE Cy – Ficoeritrina Cy chrome 5.5

PerCP – Proteína clorofilperidina

PFA – Paraformaldeído

pg – Picogramas (unidade de medida de massa)

PI – Pós-infecção

rpm – Rotações por minuto

RPMI – Meio de cultura originalmente desenvolvido no *Roswell Park Memorial Institute*

SBF – Soro fetal bovino

SSC – do inglês *side scatter*, dispersão lateral da luz

TGF-β – fator de crescimento tumoral beta

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

Treg – Célula T Regulatória

WHO – Organização Mundial da Saúde

μL – Microlitro (unidade de medida volumétrica)

μm – Micrometro (unidade de medida)

μM – Micro Molar (unidade de medida de concentração)

TA – Temperatura ambiente

Tris – Hidroximetil amino metano

% - Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas promastigotas em meio de cultura (A) e formas amastigotas em <i>imprint</i> de baço de hamster infectado cronicamente, (B) com <i>Leishmania</i> spp.....	3
Figura 2: Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	5
Figura 3: Espectro Clínico e Imunopatológico da LTA	15
Figura 4: Estratégia de definição de janela de identificação (<i>gate</i>) para análise de subpopulações de células dendríticas (A) e ativação das células dendríticas (B).....	40
Figura 5: Estratégia de definição da janela de identificação (<i>gate</i>) para a análise da população de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de citocinas.	44
Figura 6: Estratégia de definição de janelas (<i>gate</i>) para a análise da população de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ ativados e de memória.	49
Figura 7: Estratégia de definição de janelas (<i>gate</i>) para a determinação da população de células Treg induzidas e Treg naturais.....	51
Figura 8: Evolução do tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	54
Figura 9: Corte histológico de pele do ponto de inoculação no coxim plantar de camundongos BALB/c.	56
Figura 10: Carga parasitária na pele de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	57

Figura 11: Densidade de células dendríticas dérmicas com perfil CD11c ⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i> , analisadas pela reação de imunoistoquímica.....	58
Figura 12: Imunoistoquímica para detecção de células dendríticas dérmicas (CD11c ⁺).....	59
Figura 13: Densidade de células de Langerhans com perfil CD207 ⁺ no ponto de inoculação do camundongo BALB/c infectado com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i> analisadas pela reação de imunoistoquímica.....	60
Figura 14: Imunoistoquímica para a detecção de células de Langerhans (CD207 ⁺).....	61
Figura 15: Densidade de Linfócitos T CD4 ⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i> , analisada pela reação de imunoistoquímica.	62
Figura 16: Imunoistoquímica para a detecção de linfócitos T CD4 ⁺	63
Figura 17: Densidade de Linfócitos T CD8 ⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i> analisada pela reação de imunoistoquímica.	64
Figura 18: Imunoistoquímica para a detecção de linfócitos T CD8 ⁺	65
Figura 19: Densidade de células iNOS ⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i> analisada pela reação de imunoistoquímica.	66
Figura 20: Imunoistoquímica para a detecção da expressão de iNOS.	67

Figura 21: Carga parasitária no linfonodo poplíteo de drenagem de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> .	68
Figura 22: Número absoluto de DCs no linfonodo poplíteo dos camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> .	69
Figura 23: Ativação de DC representada pelo número absoluto de células CD11c ⁺ MHCII ⁺ CD80 ⁺ (A) e CD11c ⁺ MHCII ⁺ CD86 ⁺ (B) em linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> na 4 ^a e 8 ^a semana PI.	71
Figura 24: Caracterização da população de células de Langerhans no linfonodo poplíteo dos camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> .	72
Figura 25: Caracterização da população de dCDs no linfonodo poplíteo dos camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> .	73
Figura 26: População de linfócitos T CD3 ⁺ em linfonodo poplíteo de drenagem de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> na 4 ^a e 8 ^a semana PI.	74
Figura 27: População de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ em linfonodo poplíteo de drenagem de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> na 4 ^a e 8 ^a semana PI.	75
Figura 28: População de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de IL-4 em suspensão celular de linfonodo poplíteo de drenagem de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> na 4 ^a e 8 ^a semana PI, cultivado sob estímulo homólogo.	77

Figura 29: População de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de IL-10 em suspensão celular de linfonodo poplíteo de drenagem de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> na 4 ^a e 8 ^a semana PI, cultivado sob estímulo homólogo.	78
Figura 30: População de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de IFN-γ em suspensão celular de linfonodo poplíteo de drenagem de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> na 4 ^a e 8 ^a semana PI, cultivado sob estímulo homólogo..	79
Figura 31: Produção de IL-4 quantificada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i> , estimuladas com antígeno homólogo.....	80
Figura 32: Produção de IL-10 quantificada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i> , estimuladas com antígeno homólogo.....	81
Figura 33: Produção de IFN-γ quantificada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i> , estimuladas com antígeno homólogo.....	82
Figura 34: Níveis de nitrato em sobrenadantes de cultura de células extraídas dos linfonodos poplíteos dos camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i> estimuladas com antígeno homólogo..	84

Figura 35: População de linfócitos T CD4 ⁺ (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD62L ^{low} CD45RB ^{high}) (A) e T CD8 ⁺ (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD62L ^{low} CD45RB ^{high}) (B) ativados em linfonodo poplíteo de camundongos infectados por <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> na 4 ^a e 8 ^a semana PI..	85
Figura 36: População de linfócitos T CD4 ⁺ (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD62L ^{low} CD45RB ^{low}) (A) e T CD8 ⁺ (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD62L ^{low} CD45RB ^{low}) (B) de memória em linfonodo poplíteo de camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i> na 4 ^a e 8 ^a semana PI.	86
Figura 37: População de células nTreg (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺) em linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i> na 4 ^a e 8 ^a semana PI.....	88
Figura 38: População de células iTreg (CD4 ⁺ FOXP3 ⁺) em linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i> na 4 ^a e 8 ^a semana PI.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pré-diluição utilizada para realização de ensaio de diluição limitante	33
Tabela 2: Descrição de anticorpos monoclonais utilizados para análise da população e ativação de células dendríticas	39
Tabela 3: Concentrações dos antígenos totais utilizados para estímulo da cultura de células de linfonodo de drenagem	42
Tabela 4: Descrição dos anticorpos monoclonais utilizados para determinação da frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ produtores de citocinas	43
Tabela 5: Descrição dos anticorpos monoclonais utilizados para determinação da frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ ativados e de memória	48

Resumo

Carvalho AK. Correlação do perfil das células dendríticas com a resposta imune celular T CD4⁺ e T CD8⁺ na infecção experimental do camundongo BALB/c por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

L. (L.) amazonensis (La) e *L. (V.) braziliensis (Lb)* podem causar um espectro de manifestações clínicas e imunopatológicas no homem, sendo *La* responsável pela forma anérgica difusa e *Lb* pela forma mucocutânea da doença, formas polares e de elevada gravidade. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar os aspectos da resposta imune celular no ponto de inoculação e no linfonodo de drenagem de camundongos BALB/c inoculados no coxim plantar com 10⁶ promastigotas de *La* e *Lb*. A evolução da lesão foi avaliada semanalmente sendo que na 4^a e 8^a semana PI biópsias do ponto de inoculação foram coletadas para determinação da densidade de células dendríticas (CD207⁺ e CD11c⁺), linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e células iNOS⁺ por imunoistoquímica, e o linfonodo de drenagem para caracterização de subpopulações de células dendríticas e de linfócitos T CD4 e CD8 por citometria de fluxo. Células de linfonodo de drenagem foram cultivadas, com estímulo homólogo, para quantificação de citocinas (IL-4, IL-10 e IFN-γ) e nitrito nos sobrenadantes. A infecção por *La* levou à progressão da doença, com aumento do tamanho da lesão e da carga parasitária tanto na pele quanto no linfonodo de drenagem, enquanto que a infecção por *Lb* mostrou um discreto aumento da lesão entre a 6^a e 7^a semana PI com posterior regressão e redução da carga parasitária na pele e no linfonodo de drenagem. Aumento do número de células dendríticas dérmicas e de Langerhans foi observado na pele de camundongos inoculados com *La* na 4^a semana PI, juntamente com o aumento no número de células de Langerhans nos linfonodos de drenagem. Resposta imune celular preferencial de células T CD4⁺ foi observada tanto na pele quanto no linfonodo de camundongos inoculados com *La*, que mostrou ser predominantemente do tipo Th2 com a produção aumentada de IL-10 e IL-4. Já a infecção por *Lb* levou ao aumento na expressão de células dendríticas dérmicas e Langerhans na pele dos animais inoculados com *Lb* somente na 8^a semana PI, assim como aumento do número de células dendríticas dérmicas no linfonodo. A resposta imune celular foi caracterizada por células T CD4⁺ e CD8⁺ em pele e linfonodo dos animais infectados com *Lb*, vinculada a um perfil Th1 com a produção preferencial de IFN-γ e altos níveis de NO. Aumento no número de células T regulatórias foi observado na infecção por *Lb*, que mostrou correlação direta com o número de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-10. Assim, a infecção por *La* foi relacionada à suscetibilidade, enquanto que a infecção por *Lb* foi relacionada à resistência

do hospedeiro vertebrado. Estes resultados evidenciam não só o papel do parasita na modulação da resposta imune do hospedeiro como também das células dendríticas à infecção por *Leishmania*.

Descritores: Células dendríticas, células de Langerhans, imunidade celular, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*.

Summary

Carvalho AK. Correlation to the profile of dendritic cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cellular immune response in experimental infection of BALB/c mice by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

L. (L.) amazonensis (La) and *L. (V.) braziliensis (Lb)* are responsible for a spectrum of clinical and immunopathological manifestations in humans, *La* is able to cause anergic diffuse leishmaniasis and *Lb* mucocutaneous leishmaniasis, polar forms with high severity. In this way, the aim of the present study was to evaluate aspects of the cellular immune response in the site of infection and in the draining lymph node of BALB/c mice inoculated in the hind footpad with 10⁶ promastigotes of *La* and *Lb*. The evolution of the lesion size was evaluated weekly and in the 4th and 8th week PI biopsies from the site of infection were collected to determine the density of dendritic cells (CD207⁺ and CD11c⁺), CD4⁺ and CD8⁺ T cells and iNOS⁺ cells by immunohistochemistry, and the draining lymph node to characterize subsets of dendritic cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells by flow cytometry. The draining lymph nodes cells were cultured with specific antigen to determine the cytokines (IL-4, IL-10 e IFN- γ), and the nitric oxide in the supernatants. The infection caused by *La* led to the progression of disease with increase on lesion size and parasite load in the skin and draining lymph node, while *Lb* infection showed a discrete increase on the lesion size between 6th and 7th week PI with late regression and reduction in the skin as well as lymph node parasite load. An increase on the number of dermal dendritic and Langerhans cells were observed in the skin of BALB/c mice infected with *La* at 4th week PI together with an increase of Langerhans cells in the draining lymph node. The preferential CD4⁺ T cell immune response was observed in skin and lymph node of mice infected with *La*, which showed to be rather Th2 with an increase on the levels of IL-4 and IL-10. However, *Lb* infection led an increase of dermal dendritic cells and Langerhans cells in the skin only at 8th week PI, as well as an increase in the dermal dendritic cells in lymph node. The cellular immune response were characterized by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the skin and draining lymph node of mice infected with *Lb*, which was related to a Th1 immune response with production of high levels of IFN- γ and nitric oxide. An increase of Regulatory T cells was observed in *Lb* infection, which showed the positive correlation with the IL-10 producing CD4⁺ T cells. So, the *La* infection was related to the susceptibility, while *Lb* infection was related to the resistance in the vertebrate host. These results emphasize the role of the parasite in the modulation of the host immune response to *Leishmania* infection.

Descriptors: dendritic cells, Langerhans cells, cellular immunity, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*

INTRODUÇÃO

---

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanias pertencem à Ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, o qual compreende diferentes espécies de protozoários causadoras das leishmanioses, que são doenças infecto-parasitárias. As leishmanioses são endêmicas nos 5 continentes, em 88 países localizados nas regiões tropical e subtropical, sendo a prevalência mundial superior a 12 milhões de casos, e ainda 350 milhões de pessoas encontram-se em situação de risco em contrair a enfermidade. Contudo, a notificação dos casos é obrigatória em apenas 32 países, portanto, há uma alta taxa de subnotificação (WHO, 2001).

Estes parasitas são capazes de infectar diferentes hospedeiros vertebrados como o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos (Herrer; Christensen, 1976; Braga et al., 1986; Silveira et al., 1982; Souza et al., 2005; WHO, 2010), assim como hospedeiros invertebrados pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (WHO, 2010).

A infecção no hospedeiro vertebrado é iniciada e transmitida pela picada das fêmeas de flebotomíneos infectadas com as formas promastigotas metacíclicas que apresentam morfologia fusiforme e um longo flagelo (Mohiuddin, 1952; Wheeler et al., 2011) (Figura 1-A). Durante o repasto sanguíneo do inseto infectado ocorre a inoculação da saliva, que irá

modular a resposta imune local, bem como das formas promastigotas na pele do hospedeiro, que serão fagocitadas, inicialmente por neutrófilos. Essas células são capazes de eliminar o parasita por uma série de mecanismos leishmanicidas, contudo a sobrevivência de uma população parasitária em seu interior pode levar a uma importante via de escape da resposta imune inata (Pearson; Steigbigel, 1981; Laskay et al., 2003), e à permanência parasitária no interior das células hospedeiras finais, os macrófagos (Farah et al., 1975; Reiner et al., 1987; Moll, 1993). Quando as promastigotas são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos, elas se diferenciam rapidamente em formas amastigotas, com formato arredondado e sem flagelo (Figura 1-B).

Figura 1: Formas promastigotas em meio de cultura (A) e formas amastigotas em *imprint* de baço de hamster infectado cronicamente, (B) com *Leishmania spp.* Coradas com Giemsa no aumento de 1000×. Fonte: figura A – Bruno Luiz Soares Campos, figura B – Thaíse Yumie Tomokane.

Essa modificação é necessária para que os parasitas possam se adaptar ao novo microambiente fagolisossomal (Naderer; McConville, 2008).

Quando ocorre a fagocitose dos parasitas pelas células dendríticas ou macrófagos, podemos ter a eliminação dos parasitas ou sua sobrevivência e multiplicação com posterior disseminação para os órgãos linfoides regionais, onde será iniciada a resposta imunológica. Dependendo desta resposta, o hospedeiro vertebrado pode apresentar resistência à infecção ou suscetibilidade, e nos suscetíveis o curso clínico da doença progredirá culminando no desenvolvimento da leishmaniose visceral ou cutânea, dependendo da espécie de *Leishmania* que tenha sido inoculada. Quando o inseto vetor saudável realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomíneo poderá se infectar iniciando ciclo biológico (Figura 2).

Figura 2: Ciclo biológico de *Leishmania* spp. – 1 representa repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos infectadas e início da infecção em hospedeiros vertebrados; após a infecção as formas promastigotas são fagocitadas por células apresentadoras de antígeno e se diferenciam em amastigotas (2) que se multiplicam ativamente nas células hospedeiras causando a ruptura destas células (3). Após novo repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado, as fêmeas do flebótomo podem ingerir células infectadas (4) que por ação de uma série de enzimas digestivas do inseto vetor serão rompidas e liberando os amastigotas (5), que novamente se diferenciarão em promastigotas (6), se ligarão a superfície intestinal destes insetos, multiplicandosse (7) sendo então capaz de infectar novo hospedeiro vertebrado após o repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo (1). Fonte: Center for Disease Control adaptado por Ana Kely de Carvalho.

1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Cutânea ou Leishmaniose Tegumentar Americana (no Novo Mundo) é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, causada por diferentes espécies de parasitas, caracterizada principalmente pelo comprometimento do tecido cutâneo e, secundariamente, dependendo da espécie de *Leishmania* e de fatores imunogenéticos do hospedeiro, por lesão do tecido mucoso

nasobucofaringeo. É uma doença considerada polimorfa, devido à grande variedade dos tipos de lesões que podem se manifestar na pele. Entretanto, a úlcera leishmaniótica representa, sem dúvida, a manifestação cutânea mais comum da doença, apresentando as seguintes características: contornos circulares, bordas salientes e infiltradas, fundo com granulação grosseira avermelhada e com discreto exsudato (Falqueto; Sessa, 1996; Silveira et al., 1997).

O gênero *Leishmania* compreende atualmente cerca de 30 espécies conhecidas, das quais 21 causam doença ao homem (Lainson, 1997). No Velho Mundo, entre as principais espécies cutâneas destaca-se a *Leishmania (Leishmania) major*, e seus principais vetores são insetos do gênero *Phlebotomus* (WHO, 2010). No Novo Mundo, entre as principais espécies cutâneas destacam-se a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cujos vetores são diferentes espécies do gênero *Lutzomyia*. No Brasil, são reconhecidas até o presente momento sete espécies causadoras de doença cutânea: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi* (Lainson, 1997; Silveira et al., 2002; WHO, 2010), as quais têm assegurado a ocorrência de casos em todo o território nacional (BRASIL, 2009). A *L. (L.) amazonensis* e a *L. (V.) braziliensis* são as espécies cutâneas de maior interesse médico no Brasil, devido à gravidade e alta incidência, respectivamente.

A *L. (V.) braziliensis*, é a espécie que representa o agente mais importante de LTA em toda a América Latina, pois é o de maior prevalência no homem. É responsável pela forma clínica localizada, que pode evoluir para a forma severa de leishmaniose cutâneo-mucosa que ocorre comumente na forma de recidiva da doença, às vezes anos após a cura da lesão primária (Lessa et al., 2007). Sua distribuição geográfica é bastante extensa, desde a América Central até a América do Sul, atravessando o Brasil e se estendendo até o norte da Argentina. Nessa vasta área geográfica, várias espécies de flebotomíneos têm sido incriminadas vetores do parasita, entre elas no Brasil destacam-se: *Lutzomyia intermedia*, *Lu. whitmani*, *Psychodipygus wellcomei* e *Psy. complexus* (Rangel et al., 1984; Ryan et al., 1987; Gomes, 1992; de Souza et al., 1996). Trata-se de espécies antropofílicas, fato que contribui para a alta prevalência da infecção humana por este agente (Silveira, 2001). Seus reservatórios naturais são roedores silvestres dos gêneros *Bolomys* e *Nectomys*, roedores sinantrópicos como o *Rattus rattus* e outras espécies como *Canis familiaris* (Mayrink et al., 1979; Brandão-Filho et al., 2003; WHO, 2010). Até o presente momento, o papel dos animais domésticos ainda não foi bem esclarecido na transmissão da LTA, mas a presença do parasita nesses animais alerta-nos a respeito do possível papel de reservatório e manutenção do ciclo doméstico e/ou urbano da LTA (Madeira et al., 2003; Andrade et al., 2006; Brasil, 2007).

A *L. (L.) amazonensis* é uma espécie de importância no cenário da LTA no Brasil, apesar de sua prevalência não ser muito alta entre os casos humanos. Este parasita é responsável pela forma cutânea localizada (Moraes; Silveira, 1994), porém pode causar também as formas leishmaniose cutânea disseminada borderline e a leishmaniose cutânea anérgica difusa (Silveira, et al., 2004; Silveira et al., 2005). Ocorre em toda a região Amazônica brasileira e em países vizinhos. Os principais insetos vetores associados a esta espécie são os flebotomíneos *Lutzomyia reducta*, *Lu. olmeca nociva* e *Lu. flaviscutellata*, sendo este último considerado o principal vetor apesar de apresentar hábitos alimentares pouco antropofílicos, por isso *L. (L.) amazonensis* tem uma baixa prevalência entre os casos de LTA (Rebelo et al., 1999). Os reservatórios naturais são principalmente espécies de roedores silvestres dos gêneros *Proechimys*, *Oryzomys* e *Wiedomys* dos quais o parasita tem sido isolado somente da pele (Lainson et al., 1981; WHO, 2010).

1.3 Imunidade na LTA

1.3.1 Imunidade Inata

Na fase inicial da infecção causada por parasitos do gênero *Leishmania*, ocorre à ativação da resposta imune inata com a participação de elementos humorais e celulares, como proteínas do sistema

complemento, mediadores pró-inflamatórios, assim como os neutrófilos e as células apresentadoras de antígenos. Uma vez vencido esta etapa inicial da infecção, e com a persistência do parasito, ocorre o estímulo de uma resposta imune celular específica com a participação de linfócitos podendo levar a resistência ou suscetibilidade a infecção.

No momento que formas promastigotas são introduzidas na derme através da picada do flebotomíneo, o sistema complemento é ativado pela via clássica, alternativa ou das lectinas (Mosser; Edelson, 1984; Navin et al., 1989; Green et al., 1994; Dominguez; Toraño, 1999). Essa ativação pode resultar na morte dos parasitos. Durante este processo ocorre o espessamento do glicocélice na membrana das formas promastigotas, o qual é basicamente composto por lipofosfoglicano (LPG), da mesma maneira que ocorre o aumento do número de metaloproteína de 63kDa (gp63), permitindo que os parasitos se tornem mais resistentes a ação do complemento (Talamás-Rohana et al., 1990).

Esta resistência ao complemento é basicamente efetuada pela inativação do fragmento C3b do complemento ocasionada pela ação da gp63, gerando o componente inativo do complemento, o C3bi, capaz de se ligar à superfície das formas promastigotas. Os parasitos então opsonizados pelo C3bi, são capazes de se ligar aos receptores do complemento, como o CR1 e ou CR3, presente em células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos. Quando o parasito utiliza principalmente estes receptores da membrana do macrófago para a sua adesão e internalização, um baixo

metabolismo oxidativo da célula hospedeira é desencadeado constituindo, assim, um mecanismo essencial para a sobrevivência intracelular da forma promastigota infectiva (Wright; Silverstein, 1983; Bogdan et al., 1990).

Embora o sistema complemento possa ser utilizado pelo parasito para entrar na célula hospedeira, este componente da imunidade inata também é importante para eliminar alguns parasitos, pois em camundongos BALB/c depletados de complemento, na fase inicial da infecção por *L. (L.) amazonensis* se observou uma menor resposta inflamatória e alto parasitismo, confirmando seu papel protetor e lítico contra as formas promastigotas (Laurenti et al., 2004).

Em relação aos elementos celulares que participam da resposta inflamatória aguda inicial, os leucócitos polimorfonucleares mostram-se importantes na fagocitose dos parasitos, com o auxílio de imunoglobulinas e do sistema complemento. Na década de 80, os relatos *in vitro* apontavam para um papel importante dos neutrófilos na morte de parasitos por ativação do sistema microbicida dependente de oxigênio (Pearson; Steigbigel, 1981). Da mesma maneira, foi também demonstrado que os eosinófilos fagocitavam e destruíam promastigotas de *L. (L.) donovani* por mecanismos microbicidas destas células e/ou outros constituintes lisossomais (Pearson et al., 1987). Comparativamente, no entanto, foi demonstrado que os neutrófilos foram mais eficazes no processo de fagocitose, sem opsonização específica por soro imune, das formas amastigotas de *L. (L.) donovani* seguidos dos monócitos e dos eosinófilos (Chang, 1981).

Porém, estudos recentes têm postulado uma nova teoria para o papel dos neutrófilos na interação com parasitos do gênero *Leishmania*, chamada de “Cavalo de Tróia” (Van Zandbergen et al., 2004). Usando microscopia intravital e citometria, Peters e colaboradores em 2008 mostraram que promastigotas de *Leishmania major* invadem eficientemente neutrófilos, que são recrutados para o local da picada do vetor ou da inoculação experimental, e que os parasitos permanecem viáveis dentro destas células. A depleção de neutrófilos reduziu a habilidade dos parasitos em estabelecer uma infecção produtiva. Desta maneira, os neutrófilos seriam células hospedeiras temporárias de *Leishmania*, pois permitiriam uma entrada silenciosa dos parasitos nos macrófagos, que facilmente ingerem os neutrófilos apoptóticos infectados, sem ativar mecanismos microbicidas nestas células (Rogers et al., 2009).

1.3.2 Imunidade adquirida – O papel dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

Grande parte dos conhecimentos sobre a imunidade na leishmaniose foi obtida utilizando-se *Leishmania (L.) major*, espécie do parasita causador de leishmaniose cutânea no Velho Mundo. Camundongos C57BL/6 mostram um perfil de resistência à infecção por *L. (L.) major*, o que foi correlacionado com um fenótipo de células T CD4⁺ do tipo Th1, produtoras principalmente de IFN- γ . Por outro lado, camundongos BALB/c mostram um perfil de suscetibilidade à infecção relacionado ao fenótipo de linfócitos T CD4⁺ do

tipo Th2 produtores principalmente de IL-4, IL-5 e IL-10 (Reiner; Locksley, 1995; Sacks; Noben-Trauth, 2002).

No entanto, foi demonstrado que o controle da infecção pode diferir significativamente em relação à espécie infectante. A infecção de camundongos C57BL/6 por *L. (L.) amazonensis* resulta na progressão da doença, com aumento crescente do tamanho da lesão e coexistência de respostas imunológicas antagônicas, com produção de IL-10 e de IFN- γ (Laurenti et al., 2009). A depleção de linfócitos T CD4⁺ de camundongos BALB/c, que são altamente suscetíveis a infecção por *L. (L.) amazonensis*, resulta na redução do tamanho de lesão, da carga parasitária e da incidência de metástase, demonstrando o importante papel dos linfócitos T CD4⁺ na progressão da infecção por esta espécie de parasita (Silva et al., 1994). Do mesmo modo que camundongos C57BL/6 deficientes na produção de moléculas de MHC-II, o que torna as células T CD4⁺ não funcionais, não desenvolvem lesão e mostram redução no parasitismo. A inabilidade de montar uma resposta inflamatória se correlacionou com a falha na produção de citocinas que leva ao recrutamento de monócitos e granulócitos (Soong et al., 1997). Estes parasitas, no entanto, não são capazes de produzir uma forte resposta Th2, como postulado no modelo de suscetibilidade com *L. (L.) major*, mas produzem comparáveis níveis de citocinas do perfil Th1 e Th2 (Ji et al., 2002), apresentando desta forma uma resposta imunológica mista. No entanto, camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* mostram-se relativamente resistentes à infecção devido ao desenvolvimento de uma

potente resposta imune do tipo Th1 com a produção de altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-4 e IL-10 (DeKrey et al., 1998). Estes estudos evidenciam que na infecção por espécies de parasita do Novo Mundo, a resposta imunológica pode apresentar diferenças e não manter o padrão de resistência e suscetibilidade bem definido como o verificado na infecção por *L. (L.) major*.

Entretanto, na infecção por qualquer espécie de parasita, a resistência à infecção é dependente da habilidade das células T CD4⁺ secretarem IFN- γ , o qual induz a ativação dos macrófagos, resultando na produção de óxido nítrico que tem a capacidade de destruir os parasitas intracelulares (Bogdan, 2001). Entretanto, vale ressaltar que em algumas circunstâncias, o IFN- γ pode desempenhar um papel ambíguo na infecção por *L. (L.) amazonensis*, uma vez em sinergia com citocinas do tipo Th1 (IL-12 ou TNF- α) pode proteger o camundongo contra a infecção, mas na ausência desta sinergia, promove a replicação do parasita, revelando uma surpreendente capacidade da *L. (L.) amazonensis* usar mecanismos de defesa do hospedeiro em benefício próprio (Qi et al., 2004).

Os casos humanos de leishmaniose cutânea localizada (LCL) causada tanto por *L. (L.) amazonensis* quanto por *L. (V.) braziliensis*, assumem uma posição central no espectro da doença e mostram boa resposta ao tratamento com as drogas habituais, face ao seu perfil imunológico ser predominantemente CD4⁺Th1, o que lhe confere um alto grau de resistência imunológica à infecção. Entretanto, dependendo da

espécie de *Leishmania* envolvida e do estado imunológico do hospedeiro, algumas infecções, não totalmente controladas pelos mecanismos de imunidade celular podem evoluir para as formas polares da doença dentro do espectro clínico. No caso de infecção por *L. (V.) braziliensis*, a infecção pode evoluir para o polo hiperérgico de resposta do hospedeiro, representado pela forma de leishmaniose mucosa (LM), com perfil imunológico fortemente CD4⁺ Th1; enquanto que, no caso de infecção por *L. (L.) amazonensis*, a infecção pode evoluir para o polo hipoérgico, representado pela forma de leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD), caracterizada por um perfil imunológico nitidamente CD4⁺ Th2 (Silveira et al., 2009). Entre a forma central LCL e as duas formas polares LM e LCAD, as infecções podem passar por uma forma intermediária chamada de leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB), durante a qual a imunidade celular dos pacientes apresenta-se parcialmente deprimida ou inibida, porém, com certo grau de predomínio da resposta CD4⁺ Th1 em relação da CD4⁺ Th2, motivo pelo qual se atribui a denominação específica borderline (Silveira, 2001; Silveira et al., 2004) (Figura 3).

Figura 3: Espectro Clínico e Imunopatológico da LTA. LCAD, leishmaniose cutâneo anérgica difusa, apresenta lesões cutâneas infiltradas e nodulares; LCL, leishmaniose cutâneo localizada, apresenta lesões ulceradas na pele com grande infiltrado inflamatório na borda da lesão no caso da infecção ser causada por *L. (L.) amazonensis* e um pequeno infiltrado inflamatório no caso da infecção ser causada por *L. (V.) braziliensis*; LCM, leishmaniose mucocutânea, apresenta lesões infiltradas ulceradas no nariz, palato e septo nasal; LCDB, leishmaniose cutâneo disseminada borderline, na infecção por *L. (L.) amazonensis* pode apresentar lesões infiltradas na pele no dorso das mãos (lesões primárias) e nas orelhas e na região frontal da cabeça (lesões secundárias), já no caso da infecção por *L. (V.) braziliensis* ocorre à disseminação de lesões papulo-ulceradas na pele no rosto, orelhas, tronco e braços. DTH, teste de hipersensibilidade tardia; CD4 = células T CD4⁺, CD8 = células T CD8⁺; Th1 = resposta imune celular tipo Th1; Th2 = resposta imune celular tipo Th2. Fonte: Silveira et al 2009 adaptado por Ana Kely de Carvalho.

Os linfócitos T CD8⁺ também desempenham um papel importante no desenvolvimento da resposta imune e são tidos como essenciais na imunidade frente à reinfecção de camundongos por *L. (L.) major* (Müller et al., 1993). Recentemente os linfócitos T CD8⁺ foram subdivididos em linfócitos T citotóxicos 1 (Tc1) e T citotóxicos 2 (Tc2). As células Tc1 são capazes de destruir células infectadas por meio de perforinas e/ou de

mecanismos associados à expressão de Fas/CD95L que inicia o processo de apoptose via ativação da caspase 8 (Trapani; Smyth, 2002) e uma forte produção de IFN- γ e TNF- α ; enquanto que as Tc2 destroem microorganismos intracelulares pela via das perforinas e granzimas, sendo capazes de produzir principalmente IL-4, IL-5 e IL-10 (Dobrzanski et al., 2004).

Na infecção com *L. (L.) major* foi demonstrado que as células T CD8⁺ estão relacionadas com a eliminação do parasita e com o estabelecimento e manutenção da imunidade contra a infecção. Assim as células T CD8⁺ participam diretamente na produção de IFN- γ e na regulação da produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ (Müller et al., 1991; Herath et al., 2003). De Moura et al. (2005) utilizando inóculo de baixa concentração de *L. (V.) braziliensis* na derme da orelha de camundongos BALB/c demonstraram que a população de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ no linfonodo de drenagem aumenta com o tempo de infecção, enquanto que a população destas células produtoras IL-4 e IL-10 permanecem inalteradas durante o curso da infecção. Do mesmo modo linfócitos de pacientes diagnosticados com leishmaniose que apresentaram cura clínica, quando cultivados *in vitro* na presença de antígeno de *L. (V.) braziliensis*, mostraram uma maior proliferação de linfócitos T CD8⁺ e aumento de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de pacientes que apresentaram a cura clínica (Da-Cruz et al., 1994) demonstrando o importante papel dos linfócitos T CD8⁺ na resolução da infecção por espécies do gênero *Leishmania*.

1.3.3 Células T Regulatórias

Recentemente descobertas, as células T Regulatórias (Treg) são formadas por uma diversa população de linfócitos, as quais são capazes de regular a resposta imune adaptativa em vertebrados superiores (Peterson, 2012). Estas células são capazes de limitar a amplitude das respostas efectoras, que podem resultar na incapacidade de controlar adequadamente a infecção. Por outro lado, também limitam os danos colaterais causados por uma resposta imune vigorosa contra patógenos (Belkaid; Tarbell, 2009).

Para exercerem sua função, as Tregs apresentam como propriedade básica a capacidade de produção de citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β . Atuam em uma complexa rede de mecanismos destinados a assegurar a modulação das respostas imunológicas diante de diversos antígenos provenientes de agentes infecciosos, tumores, aloantígenos, autoantígenos e aloérgenos. Entre os linfócitos T, várias subpopulações apresentam propriedades regulatórias como as TR1, produtoras de IL-10, que suprimem algumas respostas de células T *in vivo* (Papiernik et al., 1997, Apostolou et al., 2002), as células Th3 capazes de atuar via produção de TGF- β (Bach, 1995; Pearson; McDevitt, 1999) entre outras.

As Tregs têm sido agrupadas em Treg naturais (nTreg) e Treg induzidas (iTreg) baseadas no seu desenvolvimento, especificidade antigênica, mecanismos de ação, dependência de TCR e sinais coestimulatórios (Bluestone; Abbas, 2003; Bach, 2003), sendo que as Tregs

naturais (CD4⁺CD25⁺) se desenvolvem no timo e regulam as células T autorreativas na periferia e as Tregs induzidas (CD4⁺CD25⁻) desenvolvem-se na periferia a partir das células T CD4⁺ convencionais após a exposição dessas a citocinas reguladoras (especialmente IL-10 e TGF- β) ou células apresentadoras de antígenos (Belkaid, 2007). Estes linfócitos são identificados como linfócitos T CD4⁺ que coexpressam a cadeia do receptor de IL-2 (CD25) e o fator de transcrição nuclear FOXP3, diretamente responsável pelo seu desenvolvimento e função (Fontenot et al., 2003). Além destes marcadores, essas células também podem expressar outros antígenos, tais como CTLA-4 (antígeno-4 de linfócito T citotóxico), GITR (membro da superfamília dos receptores de TNF), CD62L, OX40 (CD134) (Shevach et al., 2006), CD39 e CD73 (Deaglio et al., 2007). Contudo, esses marcadores não são específicos para as células Tregs, uma vez que eles também podem ser expressos por outras células T ativadas (Belkaid; Tarbell, 2009).

A infecção de camundongos C57BL/6 por *L. (L.) major*, demonstrou que os linfócitos T CD4⁺CD25⁺ são capazes de suprimir a resposta Th1 e prevenir que os parasitas sejam completamente eliminados mantendo estimulação antigênica constante para manutenção da resposta imune celular protetora (Belkaid et al., 2002). Por outro lado, Xu et al. (2003) demonstraram que as células Tregs eram capazes de suprimir tanto a resposta Th1 quanto a resposta Th2 em camundongos BALB/c. Camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis* apresentam um

aumento de células Tregs CD4⁺CD25⁺CD86⁺, juntamente com um aumento da expressão de FoxP3, TGF- β e IL-10R na pele e linfonodo de drenagem, este efeito benéfico, no entanto foi transitório e gradualmente substituído pela expansão das células T efetoras patogênicas (Ji et al., 2005). Na infecção com *L. (V.) braziliensis* a expressão de células Tregs (CD4⁺CD25⁺) que expressam GITR, FOXP3 e CD103) exercem supressão, principalmente no ponto de inoculação; e estas Tregs detectadas também no linfonodo de drenagem podem agir limitando a patologia mediada pelo sistema imune (Falcão et al., 2012).

1.3.4 Células Dendríticas

As células dendríticas (DCs), descritas na década de 70 por Steinman e Cohn (1977), são uma família heterogênea de células apresentadoras de antígenos (APC) e como tal apresentam um papel central na determinação da resposta imune (Clausen; Kel, 2010), são células derivadas de medula óssea que interagem com células T em órgãos linfoides secundários como os linfonodos e o baço. DCs da pele representam APCs importantes para conectar o compartimento cutâneo com o linfonodo de drenagem. São descritos duas principais subpopulações de DCs na pele normal, as células de Langerhans epidérmicas (LC) e células dendríticas dérmicas (dDC) (Valladeau; Saeland, 2005). Entretanto, as LC descritas em 1868 como “nervos de pele humana” por Paul Langerhans tiveram seu papel

estabelecido como células apresentadoras de antígeno em potencial pertencentes ao sistema leucocitário apenas 100 anos mais tarde (Schuler; Steinman, 1985; Clausen; Kel, 2010).

Segundo Igyarto e Kaplan (2010), durante o processo de migração as LCs sofrem um processo de maturação e adquirem propriedades imuno-estimulatórias potentes. Elas processam antígenos adquiridos na pele e apresentam através de moléculas MHCII para as células T “naïves”. Pelo aumento da expressão na superfície de moléculas coestimulatórias e secretando citocinas pró-inflamatórias, elas fornecem um segundo e terceiro sinal para a ativação e diferenciação das células T. Assim no momento que as LCs chegam ao linfonodo de drenagem elas terão adquirido a superfície fenotípica de uma DC funcionalmente madura, capaz de ativar células T virgens e assim iniciar uma resposta imune eficiente especialmente adaptada para combater com os patógenos na pele.

As LCs constituem aproximadamente 1 a 5% da população total de células da epiderme, formando, neste local, uma rede nas camadas basal e suprabasal (Hanau et al., 1991). São células de morfologia dendrítica e são identificadas ultra-estruturalmente pela presença de Langerina, composta pela lectina C/CD207 responsável pela formação dos grânulos de Birbeck e, portanto um marcador chave para a linhagem de LCs (Valladeau et al., 2000; Valladeau et al., 2002). No entanto, novos subtipos de DCs Langerina⁺ foram descritas na derme (Bursch et al., 2007; Poulin et al., 2007), desta forma, a langerina passa a não ser mais um marcador exclusivo das LCs.

Inicialmente na década de 90, Moll et al. (1993) propuseram que as LCs após a infecção por *Leishmania* na pele migravam da epiderme para a derme, fagocitavam os parasitas, processavam o microorganismo e expressavam os seus antígenos na superfície celular associados às moléculas MHC classe II. Parte das LCs infectadas migravam para o linfonodo regional, onde apresentavam os antígenos processados aos linfócitos T não ativados da região paracortical. Esses linfócitos ativados migravam pela corrente sanguínea para a área onde ocorreu a infecção e então passavam a regular pela secreção de citocinas, a atividade efetora dos macrófagos infectados e de outras LCs remanescentes na derme. Em 1995, Moll et al. analisaram o sítio de ocupação antigênica no MHC do tipo II, assim como a biossíntese e renovação de suas moléculas em células de Langerhans infectadas com *L. major*, e mostraram que ocorria uma ligação estável dos peptídeos do parasita com o MHC II resultando na formação acentuada de dímeros $\alpha\beta$ compactos que resistiam à dissociação com SDS (dodecil sulfato de sódio). Além disso, a meia-vida dos dímeros do MHC II carregando antígenos do parasita foi significativamente maior nas LCs quando comparada aos macrófagos. Esses achados indicaram que a *L. major* modifica a síntese dos produtos do MHC II e possivelmente a formação da cadeia invariável nas LCs; como resultado, as diferentes espécies de parasitas podem influenciar na capacidade de apresentação de antígenos pelas LC, dessa forma modulando a resposta imune do hospedeiro.

No entanto, estudos mais recentes têm discutido que as principais APCs seriam as células dendríticas dérmicas e não mais as LCs como postulado anteriormente. Brewig et al. (2009) propuseram um novo conceito, onde a ativação de células T CD4⁺ é mediada por dDC Langerina⁻, enquanto que as dDC Langerina⁺ estão envolvidas na ativação inicial de células T CD8⁺. A depleção das LCs e não das DCs Langerina⁺ resulta na redução da imigração de células Treg e o aumento da resposta Th1, resultando em uma doença atenuada (Kautz-Neu et al., 2011), demonstrando que as LCs podem estar colaborando no despertar de uma resposta Th2. Silveira et al. (2009) relataram que ocorre um aumento na densidade das LCs na pele de pacientes infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, porém este aumento se desloca no espectro clínico da doença para o polo hipoérgico, causado pela infecção por *L. (L.) amazonensis* e identificados com a forma clínica de leishmaniose cutânea anérgica difusa.

Experimentalmente, Qi et al. (2001) demonstraram que amastigotas de *L. (L.) amazonensis* são capazes de infectar e ativar *in vitro* DCs (CD11c⁺) resultando na produção de IL-4 e falha na produção de IL-12 e desencadeamento de uma resposta imune T CD4⁺ Th2. As DCs infectadas com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* mostram-se menos maduras e menos potentes na apresentação de antígenos do que quando infectadas com promastigotas, reduzindo sua capacidade de ativação das células T CD4⁺, o que sugere que a *L. (L.) amazonensis*, especialmente na sua forma intracelular está envolvida em uma estratégia única de suprimir eventos

iniciais da imunidade inata, resultando no comprometimento das funções das DCs e da ativação da resposta Th1. (Xin; Soong, 2008). Por outro lado, as DCs de animais infectados experimentalmente com *L. (V.) braziliensis* mostram aumento na expressão de marcadores de ativação celular e na produção de IL-12 e TNF- α . No entanto, nem todas as DCs em cultura se tornam infectadas e o aumento na expressão de marcadores de ativação e produção de IL-12 foi observado nas DCs não infectadas, enquanto que células DCs infectadas mostraram expressão diminuída de marcadores de ativação, porém sem interferir na sua capacidade de produzir TNF- α (Carvalho et al., 2008).

Recentemente, tem sido discutido o papel das espécies de parasita do gênero *Leishmania* na determinação da forma clínica e na modulação da imunidade do hospedeiro na LTA. Silveira et al. (2009) mostraram dicotomia da resposta imune celular na LTA humana causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Enquanto a infecção pela *L. (V.) braziliensis* mostrou uma clara tendência de levar a forma cutânea localizada ao polo de hiperreatividade que caracteriza a forma mucocutânea, a *L. (L.) amazonensis* mostrou uma tendência oposta, levando a infecção cutânea localizada ao polo de hipossensibilidade, a forma anérgica difusa. Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo aprofundar os conhecimentos do papel do parasita na determinação da resposta clínica e imunológica do hospedeiro vertebrado, empregando como modelo experimental

camundongos BALB/c inoculados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

OBJETIVOS

---

2. Objetivos

2.1. *Objetivo Geral*

Correlacionar o perfil das células dendríticas e dos linfócitos T na lesão cutânea e no linfonodo de drenagem em camundongos BALB/c infectados experimentalmente por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

2.2. *Objetivos Específicos*

- ✓ Avaliar a evolução da lesão no coxim plantar dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*;
- ✓ Determinar a carga parasitária no coxim plantar e no linfonodo dos camundongos na 4^a e 8^a semana PI;
- ✓ Avaliar a expressão das células de Langerhans, células dendríticas dérmicas, linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e iNOS⁺ no ponto de inoculação;
- ✓ Quantificar as populações de células de Langerhans e células dendríticas dérmicas no linfonodo de drenagem;
- ✓ Quantificar as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-4, IL-10 e IFN- γ no linfonodo de drenagem;
- ✓ Quantificar em sobrenadante de cultura de células totais do linfonodo de drenagem estimuladas com antígeno homólogo a produção de citocinas (IL-4, IL-10 e IFN- γ) e óxido nítrico;

- ✓ Identificar e quantificar a população de células T ativadas, de memória e regulatórias no linfonodo poplíteo;
- ✓ Comparar o perfil das células dendríticas e a resposta imune celular entre os camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

MÉTODOS

---

3. Métodos

3.1. Parasitas

Leishmania (*Leishmania*) *amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) isolada de paciente com leishmaniose cutânea anérgica difusa no município de Belém (PA) e *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (MHOM/BR/1995/M15280) isolada de paciente com leishmaniose mucosa no município de Paragominas (PA) foram utilizadas neste estudo. Ambas as espécies foram classificadas por anticorpos monoclonais (Shaw et al., 1989) e isoenzimas (Miles et al., 1980) no Instituto Evandro Chagas, Belém (PA), Brasil. As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram obtidas pelo isolamento de formas amastigotas presentes em pata traseira de camundongos BALB/c e as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram obtidas pelo isolamento de formas amastigotas presentes na pata traseira de hamsters. As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram isoladas e expandidas em meio RPMI 1640 (Gibco) enquanto que os promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em meio Schneider (Sigma), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Gibco), 10 µg/mL de gentamicina e 100 UI/mL de penicilina. Todos os experimentos foram realizados com parasitas entre a quinta e sexta passagem em cultura e em fase estacionária de crescimento.

3.1.1. Produção de antígeno total de formas promastigotas de L. (L.) amazonensis e L. (V.) braziliensis para análise da resposta imune celular

Formas promastigotas, em fase estacionária foram lavadas por três vezes com PBS estéril, centrifugando-se a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e adicionados ao *pellet* cerca de 300 µL de tampão de lise, constituído por Tris-HCl 20 mM, NaCl 40 mM e EDTA 10 mM (pH 7,3). Em seguida os parasitas foram submetidos a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em temperatura ambiente. A concentração de proteínas foi estimada pelo método de Bradford utilizando kit comercial (BioRad). A concentração de proteínas foi calculada utilizando curva padrão pela dosagem de albumina bovina na faixa de concentração de 50 a 500 µg/mL.

3.2. Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, com seis a oito semanas de idade, foram obtidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os experimentos foram realizados em conformidade com as normas da Comissão para análise de projetos de pesquisas do HC-FMUSP (CAPPesq), sob o número de protocolo 0589/08 (anexo A) e mantidos no Biotério Experimental do Instituto de Medicina

Tropical de São Paulo, em ambiente com ventilação, ração e água à vontade.

3.3. Infecção experimental

Para a infecção *in vivo*, formas promastigotas de ambas as espécies de *Leishmania*, em fase estacionária de crescimento foram coletadas por centrifugação e lavadas três vezes com PBS estéril a 3000 rpm, por 10 minutos, 4°C, e sua concentração ajustada para 2×10^7 promastigotas/mL.

Foram montados quatro grupos experimentais, contendo cada grupo 36 camundongos BALB/c. Estes animais foram anestesiados com solução de tiopental à concentração de 1 mg em 200 µL de solução de PBS administrada intraperitonealmente. Em seguida os animais foram inoculados com 50 µL da suspensão de parasitas (1×10^6 parasitas/pata) no coxim plantar traseiro de ambas as patas. O grupo controle foi inoculado com o mesmo volume de PBS estéril.

3.4. Evolução da infecção causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c

3.4.1. Avaliação do tamanho da lesão

A evolução da infecção foi avaliada semanalmente até a 8ª semana pós-infecção (PI), com o auxílio de um paquímetro, sendo que o tamanho da

lesão foi obtido pela medida da espessura da pata.

3.4.2. *Análise Histopatológica*

Na 4^a e 8^a semana PI, seis animais de cada grupo foram eutanasiados pelo do deslocamento cervical. Em seguida, biópsias do ponto de inoculação foram coletadas para a avaliação histopatológica das lesões. As biópsias foram acondicionadas em formol tamponado 10% e processadas pelas técnicas usuais de histologia. Cortes histológicos de 6 µm foram corados pela hematoxilina e eosina e observados à microscopia de luz para a caracterização das alterações teciduais.

3.4.3. *Determinação da carga parasitária*

A carga parasitária dos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foi analisada pelo ensaio de diluição limitante (Passero et al., 2010). Os animais de cada grupo experimental foram eutanasiados através do deslocamento cervical, em seguida foram coletadas e pesadas biópsias de pele e linfonodos de drenagem. Em seguida, estes fragmentos foram pesados, macerados e diluídos conforme a Tabela 1 em meio Schneider (Sigma), suplementado com 10% de SFB inativado pelo calor, 10 µg/mL de gentamicina e 1000 UI de ampicilina. Após a realização de pré-diluição prévia (Tabela 1), 200 µL foram adicionados em poços de placas de

96 poços estéreis em quadruplicata. Em seguida foram realizadas diluições seriadas (1:4) desta suspensão celular em dodeplicata nas próprias placas. Estas placas foram vedadas para evitar a evaporação e incubadas a 25°C, por 10 dias, para que os amastigotas viáveis se diferenciasssem em promastigotas. Após este período cada placa foi observada em microscópio invertido e a maior diluição em que foi possível observar formas promastigotas foi anotada e a concentração de formas promastigotas/peso de cada fragmento foi estimada seguindo a fórmula matemática:

$$\text{Carga Parasitária} = \frac{\text{recíproco do maior título positivo} \times \text{diluição do material} \times (\text{vol. homogenizado/vol. 1}^{\circ}\text{poço} \times \text{diluição})}{\text{peso do órgão}}$$

Tabela 1: Pré-diluição utilizada para a realização do ensaio de diluição limitante

	PELE		LINFONODO	
	4ª semana PI	8ª semana PI	4ª semana PI	8ª semana PI
<i>L. (L.) amazonensis</i>	1:50	1:100	1:25	1:50
<i>L. (V.) braziliensis</i>	1:10	1:4	1:20	1:10

3.5. Avaliação da imunidade celular no ponto de inoculação de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na pele dos camundongos BALB/c

3.5.1. Imunomarcagem de células dendríticas e linfócitos T

Para avaliar a participação das dCDs e das LCs (CD11c⁺ e CD207⁺, respectivamente) e de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) no sítio dérmico de infecção dos parasitas, biópsias foram coletadas e estocadas em freezer -80

°C. Foram obtidos cortes de 5 µm de espessura em lâminas com silano e acondicionadas em freezer -20°C. Para iniciar a imunomarcacão, as lâminas com os respectivos cortes histológicos foram mantidas à temperatura ambiente por cinco minutos para descongelamento do corte, seguindo a fixacão em soluçao de acetona-clorofórmio (1:1) por quinze minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS por dez minutos e posteriormente incubadas por dez minutos em peróxido de hidrogênio 0,3% para o bloqueio da peroxidase endógena. Para o bloqueio de ligacões inespecíficas foi realizada incubacão com leite desnatado (Molico – Nestlè) 6% por uma hora a 37°C.

Posteriormente adicionou-se aos tecidos, anticorpo monoclonal produzido em rato anti-CD207 (eBioscience - 14-2075) 1:100, o qual reage com a Langerina de camundongo que é expressa em uma distinta populacão de células dendríticas chamadas de células de Langerhans localizada na epiderme, ou o anticorpo monoclonal produzido em hamster anti-CD11c (BD - 550283) diluído a 1:10 o qual é expresso em células dendríticas dérmicas. Para a detecção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foram empregados os anticorpos monoclonais produzidos em rato: anti-CD4 (BD - 550788) 1:160 e anti-CD8α (BD - 550281) 1:40. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS com 1% de BSA seguindo incubacão a 4°C por dezesseis horas. Após este período as lâminas foram lavadas três vezes por dois minutos cada com PBS. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo secundário biotinilado policlonal (BD – 517605KC para os anticorpos anti-CD207, anti-CD4, anti-

CD8 α produzido em rato e BD – 550335 para o anticorpo anti-CD11c produzido em hamster) a uma diluição de 1:50 em PBS com 1% BSA para e incubados por uma hora a 37°C. Após este período foram realizadas três lavagens com PBS por dois minutos cada, e em seguida a adição do complexo estreptavidina peroxidase anti-Ig HRP (BD – 551013) por quarenta e cinco minutos a 37°C. Em seguida foram feitas três lavagens com PBS por dois minutos cada e incubação por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente com diaminobenzidina líquida (DAKO – K3468). A reação foi interrompida pela da adição de água destilada e várias lavagens com água destilada para retirar o excesso da solução de diaminobenzidina. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris por dois minutos à temperatura ambiente, lavadas com água corrente e desidratadas em bateria de álcool (álcool 50%, álcool 80%, álcool 95%, álcool absoluto) e xilol e em seguida montadas com lamínulas utilizando Permount (Sigma). Como controles positivos da reação para a marcação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e das DCs CD11c⁺ foram utilizados cortes histológicos de baço e para as LCs (CD207⁺) foi utilizada pele de camundongos BALB/c saudáveis. Cada lâmina possuía dois cortes histológicos, sendo um utilizado como controle negativo, sem a adição do anticorpo primário.

Para a análise da densidade das células imunomarcadas foi utilizado um fotomicroscópio (Axioskop 2 plus - Zeiss) acoplado a um microcomputador empregando-se o programa AxioVision 4.0. Foram fotografados 10 campos de cada corte histológico (cada corte histológico

representava um animal) em objetiva de 40× e as células imunomarcadas foram contadas utilizando o programa ImageJ (Miranda et al., 2008; Drury et al., 2011). Posteriormente, foi calculada a área de cada imagem (0,03536412 mm²) e a média das células imunomarcadas de cada corte foi dividida pela área para determinação da densidade de células imunomarcadas, de acordo com a fórmula:

$$\text{Densidade de células} = \frac{\text{Nº de células marcadas}}{\text{Área total de cada imagem fotografada}}$$

3.5.2. Imunomarcagem para Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS)

Cortes histológicos parafinados de pele do ponto de inoculação foram submetidos à reação de imunoistoquímica para detecção de iNOS. Para isto, as lâminas com os respectivos cortes foram incubados em xilol por 15 minutos à temperatura ambiente para a desparafinização, logo após foram hidratados incubando-se em álcool absoluto, 70%, 50% e 30% e água, seguida por recuperação antigênica em tampão citrato 10 mM, pH 6,0 a 95°C por trinta minutos em banho-maria para a recuperação antigênica. Após 20 minutos de resfriamento, as lâminas foram retiradas do tampão citrato e lavadas com água destilada e com PBS Tween 0,01% (PBST). Em seguida, foram feitas cinco incubações por quatro minutos cada com solução de peróxido de hidrogênio 0,3% para bloqueio da peroxidase endógena e três lavagens de três minutos cada, com PBST. Para bloqueio de ligações

inespecíficas, foi realizada uma incubação com leite desnatado (Molico Nestlè®) 10% por vinte minutos a 37°C. Posteriormente, adicionou-se aos cortes o anticorpo policlonal anti-NOS2 (N-20) produzido em coelho (Santa Cruz) a uma diluição de 1:500 diluído em PBS com 1% de BSA com incubação de aproximadamente dezesseis horas a 4°C. Após este período, as lâminas foram lavadas três vezes por três minutos cada com PBST e em seguida os tecidos foram cobertos por anticorpo pós primário (kit Novolink – Novocastra) e incubados por quarenta minutos a 37°C. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas três vezes por três minutos cada com PBST e os cortes foram cobertos por uma solução de polímero (kit Novolink – Novocastra) e incubados por quarenta minutos a 37°C. Após esse período foram feitas três lavagens por dois minutos cada com PBS e incubação por 5 - 10 minutos à temperatura ambiente com uma solução de diaminobenzidina (DAKO). A reação foi interrompida pela adição de água destilada, sendo em seguida as lâminas lavadas com mais água destilada para retirar o excesso de DAB. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris por dois minutos à temperatura ambiente, desidratadas e em seguida montadas com lamínulas utilizando-se Permount (Sigma). Como controle positivo da reação foi utilizado pele de camundongo infectado com *Leishmania spp.* Cada lâmina possuía dois cortes histológicos, sendo um utilizado como controle negativo, sem a adição do anticorpo primário.

A análise da densidade das células imunomarcadas foi realizada conforme o item 3.5.1.

3.6. Avaliação da imunidade celular no linfonodo de drenagem do ponto de inoculação de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na pele dos camundongos BALB/c

3.6.1. Caracterização de populações de células dendríticas

Camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram eutanasiados e seus linfonodos poplíteos de drenagem foram macerados. As células foram quantificadas com o auxílio de azul de Trypan e as concentrações ajustadas para 10^7 células/mL. Em seguida foram adicionados 100 μ L da suspensão de células, em triplicata, em placa de 96 poços, fundo em formato V e lavadas com tampão de lavagem (PBS +0,5% BSA +2 mM EDTA) para marcação com os anticorpos de superfície. A marcação foi realizada em volume final de 50 μ L de tampão de lavagem com os anticorpos indicados na Tabela 2, de acordo com Ritter e Osterloh (2007). A placa foi incubada por 30 minutos, a 4°C na ausência de luz. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem e ressuspensas em 100 μ L de paraformaldeído 1% (PFA 1%) para posterior aquisição no citômetro.

Tabela 2: Descrição dos anticorpos monoclonais utilizados para análise da população e ativação de células dendríticas

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Tipo de marcação
CD11c	APC	N418	Superfície
CD11b	Pe	M1/70	Superfície
CD8 α	Alexa Fluor 700	53-6.7	Superfície
MHCII	FITC	14-4-4S	Superfície
CD205	PerCp e-Fluor 710	205yekta	Superfície
CD80	Pe-Cy5	16-10A1	Superfície
CD86	Pe	GL1	Superfície

As amostras foram adquiridas em um citômetro FACSFortessa utilizando o software FACSDiva (BD Bioscience – EUA). Para cada amostra, 50.000 eventos foram adquiridos. Para ajuste das voltagens, *beads* foram monomarcadas com cada um dos anticorpos utilizados. Os dados foram analisados utilizando-se o programa FlowJo (TreeStar – EUA). A estratégia de definição de janela para análise utilizada está ilustrada na Figura 4.

Figura 4: Estratégia de definição de janela de identificação (*gate*) para análise de subpopulações de células dendríticas (A) e ativação das células dendríticas (B). Para a avaliação da população de células dendríticas foi feita uma janela de aquisição na população de linfócitos totais e células mononucleares, seguida do quadrante para a determinação das células $CD11c^{+}MHCII^{+}$, a partir desta janela as células foram separadas pela expressão ou não de $CD8\alpha$, a partir daí duas outras janelas foram feitas para caracterizar as subpopulações de dDCs e LCs, (A). Para a avaliação das células dendríticas ativadas, foi feita uma janela de aquisição na população de linfócitos totais e células mononucleares, seguida do quadrante para determinação das células $CD11c^{+}MHCII^{+}$, a partir daí duas outras janelas foram feitas para caracterizar as moléculas de ativação de DCs pelos marcadores CD80 e CD86.

3.6.2. Caracterização da população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de citocinas através da citometria de fluxo

As células do linfonodo de drenagem foram quantificadas com o auxílio de azul de trypan e suas concentrações ajustadas para 10^7 células/ μ L. Em seguida foram adicionados 100 μ L da suspensão de células, em triplicata, em placa de 96 poços, fundo em formato arredondado. As células foram estimuladas com antígeno total homólogo em concentrações pré determinadas (Tabela 3) pela cinética de produção de citocinas (anexo B). Como controle de funcionamento do ensaio foi utilizado o mitógeno inespecífico, Concanavalina A, e para a determinação da produção basal de citocinas por estas células utilizou-se apenas meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Gibco – EUA), 10 μ g/mL de gentamicina e 100 UI/mL de penicilina. As células foram incubadas por 1 hora a 37°C e 5% CO₂ e então adicionado solução de Brefeldina A 0,5 μ g/ poço, a qual inibe o transporte proteico, levando ao acúmulo das citocinas no complexo de Golgi e retículo endoplasmático. A placa foi então novamente incubada a 37°C e 5% CO₂ por mais 15 horas para determinação da produção de IFN- γ e IL-10 e 23 horas para a determinação da produção de IL-4, sendo estes tempos pré determinados em experimento de cinética de tempo.

Tabela 3: Concentrações dos antígenos totais utilizados para estímulo da cultura de células de linfonodo de drenagem

Espécie	IL-4	IL-10	IFN-γ
<i>L.(L.) amazonensis</i>	150 μ g/mL	150 μ g/mL	150 μ g/mL
<i>L.(V.) braziliensis</i>	100 μ g/mL	75 μ g/mL	200 μ g/mL

Após a incubação, as triplicatas foram transferidas para placas de 96 poços, fundo em formato V e lavadas com tampão de lavagem para marcação inicial com os anticorpos de superfície. A marcação foi realizada em volume final de 50 μ L de tampão de lavagem com os anticorpos de superfície indicados na Tabela 4. A placa foi incubada por 30 minutos a 4°C na ausência de luz. Posteriormente, os poços foram lavados duas vezes com 150 μ L de tampão de lavagem, sendo em seguida adicionados 100 μ L de Cytofix/Cytoperm (B&D) que fixa a marcação realizada anteriormente e permeabiliza a membrana para posterior marcação intracelular. A placa foi então incubada por quinze minutos a 4°C na ausência de luz. Em seguida, os poços foram lavados com 150 μ L da solução de lavagem comercial (contendo soro fetal bovino e saponina) diluído 2 vezes em água destilada. Os anticorpos para a marcação intracelular foram diluídos no mesmo tampão e adicionados 50 μ L desta solução nos poços (Tabela 4). A placa foi incubada por trinta minutos a 4°C na ausência de luz. Finalmente após a incubação, os poços foram lavados duas vezes com solução de lavagem e

as células ressuspensas em 100 μ L de PFA 1% para posterior aquisição no citômetro.

Tabela 4: Descrição dos anticorpos monoclonais utilizados para determinação da frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de citocinas

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Tipo de marcação
CD3 ϵ	FITC	145-2C11	Superfície
CD4	PerCP Cy 5.5	RM4-5	Superfície
CD8 α	Alexa Fluor 700	53-6.7	Superfície
IL-4	APC	11B11	Intracelular
IL-10	APC	JES5-16E3	Intracelular
IFN- γ	PE	XMG1.2	Intracelular
LiveDead*	PE Texas Red		Superfície

* Marcação para distinção de células viáveis.

As amostras foram adquiridas e analisadas conforme o item 3.6.1. A estratégia de análise de janela (*gate*) para a determinação da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-4, IL-10 e IFN- γ está ilustrada na Figura 5.

Figura 5: Estratégia de definição da janela de identificação (*gate*) para a análise da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de citocinas. Primeiramente foi feita uma janela de aquisição na região das células que passam apenas uma vez em frente ao laser, denominadas *singlets*, determinada pelo tamanho em relação à altura (FSC-H) e em relação à área (FSC-A). Em seguida foi feita uma janela de aquisição na região dos linfócitos totais, seguida de uma janela de aquisição na população de células vivas denominada “LiveDead”. Posteriormente foi feita uma janela de aquisição na região das células CD3⁺, seguida de duas janelas de aquisição para caracterizar as populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e a partir de cada uma destas populações foi feita uma janela de aquisição para a determinação das células produtoras de citocinas, no caso exemplificado acima, IL-4.

3.6.3. Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células totais do linfonodo por ELISA

Os linfonodos poplíteos dos diferentes grupos experimentais foram macerados e lavados em meio RPMI suplementado com 10% de SFB inativado pelo calor, 10 µg/mL de gentamicina e 1000 UI de ampicilina. Em seguida as células foram contadas com o auxílio de azul de Trypan e suas concentrações ajustadas para 10^5 células/poço e distribuídas em placas de 96 poços. Estas células foram então estimuladas com antígeno total de formas promastigotas (100 µg/mL), mitógeno inespecífico (Concanavalina A 2,5 µg/mL) como controle positivo e sem estímulo como controle negativo do experimento. As placas contendo as células com ou sem estímulos foram acondicionadas em incubadora umidificada a 37°C, 5% CO₂ por 48 horas, quando então, as placas foram centrifugadas a 1000 rpm, por 10 minutos a 4°C para a coleta do sobrenadante e dosagem de citocinas.

As citocinas foram dosadas de acordo com o método descrito pelo fabricante (B&D). Anticorpos monoclonais de captura anti-IL-4 (1:250) anti-IL-10 (1:250) e anti-IFN-γ (1:250) foram adsorvidos em placas de ELISA por dezoito horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução de PBST e após este passo foi adicionada uma solução de bloqueio das ligações inespecíficas, constituído por PBS contendo 10% de soro fetal bovino, incubando-se uma hora à temperatura ambiente (TA). Após este período três lavagens com PBST foram realizadas, seguida da adição do sobrenadante de cultura de células estimuladas ou não, sendo este material

incubado por duas horas à TA. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBST e então adicionados os anticorpos de detecção biotinilados, anti IL-4 (1:250), anti-IL-10 (1:250) e anti-IFN- γ (1:250) por uma hora à TA. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBST, seguidas da incubação com estreptoavidina-peroxidase por uma hora à TA. Após seis lavagens adicionou-se o TMB (B&D). A reação foi desenvolvida por aproximadamente quinze minutos em câmara escura, adicionando-se em seguida 50 μ L de H₂SO₄ 2N para a finalização da reação. As placas foram lidas a 450 nm em leitor de ELISA (Costar). A concentração de cada citocina foi estimada com base em uma curva padrão construída com citocinas recombinantes.

3.6.4. Quantificação de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de células totais do linfonodo

A concentração de óxido nítrico foi determinada em sobrenadantes de cultura de células dos linfonodos poplíteos dos camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e animais controle estimuladas com antígeno específico ou não estimuladas. Esta determinação foi realizada com kit comercial (Dinâmica) de acordo com o método descrito por Green et al. (1990). Para esta análise cerca de 100 μ L dos sobrenadantes de cultura foram incubados com igual volume de reagente de Griess, composto por 1% de sulfonilamida, 0,1% de dihidrocloreto de naftilenodiamina e 2,5% de ácido orto-fosfórico, durante 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, a placa foi lida em leitor de ELISA utilizando o comprimento de

onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em concentração de nitratos, com base em uma curva padrão produzida em concentrações conhecidas de nitrato de sódio (Sigma) dissolvido em meio de cultura, variando de 3 a 100 μ M de NaNO₃.

3.6.5. Análise da população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados e de memória

Para determinar a frequência da população dos linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ ativados e de memória foram utilizados os anticorpos anti-CD45RB⁺ e anti-CD62L⁺. Os procedimentos para a marcação, aquisição e análise foram realizados conforme o item 3.6.1. A Tabela 5 indica os anticorpos utilizados para a realização das marcações. A estratégia de janela (*gate*) utilizada para a análise está ilustrada na Figura 6.

Tabela 5: Descrição dos anticorpos monoclonais utilizados para determinação da frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados e de memória

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Tipo de marcação
CD3ε	PerCP Cy 5.5	145-2C11	Superfície
CD4	APC	RM4-5	Superfície
CD8α	Alexa Fluor 700	53-6.7	Superfície
CD45RB	Pe	16A	Superfície
CD62L	FITC	MEL14	Superfície

Figura 6: Estratégia de definição de janelas (gate) para a análise da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados e de memória. Inicialmente foi feita uma janela de aquisição na região das células que passam apenas uma vez em frente ao laser, denominadas *singlets*, determinada pelo tamanho em relação à altura (FSC-H) e em relação à área (FSC-A). Em seguida foi feita uma janela de aquisição na região dos linfócitos totais, seguida da janela de aquisição na região das células CD3⁺. Posteriormente foi feita uma janela de aquisição na região das células CD4⁺ seguida de duas janelas de aquisição pela diferença de intensidade de fluorescência na região das células CD62L⁺, a partir daí são feitas duas janelas de aquisição através da intensidade de fluorescência das células CD45RB⁺ onde é possível determinar as populações de células T ativadas (CD3⁺CD4⁺CD62L^{low}CD45RB^{high}) e de memória (CD3⁺CD4⁺CD62L^{low}CD45RB^{low}). A mesma estratégia foi utilizada para a determinação dos linfócitos T CD8 ativados e de memória.

3.6.6. Análise da população de células T regulatórias

Para a marcação das células Treg foi utilizado um kit comercial (eBioscience), empregado de acordo com as recomendações do fabricante. Foi adicionada suspensão celular contendo 10⁶ células/poço em triplicata em placa de 96 poços, fundo em formato V, lavando-se com tampão de solução

salina comercial fornecido pelo fabricante, contendo soro fetal bovino (TSS). A marcação foi realizada em volume final de 100 µL de TSS com os anticorpos de superfície anti-CD4 (FITC) e anti-CD25 (APC). A placa foi incubada por trinta minutos, a 4°C na ausência de luz. Após lavagem com TSS, as células foram ressuspensas em 100 µL de solução de fixação e permeabilização (1 parte da solução concentrada de fixação e permeabilização em 3 partes da solução diluente de fixação e permeabilização) e incubadas por trinta minutos a 4°C na ausência de luz. Em seguida foram feitas duas lavagens com TSS e adicionado o anticorpo anti-CD16/32, utilizado como bloqueio, diluído em 100 µL de tampão de permeabilização diluído 1 vez em água destilada e incubado por quinze minutos a 4°C na ausência de luz. Posteriormente foi adicionado aos poços FOXP3 FJK-16s (PE), incubando-se por mais trinta minutos a 4°C na ausência de luz. Finalmente após esta incubação os poços foram lavados duas vezes com TSS e ressuspensos em 100 µL de PFA 1% para posterior aquisição no citômetro. As amostras foram adquiridas e a análise foi realizada conforme descrito no item 3.6.1. A estratégia de análise de janela (*gate*) para a determinação da população de células Treg está ilustrada na Figura 7.

Figura 7: Estratégia de definição de janelas (*gate*) para a determinação da população de células Treg induzidas e Treg naturais. Primeiramente foi feita uma janela de aquisição na região das células que passam apenas uma vez em frente ao laser, denominadas *singlets*, determinada pelo tamanho em relação a altura (FSC-H) e em relação à área (FSC-A). Em seguida foi feita uma janela de aquisição na região dos linfócitos totais. Posteriormente foi feito um quadrante em relação às células CD4⁺ e CD25⁺, seguido de duas novas janelas de aquisição para a determinação da expressão de FOXP3 por estas populações celulares para determinar as populações de células Treg induzidas e Treg naturais.

3.7. *Análise Estatística*

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos experimentais, considerando as diferentes espécies e o tempo de evolução da infecção com o controle.

A análise não paramétrica de correlação de Spearman foi utilizada para verificar a existência de correlação entre as diferentes populações celulares tanto na pele como no linfonodo de drenagem, assim como suas correlações com a produção de citocinas.

Para a análise dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism, sendo que valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

RESULTADOS

---

4. Resultados

4.1. Evolução da Infecção

A evolução do tamanho da lesão foi distinta com as espécies estudadas, sendo observada diferença ($p < 0,05$) a partir da 4ª semana PI entre *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Na infecção causada por *L. (L.) amazonensis* a lesão cutânea evoluiu de forma progressiva ao longo do período estudado, sendo maior ($p < 0,05$) que o grupo controle a partir da 3ª semana PI. Por outro lado, a infecção por *L. (V.) braziliensis* evoluiu discretamente, com leve aumento da lesão entre a 6ª e 7ª semanas, tendendo à regressão na semana seguinte; embora sutil, o tamanho da lesão foi maior ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle a partir da 4ª semana PI (Figura 8).

Figura 8: Evolução do tamanho das lesões cutâneas em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. * indica que o tamanho da lesão diferiu ($p < 0,05$) do grupo controle; § indica que o tamanho da lesão dos camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) amazonensis* diferiu ($p < 0,05$) da infecção com *L. (V.) braziliensis*.

4.2. Análise Histopatológica das Lesões

Nos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* foi observado na 4ª semana um processo inflamatório moderado, caracterizado pela presença de células mononucleares parasitadas, células polimorfonucleares e em alguns casos foram observadas áreas focais de necrose (Figura 9A). Já, na 8ª semana PI foi observado um processo inflamatório intenso, com presença de numerosas células mononucleares intensamente parasitadas, presença discreta de células polimorfonucleares e áreas de necrose tecidual (Figura 9B). Por outro lado, nos camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* foi observado um processo inflamatório moderado e focal com presença de células mononucleares e polimorfonucleares com poucos parasitas na 4ª semana (Figura 9C); enquanto que na 8ª semana PI, estava presente um infiltrado inflamatório bastante discreto e focal sem parasitismo evidente. (Figura 9D). Animais controle, inoculados com PBS, não mostraram alterações histológicas na 4ª e 8ª semana PI.

Figura 9: Corte histológico de pele do ponto de inoculação no coxim plantar de camundongos BALB/c. A - infecção com *L. (L.) amazonensis* na 4^a semana PI, com a presença de um processo inflamatório moderado. B - infecção com *L. (L.) amazonensis* na 8^a semana PI, formação de um processo inflamatório intenso. C – infecção com *L. (V.) braziliensis* na 4^a semana PI com a presença de um processo inflamatório moderado e focal. D – infecção por *L. (V.) braziliensis* na 8^a semana PI, com a presença de um infiltrado discreto e focal. (Coloração HE, aumento 400×).

4.3. Análise do parasitismo e resposta imune celular no ponto de inoculação

4.3.1. Análise da carga parasitária

Na pele dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* foi observada carga parasitária de $3,05 \times 10^7$ promastigotas/mg de tecido na 4^a semana PI, a qual aumentou ($p < 0,05$) na 8^a semana PI ($1,37 \times 10^9$ promastigotas/mg de tecido). Por outro lado, na pele dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* não foi observada diferença ($p > 0,05$) na

carga parasitária ao longo da evolução da infecção ($3,44 \times 10^3$ e $53,3$ promastigotas/mg de tecido na 4ª e 8ª semana PI, respectivamente) (Figura 9). Vale ressaltar que a carga parasitária da pele foi maior ($p < 0,05$) nos camundongos com *L. (L.) amazonensis* tanto na 4ª como na 8ª semana PI comparada à dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (Figura 10).

Figura 10: Carga parasitária na pele de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies no mesmo tempo de infecção; # indica diferença ($p < 0,05$) na pele durante a evolução da infecção.

4.3.2. Detecção de Células Dendríticas

Nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* na 4ª semana PI foi observado que a densidade de células dendríticas dérmicas - CD11c⁺ ($102,96$ células/mm²) foi 5 vezes maior ($p < 0,05$) que a dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* ($20,43$ células/mm²) e 31,3 vezes maior ($p < 0,05$) que a densidade celular nos camundongos controle ($3,29$

células/mm²). Na 8ª semana PI foi observado que a densidade destas células foi 5,8 vezes maior ($p < 0,05$) à dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (120,24 células/mm²) quando comparado aos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (20,43 células/mm²) e 36,5 vezes maior ($p < 0,05$) em relação a dos camundongos controle (3,29 células/mm²) (Figura 11).

Na evolução da infecção, foi observado o perfil inverso entre as espécies estudadas, uma vez que nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* notou-se redução ($p < 0,05$) da densidade de células CD11c⁺ ao longo do período estudado enquanto que nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* observou-se o aumento ($p < 0,05$) da densidade celular (Figuras 11 e 12).

Figura 11: Densidade de células dendríticas dérmicas com perfil CD11c⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, analisadas pela reação de imunoistoquímica. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo

tempo de evolução; # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O controle foi inoculado apenas com PBS.

Figura 12: Imunoistoquímica para detecção de células dendríticas dérmicas (CD11c⁺). Pele de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na 4^a (A) e 8^a semana PI (B) e *L. (V.) braziliensis* na 4^a (C) e 8^a semana PI (D). Aumento 400×.

Em relação à densidade de células de Langerhans (CD207⁺) foi observado um perfil semelhante ao descrito para as células dendríticas dérmicas. Na 4^a semana PI os camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* apresentaram densidade de células de Langerhans (2111,89 células/mm²) 1,9 vezes maior ($p < 0,05$) que os camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (1107,03 células/mm²) e 2,1 vezes maior ($p < 0,05$) que o grupo controle (1004,03 células/mm²). No entanto, na 8^a semana PI, os camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (2240,62 células/mm²)

apresentaram densidade das células de Langerhans 2,7 vezes maior ($p < 0,05$) que os camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (824,59 células/mm²) e 2,2 vezes maior ($p < 0,05$) que o grupo controle (1004,03 células/mm²) (Figura 13 e 14).

Em relação à evolução da infecção, foi observado o perfil inverso entre as densidades celulares para as duas espécies de parasita estudadas, uma vez que a densidade de células de Langerhans nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* reduziu ($p < 0,05$) ao longo da evolução da infecção e nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* houve aumento ($p < 0,05$) da densidade destas células com o tempo de infecção (Figuras 13 e 14).

Figura 13: Densidade de células de Langerhans com perfil CD207⁺ no ponto de inoculação do camundongo BALB/c infectado com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* analisadas pela reação de imunoistoquímica. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução; # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O controle foi inoculado apenas com PBS.

Figura 14: Imunoistoquímica para a detecção de células de Langerhans (CD207⁺). Pele de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na 4^a (A) e 8^a semana PI (B) e *L. (V.) braziliensis* na 4^a (C) e 8^a semana PI (D). Aumento 400 $\times$.

4.3.3. Detecção de Linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺

A densidade dos linfócitos T CD4⁺ nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* na 4^a semana PI (603,01 células/mm²) foi 30,4 vezes maior ($p < 0,05$) que nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (19,79 células/mm²), e 17,9 vezes maior ($p < 0,05$) que o grupo controle (33,62 células/mm²). Na 8^a semana PI não houve diferenças na densidade de linfócitos T CD4⁺ entre as espécies estudadas. Na evolução da infecção foi observado o aumento ($p < 0,05$) na densidade destes linfócitos no

camundongo infectado com *L. (V.) braziliensis* (19,79 células/mm² na 4^a semana PI e 855,43 células/mm² na 8^a semana PI) (Figura 15 e 16).

Figura 15: Densidade de Linfócitos T CD4⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, analisada pela reação de imunoistoquímica. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução; # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O controle foi inoculado apenas com PBS.

Figura 16: Imunoistoquímica para a detecção de linfócitos T CD4⁺. Pele de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na 4^a (A) e 8^a semana PI (B) e *L. (V.) braziliensis* na 4^a (C) e 8^a semana PI (D). Aumento 400×.

Em relação à densidade de linfócitos T CD8⁺, na 4^a semana PI os camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (44,11 células/mm²) apresentaram densidade de células 9,3 vezes maior ($p < 0,05$) que os camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (4,71 células/mm²), e 9,3 vezes maior ($p < 0,05$) que o grupo controle (4,71 células/mm²). No entanto, na 8^a semana PI os camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (286,73 células/mm²) apresentaram densidade de linfócitos T CD8⁺ 18,4 vezes maior ($p < 0,05$) que os camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (15,55

células/mm²), e 60,8 vezes maior que o grupo controle (4,71 células/mm²) (Figura 17 e 18).

Na evolução da infecção, observou-se que nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* ocorreu a redução ($p < 0,05$) da densidade de linfócitos T CD8⁺, enquanto que nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* ocorreu o aumento ($p < 0,05$) da densidade destes linfócitos (Figura 17).

Figura 17: Densidade de Linfócitos T CD8⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* analisada pela reação de imunoistoquímica. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução; # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O controle foi inoculado apenas com PBS.

Figura 18: Imunoistoquímica para a detecção de linfócitos T CD8⁺. Pele de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na 4^a (A) e 8^a semana PI (B) e *L. (V.) braziliensis* na 4^a (C) e 8^a semana PI (D). Aumento 400 $\times$.

4.3.4. Detecção de iNOS

Os camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (1146,78 células iNOS⁺/mm²) na 4^a semana PI apresentaram densidade de células iNOS⁺ 2,7 vezes maior ($p < 0,05$) que os camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (528,28 células iNOS⁺/mm²) e 2,8 vezes maior que o grupo controle (403,00 células iNOS⁺/mm²). Na 8^a semana PI, os camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (964,36 células iNOS⁺/mm²) apresentaram densidade de células iNOS⁺ 1,6 vez maior ($p < 0,05$) que os camundongos

infectados com *L. (L.) amazonensis* (579,46 células iNOS⁺/mm²) e 2,4 vezes maior que o grupo controle (403,00 células iNOS⁺/mm²). Não houve diferença na densidade de células iNOS⁺ durante a evolução da infecção de ambos os grupos estudados (Figuras 19 e 20).

Figura 19: Densidade de células iNOS⁺ no ponto de inoculação dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* analisada pela reação de imunoistoquímica. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução. O controle foi inoculado apenas com PBS.

Figura 20: Imunoistoquímica para a detecção da expressão de iNOS. Pele de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na 4^a (A) e 8^a semana PI (B) e *L. (V.) braziliensis* na 4^a (C) e 8^a semana PI (D). Aumento 400 $\times$.

4.4. Análise do parasitismo e da resposta imune celular no linfonodo poplíteo de drenagem

4.4.1. Análise da carga parasitária

Nos linfonodos poplíteos de drenagem, os camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* apresentaram redução ($p < 0,05$) da carga parasitária ao longo da infecção ($6,27 \times 10^6$ e $2,46 \times 10^5$ promastigotas/mg de órgão na 4^a e 8^a semanas PI, respectivamente); porém a redução da carga parasitária foi mais evidente nos camundongos infectados com *L. (V.)*

braziliensis ($6,6 \times 10^4$ e $65,5$ promastigotas/mg de órgão na 4ª e 8ª semanas PI, respectivamente). A carga parasitária na infecção por *L. (L.) amazonensis* foi maior ($p < 0,05$) quando comparado à da infecção por *L. (V.) braziliensis* tanto na 4ª como na 8ª semana PI (Figura 21).

Figura 21: Carga parasitária no linfonodo poplíteo de drenagem de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies no mesmo tempo de infecção; # indica diferença ($p < 0,05$) no linfonodo durante a evolução da infecção.

4.4.2. Caracterização da população de DCs totais e ativação

Na 4ª semana PI o número absoluto das células dendríticas ($CD11c^+MHCII^+$) no linfonodo dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (4860 células) foi 4,8 vezes maior ($p < 0,05$) que o dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (1012 células). Na 8ª semana PI, o número absoluto de células dendríticas nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (7705 células) foi 3,7 vezes maior ($p < 0,05$) que os camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (2282 células).

É notável que ao longo da evolução da infecção o número absoluto destas células se manteve constante nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, enquanto nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* ocorre aumento ($p < 0,05$) da população destas células. Todos os grupos apresentaram número absoluto de células dendríticas maiores ($p < 0,05$) que o do grupo controle (304 células) (Figura 22).

Figura 22: Número absoluto de DCs no linfonodo popliteo dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução, # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O controle foi inoculado apenas com PBS.

A ativação de células dendríticas foi avaliada pela análise da expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86. Para isto, as células CD11c⁺MHCII⁺ foram selecionadas, analisando-se a expressão de CD80 e CD86.

Na 4ª semana PI, foi possível verificar que a população de células dendríticas positivas para o marcador CD80 na infecção causada por *L. (L.) amazonensis* (1294 células) foi 7,9 vezes maior ($p < 0,05$) que as dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (162 células) (Figura 23 A). As células dendríticas positivas para o marcador CD86 nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (4629 células) foi 5,8 vezes maior ($p < 0,05$) que as dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (794 células) (Figura 23 B). Na 8ª semana PI, o número absoluto de células dendríticas positivas para o marcador CD80 nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (8819 células) foi 4,4 vezes maior ($p < 0,05$) que o dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (1976 células); o número absoluto de células dendríticas positivas para o marcador CD86 nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* foi 5,7 vezes maior ($p < 0,05$) que o dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* na 8ª semana PI. Na evolução da infecção observou-se aumento de 6,8 vezes ($p < 0,05$) do número absoluto de células ativadas positivas para o marcador CD80 nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e de 12,2 vezes ($p < 0,05$) nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (Figura 23 A). No entanto, o número absoluto de células com o marcador CD86 ao longo do tempo de infecção foi reduzido ($p < 0,05$) nos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* (Figura 23 B). Todos os grupos infectados apresentaram maior ($p < 0,05$) número absoluto de células CD11c⁺MHCII⁺CD80⁺ e CD11c⁺MHCII⁺CD86⁺ em relação às mesmas populações do grupo controle (22 e 76 células, respectivamente).

Figura 23: Ativação de DC representada pelo número absoluto de células $CD11c^{+}MHCII^{+}CD80^{+}$ (A) e $CD11c^{+}MHCII^{+}CD86^{+}$ (B) em linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na 4ª e 8ª semana PI. * indica diferença (p < 0,05) em relação ao grupo controle; § indica diferença (p < 0,05) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução da infecção; # indica diferença (p < 0,05) na evolução da infecção. O grupo controle foi inoculado com PBS.

4.4.3. Caracterização das células dendríticas dérmicas e das células de Langerhans

Na 4ª semana PI, o número absoluto de LCs ($MHCII^{+}CD11c^{+}CD8\alpha^{+}CD205^{+}CD11b^{-}$) foi 5,1 vezes maior (p < 0,05) nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (31 células) que os camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (5 células). Na 8ª semana PI não houve diferença na frequência destas células entre os camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (5 células) e *L. (V.) braziliensis* (5 células). Ao longo da infecção notou-se uma redução de 5,1 vezes na frequência das LCs nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Ocorreu diferença em relação ao grupo controle (3 células) apenas na infecção com *L. (L.) amazonensis* na 4ª semana PI (Figura 24).

Figura 24: Caracterização da população de células de Langerhans no linfonodo poplíteo dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução da infecção; # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O grupo controle foi inoculado com PBS.

A população das dDCs (MHCII⁺CD11c⁺CD8^α⁻CD205⁻CD11b⁺) não apresentou diferença entre os camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (269 células) e os infectados com *L. (L.) amazonensis* (310 células) na 4ª semana PI. Na 8ª semana PI os camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (688 células) apresentaram população celular 2 vezes maior ($p < 0,05$) que a dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (334 células). Foi observado também aumento de 2,5 vezes ($p < 0,05$) nesta população celular com o tempo de evolução na infecção causada por *L. (V.) braziliensis*. A população de dDCs nos camundongos

infectados por ambas as espécies de parasitas foi maior que a do grupo controle (1 célula) (Figura 25).

Figura 25: Caracterização da população de dCDs no linfonodo poplíteo dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; \$ indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução da infecção; # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O grupo controle foi inoculado com PBS.

4.4.4. Caracterização da população de linfócitos T

A população de linfócitos T ($CD3^+$) nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* foi 1,3 vez maior ($p < 0,05$) na 4ª semana PI (10269 células) e 2 vezes maior na 8ª semana PI (15338 células) que a dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (7711 e 7495 células, respectivamente). Durante a evolução da infecção ocorreu aumento ($p < 0,05$) da população dos linfócitos T nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis*. A população destas células nos camundongos infectados foi

maior ($p < 0,05$) do que a do grupo controle (3828 células) durante todo o período estudado (Figura 26).

Figura 26: População de linfócitos T CD3⁺ em linfonodo poplíteo de drenagem de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na 4ª e 8ª semana PI. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução da infecção e # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O grupo controle foi inoculado com PBS.

A população de linfócitos T CD4⁺ nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* foi 1,6 vez maior ($p < 0,05$) na 4ª semana PI (8027 células) e 3,2 vezes maior ($p < 0,05$) 8ª semana PI (10174 células) do que a dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (5018 e 3153 células, respectivamente). A população de linfócitos T CD8⁺ foi semelhante na infecção por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* na 4ª semana PI; no entanto, na 8ª semana PI, foi 2,8 vezes maior ($p < 0,05$) na infecção por *L. (V.) braziliensis*. Durante a evolução da infecção ocorreu aumento ($p < 0,05$)

da população destas células nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* tanto de linfócitos T CD4⁺ quanto de linfócitos T CD8⁺. Apenas os camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* apresentaram aumento ($p < 0,05$) da população de linfócitos T CD4⁺ em relação ao grupo controle, enquanto que a população de linfócitos T CD8⁺ foi maior em todos os grupos infectados em relação ao grupo controle (649 células) (Figura 27).

Figura 27: População de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em linfonodo poplíteo de drenagem de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na 4ª e 8ª semana PI. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução da infecção e # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O grupo controle foi inoculado com PBS.

4.4.5. Caracterização dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de citocinas

Com o intuito de avaliar a produção de IL-4, IL-10 e IFN- γ pelas células T CD4⁺ e T CD8⁺, a suspensão de células de linfonodo de drenagem cultivadas sob estímulo específico foi marcada para os antígenos de

superfície para reconhecimento de linfócitos e posteriormente permeabilizadas para a marcação intracelular de citocinas.

Na 4ª semana PI os camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (168 células) apresentaram maior população ($p < 0,05$) de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 (CD3⁺CD4⁺IL-4⁺) em relação aos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (56 células), no entanto na 8ª semana PI os camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (127 células) apresentaram maior ($p < 0,05$) população de células CD3⁺CD4⁺IL-4⁺ em relação aos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (22 células). Ao longo da infecção ocorreu redução ($p < 0,05$) do número absoluto destes linfócitos nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, enquanto que nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* ocorreu aumento ($p < 0,05$). A população de linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-4 (CD3⁺CD8⁺IL-4⁺) nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (17 células) foi maior ($p < 0,05$) que a dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (nenhuma célula) tanto na 4ª quanto na 8ª semana PI. Ao longo da evolução da infecção ocorre um aumento ($p < 0,05$) destas células tanto nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* como nos infectados com *L. (V.) braziliensis* (Figura 28).

Figura 28: População de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-4 em suspensão celular de linfonodo poplíteo de drenagem de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na 4ª e 8ª semana PI, cultivado sob estímulo homólogo. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução da infecção. ND = não detectado. O grupo controle foi inoculado com PBS.

A população de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-10 (CD3⁺CD4⁺IL-10⁺) foi maior ($p < 0,05$) tanto na 4ª quanto na 8ª semana PI nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (499 e 60 células, respectivamente) em relação aos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (151 e 20 células, respectivamente). Entretanto, o número de linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-10 (CD3⁺CD8⁺IL-10⁺) foi maior ($p < 0,05$) nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tanto na 4ª quanto na 8ª semana PI (119 e 29 células, respectivamente) em relação aos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (88 e 10 células, respectivamente). Ao longo da infecção ocorreu uma redução no número

absoluto destes linfócitos produtores de IL-10 tanto CD4⁺ quanto CD8⁺ para ambas as espécies de parasitas (Figura 29).

Figura 29: População de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-10 em suspensão celular de linfonodo poplíteo de drenagem de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na 4ª e 8ª semana PI, cultivado sob estímulo homólogo. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução da infecção. ND = não detectado. O grupo controle foi inoculado com PBS.

A população de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ (CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺) e linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ (CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺) foi detectada apenas nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* tanto na 4ª semana PI (107 e 20 células, respectivamente) quanto na 8ª semana PI (39 e 38 células respectivamente). Ao longo da infecção o número de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ se manteve constante, enquanto o número de linfócitos T CD8⁺ aumentou ($p < 0,05$) (Figura 30).

Figura 30: População de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ em suspensão celular de linfonodo poplíteo de drenagem de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na 4ª e 8ª semana PI, cultivado sob estímulo homólogo. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução da infecção; # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O grupo controle foi inoculado com PBS.

4.4.6. Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células do linfonodo poplíteo

O perfil da produção de citocinas foi avaliado pela produção de IL-4, IL-10 e IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de um *pool* de células de linfonodos poplíteo de drenagem, estimuladas com antígeno homólogo, dos grupos experimentais infectados com ambas as espécies de parasitas, sendo essas citocinas quantificadas por ELISA de captura.

Na 4ª semana PI, a produção de IL-4 foi 9,6 vezes maior ($p < 0,05$) pelos linfócitos isolados dos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* (139,61 pg/mL) quando comparada à *L. (V.) braziliensis* (14,45 pg/mL). Ao

longo da infecção ocorreu redução da produção de IL-4 pelos linfócitos dos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* (15,69 pg/mL), que foi 8,8 vezes menor ($p < 0,05$) na 8ª semana PI em relação à 4ª semana PI (139,61 pg/mL). Os sobrenadantes das culturas das células dos linfonodos de drenagem dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* apresentaram níveis de detecção abaixo da curva padrão na 8ª semana PI, assim como os do grupo controle em todos os períodos experimentais analisados (Figura 31).

Figura 31: Produção de IL-4 quantificada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, estimuladas com antígeno homólogo § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução; # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção.

O perfil da produção de IL-10 foi semelhante ao da produção de IL-4, no entanto foi 21,2 vezes maior ($p < 0,05$) a produção desta citocina no sobrenadante dos linfonodos com *L. (L.) amazonensis* (374,64 pg/mL) do

que no sobrenadante dos linfócitos com a *L. (V.) braziliensis* (17,62 pg/mL) na 4ª semana PI. Ao longo da infecção, as células dos linfonodos dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* sob o estímulo de antígeno total homólogo foi 14,4 vezes menor na 8ª semana PI (26,03 pg/mL) que na 4ª semana PI (374,64 pg/mL). Os sobrenadantes das culturas das células dos linfonodos de drenagem dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* apresentaram níveis de detecção abaixo da curva padrão na 8ª semana PI, assim como o grupo controle em todos os períodos experimentais (Figura 32).

Figura 32: Produção de IL-10 quantificada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, estimuladas com antígeno homólogo § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução; # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção.

A produção de IFN- γ apresentou um perfil oposto ao da produção de IL-4 e IL-10. Os valores de detecção de IFN- γ foi 3,5 vezes (174,41 pg/mL)

maior ($p < 0,05$) nos sobrenadantes das células do linfonodo de drenagem dos animais infectados com *L. (V.) braziliensis* do que nos sobrenadantes das células de linfonodo dos animais infectados com a *L. (L.) amazonensis* (50,83 pg/mL) na 4ª semana PI, e 15 vezes maior na 8ª semana PI (454,13 e 30,16 pg/mL, respectivamente) (Figura 33). Ao longo do tempo de evolução da infecção, observamos aumento ($p < 0,05$) de duas vezes na produção de IFN- γ pelas células dos linfonodos de drenagem dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis*, já nas células dos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* foi observada redução ($p < 0,05$) de 1,7 vezes nos níveis desta citocina (Figura 33). Os sobrenadantes das culturas das células dos linfonodos de drenagem dos animais controle apresentaram níveis de detecção abaixo da curva padrão.

Figura 33: Produção de IFN- γ quantificada pelo ensaio de ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas de células dos linfonodos poplíteos de drenagem dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, estimuladas com antígeno homólogo. § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução; # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção.

4.4.7. Avaliação dos níveis de nitrato no sobrenadante de cultura das células do linfonodo poplíteo

Ao quantificar os níveis de nitrato no sobrenadante de cultura das células extraídas dos linfonodos estimuladas com antígeno homólogo dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, foi possível observar que tanto na 4ª semana quanto na 8ª semana PI no sobrenadante de cultura dos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (67,73 nM/mL e 58,03 nM/mL, respectivamente) apresentaram maiores ($p < 0,05$) níveis de nitrato quando comparado tanto aos sobrenadantes de cultura dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (43,48 nM/mL e 37,41 nM/mL, respectivamente), assim como dos animais controle (25,39 nM/mL). Ao longo da infecção, foi observado que tanto na infecção por *L. (L.) amazonensis* quanto na infecção por *L. (V.) braziliensis* houve uma redução ($p < 0,05$) dos níveis de nitrato no sobrenadante de cultura de células do linfonodo (Figura 34).

Figura 34: Níveis de nitrato em sobrenadantes de cultura de células extraídas dos linfonodos popliteos dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* estimuladas com antígeno homólogo. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução; # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O controle foi inoculado apenas com PBS.

4.4.8. Avaliação da ativação e memória dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

O número de linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺CD62L^{low}CD45RB^{high}) e T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺CD62L^{low}CD45RB^{high}) ativados foi maior ($p < 0,05$) nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (5061 e 1329 células, respectivamente) do que nos infectados com *L. (L.) amazonensis* (3148 e 683 células, respectivamente) na 4ª semana PI (Figura 35-A e B). Entretanto, na 8ª semana PI embora o número de linfócitos T CD4⁺ ativados tenha se mostrado maior ($p < 0,05$) nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (3013 células) em relação aos infectados com *L. (L.) amazonensis* (1551 células) (Figura 34-A), o número de linfócitos T CD8⁺ ativados foi menor ($p < 0,05$) nos camundongos infectados com *L. (V.)*

braziliensis (845 células) quando comparado aos camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* (1318 células) (Figura 35-B). Ao longo da infecção foi notada redução ($p < 0,05$) no número de linfócitos T CD4⁺ ativados tanto nos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* como por *L. (V.) braziliensis* (Figura 35-A). No entanto, ocorreu aumento ($p < 0,05$) do número de linfócitos T CD8⁺ ativados ao longo da infecção por *L. (L.) amazonensis* e redução ($p < 0,05$) nos animais infectados por *L. (V.) braziliensis* (Figura 35-B). Os animais infectados mostraram número maior de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados do que o grupo controle (23 e 8 células, respectivamente).

Figura 35: População de linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺CD62L^{low}CD45RB^{high}) (A) e T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺CD62L^{low}CD45RB^{high}) (B) ativados em linfonodo poplíteo de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na 4ª e 8ª semana PI. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; \$ indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies no mesmo período de infecção e # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O grupo controle foi inoculado com PBS.

Em relação aos linfócitos T CD4⁺ de memória (CD3⁺CD4⁺CD62L^{low}CD45RB^{low}), os camundongos infectados com *L. (V.)*

braziliensis (639 células) e *L. (L.) amazonensis* (375 células) mostraram número semelhante ($p > 0,05$) desta população celular na 4ª semana PI (Figura 36-A). Entretanto, número maior ($P < 0,05$) de linfócitos de memória foi observado na infecção por *L. (V.) braziliensis* (995 células) em relação à infecção por *L. (L.) amazonensis* (599 células) na 8ª semana PI. Ao longo da infecção, foi observado aumento ($p < 0,05$) do número de células de memória na infecção por *L. (V.) braziliensis*.

Em relação ao número de linfócitos T CD8⁺ de memória (CD3⁺CD8⁺CD62L^{low}CD45RB^{low}), foi observado aumento do número destas células somente na 8ª semana PI nos animais infectados com ambas as espécies do parasita, *L. (L.) amazonensis* (32 células) e *L. (V.) braziliensis* (31 células) em relação ao controle (8 células) (Figura 36-B).

Figura 36: População de linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺CD62L^{low}CD45RB^{low}) (A) e T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺CD62L^{low}CD45RB^{low}) (B) de memória em linfonodo poplíteo de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* na 4ª e 8ª semana PI. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; \$ indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies no mesmo período de infecção e # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O grupo controle foi inoculado com PBS.

4.4.9. Avaliação da população de células T regulatórias

O número das células T regulatórias naturais ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$) foi 2,4 vezes maior ($p < 0,05$) nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (2525 células) comparando ao dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (1046 células) na 4ª semana PI; em contraste, na 8ª semana PI o número destas células foi maior na infecção por *L. (L.) amazonensis* (1209 células) do que o dos animais infectados com *L. (V.) braziliensis* (1139 células). Na evolução da infecção nota-se redução ($p < 0,05$) desta população celular nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis*, enquanto que nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* nota-se aumento ($p < 0,05$). Os animais infectados apresentaram número maior ($p < 0,05$) de células T regulatórias naturais em relação ao grupo controle (Figura 37).

Figura 37: População de células nTreg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) em linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* na 4ª e 8ª semana PI. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies com o mesmo tempo de evolução da infecção e # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção.

A população de células Treg induzidas (CD4⁺FOXP3⁺) nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (684 células) foi 4,3 vezes maior ($p < 0,05$) do que a dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (158 células) e 5,2 vezes maior que a do grupo controle (131 células) na 4ª semana PI. No entanto, na 8ª semana PI o número destas células foi menor ($p < 0,05$) nos animais infectados com *L. (V.) braziliensis* (94 células) em comparação aos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (159 células), inclusive em relação ao controle. Ao longo da evolução da infecção ocorreu diminuição ($p < 0,05$) das células iTreg somente nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* (Figura 38).

Figura 38: População de células iTreg (CD4⁺FOXP3⁺) em linfonodos poplíteos de camundongos BALB/c infectados no coxim plantar com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* na 4ª e 8ª semana PI. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; § indica diferença ($p < 0,05$) entre as espécies no mesmo período de infecção e # indica diferença ($p < 0,05$) na evolução da infecção. O grupo controle foi inoculado com PBS.

4.5. Análise de Correlação

Os resultados da análise de correlação de Spearman, que mostraram significância estatística estão descritos nos anexos C e D.

DISCUSSÃO

---

5. Discussão

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) possui um amplo espectro de manifestações clínicas e imunopatológicas representado pela forma cutânea localizada (LCL), alocada no centro do espectro e caracterizada por uma resposta de células T moderada, a forma mucocutânea (LMC) representando o polo de hipereatividade e caracterizada por uma proeminente resposta imune celular do tipo Th1 e a forma anérgica difusa (ADCL), polo de hipossensibilidade com marcada resposta imune celular do tipo Th2. Entre o centro do espectro clínico (LCL) e as formas polares, se observa a forma cutânea disseminada borderline (LCDB), caracterizada por uma inibição parcial da resposta de células T, com tendência de maior resposta Th1 em relação à Th2 (Silveira et al., 2004).

Recentemente, tem sido discutido o papel das espécies de parasita do gênero *Leishmania* na determinação da forma clínica e na modulação da imunidade do hospedeiro na LTA. Silveira et al. (2009) mostraram uma dicotomia da resposta imune celular na LTA humana causada por *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Enquanto a infecção por *L. (V.) braziliensis* mostrou uma clara tendência de levar a forma cutânea localizada para a forma mucocutânea no polo de hipereatividade, a *L. (L.) amazonensis* mostrou uma tendência oposta, levando a infecção cutânea localizada para a forma anérgica difusa no polo de hipossensibilidade.

Neste sentido, com o objetivo de aprofundar os conhecimentos em relação ao papel do parasita na determinação da resposta clínica e imunológica do hospedeiro vertebrado, no presente estudo camundongos BALB/c, foram inoculados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* e a evolução da infecção assim como a modulação de células e fatores da imunidade foram avaliados no ponto de inoculação e no linfonodo de drenagem desses animais.

A avaliação da evolução clínica dos animais mostrou que os inoculados com *L. (L.) amazonensis* apresentaram lesão cutânea maior e de evolução progressiva, enquanto que os inoculados com *L. (V.) braziliensis* mostraram lesão pequena e discreta entre a sexta e sétima semana PI com posterior regressão. O parasitismo da pele mostrou correlação positiva com o tamanho da lesão ($p = 0,002$), ou seja aumentou com o tempo de evolução na pele dos animais inoculados com *L. (L.) amazonensis* e foi maior do que o dos animais inoculados com *L. (V.) braziliensis* cujo parasitismo diminuiu com o tempo de infecção. No que tange aos aspectos histológicos das lesões da pele, os animais inoculados com *L. (L.) amazonensis* apresentaram um infiltrado inflamatório intenso, formado por macrófagos intensamente parasitados e linfócitos, enquanto os infectados com *L. (V.) braziliensis* mostraram um infiltrado linfohistiocitário discreto na derme que regrediu quase completamente com o tempo de evolução da infecção. Estes resultados mostram uma dicotomia da resposta do hospedeiro frente à infecção por parasitas de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, pois

enquanto a infecção por *L. (L.) amazonensis* levou a um padrão claro de suscetibilidade do hospedeiro, a infecção por *L. (V.) braziliensis* levou a um padrão de resistência à infecção, como já sugerido no passado por alguns autores (Neal; Hale, 1983; Andrade et al., 1984; Childs et al., 1984).

Na fase inicial da infecção por *Leishmania*, além dos macrófagos, diferentes subtipos de DCs incluindo as LCs e dDCs podem desempenhar a função de células fagocíticas e apresentadoras de antígenos. Entretanto, foi demonstrado na infecção experimental que as dDCs e não as LCs são responsáveis pelo transporte dos antígenos do parasita para o linfonodo de drenagem e capazes de estimular resposta imune celular Th1 eficiente (Ritter et al., 2004). A interação dos parasitas do gênero *Leishmania* com as células dendríticas é bastante complexa e envolve funções paradoxais, já que podem inibir ou estimular as células T, levando tanto à progressão quanto ao controle da infecção, respectivamente (Soong, 2008).

Considerando esses aspectos, foi demonstrado no presente trabalho que as espécies de *Leishmania* também podem representar um fator crucial na ativação das DCs (dDC e LC) e na modulação preferencial da resposta imune eficiente Th1 ou ineficiente Th2. Na 4ª semana PI, o aumento da densidade celular de ambas as populações de DCs (CD11c⁺ e CD207⁺) na pele de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* foi observado comparada à dos animais infectados com *L. (V.) braziliensis* ($p < 0,05$); no entanto, com a evolução da infecção, na 8ª semana PI um perfil inverso foi observado, com aumento significativo da densidade de DCs na

pele dos animais infectados por *L. (V.) braziliensis* em relação aos infectados com *L. (L.) amazonensis* ($p < 0,05$). Curiosamente, enquanto camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* desenvolveram uma infecção grave, com um aumento do tamanho da lesão, do parasitismo tecidual e do processo inflamatório na pele associado à destruição tecidual, os animais infectados com *L. (V.) braziliensis* apresentaram lesões mínimas na pele, parasitismo escasso, e discretas alterações histopatológicas nos sítios de infecção na pele, sugerindo que a resposta na 4ª semana PI com número elevado de ambos as subpopulações de DCs nos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* não foi capaz de controlar a infecção, apesar do número também elevado de células T CD4⁺ observado na derme destes animais. Em contraste, o aumento destas células na 8ª semana PI correlacionou-se com a regressão da infecção por *L. (V.) braziliensis*, juntamente com o aumento do número de células T CD4⁺ e CD8⁺ no sítio dérmico da infecção.

Corroborando os resultados acima, é digno de nota que experimentos mostraram que a *L. (L.) amazonensis* é capaz de inibir a completa diferenciação de DCs derivadas a partir de mononucleares de sangue periférico, diminuindo a expressão de moléculas co-estimuladoras e produção de citocinas, causando não apenas um atraso na resposta imune, mas também favorecendo o estabelecimento da infecção na célula hospedeira (Favali et al., 2007). Deve ser também ressaltado que DCs derivadas de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* secretam níveis mais baixos de IL-1 e são menos potentes na ativação de DCs

CD11c⁺ produtoras de IL-12; assim, a ativação de células T CD4⁺ é preferencialmente do fenótipo produtor de baixo nível de IFN- γ e alto de IL-10 e IL-17, sugerindo que os defeitos intrínsecos na ativação das DCs são responsáveis pelo fenótipo de suscetibilidade no hospedeiro infectado por *L. (L.) amazonensis* (Xin et al., 2007). Além disso, DCs infectadas com a forma amastigota de *L. (L.) amazonensis* mostraram-se menos maduras e potentes na apresentação de antígenos do que as células infectadas com promastigotas, avaliadas pela menor expressão de moléculas co-estimulatórias, supressão da produção de IL-12, aumento de IL-10 e eficácia reduzida na ativação de células T CD4⁺, sugerindo que *L. (L.) amazonensis*, especialmente a sua forma intracelular, mostra estratégias únicas para suprimir a ativação celular nos eventos iniciais da infecção, resultando em prejuízo das funções das DCs e na ativação de células Th1 (Xin et al., 2008).

Por outro lado, as DCs de animais infectados experimentalmente com *L. (V.) braziliensis* mostram aumento na expressão de marcadores de ativação celular e na produção de IL-12 e TNF- α . No entanto, nem todas as DCs em cultura se tornam infectadas e esta análise mostrou um aumento na expressão de marcadores de ativação e produção de IL-12 principalmente nas DCs não infectadas e que as DCs ativadas foram mais eficientes como células apresentadoras de antígenos. Em contraste, as células DCs infectadas com *L. (V.) braziliensis* suprimem a expressão de marcadores de ativação, porém sem interferência na sua capacidade de produzir TNF- α que pode contribuir para o controle local da multiplicação de parasitas (Carvalho

et al., 2008). Assim, a infecção por *L. (V.) braziliensis* desencadeia uma resposta imune inata eficiente das DCs, o que leva à ativação da resposta imune adaptativa e eliminação do parasita. Vargas-Inchaustegui et al., (2008) mostraram que DCs transportando parasita ou antígeno de *L. (V.) braziliensis* apresentam um fenótipo de ativação, apesar de a infecção por amastigotas se relacionar com uma maior infectividade e menor potencial para estimular DCs derivadas da medula óssea na produção de IL-12 em comparação à infecção por promastigotas e correlacionou a cura espontânea da infecção com a expansão de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , sugerindo a existência de mecanismos ativos para regular a inflamação local.

Nos linfonodos de drenagem observamos que a infecção por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* levou a um aumento na população de DCs totais, sendo maior nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Quando se avalia a ativação destas células pela expressão de moléculas coestimulatórias B7-1 e B7-2 (CD80 e CD86, respectivamente) se observa maior número de células expressando CD80 na 8ª semana PI e de CD86 na 4ª e 8ª semana PI nos camundongos inoculados com *L. (L.) amazonensis*. É importante salientar que a expressão de CD86 mostrou uma correlação positiva com a produção de IL-10 ($p < 0,001$) e IL-4 ($p = 0,004$) nos sobrenadantes das culturas de células de linfonodos de drenagem, assim como com células T CD4⁺ produtoras de IL-4 ($p = 0,003$), IL-10 ($p = 0,003$) e T CD8⁺ produtora de IL-10 ($p < 0,001$). Em relação à expressão de CD80,

houve correlação positiva com as células T CD8⁺ produtoras de IL-4 ($p = 0,011$). O conjunto dos dados mostrou que a ativação das DCs na infecção por *L. (L.) amazonensis* levou a uma resposta imune celular preferencialmente do tipo Th2, favorecendo o estabelecimento da infecção. Importante notar que na infecção por *L. (V.) braziliensis* houve uma correlação positiva da expressão de CD80 com a produção de IFN- γ ($p = 0,002$) nos sobrenadantes das culturas de células de linfonodo e negativa com a produção de IL-4 ($p = 0,032$) e IL-10 ($p = 0,002$).

Quando as subpopulações de DCs foram avaliadas no linfonodo de drenagem, foi possível caracterizar uma subpopulação de dDCs (MHCII⁺CD11c⁺CD8⁻CD205⁻CD11b⁺) que estava expressa em número elevado na infecção por ambas as espécies do parasita, porém muito mais na infecção por *L. (V.) braziliensis* na 8ª semana PI. Na infecção por *L. (V.) braziliensis*, essa população celular mostrou uma correlação positiva com a expressão das células T CD8⁺ ($p = 0,049$) e com os níveis de IFN- γ ($p = 0,002$) nos sobrenadantes das culturas de células do linfonodo. Esta mesma subpopulação celular mostrou uma correlação negativa com a expressão de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-10 ($p = 0,009$ e $p = 0,006$ respectivamente), assim como com os níveis de IL-10 ($p = 0,010$) e IL-4 ($p = 0,002$) nos sobrenadantes das culturas de células do linfonodo, sugerindo ser esta uma subpopulação de células dendríticas importante para ativação de uma resposta imune celular do tipo Th1 associada à proteção. Ressalta-

se que essas correlações não foram observadas na infecção por *L. (L.) amazonensis*.

Por outro lado, a população de LCs (MHCII⁺CD11c⁺CD8 α ⁺CD205⁺CD11b⁻) caracterizadas no linfonodo de drenagem mostrou-se aumentada somente na infecção por *L. (L.) amazonensis* na 4ª semana PI e guardou correlação positiva com o número de células CD4⁺ produtoras de IL-4 ($p = 0,004$) assim como com os níveis de IL-4 ($p = 0,049$) e IL-10 ($p = 0,041$) nos sobrenadantes das culturas de células do linfonodo. Além disto, esta população celular mostrou uma correlação negativa com as células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ ($p < 0,001$), sugerindo que esta subpopulação de DCs está ligada à ativação preferencial de uma resposta imune celular do tipo Th2 e, conseqüentemente, à progressão da infecção por *L. (L.) amazonensis*. Não foram observadas essas correlações na infecção por *L. (V.) braziliensis*, com exceção da correlação positiva com T CD4⁺ produtora de IFN- γ .

No que diz respeito à expressão de células T CD4⁺, um perfil distinto foi notado entre as duas espécies de *Leishmania* estudadas, já que camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* mostraram elevado número de células T CD4⁺ nas lesões de pele tanto na 4ª quanto na 8ª semana PI ($p < 0,05$), enquanto aqueles infectados com *L. (V.) braziliensis* apresentaram um número maior ($p < 0,05$) de células T CD4⁺ apenas na 8ª semana PI. Já nos linfonodos de drenagem, foi observado aumento na população de células T CD4⁺ durante a infecção por ambas as

espécies do parasita em relação ao controle; porém, o aumento do número de células T CD4⁺ foi maior na infecção por *L. (V.) braziliensis* tanto na 4^a como na 8^a semana PI. Importante salientar que apesar do número maior de células T CD4⁺ produtoras de IL-4 e IL-10 na infecção por *L. (V.) braziliensis*, células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ foram observadas somente na infecção por esta espécie de parasita. De acordo com a produção de citocinas avaliada nos sobrenadantes das culturas de células totais do linfonodo de drenagem, podemos inferir que a resposta das células T CD4⁺ na 4^a semana PI na infecção por *L. (L.) amazonensis* foi preferencialmente caracterizada por uma resposta Th2, uma vez que níveis elevados de IL-4 e IL-10 foram observados neste grupo experimental. A este respeito, é interessante notar que Qi et al., (2001) mostraram que células de linfonodos de drenagem de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* podem produzir ambos os perfis de citocinas, Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4 e IL-10), porém a magnitude da resposta Th2, associada a uma maior expressão de IL-4 e IL-10, é responsável pelo sucesso da infecção por *L. (L.) amazonensis* quando baixos níveis de IFN- γ são encontrados.

Em contraste, a resposta de células T CD4⁺ foi maior nas lesões da pele dos camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* na 8^a semana PI, enquanto nos linfonodos de drenagem foi maior tanto na 4^a como na 8^a semana PI e caracterizado por células produtoras de citocinas Th1 e Th2. Porém, esta resposta foi acompanhada principalmente de elevado nível de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de células totais do

linfonodo de drenagem, juntamente com o controle do tamanho da lesão, da carga parasitária e do processo inflamatório, mostrando assim predominância de resposta das células T CD4⁺ do tipo Th1 na infecção por essa espécie.

O IFN- γ é uma citocina importante para a ativação de macrófagos, que conduz à eliminação do parasita pela produção de metabólitos de oxigênio e nitrito. Desse modo, níveis reduzidos dessa citocina podem afetar a eficiência da eliminação do parasita e do controle da infecção (Herath et al., 2003). Deve ser salientado que nossos experimentos mostraram mesmo nível de expressão de iNOS que o grupo controle nas lesões de pele de animais infectados com *L. (L.) amazonensis*, enquanto aumento na expressão de células iNOS⁺ e níveis elevados do nitrito nos sobrenadantes da culturas de células totais de linfonodo de drenagem foram observados na infecção por *L. (V.) braziliensis* na 4^a e na 8^a semana PI. Esses dados se correlacionaram com a expansão de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e declínio do processo inflamatório local com a cura espontânea das lesões na infecção por essa espécie, como observado por Vargas-Inchaustegui et al., (2008).

É importante destacar ainda que a expressão de células T CD4⁺ ativadas foi maior na infecção por *L. (V.) braziliensis*, tanto na 4^a como na 8^a semana PI, porém esta expressão não mostrou correlação com a produção de nenhuma das citocinas quantificadas nos sobrenadantes das culturas de células totais do linfonodo de drenagem. Já na infecção por *L. (L.)*

amazonensis, foi observada correlação positiva entre a expressão de células T CD4⁺ ativadas e a produção de IL-10 ($p < 0,001$) nos sobrenadantes, assim como com as células T CD4⁺ produtoras de IL-4 ($p = 0,042$) e IL-10 ($p = 0,003$) e negativa com T CD4⁺ produtor de IFN- γ ($p = 0,003$), que no conjunto mostrou um perfil de resposta imune celular do tipo Th2.

A expressão de células T CD4⁺ de memória foi maior nos linfonodos dos animais inoculados com *L. (V.) braziliensis* na 8ª semana PI e mostrou correlação positiva com o número de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ ($p = 0,014$) e negativa com a produção de IL-4 ($p = 0,001$) e IL-10 ($p = 0,010$) nos sobrenadantes das culturas de células totais dos linfonodos de drenagem, sugerindo que estas células de memória sejam do tipo Th1 e ligadas à proteção do hospedeiro.

No que diz respeito ao papel das células T CD8⁺ na leishmaniose, deve ser ressaltado que estas células têm sido associadas com a cura e proteção da leishmaniose humana e murina e que a sua ativação é dependente de linfócitos T CD4⁺ e DCs (Melief, 2003, Ruiz; Becker, 2007). Sabe-se também que este importante papel das células T CD8⁺ no controle da infecção por *Leishmania* decorre principalmente de sua função citotóxica como também de sua produção de IFN- γ , um potente indutor de óxido nítrico, mediador que promove a destruição dos parasitas (Müller et al., 1991; Herath et al., 2003).

Deve ser salientado que a participação das células T CD8⁺ no sítio de infecção e no linfonodo de drenagem foi menor que das células T CD4⁺ durante a infecção por ambas as espécies do parasita. Os animais infectados com *L. (V.) braziliensis* apresentaram número maior de células T CD8⁺ tanto na pele quanto no linfonodo de drenagem na 8ª semana PI o que se correlacionou positivamente com maior produção de IFN- γ ($p = 0,005$) nos sobrenadantes das culturas de células totais dos linfonodos de drenagem, coincidindo com a regressão da infecção e a resolução do processo inflamatório. Ressalta-se ainda que em todo o período estudado as células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ só foram detectadas na infecção por essa espécie de parasita.

Por outro lado, as lesões de pele dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* revelaram uma menor densidade de células T CD8⁺, bem como níveis baixos de IFN- γ e baixa expressão de células iNOS⁺, levando à ativação de uma resposta imune celular preferencial do tipo Th2 e progressão da infecção. Embora em nível baixo, salienta-se que houve detecção de IFN- γ no sobrenadante de células do linfonodo nesses animais. Esta citocina, no entanto, pode promover a replicação do parasita na infecção causada por *L. (L.) amazonensis*, revelando uma capacidade surpreendente desta espécie em utilizar os mecanismos de defesa do hospedeiro para benefício próprio (Qi et al., 2004).

Interessante notar que houve aumento da expressão das células T CD8⁺ ativadas na infecção por ambas as espécies do parasita, sendo maior

na infecção por *L. (V.) braziliensis* na 4ª semana PI e na infecção por *L. (L.) amazonensis* na 8ª semana PI, porém esta expressão não foi correlacionada com a produção de nenhuma das citocinas quantificadas nos sobrenadantes das culturas de células totais do linfonodo de drenagem.

A expressão de células T CD8⁺ de memória foi maior na 8ª semana PI tanto nos linfonodos dos animais infectados com *L. (V.) braziliensis* como com *L. (L.) amazonensis*. É importante notar que na infecção por *L. (V.) braziliensis* houve correlação positiva entre estas células e os linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ ($p = 0,029$) assim como com a produção de IFN- γ ($p = 0,014$) nos sobrenadantes das culturas; e negativa com os linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-10 ($p = 0,033$) e com a produção de IL-4 ($p < 0,001$) e IL-10 ($p = 0,023$) nos sobrenadantes, sugerindo que estas células de memória são do perfil Th1 ligadas à resistência do hospedeiro.

Duas subpopulações de células Treg têm sido descritas, os linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺ naturais (nTreg), os quais se originam no timo durante a ontogênese, e as células Treg CD4⁺CD25⁻ induzíveis (iTreg), as quais se desenvolvem na periferia a partir de células T CD4⁺ convencionais (Belkaid et al., 2006). O marcador FOXP3 é o responsável pelo desenvolvimento e função das células Treg e é expresso tanto nas células nTreg assim como nas células iTreg (Fontenot et al., 2003, Hori et al., 2003, Khattri et al., 2003).

Nossos experimentos mostraram uma forte indução de células nTreg na infecção por *L. (V.) braziliensis*. Resultados semelhantes foram observados por Falcão et al., (2012) que relataram alta frequência de células

Treg tanto nas lesões de pele como em linfonodos de drenagem durante a infecção experimental por *L. (V.) braziliensis*. O presente estudo também mostrou uma correlação positiva entre o número de células nTreg e iTreg ($p = 0,030$ e $p = 0,010$, respectivamente) e a produção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de linfonodo de drenagem nos camundongos infectados por essa espécie de parasita. Observa-se também que a indução das células iTreg no linfonodo foi bem menos expressiva em relação às nTreg nesse modelo experimental.

As células Treg têm a função de mediar a supressão das células T efectoras pelo contato direto (Piccirillo; Shevach, 2001), mas também por meio de citocinas anti inflamatórias como o TGF- β e o IL-10 (Tang; Bluestone, 2008). Assim, foi demonstrado que células CD25⁺ nas lesões cutâneas de pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* eram fontes importantes de IL-10 e TGF- β , sugerindo que estas citocinas são produzidas por células Treg no local da infecção (Campanelli et al., 2006). Notar no presente estudo o número de células Treg na infecção por *L. (V.) braziliensis* diminuiu com o tempo de evolução, ou seja, da 4ª semana para 8ª semana PI. Essa queda foi relacionada à regressão das lesões cutâneas e o encontro de baixa carga parasitária tanto em pele como em linfonodo.

Por outro lado, as células nTreg nos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* foram evidenciadas no linfonodo durante todo o curso da infecção, mostrando discreto aumento ao final do estudo. Os mesmos dados foram observados por Ji et al., (2005) no linfonodo de camundongos

C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis*. Porém, no sítio da lesão cutânea essas células foram diminuindo gradualmente até a 8ª semana PI. Embora esse período correspondesse ao encontro de maior lesão cutânea e parasitismo, assim como no nosso experimento, os autores apontam o papel de tais células no refreamento da forte resposta Th2 deflagrada quando da infecção por *L. (L.) amazonensis*. Esta afirmação encontra suporte no trabalho de Belkaid et al., (2002) onde se demonstra que as células Treg CD4⁺ CD25⁺ não apenas suprimem uma dominante resposta imune celular do tipo Th1, como também suprimem uma exacerbada resposta do tipo Th2.

Resumindo, nossos resultados mostraram que a infecção por *L. (L.) amazonensis* levou à progressão da doença, caracterizada pelo aumento do tamanho da lesão e da carga parasitária tanto na pele quanto no linfonodo de drenagem, enquanto a infecção por *L. (V.) braziliensis* mostrou um discreto aumento da lesão entre a 6ª e 7ª semana PI com posterior regressão e redução na carga parasitária na pele e no linfonodo de drenagem. Foi observado também aumento do número de células dendríticas dérmicas e de Langerhans na pele de camundongos inoculados com *L. (L.) amazonensis* na 4ª semana PI, e aumento do número de células de Langerhans nos linfonodos de drenagem juntamente com uma resposta imune celular preferencial de células T CD4⁺ tanto na pele quanto no linfonodo destes animais, predominantemente do tipo Th2 com a produção aumentada de IL-10 e IL-4. Por outro lado, a infecção por *L. (V.) braziliensis* levou ao aumento da expressão de células dendríticas dérmicas e

Langerhans na pele dos camundongos somente na 8ª semana PI e aumento do número de células dendríticas dérmicas nos linfonodos de drenagem, que foi acompanhado por resposta imune celular T CD4⁺ e CD8⁺ em pele e linfonodo, caracterizando o perfil Th1 com a produção preferencial de IFN- γ e altos níveis de óxido nítrico.

Analisados em conjunto, os nossos resultados fortemente reforçam a participação de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* na modulação da resposta imune celular do hospedeiro vertebrado, principalmente em relação à interação das células dendríticas dérmicas e de Langerhans com a resposta imune celular T CD4⁺ e CD8⁺; *L. (V.) braziliensis* mostra grande habilidade de interagir com as células dendríticas para modular uma resposta preferencial T CD4⁺ do tipo Th1 com a participação importante das células T CD8⁺ e T regulatórias; em contraste a interação da *L. (L.) amazonensis* apresenta clara competência de interagir com as células dendríticas, especialmente as células de Langerhans leva a uma proeminente resposta imune celular T CD4⁺ do tipo Th2. Assim, os resultados obtidos neste estudo certamente adicionam conhecimentos importantes à complexa regulação da imunidade celular na infecção por diferentes espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose cutânea no Novo Mundo.

CONCLUSÕES

---

6. Conclusões

A lesão de pele nos camundongos inoculados com *L. (L.) amazonensis* aumentou durante a evolução da infecção enquanto que os animais inoculados com *L. (V.) braziliensis* desenvolveram uma discreta lesão que evoluiu para a cura clínica espontânea.

A carga parasitária no ponto de inoculação e no linfonodo de drenagem foi maior nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* do que nos infectados com *L. (V.) braziliensis*, tendo aumentado durante a evolução da infecção, enquanto que houve uma regressão do parasitismo na infecção por *L. (V.) braziliensis*.

A densidade de células dendríticas no ponto de inoculação, tanto Langerhans como dendríticas dérmicas foi maior na infecção por *L. (L.) amazonensis* na 4ª semana PI, porém na 8ª semana foi maior na infecção por *L. (V.) braziliensis*.

A densidade de células T CD4⁺, CD8⁺ e iNOS foi maior na infecção por *L. (V.) braziliensis* na 8ª semana PI, enquanto que na infecção por *L. (L.) amazonensis* só houve participação de células T CD4⁺ que se manteve estável durante toda a infecção.

O número de células de Langerhans no linfonodo de drenagem foi maior na 4ª semana PI nos animais inoculados com *L. (L.) amazonensis*,

enquanto que os animais inoculados com *L. (V.) braziliensis* apresentaram número maior de células dendríticas dérmicas na 8ª semana PI.

A densidade de células T CD4⁺ nos linfonodos de drenagem foi maior na infecção por *L. (V.) braziliensis* do que por *L. (L.) amazonensis* na 4ª e 8ª semana PI, enquanto que a população de células T CD8⁺ foi maior apenas na 8ª semana PI.

Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IL-4 e IL-10 foram observados nos camundongos infectados tanto com *L. (L.) amazonensis* como com *L. (V.) braziliensis*, no entanto linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ foram detectados apenas nos animais infectados com *L. (V.) braziliensis*.

O perfil de citocinas no sobrenadante de cultura de células totais de linfonodo de drenagem mostrou níveis mais elevados de IL-4 e IL-10 na infecção por *L. (L.) amazonensis*, enquanto que níveis elevados de IFN- γ assim como NO foram observados na infecção por *L. (V.) braziliensis*.

A população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados foi maior nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* em relação aos infectados com *L. (L.) amazonensis* que só mostraram número maior de células T CD8⁺ ativadas na 8ª semana PI.

O número de células T CD4⁺ de memória mostrou-se maior nos camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* na 8ª semana PI, enquanto

que as células T CD8⁺ de memória mostraram-se aumentadas tanto na infecção por *L. (V.) braziliensis* como por *L. (L.) amazonensis* na 8ª semana PI.

Houve aumento da população de células T reguladoras na infecção por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, porém ele foi maior na infecção por *L. (V.) braziliensis* na 4ª semana PI.

A infecção experimental de camundongos BALB/c por *L. (V.) braziliensis* desencadeou no hospedeiro resposta imune celular do tipo Th1, ligada à resistência, caracterizada pela maior expressão de células dendríticas dérmicas, linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, linfócitos ativados, linfócitos de memória, linfócito regulatório, assim como produção de IFN- γ e NO. Por outro lado, a infecção por *L. (L.) amazonensis* levou o hospedeiro à resposta imune celular do tipo Th2, ligada à suscetibilidade, caracterizada pela maior expressão de células de Langerhans e menor de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, linfócitos ativados, linfócitos de memória, linfócito regulatório e produção de citocinas como IL-4 e IL-10.

ANEXOS

---

7. Anexos

7.1. Anexo	A	–	Aprovação
CAPPesp			

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06/08/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0589/08, intitulado: "**AValiação ImunoHistoquímica da Interação entre a Célula de Langerhans e a Resposta Imune CD4+/CD8+ na Infecção Experimental de Camundongos BALB/C por Leishmania (Leishmania) Amazonensis e Leishmania (Viannia) Braziliensis**" apresentado pelo Departamento de Patologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, Inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Márcia Delastre Laurenti**

Pesquisador (a) Executante: **Ana Kely Carvalho**

CAPPesq, 11 de Agosto de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

7.2. Anexo B – Cinética de Produção de Citocinas

Cinética de Produção de Citocinas

Concentração de uso: 150 µg/mL

Concentração de uso: 100 µg/mL

Concentração de uso: 150 µg/mL

Concentração de uso: 75 µg/mL

Concentração de uso: 150 µg/mL

Concentração de uso: 200 µg/mL

7.3. Anexo C – Tabela: Coeficientes de correlação de Spearman, na infecção com *L. (L.) amazonensis*

Variáveis	Espécie	Coeficiente de correlação*	p-valor**
Célula MHCII ⁺ CD11c ⁺ CD86 ⁺ x IL-10 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = 0,864	p < 0,001
Célula MHCII ⁺ CD11c ⁺ CD86 ⁺ x IL-4 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = 0,716	p = 0,004
Célula MHCII ⁺ CD11c ⁺ CD86 ⁺ x T CD4 ⁺ produtor IL-4	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = 0,683	p = 0,003
Célula MHCII ⁺ CD11c ⁺ CD86 ⁺ x TCD4 ⁺ produtor IL-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = 0,890	p = 0,003
Célula MHCII ⁺ CD11c ⁺ CD86 ⁺ x T CD8 ⁺ produtor IL-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = 1,000	p < 0,001
Célula MHCII ⁺ CD11c ⁺ CD80 ⁺ x T CD8 ⁺ produtor IL-4	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = 0,829	p = 0,011
LC x Linfócito T CD4 ⁺ produtor IL-4	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = 0,799	p = 0,004
LC x IL-4 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = 0,765	p = 0,049
LC x IL-10 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = 0,815	p = 0,041
LC x Linfócito T CD4 ⁺ produtor IFN- γ	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = -0,890	p < 0,001
Linfócito T CD4 ⁺ ativado x IL-10 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = 0,938	p < 0,001
Linfócito T CD4 ⁺ ativado x Linfócito T CD4 ⁺ produtor IL-4	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = 0,726	p = 0,042
Linfócito T CD4 ⁺ ativado x Linfócito T CD4 ⁺ produtor IL-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = 0,890	p = 0,003
Linfócito T CD4 ⁺ ativado x Linfócito T CD4 ⁺ produtor IFN- γ	<i>L. (L.) amazonensis</i>	r = -0,890	p = 0,003

*A correlação é dita nula, quando $r = 0$, fraca, quando $0 < r \leq 0,3$, regular, quando $0,3 < r \leq 0,6$, forte, quando $0,6 < r \leq 0,9$, muito forte, quando $0,9 < r < 1$ e plena ou perfeita, quando $r = 1$. **p < 0,05 considerado significativo (Callegari –Jacques, 2003).

7.4. Anexo D – Tabela: Coeficientes de Correlação de Spearman, Iná infecção com *L. (V.) braziliensis*

Variáveis	Espécie	Coeficiente de correlação*	p-valor**
Célula MHCII ⁺ CD11c ⁺ CD80 ⁺ x IFN- γ (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = 0,908$	$p = 0,002$
Célula MHCII ⁺ CD11c ⁺ CD80 ⁺ x IL-4 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = -0,750$	$p = 0,032$
Célula MHCII ⁺ CD11c ⁺ CD80 ⁺ x IL-10 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = -0,906$	$p = 0,002$
dDC x Linfócito T CD8 ⁺	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = 0,780$	$p = 0,049$
dDC x IFN- γ (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = 0,790$	$p = 0,002$
dDC x Linfócito T CD4 ⁺ produtor IL-10	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = -0,890$	$p = 0,009$
dDC x Linfócito T CD8 ⁺ produtor de IL-10	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = -0,945$	$p = 0,006$
dDC x IL-10 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = -0,911$	$p = 0,010$
dDC x IL-4 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = -0,755$	$p = 0,002$
LC x Linfócito T CD4 ⁺ produtor de IFN- γ	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = 0,713$	$p = 0,047$
Linfócito T CD4 ⁺ memória x Linfócito T CD4 ⁺ produtor IFN- γ	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = 0,307$	$p = 0,014$
Linfócito T CD4 ⁺ memória x IL-4 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = -0,879$	$p = 0,001$
Linfócito T CD4 ⁺ memória x IL-10 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = -0,776$	$p = 0,010$
Linfócito T CD8 ⁺ x IFN- γ (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = 0,781$	$p = 0,005$
Linfócito T CD8 ⁺ memória x Linfócito T CD8 ⁺ produtor IFN- γ	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = 0,771$	$p = 0,029$
Linfócito T CD8 ⁺ memória x Linfócito T CD8 ⁺ produtor IL-10	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = -0,843$	$p = 0,033$
Linfócito T CD8 ⁺ memória x IFN- γ (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = 0,781$	$p = 0,014$
Linfócito T CD8 ⁺ memória x IL-10 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = -0,823$	$p = 0,023$
Linfócito T CD8 ⁺ memória x IL-4 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = -0,823$	$p < 0,001$
Célula nTreg x IL-10 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = 0,755$	$p = 0,030$
Célula iTreg x IL-10 (sobrenadante de cultura)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	$r = 0,833$	$p = 0,010$

*A correlação é dita nula, quando $r = 0$, fraca, quando $0 < r \leq 0,3$, regular, quando $0,3 < r \leq 0,6$, forte, quando $0,6 < r \leq 0,9$, muito forte, quando $0,9 < r < 1$ e plena ou perfeita, quando $r = 1$. ** $p < 0,05$ considerado significativo (Callegari –Jacques, 2003)

REFERÊNCIAS

---

8. Referências

Andrade ZA, Reed SG, Roters SB, Sadigursky M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol.* 1984; 114(1): 137-48.

Andrade HM, Reis AB, Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol.* 2006; 140(3-4):231-238.

Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol.* 2002; 3:756-63.

Bach JF. Organ-specific autoimmunity. *Immunol Today.* 1995;16:353-5.

Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(3):189-98.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 2002;420(6915):502-7.

Belkaid Y, Sun CM, Bouladoux N. Parasites and immunoregulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18(4): 406-12.

Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:875-88.

Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:551-89.

Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003 Mar;3(3):253-7.

Bogdan C, Rollinghoff M, Solbach W. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitol Today.* 1990; 6: 183-7.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol.* 2001; 2: 907-16.

Braga RR, Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. XVII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarém, Pará State. *Trans R Soc Trop Med.* 1986; 80: 145-5.

Brandão-Filho SP, Britto ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (V.) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2003; 97(3): 291-6.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009; Caderno 11: 17 – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brewig N; Kissenpfennig A; Malissen B; Veit A; Bickert T; Fleischer B; Mostböck S; Ritter U. Priming of CD8⁺ and CD4⁺ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *J. Immunol.* 2009; 182(2):774-83.

Bruch LS, Wang L, Igyarto B, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaplan DH et al., Identification of a novel population of Langerin⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 2007; 204: 3147-56.

Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MSF, Mortara RA, Brodskyn CI, Gonçalves HS, Belkaid Y, Barral-Netto M, Barral A, Silva JS. CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with Cutaneous Leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *The Journal of Infectious Diseases.* 2006; 193:1313–22.

Carvalho LP, Pearce EJ, Scott P. Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania braziliensis*: infected cells produce high

levels of TNF α , whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell response. *J. Immunol*, 2008; 181: 6473-80.

Chang, K. P. Antibody-mediated inhibition of phagocytosis in *Leishmania donovani*-human phagocyte interactions *in vitro*. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 1981; 30: 334-9.

Childs GE, Lightner LK, McKinney L, Groves MG, Price EE, Hendricks LD. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1984 Feb; 78(1): 25-34.

Clausen BE, Kel JM. Langerhans cells: critical regulators of skin immunity? *Immunol Cell Biol*. 2010; 88(4):351-60.

Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. *Leishmania*-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 1994; 62(6): 2614-8.

de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*. 2005; 73(9):5827-34.

de Souza A, Ishikawa EAY, Braga RR, Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ. *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará state, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996; 90(2):112-3.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007; 2004:1257-65.

DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun.* 1998; 66(2):827-9.

Dobrzanski KJ, Reome JB, Hollenbaugh JA, Dutton RW. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. *J Immunol* 2004; 172: 1380-90.

Dominguez M, Toraño A. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *J Exp Med.* 1999; 189:25-35.

Drury JA, Nik H, van Oppenraaij HF, Tang AW, Turner MA, Quenby S. Endometrial cell counts in recurrent miscarriage: a comparison of counting methods. *Histopathology.* 2011; 59(6): 1156-62.

Falcão CS, de Moura TR, Clarêncio J, Brodskyn C, Barral A, de Oliveira CI. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. *Int J Parasitol*. 2012; 42(8):771-80.

Falqueto A, Sessa PA. Leishmaniose tegumentar Americana In: Veronesi R, Focaccia R editores. Tratado de infectologia. São Paulo: Atheneu; 1996: 1221-33.

Farah FS, Samra SA, Nuwayri-Salti N. The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis. *Immunology*. 1975; 29: 7555-64.

Favali C, Tavares N, Clarêncio J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2007; 82(6): 1401-6.

Fontenot JD, Gavin NA, Rudensky AY. FOXP3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003; 4:330-6.

Gomes AC. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. *An. Bras Dermat*. 1992; 67 (2):55-60.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB Jr, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol*. 1990; 144: 278-83.

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

Hanau D, Gachet C, Schmitt PA, Ohlmann P, Brisson C, Fabre M, Cazenave JP. Ultrastructural similarities between epidermal Langerhans cell Birbeck Granules and the surface-connected canalicular system of EDTA-treated human blood platelets. *J. Invest. Dermatol.* 1991; 97: 756-62.

Herath S, Kropf P, Müller I. Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. *Parasite Immunol.* 2003; 25(11-12): 559-67.

Herrer A, Christensen HA. Epidemiological patterns of cutaneous leishmaniasis in Panama. III. Endemic persistence of the disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1976; 25:54-8.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299(5609): 1057-61.

Igyarto BZ, Kaplan DH. The evolving function of Langerhans cells in adaptive skin immunity. *Immunol Cell Biol.* 2010;88(4):361-5.

Ji J, Sun J, Qi H, Soong L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66(4):338-45.

Ji J Masterson J, Sun J, Soong L. CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 2005; 174(11): 7147–7153.

Kautz-Neu K, Noordegraaf M, Dinges S, Bennett CL, John D, Clausen BE, von Stebut E. Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response. *J Exp Med.* 2011; 208(5):885-91.

Khatti R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003; 4(4): 337-42.

Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil. XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of “pian-bois”. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981; 75(4): 530-6.

Lainson R. *Leishmania* e Leishmaniose, com particular referência à Região Amazônica do Brasil. *Rev. Paranaense de Medicina.* 1997; 11(1): 29-40.

Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes-Troja horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 2003; 11(5):210-4.

Laurenti MD, Orn A, Sinhorini IL, Corbett CE. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(3): 427-34.

Laurenti MD, Silveira VM, Secundino NF, Corbett CE, Pimenta PP. Saliva of laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* exacerbates *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection more potently than saliva of wild-caught *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol Int.* 2009; 58(3):220-6.

Lessa MM, Lessa HÁ, Castro TWN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007; 73(6): 843-7.

Lima GM, Vallochi AL, Silva VR, Bevilacqua EM, Kiffer MM, Abrahamsohn IA. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutâneo leishmaniasis. *Immunol Lett.* 1998; 64: 145-51.

Madeira MF, Uchôa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM, Serra CMB. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36(5): 551-5.

Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, da Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 1979; 73(2): 123-37.

Melief CJ. Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *Eur J Immunol*. 2003; 33(10): 2645-54.

Miles MA, Póvoa MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980;74(2):243-52.

Ministério da Saúde <http://www.saude.gov.br>

Miranda AA, Sarniento L, Caldas ML, Zapata C, Bello FJ. Morphology and cytochemistry of *Aedes aegyptis* cell culture (Diptera: Culicidae) and susceptibility to *Leishmania panamensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Rev Biol Trop*, 2008; 56(2): 447-58.

Mohiuddin A. An investigation into the relationships between the species (parasitic in man) of the genus *Leishmania* Ross, 1903. Part I. A study of the

cultural characters and morphology with a statistical analysis of the relative measurements of the various species. *Indian J Med Res.* 1952; 40:7-23.

Moll H. Experimental cutaneous leishmaniasis: Langerhans cells internalize *Leishmania major* and induce an antigenic-specific T cell response. *Adv Exp Med Biol.* 1993; 329:587-92.

Moll H, Flohé S, Röllinghoff M. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T-cell immune response. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25(3): 693-9.

Moraes MAP, Silveira FT. Histopatologia da forma localizada de Leishmaniose Cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med Trop.* 1994; 36(5):459-463.

Mosser DM, Edelson PJ. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasites lysis and attachment to macrophages. *J Immunol.* 1984; 132:1501-05

Müller I, Pedrazzini T, Kropf P, Louis J, Milon G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8⁺ T cells. *Int Immunol.* 1991; 3(6):587-97.

Müller I, Kropf P, Etges RJ & Louis JA. Gamma-interferon response in secondary *Leishmania major* infection. Role of CD8⁺ T cells. *Infect Immun*, 1993; 61: 3730–38.

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

Navin TR, Krug EC, Pearson RD. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infect Immun*. 1989; 57:1343-46.

Neal RA, Hale C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniases. *Parasitology*. 1983; 87(1): 7-13.

Papiernik M, Leite-de-Moraes MC, Pontoux C, Joret AM, Rocha B, Penit C, Dy M. T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infections capacity. *J Immunol*. 1997; 158:4642-53.

Passero LF, Marques C, Vale-Gato I, Corbett CE, Laurenti MD, Santos-Gomes G. Histopathology, humoral and cellular immune response in the

murine model of *Leishmania* (*Viannia*) *shawi*. *Parasitol Int.* 2010 Jun; 59(2):159-65.

Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 1981; 127: 1438-43.

Pearson RD, UYDESM IL, CAMPMAN SW. Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*. *American Journal Tropical Medicine Parasitology.* 1987; 81: 735-739.

Pearson CI, McDevitt HO. Redirecting Th1 and Th2 responses in autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999; 238:79-122.

Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol.* 2012; 40(2):186-204.

Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol.* 2001; 167(3): 1137-40.

Poulin LF, Henri S, de Bovis B, Devilard E, Kissenpfennig A, Malissen B. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med.* 2007; 204(13): 3119-31.

Qi H, Popov V, Soong L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4⁺T cells in vivo. *J. Immunol.* 2001; 167(8): 4534-42.

Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2004; 72:988-95.

Rangel EF, de Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. Natural infection of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, in an endemic area of cutaneous leishmaniasis of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984; 79(3) 395-6.

Rebelo JMC, Leonardo FS, Costa JML, Pereira YNO, Silva FS. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área endêmica de leishmaniose na região dos cerrados, Estado do Maranhão, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 1999; 15(3): 623-630.

Reiner NE, Ng W, MacMaster WR. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppress macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol.* 1987; 138:1926-32.

Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:151-77.

Ritter U, Meissner A, Scheidig C, Körner H. CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol*. 2004; 34(6): 1542-50.

Ritter U, Osterloh A. A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol*. 2007; 196(1):51-9.

Ritter U, Lechner A, Scharl K, Kiafard Z, Zwirner J, Körner H. TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of *Leishmania major* infection. *Med Microbiol Immunol*. 2008; 197(1):29-37.

Rogers M, Kropf P, Choi BS, Dillon R, Podinovskaia M, Bates P, Muller I. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sandflies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival, *PLOS Pathogens*. 2009; 5, e1000555.

Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2007; 29(12): 671-8.

Ryan L, Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the role of *Psuchodopygus wellcomei* as the vector of

Leishmania braziliensis braziliensis in the Serra dos Carajás. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987; 81(3): 353-9.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(11): 845-58.

Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med.* 1985. 161: 526-46.

Shaw JJ, Ishikawa EA, Lainson R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989; 83(6): 783-4.

Shevach EM, Dipaolo RA, Anderson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006; 212:60-73.

Silva EM, Bertho AL, Mendonça SC. Effect of in vivo depletion of CD4⁺ T cells on experimental infection of susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop.* 1994; 56(1):111-20.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Póvoa MM. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of

Amazonian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982; 76: 830-32.

Silveira FT, Lainson R, de Brito AC, Oliveira MRF, Paes MG, de Souza AAA, da Silva BM. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão, R.N.Q. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: Editora CEJUP. 1997: p.619-30.

Silveira FT. Patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana: caracterização clínica, histopatológica e imunopatológica da Leishmaniose Cutânea Disseminada, com ênfase na doença causada pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. [Tese Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2001.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004; 99(3): 239-51.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100(5): 525-34.

Silveira FT, Lainson R, Gomes CM de C, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 2009; 31(8): 423-31.

Soong L, Chang CH, Sun J, Longley BJ Jr, Ruddle NH, Flavell RA, McMahon-Pratt D. Role of CD4⁺ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol*. 1997; 158(11): 5374-83.

Soong L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J Immunol*. 2008; 180(7): 4355-60.

Souza AI, Barros EMS, Ishikawa E, Ilha IMN, Marin GRB, Nunes VLB. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2005; 128: 41-5.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med*. 1974;139(2):380-97.

Talamá-Rohana P, Wright SD, Lennartz MR, Russell DG. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150, 95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J immunol*. 1990; 144: 4817-24.

Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*. 2008 Mar;9(3):239-44.

Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, et al., Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000; 12:71-81.

Valladeau J, Clair-Moninot V, Dezutter-Dambuyant C, Pin JJ, Kissenpfennig A, Mattéi MG, Ait-Yahia S, Bates EE, Malissen B, Koch F, Fossiez F, Romani N, Lebecque S, Saeland S. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J Immunol*. 2002; 168(2):782-92.

Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol* 2005; 17(4):273-83.

Van Zandbergen GK M, Mueller A, Dannenberg S, Gerbert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *Journal of Immunology*. 2004; 173: 6521-5.

Vargas-Inchaustegui DA, Xin L, Soong L. *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. *J Immunol.* 2008; 180(11): 7537-45.

Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol Microbiol.* 2011; 79: 674 – 62.

World Health Organization (WHO). The world health report. 2001. Geneva.

World Health Organization (WHO). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases 2010. Geneva.

Wright SD, Silverstein SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med.* 1983; 158(6): 2016-23.

Xin L, Li Y, Soong L. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD45RB- dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4+ T cells in vitro and in vivo. *Infect Immun.* 2007; 75(10): 5018-26.

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

Xu D, Liu H, Komai-Koma M, Campbell C, McSharry C, Alexander J, Liew FY. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice. *J Immunol.* 2003; 170(1):394-9.