

CÍNTHIA SIESS-PORTUGAL

PAPEL DA PROTEÍNA IMUNOMODULADORA CD200
NAS INFECÇÕES DE MACRÓFAGOS POR
LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM CHAGASI

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

São Paulo
2019

RESUMO

Siess-Portugal C. Papel da proteína imunomoduladora CD200 em infecções de macrófagos por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, [dissertação (Mestrado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo; 2019.

Parasitas do gênero *Leishmania* desenvolveram mecanismos de evasão das respostas microbicidas de células de defesa, como macrófagos, assim a resposta imunológica do hospedeiro é modulada favorecendo a sobrevivência do parasito. A glicoproteína CD200, quando induzida no macrófago, inibe o mecanismo leishmanicida mediado por óxido nítrico (NO) no escape da resposta imune contra *L. (L.) amazonensis*, espécie associada à leishmaniose cutânea. No entanto, nenhum trabalho descreve o papel de CD200 em infecções de macrófagos pela espécie *L. (L.) infantum chagasi*, que causa leishmaniose visceral, a forma mais grave e letal das leishmanioses. A hipótese deste trabalho é que a expressão de CD200 induzida por *L. (L.) infantum chagasi*, esteja relacionada com a inibição da resposta leishmanicida do macrófago. Assim, buscou-se elucidar o papel de CD200, avaliando sua expressão em macrófagos infectados ao longo do tempo. Nossos resultados indicam que *L. (L.) infantum chagasi* induz a expressão de CD200 a partir de 24 até 72 h de infecção, mas o evento não está relacionado com a proliferação de *L. (L.) infantum chagasi* no macrófago devido a inibição de iNOS, visto que a inibição da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) pelo inibidor L-NAME, o bloqueio de CD200 com anticorpos ou a adição de CD200Fc solúvel não afetam a proliferação ou sobrevivência do parasito intracelular. Além disso, mostramos que células do baço apresentam maiores taxas de infecção e altos níveis de CD200/CD200R, o que pode estar relacionado ao acometimento desse órgão por essa espécie de parasito. Experimentos futuros poderão desvendar a funcionalidade da indução de CD200 na infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, a qual pode ser relevante na inibição de outras células que chegam no foco infeccioso ou no processo de migração celular em direção a órgãos afetados durante a leishmaniose visceral.

Palavras-chave: CD200/CD200R, iNOS, *Leishmania (L.) infantum chagasi*, macrófagos, óxido nítrico.

ABSTRACT

Siess-Portugal C. Role of CD200 immunomodulatory protein in macrophage infections by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, [dissertation (Master of Sciences)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, Department of Parasitology, University of São Paulo; 2019.

Parasites of *Leishmania* genus developed evasion mechanisms of the defense cell microbicidal responses, such as macrophages, the host immune response is modulated favoring parasite survival. Glycoprotein CD200, when induced in the macrophage, inhibits the leishmanicidal mechanism mediated by nitric oxide (NO) in the immune escape response by *L. (L.) amazonensis*, species associated with cutaneous leishmaniasis. However, none report describes the role of CD200 in macrophage infection by *L. (L.) infantum chagasi*, which causes visceral leishmaniasis, the most lethal and severe form of the disease. The hypothesis of this study is that *L. (L.) infantum chagasi* induced CD200 expression is related to inhibition of macrophage leishmanicidal response. Thus, we sought to elucidate the role of CD200 by evaluating its expression in infected macrophages in different time points. Our results indicate that *L. (L.) infantum chagasi* induce CD200 expression from 24 to 72 h of infection, but it was not to the proliferation of *L. (L.) infantum chagasi* in macrophage due to inhibition, since inhibition of iNOS by L-NAME, blockage by CD200/CD200R antibodies or addition of CD200Fc did not affect the intracellular parasite proliferation. Furthermore, spleen cells presented higher infection and high levels of CD200 / CD200R, perhaps due to involvement of this organ in the visceral pathology. Future experiments will allow knowing the primary function of CD200 in *L. (L.) infantum chagasi* infection, which could be relevant to the inhibitory function in neighbor recruited cells during infection or the cellular migration of *Leishmania* in infected cells at the different systemic organs during visceral leishmaniasis.

Keywords: CD200/CD200R, iNOS, *Leishmania (L.) infantum chagasi*, macrophages, nitric oxide.

1.Introdução

1.1. As leishmanioses

Leishmanioses são um complexo grupo de doenças negligenciadas causadas por pelos menos 20 espécies conhecidas de protozoários do gênero *Leishmania* (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Esses parasitos são transmitidos para hospedeiros mamíferos por fêmeas de flebotomíneos. Diferentes espécies de *Leishmania* causam manifestações clínicas distintas que variam desde lesões cutâneas com cura espontânea até doença visceral fatal (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; WHO, 2017). O quadro clínico final é determinado por fatores relacionados à espécie do parasito e à resposta imune do hospedeiro (BRUSCHI; GRADONI, 2018; COLMENARES *et al.*, 2002).

As leishmanioses podem ser classificadas em três principais formas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LM) e leishmaniose visceral (LV) (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

A LC é considerada a forma mais comum da doença, apresentando úlceras corporais auto-curáveis que persistem de três a 18 meses e podem deixar cicatrizes (**Figura 1 A**). Entretanto, cerca de 10% dos casos podem evoluir para quadros clínicos mais graves como a leishmaniose cutânea difusa, a leishmaniose cutânea disseminada e a leishmaniose mucocutânea (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; WHO, 2018). A leishmaniose cutânea difusa tem como característica elementar o aparecimento de nódulos não ulcerativos e a disseminada apresenta lesões ulceradas e papulares espalhadas pelo corpo (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Na forma mucocutânea, a doença atinge as cavidades nasal e oral, as consequências são tão devastadoras que podem causar a destruição parcial ou total de tecidos (**Figura 1 B**), gerando desfiguração ou mesmo a morte devido a infecções secundárias (GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012).

Das formas apresentadas, a LV (ou Calazar) é a forma mais grave, sendo fatal em mais de 95% dos casos não tratados. É uma doença sistêmica em que ocorre migração das células infectadas do local da picada do inseto vetor para órgãos viscerais, principalmente baço, fígado e a medula óssea (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Indivíduos sintomáticos apresentam um quadro clínico de hepatoesplenomegalia, febres irregulares, perda de peso, trombocitopenia e anemia

devido à supressão da medula (**Figura 1 C**) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Após a cura clínica da LV, há casos em que os pacientes apresentam uma manifestação cutânea conhecida como leishmaniose dérmica pós-Calazar, desenvolvendo progressivamente erupções cutâneas maculares, lesões nodulares ou papulares, geralmente no rosto e na parte superior dos braços (**Figura 1 D**).



Figura 1. Formas das leishmanioses. (A) Leishmaniose cutânea localizada, (B) Leishmaniose mucocutânea, (C) leishmaniose visceral e (D) leishmaniose dérmica pós-calazar. As imagens pertencem ao site da Organização Mundial da saúde. Acesso em agosto de 2019.

Diante da complexidade dos quadros clínicos das leishmanioses, quanto mais precoce o diagnóstico e o tratamento, maiores as chances de minimizar os danos causados pela doença. Entretanto, apesar de todos os esforços, ainda não há um tratamento ideal para as leishmanioses. Os fármacos disponíveis apresentam diversas limitações: toxicidade e efeitos adversos severos, surgimento de resistência do parasito, custo elevado e longos períodos de tratamento em ambiente hospitalar (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

As drogas leishmanicidas comumente administradas são os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina ou Glucantime), anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paromomicina (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

O tratamento varia de acordo com a manifestação clínica (e espécie de *Leishmania*) e localização geográfica. No Brasil, os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados como tratamento de primeira escolha, apesar da alta toxicidade (CHRUSCIAK-TALHARI *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2011; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018). A anfotericina B e a pentamidina são drogas de segunda escolha, porém também apresentam alta toxicidade, além do alto custo (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006). O único tratamento oral disponível no combate à leishmaniose é a Miltefosina. Porém, estudos mostram que a sua eficácia é menor em espécies de leishmania causadoras da forma cutânea (ESCOBAR *et al.*, 2002).

1.2.Epidemiologia das leishmanioses

Endêmica em 98 países, as leishmanioses encontram-se amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo prevalentes em países da Europa, África, Ásia e América do Sul. Baseado na ocorrência geográfica, as espécies de *Leishmania* são separadas em dois grupos: espécies do Velho Mundo, para espécies identificadas na África, Ásia, Oriente Médio, Mediterrâneo e Índia; e espécies do Novo Mundo, as quais foram identificadas nas Américas do Sul e Central (ALVAR *et al.*, 2012).

As leishmanioses afetam principalmente populações de baixa renda devido a mal nutrição, moradia precária, falta de acesso a saneamento e serviço de saúde básicos. A Organização Mundial da Saúde (OMS, do inglês *World Health Organization*) lista as leishmanioses com umas das principais doenças negligenciadas. Essa lista engloba doenças infecciosas e parasitárias que atingem milhões de pessoas no mundo todo, mas apesar disso, recebem pouco recurso

financeiro para medidas de prevenção, estratégias de tratamento e pesquisa e desenvolvimento. A indústria farmacêutica ignorou essas doenças por muito tempo devido ao baixo potencial de retorno lucrativo (WHO, 2017).

Estima-se que há cerca de 1,7 milhão de pessoas infectadas e desses, entre 20 a 30 mil chegarão à óbito, acometidas, principalmente, pela forma visceral (WHO, 2017).

Em 2017, 94% dos novos casos relatados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Quase 95% dos casos são da Região das Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central (**Figura 2**). Cerca 90% dos casos da forma mucocutânea ocorrem no Brasil, Peru e no Estado Plurinacional da Bolívia (WHO, 2017).

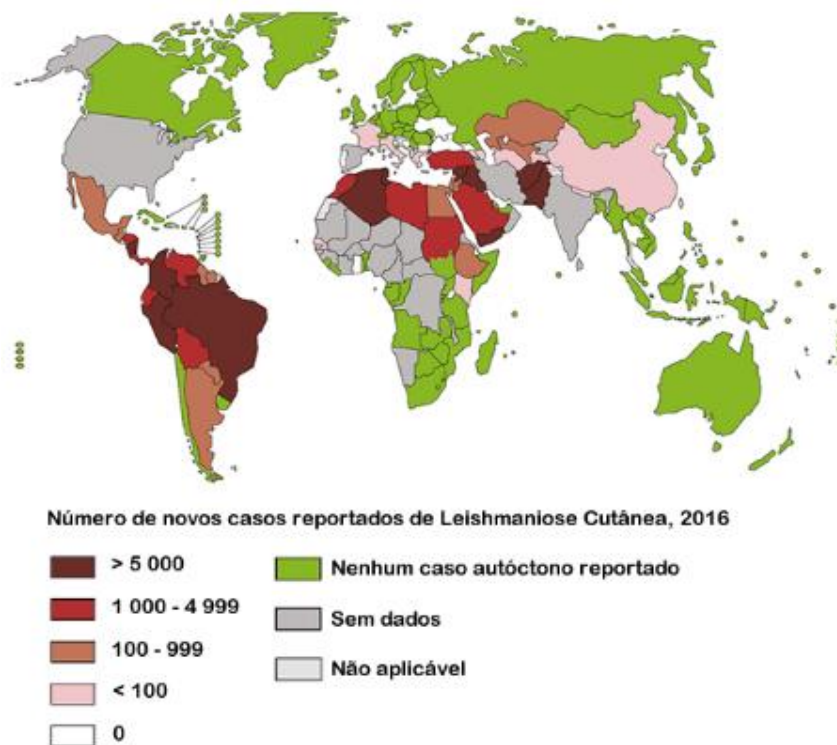


Figura 2. Distribuição mundial da leishmaniose cutânea em 2016. Adaptado do mapa da Organização Mundial da Saúde. Acesso agosto de 2019.

Segundo a OMS, em 2016, mais de 95% dos novos casos de LV relatados à OMS ocorreram no Brasil, Bangladesh, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Estimam-se 50 mil a 90 mil novos casos de LV ocorram a cada ano em todo o mundo, e apenas 25 a 45% são relatados à OMS (**Figura 3**) (BURZA;

CROFT; BOELAERT, 2018; WHO, 2017). Nos últimos anos, a incidência global de LV diminuiu de 200 mil a 400 mil novos casos em 2012, para 50 mil a 90 mil em 2017 (WHO, 2017).

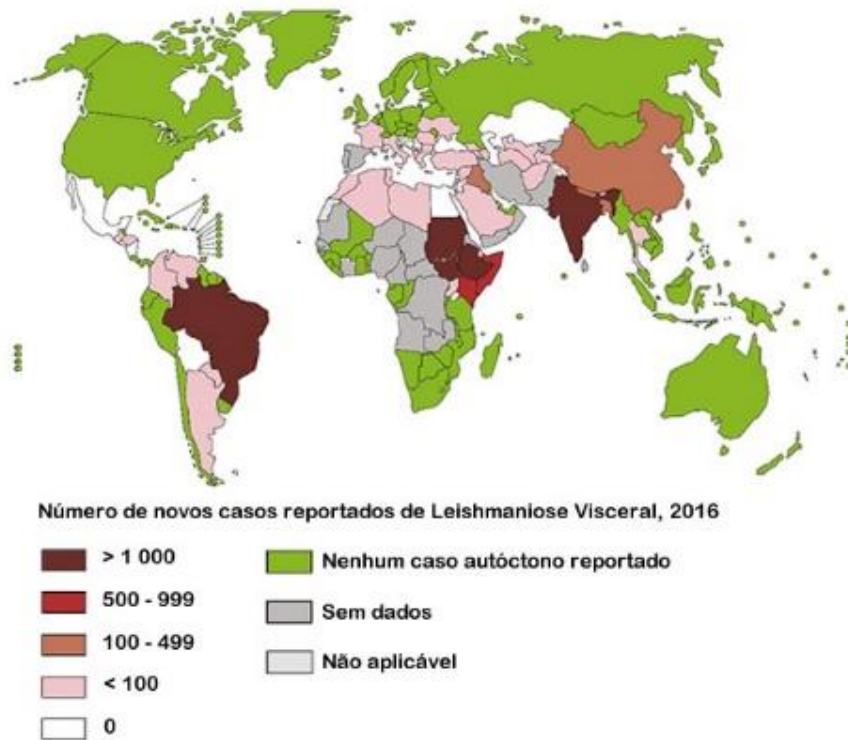


Figura 3. Distribuição mundial da leishmaniose visceral em 2016. Adaptado do mapa da organização mundial da saúde. Acesso agosto de 2019.

No Velho Mundo, as espécies que causam LC são: *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (L.) tropica* e *Leishmania (L.) aethiopica*. Já no Novo Mundo são: *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) panamensis* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). As espécies *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (V.) panamensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* também causam a forma mucocutânea no Novo Mundo (GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012). As espécies que causam LV no Velho Mundo são a *L. (L.) donovani* e a *L. (L.) infantum*, já no Novo mundo é a espécie *L. (L.) infantum chagasi*, também conhecida como *L. (L.) infantum* ou *L. (L.) chagasi* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

1.3. Leishmaniose visceral no Brasil

O Brasil é um dos países que apresenta as três formas de leishmanioses. É o país que registra mais de 99% dos 3.500 casos anuais de LV na América Latina (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018) com aproximadamente 7% de taxa de letalidade (DA ROCHA *et al.*, 2018).

A urbanização de LV no Brasil vem crescendo desde os anos 80, revelando a necessidade de medidas emergenciais de controle em áreas urbanas (BRASIL, 2014; HARHAY *et al.*, 2011). No período de 1984 a 2002 foram notificados 48.455 casos e 66% deles ocorreram nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará e Bahia (BRASIL, 2014).

Dados mais recentes mostram que a maior concentração de LV ocorre no nordeste do país (**Figura 4**), região brasileira com os maiores índices de pobreza (IBGE, 2018). Esses dados evidenciam a correlação entre situações de vulnerabilidade ou pobreza e o aumento do risco de leishmaniose (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006). Além disso, o estado nutricional deficiente para proteína, ferro, vitamina A e zinco também é um fator de risco na progressão de LV para quadros fatais (GRADONI, 2018).

No entanto, cabe ressaltar que a doença não está somente no nordeste brasileiro, a LV está se expandindo rapidamente para outras regiões, principalmente o Sudeste (BEZERRA *et al.*, 2018; OPAS/OMS, 2018). Casos de LV foram registrados em 22 estados brasileiros com aproximadamente 1.600 cidades com transmissão autóctone. Esses dados têm sido procedentes principalmente em regiões rurais, porém, atualmente o avanço da doença tem sido observado também em áreas urbanas (BRASIL, 2014). Na última década, a média anual de casos no país foi de 3.156 casos, com incidência de dois para 100 mil habitantes. As estatísticas mostram que esse quadro é ainda pior para crianças menores de 10 anos, devido ao estado de imaturidade imunológica que é agravado pela desnutrição (BRASIL, 2014).

No Brasil, o agente etiológico de LV é a *Leishmania (L.) infantum chagasi* (BRUSCHI; GRADONI, 2018). Este parasito tem se dispersado em áreas urbanas brasileiras e esse fato está associado às mudanças ambientais, migração de pessoas, crescimento populacional desorganizado, habitação de áreas urbanas periféricas, alta densidade de pessoas e cães e condições de vida precária (HARHAY *et al.*, 2011; ROMERO; BOELAERT, 2010).

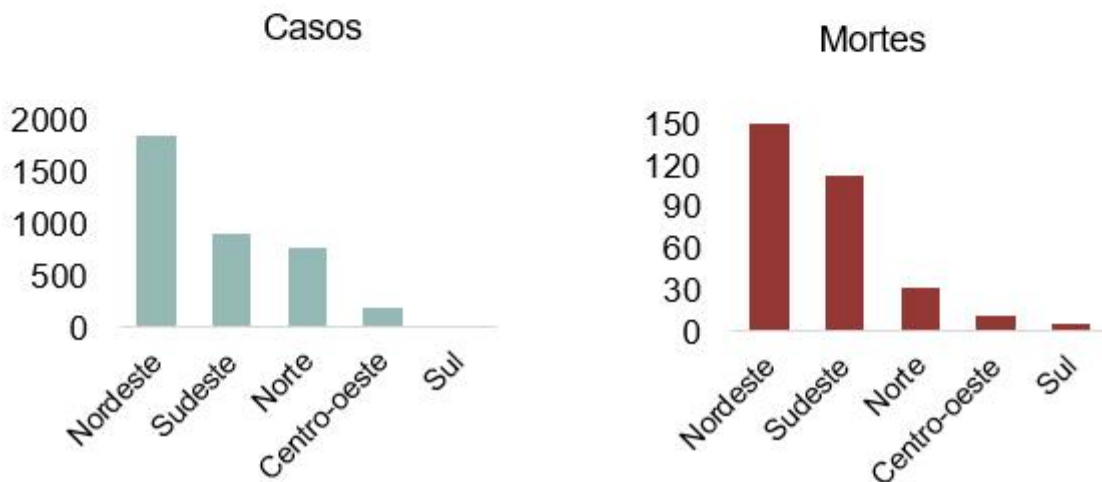
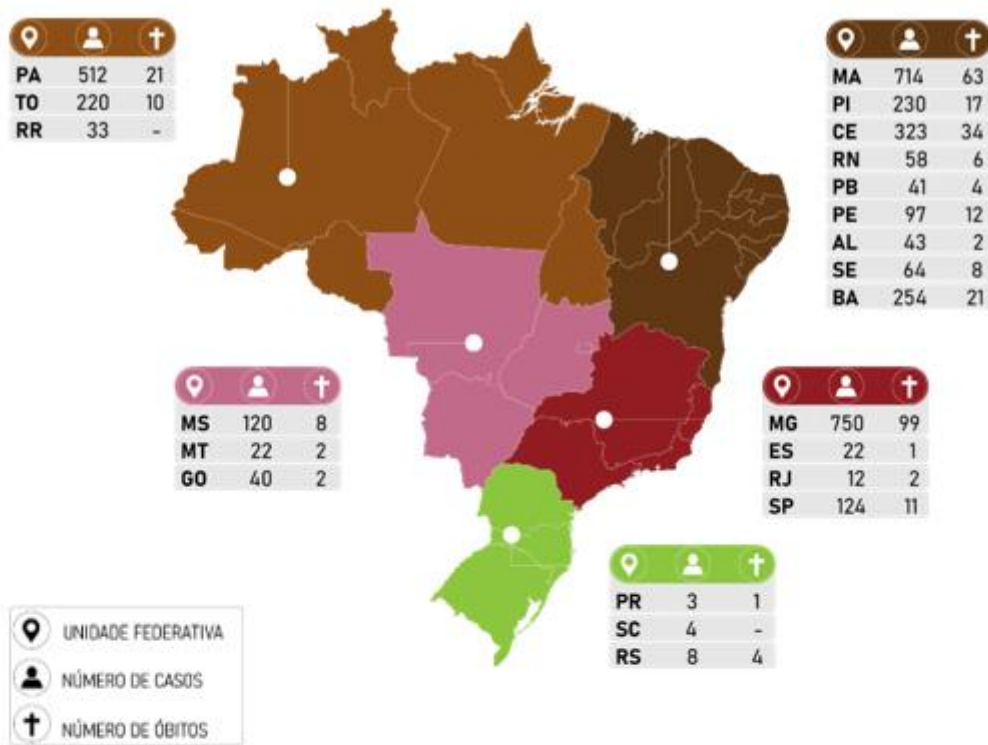


Figura 4. Distribuição de casos e óbitos de leishmaniose visceral no território brasileiro em 2017. Figura de Cíntia Siess Portugal baseada em dados epidemiológicos do SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2018.

Ciente disso, no Brasil, o Programa Brasileiro de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral (PBVCLV) tem buscado traçar estratégias de controle e prevenção que incluem a identificação e sacrifício de cães infectados soropositivos, diagnóstico e tratamento precoces de pessoas infectadas, controle químico do vetor e conscientização da população. Entretanto, a despeito dos esforços, os resultados são insatisfatórios, sendo ainda observada a prevalência de crianças infectadas por

L. (L.) infantum chagasi. (BEZERRA *et al.*, 2018; DA ROCHA *et al.*, 2018).

1.4.O parasito *Leishmania*

Leishmania é um protozoário parasito que pertence à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania* (BRUSCHI; GRADONI, 2018) (**Figura 5**). O gênero *Leishmania* é ainda subdividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, de acordo com o local de desenvolvimento e fixação da forma promastigota no intestino do flebótomo (peripilariano ou suprapilariano, respectivamente).

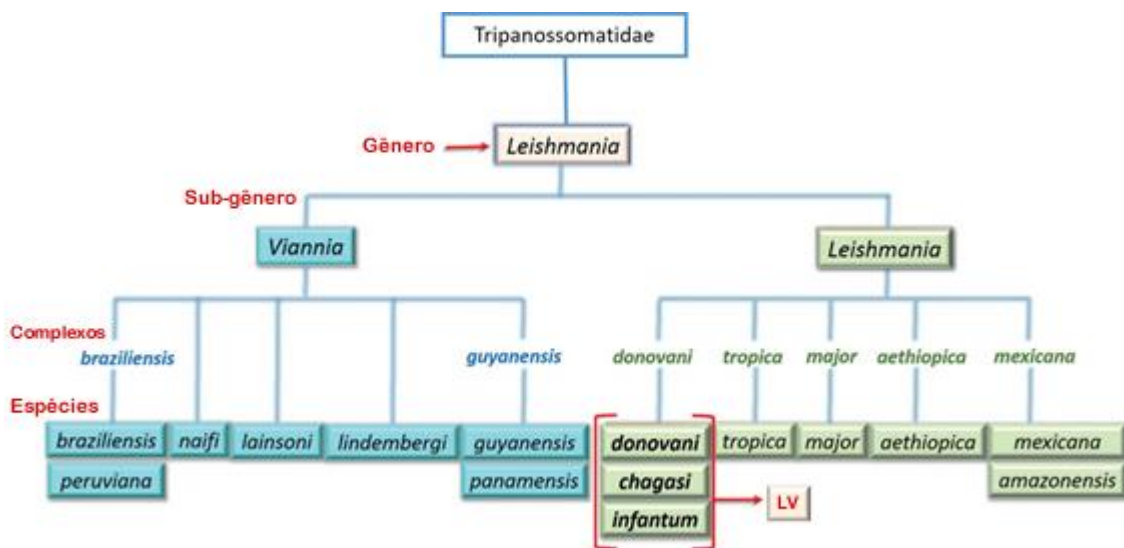


Figura 5. Taxonomia das principais espécies do gênero *Leishmania*. Figura adaptada de Paridah e colaboradores (2017).

Esse parasito é dimórfico, apresentando duas formas biológicas: (1) a forma promastigota, a qual é flagelada e móvel, possui uma forma alongada com aproximadamente 20 μm , é extracelular e está presente no interior do inseto vetor. (**Figura 6 A**); (2) a forma amastigota, a qual possui um flagelo internalizado e são sésseis, possui morfologia arredondada com tamanho de 5 μm , é intracelular e estão presentes no hospedeiro mamífero (**Figura 6 B**) (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007; BESTEIRO *et al.*, 2007; BRUSCHI; GRADONI, 2018; KAUFER *et al.*, 2017).

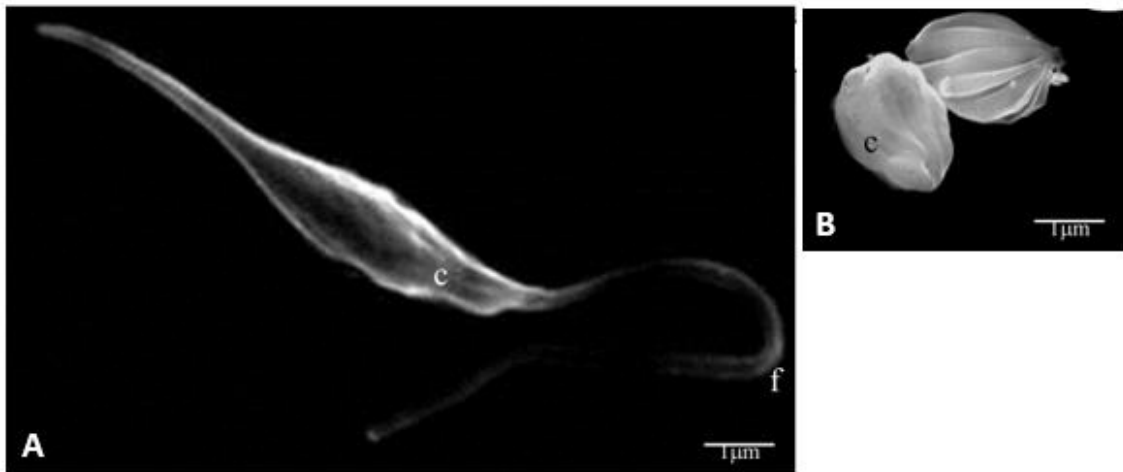


Figura 6. Formas de *L. (L.) infantum chagasi* durante seu ciclo biológico. Imagens de microscópio eletrônico de varredura das formas de Leishmania no estágio no inseto vetor (**A**), formas promastigotas e no hospedeiro mamífero, formas amastigotas (**B**). c: corpo celular; f: flagelo. Fotos de Márcio Sobreira e Vanessa Freitas – Fiocruz-MG, CPqRR.

1.5.O vetor flebotomíneo

O inseto vetor das leishmanioses são flebotomíneos ou flebótomos fêmeas da ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phebotominae* e gênero *Phebotomus* no Velho Mundo ou *Lutzomyia* no Novo Mundo (RANGEL, 2018).

O flebotomíneo, popularmente conhecido como mosquito-palha, é um inseto pequeno com tamanho variável de 1 a 3mm, corpo piloso, exoesqueleto delgado e quitinoso, sensíveis as variações do clima e luminosidade. Durante o dia se escondem em brechas de árvores, rochas, rachaduras das paredes de casas e possuem atividade crepuscular ou noturna. As características particulares são a cabeça fletida para baixo, asas eretas em repouso, voo por saltos e sem barulho audível e picada extremamente dolorosa. São encontrados em área peridomiciliar, abrigo de animais, lixo e matéria orgânica em decomposição (FELICIANGELI, 2004; MARCONDES; ROSSI, 2013; RANGEL, 2018).

No Brasil, a principal espécie identificada na transmissão de *L. (L.) infantum chagasi* é *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ; NEIVA, 1912; MARCONDES; ROSSI, 2013; RANGEL, 2018). A ausência desse vetor em regiões onde existem casos de LV indica que outras espécies de flebotomíneos são competentes para a transmissão de *L. (L.) infantum chagasi* (BRASIL, 2014; DANTAS-TORRES, 2009; DE PITA-PEREIRA *et al.*, 2008).

A transmissão ocorre por meio da picada das fêmeas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero. A alimentação de sangue é importante para o processo de ovagênese. As fêmeas têm um hábito alimentar sanguíneo bastante eclético, além do homem, ingerem sangue de cães, cavalos, jumentos, cabras, bois, porcos, galinhas, gatos, além de animais silvestres. (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; MARCONDES; ROSSI, 2013).

1.6.Ciclo biológico da *Leishmania*

O parasito *Leishmania* possui um ciclo biológico complexo que envolve diversas formas de desenvolvimento (SACKS; PERKINS, 1984). O parasito é exposto a mudanças relacionadas com variações de pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes, as quais requerem adaptações morfológicas e bioquímicas para sobrevivência no inseto vetor e no hospedeiro (MCCONVILLE *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2008).

O flebotomíneo durante o repasto sanguíneo, lesiona a pele e a microvasculatura do hospedeiro, gerando uma resposta inflamatória local com o recrutamento de neutrófilos e monócitos (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011). O vetor inocula na pele, parasitos na forma promastigota metacíclica, os quais são fagocitados por células do sistema imune que foram recrutadas ou infectam outros tipos celulares, residentes do local (KIMBLIN *et al.*, 2008; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011; ROGERS *et al.*, 2004).

No início da infecção, as primeiras células residentes que interagem com os parasitos são os macrófagos, queratinócitos e células Langerhans. Os queratinócitos são uma barreira de proteção do hospedeiro e o ambiente, secretam citocinas como IL-12, IL-1 β , IL-4 e IL-6, que modulam a resposta imune (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011). As células de Langerhans são importantes no auxílio da resposta imune protetora inicial, pois fagocitam o parasito, se ativam, se diferenciam e migram para os linfonodos (ASHOK; ACHA-ORBEA, 2014).

Os neutrófilos são as primeiras células a infiltrar no sítio de inoculação do parasito (RIBEIRO-GOMES; SACKS; BEVERLEY, 2012). As espécies de *Leishmania* desenvolveram estratégias para escapar dos mecanismos efetores dos neutrófilos, algumas até mesmo resistem às armadilhas extracelulares de neutrófilos ou NETs (do inglês *neutrophil extracellular traps*) (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2009; HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016). Os neutrófilos têm vida curta e quando não

conseguem eliminar a *Leishmania* se tornam células hospedeiras intermediárias. Os macrófagos, célula hospedeira definitiva da *Leishmania*, podem fagocitar diretamente os promastigotas, bem como fagocitar neutrófilos infectados em processo de apoptose. A infecção de macrófagos pela fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados por *L. (L.) donovani*, apesar de controverso, é conhecida como “cavalo de Tróia”, pois não ocorre a ativação de funções efetoras antimicrobianas, sendo considerada uma via de infecção silenciosa (LASKAY; ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003).

No interior dos macrófagos, os promastigotas se diferenciam na forma amastigota dentro do vacúolo parasitóforo, o qual possui pH ácido (em torno de pH 4,5 a 6,0). Nesse ambiente, os amastigotas se multiplicam por fissão binária, o que pode ocorrer em vacúolos individuais (maioria das espécies de *Leishmania*) ou em grandes vacúolos compartilhados (complexo *L. mexicana*). Eventualmente esses amastigotas são liberados da célula e infectam novas células, mantendo a infecção no hospedeiro (MCCONVILLE *et al.*, 2015; MCCONVILLE; NADERER, 2011; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Eventualmente, um flebotomíneo ingere células infectadas e amastigotas livres durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado. No período de 6 a 12 horas após o repasto ocorre a transformação da forma amastigota em promastigota, seguida pela multiplicação, por fissão binária, do parasito no intestino médio do vetor. A migração do parasito do intestino médio para a região anterior do vetor (válvula estomodeal) leva a vários estágios de desenvolvimento distintos, impulsionando mudanças morfológicas funcionais (KAMHAWI, 2006; LAWYER *et al.*, 1987; SECUNDINO *et al.*, 2010).

As promastigotas procíclicas, com flagelos curtos e resistentes às enzimas digestivas, são encontradas no vetor 18 a 24 horas após o repasto sanguíneo. A partir daí é observada a multiplicação do parasito por sucessivas divisões por fissão binária. De três a quatro dias no interior do inseto, é encontrada a forma promastigota nectomona, a qual é capaz de ultrapassar a matriz peritrófica e migrar para a região anterior e aglomerar na válvula estomodeal. A matriz peritrófica é o revestimento do intestino médio do inseto, composto principalmente por quitina que envolve o bolo alimentar. No quinto dia de infecção, o flebotomíneo carrega em seu interior formas leptomona e nesse momento acontece o segundo momento de multiplicação do parasito. Uma característica dessa morfologia da promastigota leptomona é a

habilidade de se fixar na cutícula da válvula estomodeal (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; KAMHAWI, 2006; SACKS; KAMHAWI, 2001).

Da forma leptomona, com aproximadamente 6 a 9 dias, há a diferenciação em dois tipos de promastigota: haptomona e metacíclica. A promastigota haptomona é importante, pois forma um plugue que garante que a promastigota metacíclica seja regurgitada pelo vetor no momento do repasto sanguíneo. A promastigota metacíclica é forma infectiva transmitida para o hospedeiro. Essa forma tem corpo celular pequeno e flagelo longo, são ágeis e resistentes a lise do sistema complemento do hospedeiro (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; KAMHAWI, 2006; SACKS; KAMHAWI, 2001; SECUNDINO *et al.*, 2010).

Até recentemente, as formas metacíclicas eram consideradas a forma terminal de diferenciação dentro do vetor flebotomíneo. No entanto, Serafim e colaboradores (2018) demonstraram que alguns promastigotas metacíclicos se diferenciam em uma forma parecida com leptomonas quando um fletomíneo infectado realiza repasto sanguíneo com sangue não infectado, os autores nomearam essa forma de retroleptomonas. Essas retroleptomonas são altamente replicativas e se diferenciam para metacíclicos rapidamente, assim aumentando o número de formas infectivas (SERAFIM *et al.*, 2018). O ciclo biológico da *Leishmania* continua quando o vetor regurgita promastigotas metacíclicos na pele de outro vertebrado não infectado. Na **Figura 7** podemos ver um resumo do ciclo aqui descrito.

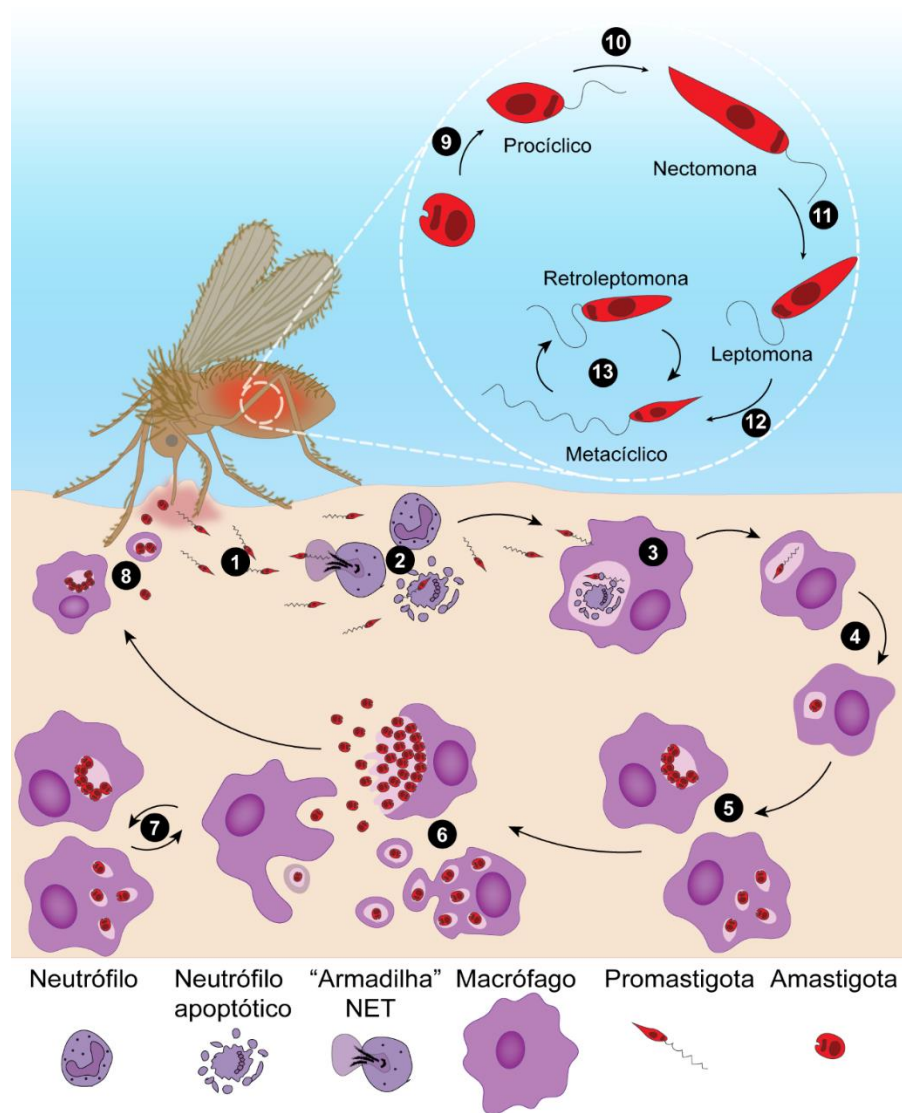


Figura 7. Ciclo biológico da *Leishmania* spp. (1) As formas promastigotas metacíclicas são transmitidas pelas picadas de flebotomíneos fêmeas durante o repasto, recrutando células para o local da picada. (2) Neutrófilos fagocitam parasitos. (3) Macrófagos fagocitam parasitos livres e neutrófilos apoptóticos. (4) Em vacúolos parasitóforos, as formas promastigotas se transformam em amastigotas (forma intracelular obrigatória). (5) Os amastigotas se dividem por fissão binária em vacúolos individuais (maioria das espécies de *Leishmania*) ou em grandes vacúolos compartilhados (complexo *L. mexicana*). (6) Com a sucessiva multiplicação do parasito, há o rompimento da célula infectada, (7) infectando outras células ou (8) sendo ingeridas pelo flebotomíneo no respasto sanguíneo. (9) No trato digestivo do inseto vetor, a forma amastigota se transforma em formas promastigotas procíclicas, a qual se transformam em (10) nectomonas e posteriormente em (11) leptomonas, até diferenciação em (12) promastigotas metacíclicos, estágio infectivo. (13) Os metacíclicos porém se diferenciam em retroleptomonas e retornam a metacíclicos. Figura de (FERREIRA, 2019).

1.7. Resposta imune durante a infecção inicial por *Leishmania*

Os momentos iniciais da interação entre o vetor, a *Leishmania* e o hospedeiro determinarão se a infecção irá progredir para LC ou LV (ALMEIDA *et al.*, 2003; SACKS; KAMHAWI, 2001). No local da picada pelo vetor há células residentes e

inflamatórias que desencadeiam o início da resposta imunológica com a liberação de citocinas, quimionas e fatores de crescimento para o recrutamento de fagócitos profissionais (RIBEIRO-GOMES; SACKS; BEVERLEY, 2012).

As principais células do sistema imune que fagocitam a *Leishmania* são neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (CHEN *et al.*, 2005; KAUTZ-NEU *et al.*, 2012; LAI *et al.*, 2008; LASKAY; ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; MOSSER; EDWARDS, 2008; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004), mas o parasito pode infectar também outros tipos celulares, como fibroblastos (RITTIG; BOGDAN, 2000; SCHMID; WEGE; RITTER, 2012). A forma amastigota é obrigatoriamente intracelular, assim o parasito precisa infectar rapidamente essas células para se manter viável e estabelecer a infecção (LIU; UZONNA, 2012).

Como citado anteriormente, as primeiras células recrutadas são os neutrófilos (RIBEIRO-GOMES; SACKS; BEVERLEY, 2012). Após internalizado, o parasito induz nessas células a formação de redes, compostas por DNA, histonas e elastase para imobilizar o parasito. Estas redes são conhecidas como armadilhas extracelulares de neutrófilos ou NETs (do inglês *neutrophil extracellular traps*) (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2009; HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016).

Outro tipo celular envolvido na infecção por *Leishmania* são as células dendríticas, essenciais no estabelecimento da resposta imune adaptativa do hospedeiro, na ativação e polarização de células TCD4⁺ (KAUTZ-NEU *et al.*, 2012). As células dendríticas liberam citocinas, como interferon (IFN) tipo 1 e interleucina 12 (IL-12), que estimulam a diferenciação das células T naive em T auxiliares efectoras, do tipo 1 (Th1, do inglês *T helper 1*) que monta uma resposta resistente durante a infecção da *Leishmania* (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011).

Os macrófagos são células importantes na imunobiologia da leishmaniose (HANDMAN; BULLEN, 2002) e as suas principais funções são a fagocitose e o elo de ligação entre a resposta imune inata e adaptativa (LOCATI; MANTOVANI; SICA, 2013; REVIE; SALAHUDDIN, 2014; TAKEDA; AKIRA, 2005). Essa capacidade de ingerir e eliminar células infectadas em processo de apoptose ou patógenos é devido à presença de receptores *scavenger* (SR), de manose (MR) e do tipo *toll* (TLR), do complemento e do fragmento Fc (EZEKOWITZ; GORDON, 2006; TAKEDA; AKIRA, 2005). Ao fagocitar o parasito, os macrófagos são ativados e conseguem degradar o patógeno e realizar a apresentação de antígenos via MHC às células T, iniciando o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (STRAUSS, 2010; TEO; HUGHES,

2003). A degradação do parasito intracelular acontece com a maturação do fagossoma ao se fundir com lisossoma. Neste compartimento o patógeno é exposto a diversas enzimas hidrolíticas, as espécies reativas de oxigênio (como superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila) e as espécies reativas de nitrogênio (como o óxido nítrico) (STAERCK et al., 2017).

Macrófagos ativados devido a fagocitose, apresentam fenótipos que geralmente são uma combinação de funções inflamatórias e anti-inflamatórias, que variam de acordo com a espécie do parasito infectante e a genética do hospedeiro. Essa plasticidade na função macrofágica tem sido definida como classicamente ativada (fenótipo M1) ou estado alternativamente ativado (fenótipo M2) (MURAILLE; LEO; MOSER, 2014).

Na ativação clássica, macrófagos são estimulados por citocinas, principalmente IFN- γ (interferon gama), produzidas por células Th1 e NK (do inglês, *Natural Killer Cell*). Nessa via de ativação, os macrófagos produzem uma enzima denominada óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que metaboliza L-arginina e oxigênio em L-citrulina e óxido nítrico (NO). O NO é uma molécula importante na resposta leishmanicida. Esse perfil imune é caracterizado pela resistência à infecção (GANTT et al., 2001; KANE; MOSSER, 2000; KAYE; SCOTT, 2011; LIU; UZONNA, 2012; MILLER et al., 2000; MOSSER; EDWARDS, 2008; SCOTT; NOVAIS, 2016). Na ausência de estímulo de IFN- γ ou de produtos microbianos, como lipossacarídeo (LPS), não se detecta iNOS em macrófagos (SANTOS et al., 2006).

Outras citocinas inflamatórias, como IL-1 β (interleucina 1 beta), TNF (fator de necrose tumoral, do inglês *tumor necrosis factor*), IFN- α (interferon alfa) e IFN- β (interferon beta) também estão envolvidas na ativação clássica do macrófago e na indução de iNOS (LIU; UZONNA, 2012; SCOTT; NOVAIS, 2016).

A ativação alternativa do macrófago é induzida por citocinas da resposta imune do tipo Th2 (*T helper* do tipo 2), como IL-4 e IL-13 (HURDAYAL; BROMBACHER, 2014; SCOTT; NOVAIS, 2016). Durante essa ativação, L-arginina é metabolizada pela arginase, com a produção de poliaminas e prolinas, favorecendo a sobrevivência do parasito e gerando um perfil de susceptibilidade à infecção (MANDAL et al., 2017; MURAILLE; LEO; MOSER, 2014). IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês *transforming growth factor* beta) são outras citocinas anti-inflamatórias que inibem a ativação clássica do macrófago e propiciam a sobrevivência da *Leishmania* (LIU; UZONNA, 2012; MURAILLE; LEO; MOSER, 2014).

Esse balanço de perfil imune, Th1 e Th2, está condicionado à espécie de *Leishmania* e à resposta imunológica do hospedeiro. Esse perfil imune pode ser resistente, predomínio de resposta Th1 ou susceptível à infecção, predomínio de resposta Th2, conforme a capacidade do parasito evadir a resposta imune (MURAILLE; LEO; MOSER, 2014).

1.8.Mecanismos de evasão da resposta imunológica

O estabelecimento da infecção está diretamente relacionado com a capacidade de o parasito resistir à resposta leishmanicida dos fagócitos, principalmente dos macrófagos. O fagolisossomo é um ambiente inóspito para a sobrevivência de muitos patógenos, exceto pela *Leishmania*, que desenvolveu estratégias para sobreviver nesse compartimento hostil do macrófago (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006).

A forma promastigota metacíclica, inoculada no hospedeiro durante o raspato sanguíneo do vetor, possui em sua superfície celular lipofosfoglicanos (LPG) e metaloprotease 63 (GP63), fatores de virulência importantes durante a fagocitose (NADERER; MCCONVILLE, 2008; YAO; DONELSON; WILSON, 2003).

No início da infecção, o sistema complemento, composto por proteínas solúveis no sangue e na membrana plasmática, é um dos principais mecanismos no controle do patógeno. A *Leishmania* sofre ataque do sistema complemento, mas resiste devido à presença de LPG e GP63 em sua membrana. Essas moléculas são alvos de opsoninas, como o componente do complemento C3 e a proteína de ligação à manose que favorece a entrada do parasito na célula (BRITTINGHAM; MOSSER, 1996; GREEN *et al.*, 1994). LPG na superfície do parasito forma uma barreira contra a inserção do complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês *membrane attack complex*) (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013; LIU; UZONNA, 2012) e também inibe a fusão do fagossomo com o lisossomo do macrófago (KAYE; SCOTT, 2011).

GP63 cliva C3b em C3bi (forma inativa), que recobre a superfície da *leishmania* impedindo a formação do complexo MAC e favorecendo a fagocitose do parasito pelas células via receptores do sistema complemento (CR3 e CR1) sem desencadear mecanismos oxidativos. Além disso a GP63 cliva o fator nuclear κ B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa B*) que modula a resposta pro-inflamatória do hospedeiro (ANVERSA *et al.*, 2018; KAYE; SCOTT, 2011).

Ao escapar da lise mediada pelo sistema complemento, a *Leishmania* se estabelece dentro da célula e, em seguida, o parasito se transforma na forma

amastigota, resistente ao pH ácido e à explosão oxidativa dos macrófagos (KLOEHN *et al.*, 2015; MCCONVILLE *et al.*, 2015; MCCONVILLE; NADERER, 2011; NADERER; MCCONVILLE, 2008).

Existem diferenças biológicas marcantes durante a evasão da resposta imune entre as espécies que causam a doença cutânea e a doença visceral. As *Leishmanias* sobrevivem e proliferam no ambiente acidificado do fagolisossomo, algumas espécies (complexo *L. mexicana*) se mantêm em grandes vacúolos contendo vários parasitos, assim diluindo moléculas leishmanicidas da célula, por exemplo, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (SCOTT; NOVAIS, 2016). Já outras espécies tem a capacidade de evitar a maturação do vacúolo parasitóforo, fusão com lisossomo, até que haja a diferenciação na forma amastigota (COURRET *et al.*, 2002; LEIRIÃO *et al.*, 2004). Outra diferença é a resposta inflamatória desencadeada pelo sistema complemento. Nas infecções por formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* é importante na evasão da resposta imune durante as primeiras horas, além do favorecimento da fagocitose do parasito pelos macrófagos, C3 depositado na superfície do parasito logo no momento da inoculação está diretamente relacionado com a visceralização das formas amastigotas para órgãos como o baço e o fígado, (LAURENTI *et al.*, 1996), diferentemente, as formas promastigotas de espécies que causam LC, como *L. (L.) amazonensis*, são mais sensíveis à ação do sistema complemento. A presença de C3 durante a fase aguda está relacionado com uma resposta mais intensa e durante a fase crônica, menor parasitismo. O sistema complemento é importante no controle da carga parasitária na lesão desenvolvida e é um dos fatores que impede a migração do parasito para as vísceras (LAURENTI *et al.*, 2004).

Nas infecções *in vivo* ou *in vitro* por *L. (L.) donovani* a produção de TNF é prejudicada. O atraso observado na produção de TNF *in vivo* talvez esteja relacionado com a capacidade de IFN- γ estimular a ativação clássica dos macrófagos e assim a subsequente produção de TNF (BLACKWELL *et al.*, 1984; GORAK; ENGWERDA; KAYE, 1998; KAYE; BANCROFT, 1992; STANLEY; ENGWERDA, 2007). Além disso, na infecção de macrófagos por *L. (L.) donovani* há, também, a modulação negativa da expressão de MHC-II (do inglês, *major histocompatibility complex class II*) em resposta ao IFN γ , afetando a apresentação de antígenos e ativação de células T (REINER *et al.*, 1988; STANLEY; ENGWERDA, 2007).

Outro mecanismo de evasão durante a LV está relacionado com a modulação de moléculas co-estimuladoras pela *Leishmania* que afeta o estabelecimento da

resposta imune do hospedeiro. Macrófagos infectados têm a regulação positiva de moléculas co-estimuladoras prejudicada, como acontece com CD80 (KAYE *et al.*, 1994; LINSLEY *et al.*, 1994). CTLA-4 (do inglês, *Cytotoxic T- Lymphocyte Antigen 4*) é um inibidor da ativação de células T durante a doença visceral que compete com CD28 que se liga a CD80/86 (KAYE *et al.*, 1994; LINSLEY *et al.*, 1994). No início da infecção por *L. (L.) donovani* é observado um aumento de CTLA-4 e quando essa molécula é bloqueada há melhora na resposta imune celular e resolução da doença (MURPHY *et al.*, 1998).

Indivíduos sintomáticos têm maior nível da expressão de CTLA-4 nos aspirados esplênicos e em PBMCs (do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) (GANNAVARAM *et al.*, 2016; GAUTAM *et al.*, 2014). Nas lesões de leishmaniose dérmica pós-calazar também é observado maior expressão de CTLA-4 estando associado com a persistência do parasito (GANNAVARAM *et al.*, 2016; KATARA *et al.*, 2011). Nas co-infecções de *Leishmania*-HIV há uma regulação positiva de CTLA-4 em células T CD4⁺ relacionado à deficiente imunológica que permite a persistência da infecção por *Leishmania* (GANNAVARAM *et al.*, 2016; VALLEJO *et al.*, 2014).

Outra molécula inibidora que aparentemente desempenha um papel importante nas infecções por *Leishmania* é CD200 (CORTEZ *et al.*, 2011; SAUTER *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2018).

1.9.Glicoproteína imunomoduladora CD200

O sistema imune inato e adaptativo precisam ser adequados e controlados, evitando assim uma resposta exacerbada e desenfreada, importante para manter a homeostase do organismo. Para isso é essencial que haja mecanismos ativadores e inibidores durante a regulação do sistema imunológico. CD200 e seu receptor (CD200R) fazem parte dos moduladores negativos responsáveis para tolerância do sistema imune, diferenciação, adesão, e quimiotaxia de várias células, entre outras funções (GANNAVARAM *et al.*, 2016; LIEW *et al.*, 2005).

CD200 é uma glicoproteína de membrana da superfamília das imunoglobulinas, expressas em muitos tipos celulares como células linfoides, neurônios e células endoteliais, mas está naturalmente ausente nos macrófagos (Tabela1). Essa glicoproteína imunomoduladora foi descrita na década de 80 e originalmente era conhecida como OX2 (BARCLAY *et al.*, 2002). CD200 possui um domínio citoplasmático curto com 19 aminoácidos e sem motivo de sinalização.

O receptor de CD200, CD200R, está na superfície de células da linhagem mielóide, logo, presente em macrófagos (WRIGHT *et al.*, 2000). Ao contrário de seu ligante, CD200R tem um domínio citoplasmático maior que CD200, com 67 aminoácidos contendo três resíduos de tirosina (WRIGHT *et al.*, 2000). Diferente de outras vias inibitórias, CD200/CD200R não sinalizam a inibição do imunorreceptor baseado em tirosina (ITIMs) com recrutamento de fosfatases (MIHRSHAHI; BARCLAY; BROWN, 2009; MIHRSHAHI; BROWN, 2010a).

Tabela 1. Distribuição de CD200 e CD200R na membrana de diferentes tipos celulares.

Tipo celular	CD200	CD200R
Timócitos	+	-
Células T	+/-	-
Células T ativadas	+	+/-
Células B	+	-
Células B ativadas	+/-	-
Células dendríticas	+/-	+
Monócitos/Macrófagos	-	+
Células endoteliais	+	-
Neurônios	+	-
Plaquetas	-	ND
Eritrócitos	-	-

+: presente; -: ausente; +/-: pouco ou variável entre espécies; ND: não determinado

Tabela adaptada de Barclay *et al.*, 2002

Quando CD200 se liga ao seu receptor (**Figura 8**), CD200R ativado sofre fosforilação dos resíduos de tirosina em seu domínio citoplasmático, recrutando Dok2, uma proteína adaptadora (do inglês, *downstream of tyrosine kinase 2*) (MIHRSHAHI; BARCLAY; BROWN, 2009; MIHRSHAHI; BROWN, 2010b).

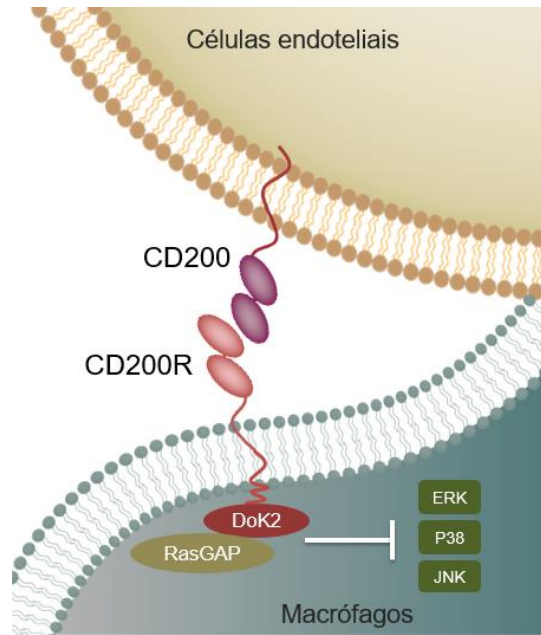


Figura 8. Representação da imunomodulação de CD200/CD200R. CD200 ao se ligar ao CD200R, ocorre a fosforilação dos resíduos de tirosina presentes no domínio citoplasmático do receptor. Conseqüente, a proteína Dok2 é recrutada e se liga à terceira fosfotirosina ativando a proteína RasGAP. RasGAP ativada inibe a via de ERK, p38 e JNK, e a produção de citocinas pró-inflamatórias. Figura baseada de Rygiel & Meyaard 2012.

Em seguida Dok2 fosforila GTPase de Ras (RasGAP, do inglês *Ras GTPase-activating protein*) que bloqueia ERK, (e as proteínas quinase ativadas por mitógeno p38 e c-Jun N-terminal quinase (JNK, do inglês *JUN N-terminal kinase*) (HUSSELL; BELL, 2014).

A interação CD200/CD200R é uma das vias inibitórias que tem sido estudada devido à sua ocorrência em muitos processos biológicos (REN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2019; ZHANG; HE; ZHANG, 2019). A modulação de CD200 e CD200R pode acontecer pós-traducional, com a fosforilação de CD200R ou pela regulação da expressão gênica de CD200 ou de CD200R (GANNAVARAM *et al.*, 2016).

A função de CD200 e seu receptor já tem sido descrita em processos biológicos no sistema nervoso central (SNC), a via CD200/CD200R controla a ativação dos macrófagos da região, as microglias. CD200 está presente na superfície de neurônios e ao interagir com CD200R, ativa a via inibitória. Quando não há CD200, as microglias permanecem ativadas causando uma agregação celular e ocasionando inflamação e neurodegeneração. Desse modo, a via CD200/CD200R parece ter papel na proteção de doenças inflamatórias e autoimunes (HOEK *et al.*, 2000).

Na osteoclastogênese, macrófagos se fundem e expressam CD200 para a diferenciação em osteoclastos. Osteoclastos são importantes na manutenção óssea

como absorver, degradar e remodelar os ossos. Portanto, quando não há expressão de CD200, há interferência direta no processo de osteogênese, devido à diminuição da diferenciação em osteoclastos. Isso tende a ocasionar um desequilíbrio e acúmulo da massa óssea, além de outras disfunções ósseas relacionadas com a expressão de CD200 (CUI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2006; REN *et al.*, 2014; VARIN *et al.*, 2013).

A via CD200/CD200R também está relacionada com respostas antitumorais, podendo estimular ou suprimir o sistema imune, promovendo a formação de metástase e desenvolvimento de tumores. Durante a supressão, além do tumor, a expressão de CD200 em células saudáveis também pode regular a resposta antitumoral. Assim, a expressão de CD200 e CD200R são importantes alvos para o tratamento anticancerígeno (ERIN *et al.*, 2014, 2018; GORCZYNSKI *et al.*, 2010, 2011, 2013; RYGIEL *et al.*, 2012; RYGIEL; MEYAARD, 2012; ZHANG; HE; ZHANG, 2019).

Outro aspecto que tem sido explorado é a relação de CD200/CD200R e casos de aborto espontâneo no primeiro trimestre de gravidez. A comparação entre mulheres com gestação normal e as que sofreram aborto, observa-se uma diminuição de CD200 e de CD200R nas células do endométrio. Com isso, uma das suspeitas é que a diminuição da expressão dessas glicoproteínas possa estar relacionada ao aborto espontâneo (WANG *et al.*, 2019).

Há, também, indícios de que algumas patogêneses infecciosas estejam relacionadas com a expressão de CD200/CD200R. Muitos patógenos regulam essa via inibitória de modo a garantir a sua sobrevivência e o sucesso infectivo (VAINE; SOBERMAN, 2014), como bactérias (CHEN; MARSDEN; GORCZYNSKI, 2009) vírus (KARNAM *et al.*, 2012) e protozoários (CORTEZ *et al.*, 2011; DECKERT *et al.*, 2006).

Camundongos deficientes para o receptor de CD200 e infectados por citomegalovírus murino têm grande imunidade antiviral mediada por células T CD4⁺. A via CD200/CD200R promove a persistência do vírus nas mucosas dos animais. Durante a infecção, células que possuem CD200, ao interagir com seu receptor leva a um sinal inibitório que permite a continuidade do vírus (STACK *et al.*, 2015).

Em infecções por *Neisseria meningitidis*, as células do hospedeiro induzem CD200 regulando a ativação de macrófagos para se proteger da infecção sistêmica (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2010).

O parasito *Toxoplasma gondii* induz o aumento de CD200 nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e de CD200R na superfície de microglias. Estudos

mostraram que na ausência de CD200, as células microgлияis tiveram aumento na sua ativação, proliferação e expressão do MHC tipo II, TNF- α e iNOS durante a infecção crônica por *T. gondii*. Ao comparar esses animais deficientes de CD200 com camundongos selvagens, observa-se um aumento da carga parasitária e mortalidade (DECKERT *et al.*, 2006).

Além dos aspectos previamente abordados, a regulação da expressão de CD200 e seu receptor foi investigada em infecções causadas por *Leishmania* (CORTEZ *et al.*, 2011; GANNAVARAM *et al.*, 2016; SAUTER *et al.*, 2019; SILVEIRA, 2019; SINGH *et al.*, 2018), o que será discutido no próximo tópico.

1.10. CD200 e *Leishmania*

Um dos primeiros estudos que mostrou a relação de CD200 e *Leishmania* foi conduzido em 2011 por Cortez e colaboradores. Um achado significativo do trabalho foi o fato de que macrófagos eram capazes de induzir a expressão de CD200 quando infectados por *L. (L.) amazonensis*. Simultaneamente, a expressão de CD200 prejudicava a resposta leishmanicida dos macrófagos, garantindo a sobrevivência intracelular do parasito. Ou seja, macrófagos infectados expressam CD200 e concomitantemente a isso, há inibição da expressão de iNOS e a consequente produção de NO, o que favorece a multiplicação do parasito (CORTEZ *et al.*, 2011).

Aparentemente, a expressão de CD200 está relacionada com o parasito virulento. Porém, nem todas as espécies de *Leishmania* induzem a expressão de CD200. Nas infecções por *L. (L.) major*, por exemplo, que também causa a doença cutânea branda em camundongos C57Bl/6, não é observado CD200 nos macrófagos infectados e nem a proliferação do parasito. Contudo, quando esses macrófagos infectados são tratados com CD200 exógeno, *L. (L.) major* se torna tão virulenta quanto *L. (L.) amazonensis* (CORTEZ *et al.*, 2011).

Essa associação entre a expressão de CD200 e a infecção é confirmada quando camundongos deficientes para CD200 apresentam um quadro de resistência à infecção (CORTEZ *et al.*, 2011).

Todavia, é importante salientar que esse estudo mostra que a expressão de CD200 é observada na primeira hora de infecção dos macrófagos pela forma amastigota de *L. (L.) amazonensis*. Isso pode indicar que a indução de CD200 pode estar relacionada à forma amastigota do parasito durante a adesão e fagocitose pelo macrófago. Além disso, outros receptores também podem estar participando do

reconhecimento da *Leishmania* e os mecanismos de indução da expressão de CD200 ainda continuavam desconhecidos.

Em 2019, Sauter e Colaboradores contribuíram com um estudo pioneiro, mostrando que a indução da expressão de CD200 nos macrófagos infectados por amastigotas de *L. (L.) amazonensis* ocorria devido à fagocitose do parasito viável, seguida da ativação da sinalização endossômica via TLR9 dependentes da proteína adaptadora tipo MyD88 (MAL, do inglês *MyD88-adaptador-like protein*) e a proteína adaptadora TRIF (do inglês *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*). Além disso, os autores demonstraram também que microvesículas contendo DNA do parasito ativam a indução da expressão de CD200 dependente de TLR9, inibindo iNOS e a produção de NO. Assim, *L. (L.) amazonensis* explora a via de sinalização TLR9 para inibir a resposta leishmanicida do macrófago e, conseqüentemente, a resposta sistêmica do hospedeiro (SAUTER *et al.*, 2019)

O estudo de revisão feita por Silveira, em 2019, comparando diferenças clínicas e imunopatológicas entre doentes acometidos pela forma cutânea anérgica difusa e doentes com a forma mucocutânea de leishmaniose no Brasil corroboram com os dados apresentados por Sauter e colaboradores. Os resultados dessa revisão mostram que a infecção por *L. (L.) amazonensis* está diretamente associada à resposta dos receptores TLR9 na mediação dos antígenos do parasito com a resposta imune inata, principalmente nos casos clínicos de leishmaniose cutânea anérgica difusa(SILVEIRA, 2019).

Singh e colaboradores em 2018 relacionaram a via inibitória CD200/CD200R com espécie de *Leishmania* causadora da LV. A virulência de *L. (L.) donovani* também está relacionada com a expressão de CD200, uma vez que células dendríticas infectadas com a forma promastigota do parasito deficiente para o gene centrina, proteína importante para divisão celular, não induziam a expressão de CD200 e o parasito não proliferava. Diferente do que foi observado nas infecções com o parasito selvagem(SINGH *et al.*, 2018). Assim, com a expressão de CD200 afetada houve modulação negativa da via CD200/CD200R. Além disso, infecções com parasitos deficientes geravam um perfil predominante Th1, que promovia uma proteção contra o desafio virulento, parasito selvagem. A regulação negativa de CD200/CD200R durante a infecção pelo parasito deficiente, promoveu a proliferação de células TCD4⁺ gerando citocinas pró-inflamatórias. Camundongos C57Bl/6 infectados com parasito selvagem e tratados com anti-CD200 tiveram redução tanto de células Treg

produtoras de IL-10 quanto da carga parasitária, restringindo o perfil Th2. Já nos camundongos infectados com parasito deficiente e tratados com anti-CD200, houve melhora na resposta induzida Th1 e redução na carga parasitária do baço após o desafio virulento(SINGH *et al.*, 2018).

Nosso grupo de pesquisa já tinha dados sobre a expressão de CD200 em infecções por *L. (L.) infantum chagasi*. Em 2015, Bressan em sua dissertação mostrou que macrófagos infectados por promastigota de *L. (L.) infantum chagasi* expressavam CD200 em 120 horas após a infecção, mas apesar disso, o parasito não proliferava (BRESSAN, 2015).

Nesse sentido, o presente trabalho trata-se de uma continuação da investigação do papel de CD200 nas infecções de macrófagos por *L. (L.) infantum chagasi*. A hipótese é que a expressão induzida por *L. (L.) infantum chagasi* esteja relacionada com a inibição da resposta leishmanicida do macrófago via iNOS/NO. Isto é, será que o mesmo mecanismo observado nas infecções por *L. (L.) amazonensis*, acontece nas infecções por *L. (L.) infantum chagasi*?

Assim, julgamos que este estudo é de grande relevância para o conhecimento de um dos mecanismos de evasão da espécie de *Leishmania* causadora da forma mais grave e fatal de leishmaniose no Brasil.

6. Conclusões

Os resultados deste trabalho permitem concluir que durante o processo de infecção por promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, o parasito induz a expressão de CD200 no macrófago a partir de 24 horas de infecção e esta expressão é crescente ao longo da infecção. Uma vez expresso, CD200 pode estar se ligando a CD200R, já que neste momento é observado uma diminuição proteica do mesmo, indicando a sua ativação.

Concluimos também que *L. (L.) infantum chagasi* não é capaz de proliferar no interior do macrófago, independentemente se a infecção for com altos MOIs ou células extraídas do baço, mas também não é eliminado pela célula. Além disso, quando os macrófagos são pré-ativados, *L. (L.) infantum chagasi* resiste no interior destas células e com a inibição da produção de NO pela célula, não é favorecido a proliferação do parasito.

Por fim, o bloqueio ou a adição de CD200 exógeno não interferiu na proliferação e/ou na sobrevivência de *L. (L.) infantum chagasi* dentro do macrófago.

Encerramos este trabalho com uma reflexão de que a expressão de CD200 nos macrófagos infectados por *L. (L.) infantum chagasi* pode não ter um papel para o estabelecimento ou desenvolvimento da infecção e com nossas hipóteses: como observado, CD200 não interfere nas infecções *in vitro*, e talvez, a expressão aumentada de CD200 possa estar correlacionada à atividade inibitória para outras células que estejam chegando no processo de infecção ou ainda, este ligante pode estar associado com uma reprogramação dos macrófagos infectados para a posterior migração de *L. (L.) infantum chagasi* em direção aos órgãos atingidos durante a leishmaniose visceral.

7.Referências

- ACESTOR, N. et al. Resistance to Oxidative Stress Is Associated with Metastasis in Mucocutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 8, p. 1160–1167, 2006.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, mar. 2016.
- ALMEIDA, M. C. DE et al. Leishmanial Infection : Analysis of its First Steps . A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 861–870, 2003.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 61, n. 05, p. 223–274, 2006.
- ANVERSA, L. S. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- ASHOK, D.; ACHA-ORBEA, H. Timing is everything : dendritic cell subsets in murine Leishmania infection. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 10, p. 499–507, 2014.
- BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, v. 64, 2007.
- BARCLAY, A. N. et al. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 6, p. 285–290, 2002.
- BELKAID, Y.; BUTCHER, B.; SACKS, D. L. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in Leishmania-infected cells. **European journal of immunology**, v. 28, n. 4, p. 1389–1400, 1998.
- BESTEIRO, S. et al. Protein turnover and differentiation in Leishmania. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063–1075, 2007.
- BEZERRA, J. M. T. et al. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. 1–19, 2018.
- BISGIN, A. et al. Interaction of CD200 Overexpression on tumor cells with cd200r1 overexpression on stromal cells: An escape from the host immune response in rectal cancer patients. **Journal of Oncology**, v. 2019, 2019.
- BLACKWELL, J. M. et al. ROLE OF LSH IN REGULATING MACROPHAGE PRIMING/ACTIVATION. **Research in Immunology**, v. 140, p. 798–805, 1984.
- BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde.** [s.l.: s.n.].
- BRESSAN, A. DA S. **Expressão da proteína imunomodulatória CD200 em macrófagos murinos com Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.** [s.l.] Univerdade de São Paulo, 2015.
- BRITTINGHAM, A.; MOSSER, D. M. Exploitation of the Complement System by Leishmania Promastigotes C3b. **Parositology Toddy**, v. 12, p. 444–447, 1996.
- BRUSCHI, F.; GRADONI, L. **The leishmaniases: Old neglected tropical diseases.** [s.l.: s.n.].

- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.
- CASERTA, S. et al. Chronic Infection Drives Expression of the Inhibitory Receptor CD200R , and Its Ligand CD200 , by Mouse and Human CD4 T Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35466, 2012.
- CHEN, L. et al. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 109–118, 2005.
- CHEN, Z. et al. Cell membrane-bound CD200 signals both via an extracellular domain and following nuclear translocation of a cytoplasmic fragment. **Leukemia Research**, v. 69, n. December 2017, p. 72–80, 2018.
- CHEN, Z.; MARSDEN, P. A.; GORCZYNSKI, R. M. Role of a distal enhancer in the transcriptional responsiveness of the human CD200 gene to interferon-gama and tumor necrosis factor- alfa. **Molecular Immunology**, v. 46, p. 1951–1963, 2009.
- CHRISTENSEN, S. M. et al. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 1–23, 2018.
- CHRUSCIAK-TALHARI, A. et al. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 255–260, 2011.
- COLMENARES, M. et al. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. S3–S7, 2002.
- COPLAND, D. A. et al. Monoclonal antibody-mediated CD200 receptor signaling suppresses macrophage activation and tissue damage in experimental autoimmune uveoretinitis. **American Journal of Pathology**, v. 171, n. 2, p. 580–588, 2007.
- CORTEZ, M. et al. *Leishmania* promotes its own virulence by inducing expression of the host immune inhibitory ligand CD200. **Cell Host and Microbe**, v. 9, n. 6, p. 463–471, 2011.
- COURRET, N. et al. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 11, p. 2303–2316, 2002.
- CRUZ-MACHADO, S. DA S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFκB. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40–43, 2012.
- CUI, W. et al. CD200 and its receptor, CD200R, modulate bone mass via the differentiation of osteoclasts. **PNAS**, v. 104, p. 14436–14441, 2007.
- DA ROCHA, I. C. M. et al. Effectiveness of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Surveillance and Control Programme in reducing the prevalence and incidence of *Leishmania infantum* infection. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 586, 2018.
- DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites and Vectors**, v. 2, n. SUPPL.1, p. 1–8, 2009.
- DAVIES, L. C. et al. Tissue-resident macrophages. **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 986–995, 2013.
- DE MORAIS-TEIXEIRA, E. et al. In vitro interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World *Leishmania* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p. 150–154, 2014.
- DE PITA-PEREIRA, D. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**,

v. 107, n. 1, p. 66–69, 2008.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

DECKERT, M. et al. Regulation of microglial cell responses in murine Toxoplasma encephalitis by CD200 / CD200 receptor interaction. **Acta Neuropathol**, v. 111, p. 548–558, 2006.

DICK, A. D.; BANERJEE, D. Blocking CD200-CD200 receptor axis augments NOS-2 expression and aggravates experimental autoimmune uveoretinitis in Lewis rats. **Ocular immunology and inflammation**, v. 12, n. 2, p. 115–25, 2004.

ERIN, N. et al. Bidirectional effect of CD200 on breast cancer development and metastasis , with ultimate outcome determined by tumor aggressiveness and a cancer-induced inflammatory response. **Oncogene**, v. 34, p. 3860–3870, 2014.

ERIN, N. et al. CD200fc enhances anti-tumoral immune response and inhibits visceral metastasis of breast carcinoma. **Oncotarget**, v. 9, n. 27, p. 19147–19158, 2018.

ESCOBAR, P. et al. Sensitivities of Leishmania species to (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, v. 81, p. 151–157, 2002.

EZEKOWITZ, R. A. B.; GORDON, S. Interaction and regulation of macrophage receptors. In: **Biochemistry of macrophages**. p. 127–136, 2006.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 1, p. 71–80, 2004.

FERREIRA, T. C. DA S. **Relevance of multi-species phenotypic assays in Leishmania early drug discovery**. [s.l.] UNICAMP, 2019.

GANNAVARAM, S. et al. Modulation of innate immune mechanisms to enhance Leishmania vaccine-induced immunity: Role of coinhibitory molecules. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. MAY, p. 1–10, 2016.

GANTT, K. R. et al. Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of Leishmania chagasi. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 893–901, 2001.

GAUTAM, S. et al. CD8 T Cell Exhaustion in Human Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, p. 290–99, 2014.

GORAK, P. M. A.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells , but not macrophages , produce IL-12 immediately following Leishmania donovani infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 687–695, 1998.

GORCZYNSKI, R. M. et al. Breast cancer cell CD200 expression regulates immune response to EMT6 tumor cells in mice. **Breast Cancer Res Treat**, v. 123, p. 405–415, 2010.

GORCZYNSKI, R. M. et al. Role of CD200 expression in regulation of metastasis of EMT6 tumor cells in mice. **Breast Cancer Res Treat**, v. 130, p. 49–60, 2011.

GORCZYNSKI, R. M. et al. Cure of metastatic growth of EMT6 tumor cells in mice following manipulation of CD200 : CD200R signaling. **Breast Cancer Res Treat**, v. 142, p. 271–282, 2013.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953–964, 2005.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: Implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.

GRADONI, L. A brief introduction to leishmaniasis epidemiology. **The Leishmaniases: Old**

Neglected Tropical Diseases, p. 1–13, 2018.

GREEN, P. J. et al. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of Leishmania parasites by the human serum mannan-binding protein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 66, p. 319–328, 1994.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **PNAS**, v. 106, p. 6748–6753, 2009.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. **Adv Appl Microbiol.**, v. 82, p. 155–184., 2013.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of Leishmania with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 332–334, 2002.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011.

HOEK, R. M. et al. Down-Regulation of the Macrophage Lineage Through Interaction with OX2 (CD200). **Science**, v. 290, p. 1768–1771, 2000.

HURDAYAL, R.; BROMBACHER, F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. **Immunology Letters**, 2014.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different Leishmania Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in Parasitology**, v. 32, p. 392–401, 2016.

HUSSELL, T.; BELL, T. J. Alveolar macrophages : plasticity in a tissue-specific context. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 81–93, 2014.

IBGE. **Síntese de indicadores sociais: Uma análise das condições de vida da população brasileira 2018**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [s.l.: s.n.].

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, 2006.

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

KARNAM, G. et al. CD200 Receptor Controls Sex-Specific TLR7 Responses to Viral Infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, p. 1–8, 2012.

KATARA, G. K. et al. Foxp3 and IL-10 Expression Correlates with Parasite Burden in Lesional Tissues of Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e1171, 2011.

KAUFER, A. et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2017.

KAUTZ-NEU, K. et al. Dendritic cells in Leishmania major infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. **Med Microbiol Immunol**, p. 581–592, 2012.

KAYE, P. M. et al. Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages ". **Eur. J. Immunol.**, v. 24, p. 2850–2854, 1994.

KAYE, P. M.; BANCROFT, G. J. Leishmania donovani Infection in scid Mice : Lack of Tissue Response and In Vivo Macrophage Activation Correlates with Failure To Trigger Natural Killer Cell-Derived Gamma Interferon Production In Vitro. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 60, p. 4335–4342, 1992.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KIMBLIN, N. et al. Quantification of the infectious dose of Leishmania major transmitted to the skin by single sand flies. **PNAS**, v. 105, p. 10125–10130, 2008.

- KLOEHN, J. et al. Characterization of Metabolically Quiescent Leishmania Parasites in Murine Lesions Using Heavy Water Labeling. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 1–20, 2015.
- LAI, G. N. et al. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, 2008.
- LAPARA, N. J.; KELLY, B. L. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with Leishmania. **Journal of Inflammation**, v. 7, p. 1–9, 2010.
- LASKAY, T.; ZANDBERGEN, G. VAN; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes ? **TRENDS in Microbiology**, v. 11, p. 210–214, 2003.
- LAURENTI, M. D. et al. The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host – parasite interaction in hamsters inoculated with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Int. J. Exp. Path.**, v. 77, p. 15–24, 1996.
- LAURENTI, M. D. et al. The role of complement in the early phase of Leishmania (Leishmania) amazonensis infection in BALB / c mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 427–434, 2004.
- LAWYER, P. G. et al. Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). **Journal of medical entomology**, v. 24, n. 3, p. 347–355, 1987.
- LEE, L. et al. A role for the immunomodulatory molecules CD200 and CD200R in regulating bone formation. **Immunology Letters**, v. 105, p. 150–158, 2006.
- LEIRIÃO, P. et al. Survival of protozoan intracellular parasites in host cells. **EMBO reports**, v. 5, n. 12, p. 1142–1147, 2004.
- LIEW, F. Y. et al. NEGATIVE REGULATION OF TOLL - LIKE RECEPTOR-MEDIATED IMMUNE RESPONSES. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. June, p. 446–458, 2005.
- LINSLEY, P. S. et al. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) Bind with Similar Avidities but Distinct Kinetics to CD28 and CTLA-4 Receptors. **Immunity**, v. 1, p. 793–801, 1994.
- LIPOLDOVÁ, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **NATURE REVIEWS GENETICS**, v. 7, p. 294–305, 2006.
- LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 2, p. 1–8, 2012.
- LIU, J.-Q. et al. A Critical Role for CD200R Signaling in Limiting the Growth and Metastasis of CD200 + Melanoma . **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 4, p. 1489–1497, 2016.
- LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophage Activation and Polarization as an Adaptive Component of Innate Immunity. In: **Advances in Immunology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 120p. 163–184.
- LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero Phlebotomus existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, n. 1, p. 84–95, 1912.
- LUTZ, M. B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of Immunological Methods**, v. 223, p. 77–92, 1999.
- MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania braziliensis in Brazil: A randomized and controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–6, 2010.
- MANDAL, A. et al. L-Arginine uptake by cationic amino acid transporter promotes intra-macrophage survival of Leishmania donovani by enhancing arginase-mediated polyamine synthesis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUL, p. 1–21, 2017.
- MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim.**

Sci., v. 50, n. 5, p. 341–352, 2013.

MCCONVILLE, M. J. et al. Leishmania carbon metabolism in the macrophage phagolysosome- feast or famine? **F1000Research**, v. 4, p. 938, 2015.

MCCONVILLE, M. J.; NADERER, T. Metabolic Pathways Required for the Intracellular Survival of *Leishmania*. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 543–561, 2011.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MESQUITA, J. T. et al. Activity of imidazole compounds on *Leishmania (L.) infantum chagasi*: Reactive oxygen species induced by econazole. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 389, n. 1–2, p. 293–300, 2013.

MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A. G.; REIMÃO, J. Q. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime®, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 112–116, 2014.

MIHRSHAHI, R.; BARCLAY, A. N.; BROWN, M. H. Essential Roles for Dok2 and RasGAP in CD200 Receptor-Mediated Regulation of Human Myeloid Cells. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 8, p. 4879–4886, 2009.

MIHRSHAHI, R.; BROWN, M. H. Dok1 and Dok2 play opposing roles in CD200R signaling1. **J Immunol.**, v. 185, p. 7216–7222, 2010a.

MIHRSHAHI, R.; BROWN, M. H. Downstream of Tyrosine Kinase 1 and 2 Play Opposing Roles in CD200 Receptor Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 12, p. 7216–7222, 2010b.

MILLER, M. A. et al. Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33883–33889, 2000.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 286–296, 2011.

MUKHERJEE, A. K. et al. Amphotericin B regulates the host immune response in visceral leishmaniasis: Reciprocal regulation of protein kinase C isoforms. **Journal of Infection**, v. 61, n. 2, p. 173–184, 2010.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Immune Inhibitory Ligand CD200 Induction by TLRs and NLRs Limits Macrophage Activation to Protect the Host from Meningococcal Septicemia. **Cell Host & Microbe**, v. 8, p. 236–247, 2010.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Formation of distinct chromatin conformation signatures epigenetically regulate macrophage activation. **International Immunopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 7–11, 2014.

MURAILLE, E.; LEO, O.; MOSER, M. Th1/Th2 paradigm extended: Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, p. 1–13, 2014.

MURPHY, M. L. et al. Blockade of CTLA-4 Enhances Host Resistance to the Intracellular Pathogen, *Leishmania donovani*. **The Journal of Immunology**, v. 161, p. 4153–4160, 1998.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301–308, 2008.

NAGASE, H. et al. Despite Increased CD4 + Foxp3 + Cells within the Infection Site, BALB/c IL-4 Receptor-Deficient Mice Reveal CD4 + Foxp3-Negative T Cells as a Source of IL-10 in *Leishmania major* Susceptibility . **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2435–2444, 2007.

NEVES, L. O. et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate ,

pentamidine and amphotericin B for the treatment of cuta-. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, 2011.

OPAS/OMS. **Informe Epidemiológico das Américas 2018 -ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE**, 2018. Disponível em: <www.paho.org>

OUALHA, R. et al. Infection of human neutrophils with leishmania infantum or leishmania major strains triggers activation and differential cytokines release. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–16, 2019.

PAKPOUR, N.; ZAPH, C.; SCOTT, P. The Central Memory CD4 + T Cell Population Generated during Leishmania major Infection Requires IL-12 to Produce IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 12, p. 8299–8305, 2008.

PARIDAH, M. . et al. **Visceral Leishmaniasis and Natural Infection Rates of Leishmania in Lutzomyia longipalpis in Latin America**. [s.l: s.n.].

PEARSON, R. D. et al. Differential survival of Leishmania donovani amastigotes in human monocytes. **THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY**, 1983.

PÉREZ-CABEZAS, B. et al. Understanding Resistance vs. Susceptibility in Visceral Leishmaniasis Using Mouse Models of Leishmania infantum Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. March, p. 1–14, 2019.

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

RANGEL, E. F. **Brazilian Sand Flies**. [s.l: s.n.].

REINER, N. E. et al. Kinetics of γ interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in Leishmania-infected macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, p. 4330–4334, 1988.

REN, Y. et al. Aberrant CD200 / CD200R1 expression and its potential role in Th17 cell differentiation , chemotaxis and osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. **RHEUMATOLOGY**, v. 54, p. 721–721, 2014.

REVIE, D.; SALAHUDDIN, S. Z. Role of macrophages and monocytes in hepatitis C virus infections. **World J Gastroenterol** 2014, v. 20, n. 11, p. 2777–2784, 2014.

REXIN, P. et al. The Immune Checkpoint Molecule CD200 Is Associated with Tumor Grading and Metastasis in Bladder Cancer. **Anticancer Research**, v. 38, n. 5, p. 2749–2754, 2018.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate Leishmania major Infection . **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 7, p. 4454–4462, 2004.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D.; BEVERLEY, S. M. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. May, p. 1–8, 2012.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292–297, 2000.

ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463–467, 2004.

ROMAO, S. et al. The cytosolic trypanothione of Leishmania infantum is essential for parasite survival. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 6, p. 703–711, 2009.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, 2010.

RYGIEL, T. P. et al. CD200-CD200R signaling suppresses anti-tumor responses independently of CD200 expression on the tumor. **Oncogene**, v. 31, n. 24, p. 2979–2988, 2012.

RYGIEL, T. P.; MEYAARD, L. CD200R signaling in tumor tolerance and inflammation: A tricky balance. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 2, p. 233–238, 2012.

- SACKS, D.; KAMHAWI, S. MOLECULAR ASPECTS OF PARASITE-VECTOR AND VECTOR-HOST INTERACTIONS IN LEISHMANIASIS. n. 2, 2001.
- SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an Infective Stage of *Leishmania* Promastigotes. **Science**, v. 223, n. March, p. 1417–1419, 1984.
- SANTOS, J. L. et al. Differential Sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) Macrophages to the Stimuli of IFN- γ /LPS for the Production of NO: Correlation with iNOS mRNA and Protein Expression . **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 26, n. 9, p. 682–688, 2006.
- SANTOS, V. C. et al. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): PH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 17, p. 2792–2798, 2008.
- SARI, F. et al. High serum soluble CD200 levels in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. **Journal of Investigative Medicine**, v. 65, n. 4, p. 784–786, 2017.
- SAUTER, I. P. et al. TLR9 / MyD88 / TRIF signaling activates host immune inhibitory CD200 in *Leishmania* infection. **JCI Insight**, v. 4, 2019.
- SCHMID, M.; WEGE, A. K.; RITTER, U. Characteristics of “Tip-DCs and MDSCs” and their potential role in leishmaniasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. MAR, p. 1–8, 2012.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ : 25 years of Image Analysis. **Nat Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, p. 581–592, 2016.
- SECUNDINO, N. et al. Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. **Cell Microbiol**, v. 86, n. 3, p. 906–918, 2010.
- SERAFIM, T. D. et al. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 548–555, maio 2018.
- SILVEIRA, F. T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniases so clinically and immunopathologically different ? A review in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 00, p. 1–12, 2019.
- SINGH, R. K. et al. Centrin-deleted *leishmania donovani* parasites help CD4 + T cells to acquire Th1 phenotype and multi-functionality through downregulation of CD200-CD200R immune inhibitory axis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, 2018.
- SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 5, p. 1065–1073, 2009.
- STACK, G. et al. CD200 Receptor Restriction of Myeloid Cell Responses Antagonizes Antiviral Immunity and Facilitates Cytomegalovirus Persistence within Mucosal Tissue. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1–20, 2015.
- STAERCK, C. et al. Microbial antioxidant defense enzymes. **Microbial Pathogenesis**, 2017.
- STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.
- STRAUSS, R. R. Association of some metabolic activities of leukocytes with the immune response. In: **MACROPHAGES AND LYMPHOCYTES Nature, Functions, and Interaction**. [s.l.: s.n.]. p. 2–19.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2005.
- TAYLOR, P. R. et al. Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine

- myeloid cell heterogeneity ex vivo. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 8, p. 2090–2097, 2003.
- TEO, Z. P.; HUGHES, D. The Role of Macrophages in Apoptosis : Initiator , Regulator , Scavenger. **Reviews in Undergraduate Research**, v. 2, p. 7–11, 2003.
- ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: Present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464–480, 2018.
- VAINE, C. A.; SOBERMAN, R. J. **The CD200–CD200R1 Inhibitory Signaling Pathway**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 121
- VALLEJO, A. et al. High levels of CD4 + CTLA-4 + Treg cells and CCR5 density in HIV-1-infected patients with visceral leishmaniasis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 34, p. 267–75, 2014.
- VARIN, A. et al. CD200R / CD200 Inhibits Osteoclastogenesis : New Mechanism of Osteoclast Control by Mesenchymal Stem Cells in Human. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72831, 2013.
- WADHONE, P. et al. Miltefosine Promotes IFN- γ -Dominated Anti-Leishmanial Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 11, p. 7146–7154, 2009.
- WANG, L. et al. Decreased expression of CD200 and CD200R1 by human decidual tissues in spontaneous early abortion. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2019.
- WHO. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development**. [s.l.: s.n.].
- WHO. **Recognizing neglected tropical diseases through changes on the skin: a training guide for front-line health workers**. Geneva: World Health Organization, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/resources/9789241513531/en/>
- WONG, K. K. et al. Soluble CD200 is critical to engraft chronic lymphocytic leukemia cells in immunocompromised mice. **Cancer Research**, v. 72, n. 19, p. 4931–4943, 2012.
- WRIGHT, G. J. et al. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. **Immunity**, v. 13, n. 2, p. 233–242, 2000.
- YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp . Biosynthesis , regulation of expression , and function. **Elsevier Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 132, p. 1–16, 2003.
- ZHANG, Y.; HE, W.; ZHANG, S. Seeking for Correlative Genes and Signaling Pathways With Bone Metastasis From Breast Cancer by Integrated Analysis. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1–13, 2019.