



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro

**Caracterização celular e imunológica da
interação células dendríticas- *Leishmania
braziliensis***

Tatiana María Giraldo Jaramillo

Brasília, DF

2014



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro

**Caracterização celular e imunológica da
interação células dendríticas- *Leishmania
braziliensis***

Tatiana María Giraldo Jaramillo

Orientador: Dr. Jaime Martins de Santana

Co-orientadora: Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Patologia Molecular
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Patologia Molecular**

Brasília, DF

2014

Aos meus pais e irmão
Elizabeth Jaramillo R. e Gustavo Giraldo C.
David Giraldo J.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador, professor Jaime Santana, pela oportunidade e orientação.

Agradeço à minha co-orientadora, professora Cecília Favali, pela orientação, ensino, apoio e compreensão.

Agradeço às professoras Izabella Dourado, Carla Nunes e Flávia Nader do Laboratório Interação Patógeno- Hospedeiro pela disposição e atenção.

Agradeço ao pessoal do Laboratório Biologia do Gene pela colaboração.

Agradeço à secretaria da Pós-Graduação em Patologia molecular pela prestatividade.

Agradeço às agências de fomento PRONEX/FAPDF-CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço a Deus por me permitir viver esse desafio, rodeada de pessoas maravilhosas.

Agradeço infinitamente aos meus pais e irmão, pelo amor e apoio incondicional apesar da distância.

Agradeço aos meus avós, tios, primos pelo apoio constante.

Agradeço a minha amiga Maritza pela amizade e convivência.

Agradeço ao Hernán, Glória, Laura, Juan, Catalina e Jorge pela hospitalidade na minha chegada ao Brasil e pelos momentos de risadas, diversão e aventuras.

Agradeço aos meus caros amigos do laboratório, Brina, Raquel, Paula, Camila, Graziela, Cissé, Hugo e Jhonata, por compartilharem seus conhecimentos e contribuírem para meu aprendizado. Obrigada por fazer meus dias de trabalho muito alegres. Ficarão no meu coração.

Obrigada a todos por fazer parte dessa experiência inesquecível.

" Não existe nenhum caminho lógico para a descoberta das leis elementares do universo – o único caminho é o da intuição"

Albert Einstein

RESUMO

A infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem um amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas. Uma variedade de células estão envolvidas na defesa do hospedeiro contra o parasito. Entre elas, as células dendríticas (DCs) são elementos chaves para o sistema imune, pois atuam como sentinelas na periferia e alertam os linfócitos T do tipo do antígeno invasor, direcionando sua polarização e inicializando uma resposta imune. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a interação de células dendríticas humanas com *L. braziliensis*, já que, esse contato desencadeia estímulos para a produção de citocinas e moléculas co-estimulatórias envolvidas na resposta inflamatória, contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa protetora. Assim, monócitos humanos foram isolados a partir de células mononucleares de sangue periférico, purificados por separação magnética e colocados em cultura com IL-4 e GM-CSF para gerar DCs imaturas, as quais foram infectadas com promastigotas de *L. braziliensis* durante 12 e 24 h. As células foram caracterizadas por citometria de fluxo, usando os marcadores de superfície CD1a, HLA-DR, CD86 (B7-2) e DC-SIGN (CD209). Foi observada uma taxa de infecção de $46 \pm 3.5\%$ com $7,2 \pm 0.6$ amastigotas/DCs e $52.5 \pm 2.4\%$ com $6,1 \pm 1.6$ amastigotas/DCs após 12 e 24 h de cultura, respectivamente. Os marcadores de superfície revelaram uma porcentagem de expressão de 70,5% (CD1a), 87,9% (HLA-DR), 94% (CD86) e 97,5% (DC-SIGN) nas células não infectadas; e 71% (CD1a), 89,9% (HLA-DR), 98,3% (CD86) e 97% (DC-SIGN) para células infectadas após 24 h. Após 12 h de infecção não detectamos alterações no padrão de expressão de moléculas de superfície. A inibição da apoptose pode tanto favorecer a apresentação dos antígenos quanto a disseminação do parasito. Além disso, foram encontradas principalmente as citocinas IL-12p40 e TNF- α nos sobrenadantes das culturas, enquanto não detectamos as citocinas IL-10, IL-6, IL-1 β e TGF- β .

Palavras chave: Células dendríticas, *Leishmania*, Citometria de fluxo.

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis infection leads to a broad spectrum of clinical and immunological manifestations. A great variety of cells is involved in host defense against the parasite. Among those, dendritic cells (DCs) are key elements of the immune system, which acts as sentinels in the periphery and alert T lymphocytes about the type of invading antigen, addressing their polarization and initiating an early immune response. The aim of this work was study the interaction of human dendritic cells with *L. braziliensis*, this contact triggers stimuli for the production of cytokine and co-stimulatory molecules involved in the inflammatory response, contributing to the development of protective adaptive immune response. Thereby, monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells, subsequently purified by magnetic separation, and cultured with IL-4 and GM-CSF to generate immature DCs, which were infected with *L. braziliensis* promastigotes during 12 e 24 h. The cells where characterized by flow cytometry using surface markers CD1a, HLA-DR, CD86 and DC-SIGN. It was observed an infection rate of $46\pm 3.5\%$ with $7,140\pm 0.6$ amastigotes/DC and $52.50\pm 2.4\%$ with $6,1\pm 1.6$ amastigotes/DC 12 and 24 h post infection, respectively. The surface markers showed a percentage of expression of 70.5% (CD1a), 87.9% (HLA-DR), 94% (CD86) and 97.5% (DC-SIGN) in non-infected cells; and 71% (CD1a), 89.9% (HLA-DR), 98.3% (CD86) and 97% (DC-SIGN) in infected cells after 24 h infection. After 12 h of infection, we not detected differences of surface molecules expression. Moreover, cell death delay can either stimulate antigen- presentation or favor parasite dissemination. Additionally, the cytokines IL-12p40 and TNF- α were detected in the culture supernatants, whereas IL-10, IL-6, IL-1 β and TGF- β were not detected.

Key words: Dendritic cells; *Leishmania*; Flow cytometry.

LISTA DE ABREVIATURAS

CMSP: Células mononucleares de sangue periférico

CTL: Linfócitos T citotóxicos

DAT: *Aglutination rests*

DCs: Células dendríticas

DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DTH: *Delayed Type Hypersensitivity*

DTN: Doenças Tropicais Negligenciadas

FACS: Separação de células ativada por fluorescência

FADD: Domínio FAS associado a morte

FITC: Isocianato de fluoresceína

FSC: *Forward scatter*

GIPLs: Glicosilinositol fosfato

GM-CSF: Fator estimular de colônias de macrófagos e granulócitos

H&E: Hematoxilina e Eosina

HLA: Antígeno leucocitário humano

hPSCs: Células tronco hematopoiéticas

ICAM 2/3: Molécula de adesão intracelular 2/3

IgA: Imunoglobulina A

IL-10: Interleucina 10

IL-12p40: Interleucina p40

IL-12p70: Interleucina p70

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

iNOS: Sintase óxido nítrico induzível

LAM: Lipoglicano polimonsilado lipoarabinomanan

LB: *Lishmania braziliensis*

LPG: Lipofosfoglicano

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
LV: Leishmaniose Visceral
mAbs: Anticorpos monoclonais
MCP: Morte celular programada
mDCs: Células dendríticas de origem mieloide.
MFI: *Mean Fluorescence intensity*
MHC I/ II: Complexo principal de histocompatibilidade de classe I/ II
MST/ LST: Teste de Montenegro/ *Leishmania* Skin Test
MVBS: Corpos multi vesiculares
NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate- oxidase*
NETs: Redes extracelulares de neutrófilos
NF- κ B: Fator nuclear κ B
NK: Células *Natural Killer*
NO: Óxido nítrico
NOS₂: Óxido nítrico sintase
OMS: Organização Mundial da Saúde
OPS: Organização Panamericana da Saúde
PAMPs: Padrões moleculares associados ao patógeno
PBL: *Peripheral blood leukocytes*
PCR: *Polymerase chain Reaction*
pDCs: Células dendríticas de origem linfoide
PE: Ficoeritrina
PI: Iodeto de propídeo
PPAR- γ : Receptor gamma da atividade proliferadora do peroxissoma
PS: Fosfatidil serina
Q-PCR: *Real Time PCR*
RE: Reticulo endoplasmático
RIN: *RNA Integrity Number*
RML: Reação Mista de Linfócitos
ROS: Espécies reativas do oxigênio

rTNFR-1: Receptor 1 do fator de necroses tumoral

SFB: Soro Fetal bovino

SSC: *Side scatter*

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β : Fator de crescimento transformante beta

Th1: T auxiliador tipo I

Th2: T auxiliador tipo II

TIC: Imunocromatográfico

TIP-DCs: *TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells*

TLR: Receptores semelhantes a *toll*

TMB:3,3,5,5'- tetrametilbenzidina

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TRAIL: Receptor do ligante indutor da apoptose relacionado com o fator de necrose tumoral

Treg: Células T regulatórias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características estruturais das formas Promastigotas e Amastigotas de *Leishmania* sp.

Figura 2: Ciclo de vida da *Leishmania* sp. no hospedeiro vertebrado.

Figura 3: Ciclo de vida da *Leishmania* dentro do inseto vetor. Formas promastigotas: 1- amastigotas; 2- procíclico; 3- nectomonas; 4- heptomonas; 5- leptomonas; 6- metacíclico.

Figura 4: Modelo de resposta Th1/ Th2 em camundongo

Figura 5: Purificação de monócitos

Figura 6: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão do marcador de superfície CD1a de células dendríticas 12h depois da interação com *L. braziliensis*.

Figura 7: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão do marcador de superfície CD1a de células dendríticas 24h depois da interação com *L. braziliensis*.

Figura 8: Expressão percentual da molécula CD1a de DCs na interação com *L. braziliensis* após sete dias de cultura.

Figura 9: Percentual de células positivas obtidas a partir de citometria de fluxo, em quanto a expressão do marcador CD1a.

Figura 10: Fotografia capturada no microscópio eletrônico ótico invertido (ZEISS PrimoVert) no aumento total de 400X. Cultura de DCs em meio RPMI suplementado com citocinas IL-4 e GM-CSF, após sete dias de diferenciação.

Figura 11: Porcentagem de infecção de DCs infectadas com *L. braziliensis* após 12 h e 24 h de interação.

Figura 12: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão da molécula de superfície HLA-DR de células apresentadoras de antígeno (DCs) 12h depois da interação com *L. braziliensis*.

Figura 13: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão de HLA-DR 24 h depois da interação com *L. braziliensis* em células com fenótipo CD1a+/HLA-DR+.

Figura 14: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão de HLA-DR 24 h depois da interação com *L. braziliensis* em células com fenótipo CD1a-/HLA-DR+.

Figura 15: Porcentual de células positivas obtidas a partir de citometria de fluxo, em quanto a expressão do marcador de superfície HLA-DR em células com fenótipo CD1a+/HLA-DR+ 12 e 24 h de interação com *L. braziliensis*.

Figura 16: Porcentual de células positivas obtidas a partir de citometria de fluxo, em quanto a expressão do marcador de superfície HLA-DR em células com fenótipo CD1a-/HLA-DR+ 24h após da interação com *L. braziliensis*.

Figura 17: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão da molécula co-estimulatória CD86 (B7-2) em DCs, 12h depois da interação com *L. braziliensis*.

Figura 18: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão da molécula co-estimulatória CD86 (B7-2) em DCs com fenótipo CD1a+/ CD86 (B7-2), 24h depois da interação com *L. braziliensis*

Figura 19: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão da molécula co-estimulatória CD86 (B7-2) em DCs com fenótipo CD1a-/ CD86 (B7-2), 24h depois da interação com *L. braziliensis*.

Figura 20: Porcentual de células positivas obtidas a partir de citometria de fluxo, em quanto a expressão do marcador de superfície CD86 (B7-2) em células com fenótipo CD1a+/ CD86 (B7-2)+ (A) 12 h após da interação com *L. braziliensis*.(B) 24 h após da interação com *L. braziliensis*.

Figura 21: Porcentual de células positivas obtidas a partir de citometria de fluxo, em quanto a expressão do marcador de superfície CD86 (B7-2) em células com fenótipo CD1a-/ CD86 (B7-2)+ (A) 24 h após da interação com *L. braziliensis*.

Figura 22: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão da molécula co-estimulatória CD209 (DC-SIGN) em DCs com fenótipo CD1a+/ CD209, 24h depois da interação com *L. braziliensis*

Figura 23: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão da molécula co-estimulatória CD209 (DC-SIGN) em DCs com fenótipo CD1a-/ CD209, 24h depois da interação com *L. braziliensis*

Figura 24: Porcentual de células positivas obtidas a partir de citometria de fluxo, em quanto a expressão do marcador de superfície DC-SIGN (CD209) em células com fenótipo (A) CD1a+/ DC-SIGN (CD209)+ e (B) CD1a-/ DC-SIGN (CD209)+, após 24 h da interação com *L. braziliensis*.

Figura 25: Expressão porcentual dos marcadores de superfície para a caracterização de DCs nas condições controle e infectado com *L. braziliensis*

Figura 26: Intensidade média de fluorescência dos marcadores de superfície das DCs nas condições controle e infectado com *L. braziliensis*.

Figura 27: Produção de IL-12p+40 para cada uma das condições de estudo (controle e infectado).

Figura 28: Produção de TNF- α para cada uma das condições de estudo (controle e infectado).

Figura 29: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo apresentando morte celular de DCs 24 h após a interação com *L. braziliensis*.

Figura 30: Quantificação da taxa da morte celular de DCs na interação após 24 h, com *L. braziliensis*, avaliada na condição controle e infectado

Figura 31: Imagem do gel de RNA gerado com RNA 6000 Pico LabChip na plataforma do *Bioanalyzer*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantificação no Qubit do RNA total extraído das DCs nas condições controle e infectado após 12 h de interação com *L. braziliensis*.

Tabela 2: Número de RIN do RNA extraído das DCs nas condições controle e infectado após 12 h de interação com *L. braziliensis*.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Panorama das doenças tropicais negligenciadas	17
1.2 Leishmaniose	18
1.3 Ciclo de vida	19
1.4 Formas Clínicas	22
1.4.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	22
1.4.2 Leishmaniose Visceral (LV)	23
1.5 Epidemiologia	24
1.6 Diagnóstico e Tratamento	25
1.6.1 Diagnóstico da LV	25
1.6.2 Diagnóstico da LTA	27
1.6.3 Tratamento para a LTA e LV	28
1.7 Células dendríticas (DCs)	30
1.7.1 Imunorregulação	35
1.7.2 Mecanismos de escape -Morte Celular Programada (MCP)	42
2. JUSTIFICATIVA	49
3. HIPÓTESE	49
4. OBJETIVOS	50
4.1 Geral	50
4.2 Atividades	50
5. METODOLOGIA	51
5.1 Desenho experimental	51
5.2 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	52
5.3 Obtenção de monócitos	52
5.4 Cultura de Células Dendríticas	53
5.5 Cultura dos parasitos	53
5.6 Coleta e interação das células dendríticas com <i>L. braziliensis</i>	53
5.7 Caracterização das células dendríticas	54
5.8 Taxa de infecção	54
5.9 Detecção da morte celular em células dendríticas	55
5.10. Dosagem de citocinas	55
5.11 Extração de RNA	56
5.12 Análise Estatística	57
6. RESULTADOS	57
6.1 Purificação de monócitos	57

6.2 Caracterização de células dendríticas	58
6.3. Taxa de infecção com <i>L. braziliensis</i>	64
6.4 Expressão de moléculas de superfície.....	66
6.4.1 Expressão da molécula HLA-DR	67
6.4.2 Expressão da molécula CD86 (B7-2)	74
6.3.4 Expressão da molécula DC-SIGN (CD209).....	81
6.5 Produção de citocinas.....	90
6.5.1 Níveis da Interleucina 12 (IL-12+p40).....	90
6.5.2 Níveis do fator de necrose tumoral (TNF- α)	91
6.6 Morte Celular	92
6.7 Extração de RNA.....	95
7. DISCUSSÃO	98
8. CONCLUSÃO	110
9. PERSPECTIVA.....	111
10. REFERÊNCIAS	112
ANEXO 1	126

1. INTRODUÇÃO

1.1 Panorama das doenças tropicais negligenciadas

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) tem afetado a humanidade durante séculos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define estas doenças como aquelas que ocorrem especialmente em locais quentes e úmidos nos climas tropicais e subtropicais (WHO, 2009). Os patógenos responsáveis por estas doenças formam um grupo biologicamente diverso, como por exemplo os protozoários *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* transmitidos através de triatomíneos hematófagos, vermes como *Onchocerca volvulus*; helmintos transmitidos através do solo e águas contaminadas; e outras doenças cujos mecanismos de propagação ainda não estão bem descritos, como no caso da úlcera de Buruli e da lepra que são transmitidas por *Mycobacterium ulcerans* e *Mycobacteria leprae* respectivamente (Feasey et al., 2010).

Leishmaniose, dengue, ascaridíase, malária, hanseníase, esquistossomose, filariose e Doença de Chagas, são exemplos de DTN. Estas são chamadas negligenciadas, porque, estão fortemente associadas às áreas menos favorecidas, onde as condições sanitárias, nutricionais e de vida não são as melhores. Além disso, a dificuldade de acesso aos serviços de saúde e a baixa eficácia dos programas de controle aumentam a vulnerabilidade da população às infecções. Apesar de apresentarem manifestações clínicas diferentes, no que concerne às causas e efeitos físicos, podem tornar-se doenças crônicas e provocar danos severos pelo resto da vida do indivíduo infectado. Em geral este tipo de doença não possui investimentos e interesse significativos para o desenvolvimento de novas drogas ou vacinas (Lindoso & Lindoso, 2009).

Durante os últimos anos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem estimulado os governantes dos países endêmicos e não endêmicos a investir na batalha contra essas doenças, como uma forma de incentivar o desenvolvimento social e econômico (WHO, 2006). Apesar de existirem parcerias em diferentes programas que apoiam todas as problemáticas da saúde pública, estima-se que serão necessários 2 bilhões de dólares adicionais para prevenir e tratar todas as pessoas em risco de contrair DTN para o ano de 2015 (Feasey et al., 2010). Para tanto, a Organização Mundial da Saúde recomenda cinco estratégias para prevenção, controle, eliminação e erradicação das DTN, as quais são: i) quimioterapia preventiva na otimização e uso seguro de medicamentos de dose única; ii) gestão da doença para prevenir a mortalidade, reduzir a morbidade e interromper a transmissão; iii) controle na interação patógeno-

hospedeiro focando principalmente no controle ecológico do vetor; iv) controle da saúde pública veterinária na interação homem-animal já que nas principais infecções os vertebrados estão envolvidos nos ciclos de vida, portanto, uma boa gestão na saúde do animal e do homem melhoraria a prevenção e o controle das doenças zoonóticas negligenciadas; e, v) o fornecimento de água limpa, saneamento básico e higiene tornando as populações de risco menos vulneráveis às doenças infecciosas (WHO, 2012). Assim, o dever da OMS é garantir o futuro das próximas gerações, mantendo a sustentabilidade dos programas de prevenção e controle na gestão da saúde pública.

1.2 Leishmaniose

A Leishmaniose, causada por mais de 20 espécies de *Leishmania* é considerada uma doença negligenciada, (Alves et al., 2013). Atualmente é um problema de saúde pública em destaque, ocorrendo em países pertencentes à diferentes continentes, tais como Europa, África, Ásia e América, apresentando um alto grau de impacto econômico nos países desenvolvidos (Brelaz et al., 2012; Andrade et al., 2007). Dentro desse contexto, a doença é considerada pela OMS como uma doença reemergente e segunda causa de morte entre as infecções parasitárias (Nogueira et al., 2013)

Esta doença tem como agente etiológico parasitos intracelulares do gênero *Leishmania* sp, pertencentes à família *Trypanosomatidae* (ordem Kinetoplastida) (Raymond et al., 2012), transmitidos através da picada de fêmeas da ordem Díptera e da família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*, vetores conhecidos como Flebotomíneos (Anjili et al., 1995), os quais estão distribuídos em dois gêneros: *Phlebotomus* (velho mundo) e *Lutzomyia* (novo mundo) (Oliveira et al., 2009).

O gênero *Leishmania* foi dividido em três subgêneros de acordo com análises filogenéticas (Raymond et al., 2012) e com o tipo de desenvolvimento do parasito no intestino médio do vetor. O primeiro é representado pelo subgênero *Sauroleishmania* no qual os parasitos se desenvolvem no intestino posterior (Tipo Hipopilárico), como por exemplo *Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae* (Raymond et al., 2012). Os hospedeiros são lagartos do velho mundo e acredita-se que estes lagartos se infectem via alimentação (Barral & Costa, 2011). No subgênero *Vianna* no qual os parasitos estabelecem a infecção inicial no triângulo pilórico e no intestino posterior do vetor e, logo depois, de resistirem aos

movimentos peristálticos do intestino, migram e se desenvolvem na região do intestino médio (Tipo Peripilárico). Esse grupo inclui principalmente a espécie *Leishmania (Vianna) braziliensis*. Finalmente o subgênero *Leishmania* no qual os parasitos se desenvolvem exclusivamente no intestino médio do vetor (Tipo Suprapilárico). Esse grupo inclui a maioria das espécies de *Leishmania* do Velho e do Novo Mundo, como por exemplo *Leishmania (Leishmania) major* no Velho Mundo e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Novo Mundo (Muskus et al, 2002; Barral & Costa, 2011). Esses subgêneros possuem aproximadamente 22 espécies patogênicas ao homem, das quais, 15 tem sido identificadas nas Américas. Elas são: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. colombiensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. infantum*, *L. lansoni*, *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. lindnbergi*, *L. pifanoi* e *L. garnhami* (OPS, 2013).

1.3 Ciclo de vida

A *Leishmania* possui um ciclo de vida complexo, já que sobrevive e está adaptada à dois hospedeiros, vertebrado e invertebrado, encontrado-se exposta à condições ambientais diversas (mudanças de temperatura, pH e disponibilidade do oxigênio) (Besteiro et al, 2007). Possuem duas formas morfológicas: promastigotas e amastigotas, cujas principais características estruturais estão representadas na **Figura 1**.

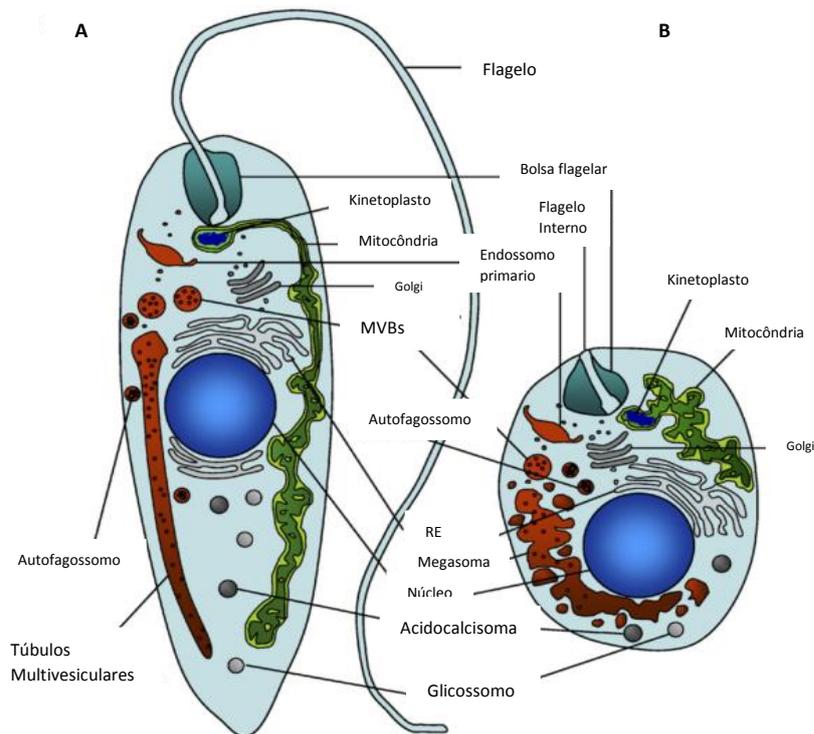


Figura 1: Características estruturais das formas (1A) Promastigotas e (1B) Amastigotas de *Leishmania* sp. Figura “adaptada de Besteiro et al, 2007”. Corpos multivesiculares (MVBs) e Reticulo endoplasmático (RE).

O ciclo de vida do parasito se inicia quando hospedeiros vertebrados (homem, cães, preguiça, gambá e roedores) (OPS, 2013) são picados pelas fêmeas dos flebotomíneos e, durante o repasto sanguíneo, inoculam as formas infectantes promastigotas metacíclicas (flageladas, móveis e extracelulares). Estas são fagocitadas pelos macrófagos diretamente ou após a infecção por neutrófilos, que são rapidamente recrutados ao sítio da lesão. Ali, se diferenciam em formas amastigotas dentro de um compartimento denominado vacúolo parasitóforo onde fusionam-se com o lisossomo para se replicarem por divisão binária em meio ácido rico em enzimas hidrolíticas. Logo depois, o macrófago se rompe, liberando para o meio extracelular formas amastigotas que serão novamente fagocitadas por outras células do hospedeiro vertebrado, continuando assim o ciclo do parasito (**Figura 2**) (Besteiro et al., 2007; Kaye & Scott, 2011).

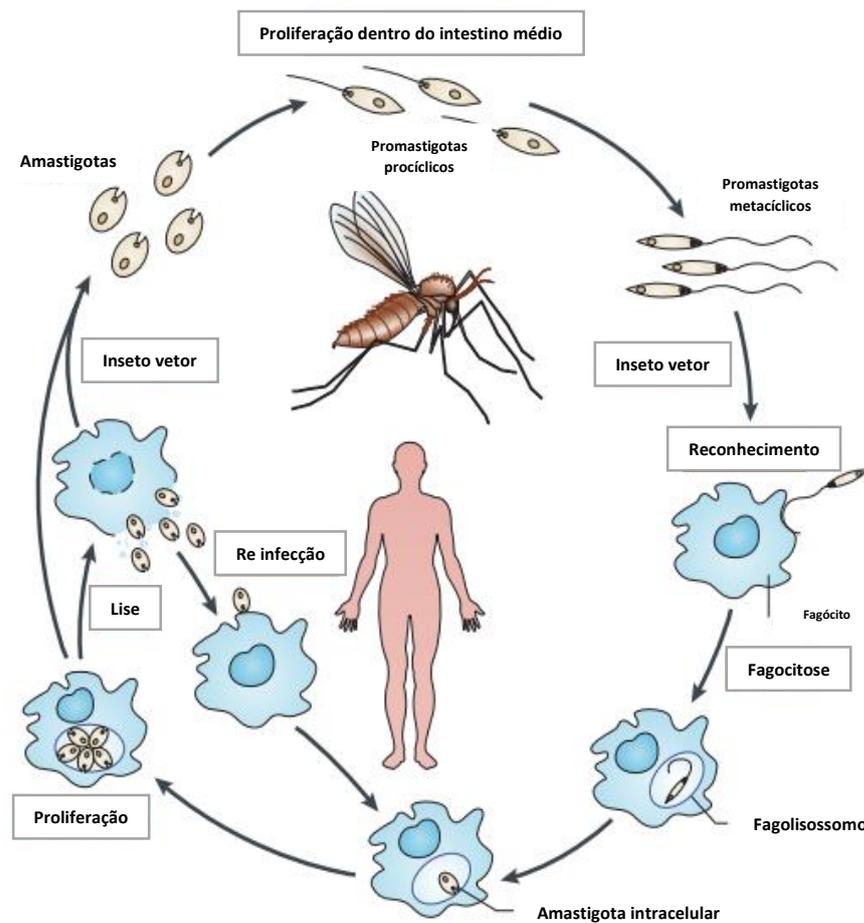


Figura 2: Ciclo de vida da *Leishmania* sp. no hospedeiro vertebrado. Figura “adaptada de Kaye & Scott, 2011”.

Uma vez que o vetor se alimenta novamente de um hospedeiro infectado, o sangue ingerido contém macrófagos infectados com *Leishmania*, começando aqui o ciclo de vida do parasito dentro do vetor. Assim, amastigotas são liberadas no intestino após a ruptura dos macrófagos onde se diferenciam em vários estágios, desde promastigotas procíclicas flageladas não infectantes localizadas no intestino do vetor até promastigotas metacíclicas infectantes localizadas no intestino médio torácico, as quais serão inoculadas em um novo hospedeiro vertebrado durante um repasto subsequente, fechando assim o ciclo. (**Figura 3**) (Oliveira et al., 2009; Besteiro et al., 2007)

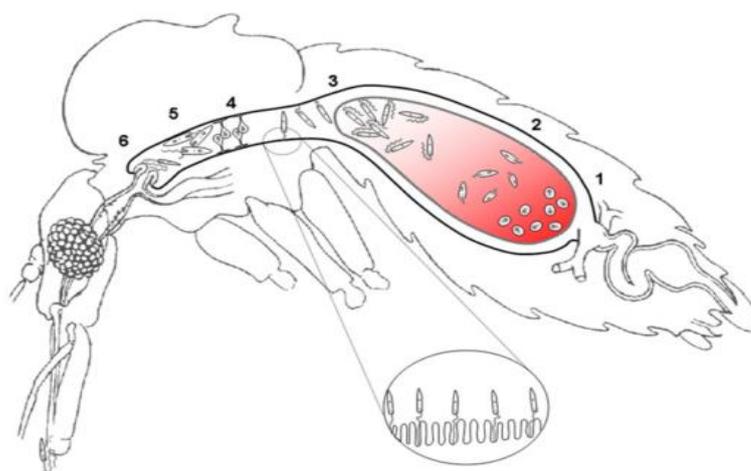


Figura 3: Ciclo de vida da *Leishmania* dentro do inseto vetor. Formas promastigotas: 1- amastigotas; 2- prociclico; 3- nectomonas; 4- heptomonas; 5- leptomonas; 6- metacíclico.

1.4 Formas Clínicas.

De acordo com as espécies de *Leishmania* envolvidas, as condições ambientais, o vetor e as condições imunológicas do hospedeiro vertebrado, as Leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, e como resultado recebem diferentes denominações: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutâneo Mucosa (LCM), Leishmaniose Cutâneo Difusa (LCD) e Leishmaniose Disseminada (LD), todas variantes da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA); citando também a Leishmaniose Visceral (LV) conhecida como Kala-azar (Brelaz et al., 2012; Vieira et al., 2013).

1.4.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A Leishmaniose Cutânea (LC), forma clínica mais comum, caracteriza-se por lesões (úlceras) locais na pele que se desenvolvem no local da picada e curam espontaneamente. A LC é frequentemente causada por *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* e *Leishmania tropica* no Velho Mundo e por *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania mexicana* no Novo Mundo (Kaye & Scott, 2011; de Assis et al., 2012). No Brasil, a espécie *L. braziliensis* é a mais predominante onde a LTA é endêmica (de Oliveira et al., 2012).

A LCM é causada por *L. braziliensis* e se caracteriza por uma destruição progressiva do septo nasal comprometendo eventualmente também o palato e a laringe. Pode causar uma severa desfiguração facial, eventualmente com graves problemas respiratórios. Cerca de 2 a 5% dos casos ocorre concomitante ou anos após um quadro de LC e pode progredir para destruição da mucosa nasal. Outras espécies de *Leishmania* como *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *Leishmania amazonensis* também tem sido associadas a LCM (Maretti-Mira et al., 2012; de Assis et al., 2012)

Já a LCD é considerada rara, crônica e progressiva caracterizando-se por nódulos e lesões em placas infiltradas de maneira difusa em pacientes anérgicos, ou seja, não responsivos aos antígenos de *Leishmania*. As lesões são geralmente não ulceradas, a menos que a área tenha sofrido algum trauma. É causada por *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. aethiopica* (de Assis et al., 2012; Kaye & Scott, 2011). Por outro lado, a LD apresenta inúmeras lesões acneiformes, papulosas e ulceradas, às vezes associadas a sinais e sintomas como febre, perda de peso, calafrios e astenia, sugerindo disseminação hematogênica do parasito. As espécies responsáveis pela síndrome são *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Barral & Costa, 2011).

1.4.2 Leishmaniose Visceral (LV)

A LV é uma doença sistêmica e representa uma severa manifestação clínica da infecção por *Leishmania*. As espécies implicadas nesta doença são *L. donovani* e *L. infantum chagasi*. Os principais sintomas são febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatias e anemia. Pode causar a morte se não tratada adequadamente (de Assis et al., 2012; Selvapandiyam et al., 2012). A doença pode evoluir para forma aguda, subaguda e crônica, mas muitos indivíduos afetados permanecem assintomáticos. Após o tratamento da LV causada por *L(L) donovani*, os pacientes podem desenvolver uma forma cutânea crônica chamada leishmaniose dérmica pós calazar (PKDL- *post-kala-azar dermal leishmaniasis*) (Barral & Costa, 2011).

Existem dois tipos de LV, as quais se diferenciam por suas características de transmissão: LV zoonótica, transmitida do animal para o vetor e do vetor para o homem. Neste caso, a maioria dos hospedeiros são humanos e canídeos; e LV antroponótica, transmitida de humano a humano pelo vetor (Stockdale & Newton, 2013; Barral & Costa, 2011).

1.5 Epidemiologia

De 2007 a 2010 a OMS organizou uma série de encontros regionais (países EMRO, Genebra 2007, os países da OPAS, Medellín 2008; países do Euro, Istambul de 2009; países afro, Adis Abeba 2010; países SEARO, Paris de 2011), com o objetivo de fornecer relatórios anuais da incidência da LTA e LV, os quais servirão de apoio para o relatório final que é realizado a cada 5 anos. Para tanto, questionários epidemiológicos eletrônicos são enviados aos gestores dos Programas Nacionais de Controle ou à cientistas nacionais de renome para preencher os dados requeridos. Esses formulários são compostos principalmente por notificações acontecidas nos últimos cinco anos, por divisões administrativas de áreas endêmicas, registro de novos casos e surtos de LC e LV, bem como por características de reservatórios conhecidos e programas de controle de vetorial (Alvar et al., 2012).

Assim, depois de compilar os dados, estimou-se que a Leishmaniose está presente nos cinco continentes e é endêmica em 98 países. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Panamericana da Saúde (OPS) estima que 350 milhões de pessoas estão em risco de adquirir a infecção (OPS, 2013; Stockdale & Newton, 2013).

Após a malária e a tripanossomíase africana (doença do sono), as leishmanioses são a terceira doença mais importante transmitidas por vetores e se encontram em nono lugar em termos globais com as doenças infecciosas e parasitárias existentes. Essa doença é responsável por causar 57 mil mortes por ano e estima-se que de 2 a 2,4 milhões de pessoas podem perder qualidade de vida (Hotez et al., 2004; Stockdale & Newton, 2013).

Aproximadamente mais de 58.000 casos de leishmaniose visceral e 220.000 de leishmaniose cutânea são reportados oficialmente a cada ano (Alvar et al., 2012), porém, estima-se uma ocorrência anual de 0,2 a 0,4 milhões casos para LV e 0,7 a 1,2 milhões casos para LC. Do total de casos de LV, 90% ocorrem principalmente na Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. Já países como Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru representam de 70% a 75% da incidência global estimada para LC, pois esta forma da doença está amplamente distribuída (Alvar et al., 2012). Não obstante, esses dados são considerados subestimados, já que não é possível determinar exatamente o número real de indivíduos afetados devido aos múltiplos fatores culturais, sociais e econômicos, visto que, são mais os casos não reportados em relação com os reportados oficialmente (Nogueira et al., 2013).

Nos últimos 20 anos a LTA vem apresentando crescimento, tanto em magnitude como em expansão geográfica. Assim, casos de leishmaniose cutânea e cutânea mucosa tem sido registrados em 18 países das Américas. Entre 2001 e 2011 foram reportados 638.702 casos na região, com uma média anual de 58.063, onde 40,36% (257.812) foram registrados na Sub região Andina, 15,73% (100.475) na América Central e 42,36% (270.572) no Brasil, que somados aos casos da Colômbia (20,08%) e Perú (12,37%), representam 75,8% dos casos reportados neste período (OPS, 2013).

Vale ressaltar que a LC e LCM estão bem distribuídas no Brasil, sendo este o país com maior incidência de LC na América do Sul (Alvar et al., 2012).

Considerando a Leishmaniose Visceral, para o mesmo período de 2001 a 2011, foram registrados nas Américas 38.808 casos, destes 96,6% foram no Brasil (37.503). Neste período, mais de 10 países reportaram LV, sendo observado um aumento através dos anos no Paraguai (597) e Argentina (96). A Colômbia reportou 513 casos. Houve registros em outros países tais como Honduras (40), Nicarágua (26), El Salvador (12), Guatemala (4), Venezuela (15), Bolívia (1) e México (1) no período (OPS, 2013).

1.6 Diagnóstico e Tratamento

1.6.1 Diagnóstico da LV

A detecção do agente causal de toda doença infecciosa é um passo muito importante para dar um direcionamento adequado no tratamento clínico e conseqüentemente uma apropriada gestão epidemiológica. Por esse motivo, é necessário contar com métodos de diagnóstico de laboratório bastante sensíveis e específicos, que ajudem a distinguir com eficácia os falsos positivos dos verdadeiros positivos, a fim de adequar medidas de controle sobre a doença (Barral & Costa, 2011).

O diagnóstico mais tradicional para confirmar a presença da infecção por *Leishmania* é a visualização dos parasitos, através do microscópio, como por exemplo, após purificação da medula óssea, biópsia de fígado e/ou aspirado de baço para LV; ou para LC em biópsias cutâneas (Boelaert et al., 2008; Srividya et al., 2012).

Uma maior sensibilidade no diagnóstico e sobreposição das dificuldades e complicações pela utilização de raspados de pele e biópsias, foi atingida com o uso de técnicas de biologia molecular tal como a Reação em Cadeia de Polimerase *Polymerase chain Reaction* (PCR) e *Real-time* PCR (Q-PCR). Tais reações abriram um leque de possibilidades para a detecção de DNA do parasito em material biológico diverso, como sangue ou órgãos, além de ser altamente específico e sensível. Contudo, há uma necessidade de mão de obra especializada o qual algumas vezes é limitante nas áreas endêmicas (Srividya et al., 2012).

O diagnóstico sorológico é altamente utilizado para o diagnóstico de LV mas esses testes não são os adequados para o diagnóstico da LC. O problema com este tipo de teste é que os anticorpos no soro permanecem no corpo por vários anos mesmo após o êxito com do tratamento, não sendo possível detectar uma reincidência da infecção. Outro problema é que geralmente a população da área endêmica tem sorologia positiva apesar de não ter história clínica de Leishmaniose. Isso pode acontecer devido a infecções assintomáticas ou resposta imune efetiva em caso de contato com parasito, dificultando a distinção de indivíduos assintomáticos, dos curados, nem como os curados que podem ser re-infectados. As técnicas sorológicas incluem: ELISA, IFAT, DAT, rK39 (Stockdale & Newton, 2013).

Como foi mencionado, os métodos sorológicos estão baseados na identificação de anticorpos no soro de pacientes com LV. Antígenos recombinantes têm melhorado consideravelmente a sensibilidade e especificidade no diagnóstico. Entre os antígenos recombinantes, uma proteína relacionada com kinesinas, a qual é codificada por um gene de kinesinas, apresenta um epítipo de 39 resíduos de aminoácidos repetitivos, chamada rK39, e tem sido um antígeno amplamente testado para diagnósticos da LV em campo. Além disso, o teste rK39 imunocromatográfico (TIC) é um diagnóstico rápido que tem facilitado a aplicabilidade dos métodos sorológicos para o controle de VL em homes e cães (Srividya et al., 2012). O teste é fácil de operar, e até mesmo trabalhadores de campo com um mínimo de treinamento pode executar de forma confiável. rK39 é amplamente utilizado para o diagnóstico da LV na África, América, Índia, Nepal e Brasil, apresentando uma sensibilidade entre 95-100% (Srividya et al., 2012). O ensaio baseado na aglutinação do soro (DAT-do inglês *Direct Agglutination tests*) usando antígenos aquosos/liofilizados, apresenta excelente sensibilidade (90-100%) e especificidade (95-100%) em vários estudos na maioria das áreas endêmicas de LV, mas precisa uma incubação de pelo menos 8 h para observar resultados confiáveis. A eficácia da DAT não é dependente da espécie de *Leishmania* ou da região avaliada. O teste é semi-quantitativo e fácil de aplicar em campo (Srividya et al., 2012).

A metodologia da imunofluorescência indireta (IFAT-do inglês *immunofluorescent-antibody test*), é uma técnica de diagnóstico usada para a detecção e localização de antígenos em células e tecidos (Rugeles et al., 2009). O IFAT é amplamente utilizado em países do Mediterrâneo, onde é considerado o melhor diagnóstico específico sorológico nas Leishmanioses caninas com alta sensibilidade alcançando um intervalo entre 80 e 100% (Mettler et al., 2005). A técnica ELISA, é fundamentada na imunodetecção de antígenos solúveis (Mettler et al., 2005), por meio da implementação de antígenos ou anticorpos acoplados a uma enzima, a adição do substrato da enzima, e em presença do anticorpo de detecção, desencadeia-se uma reação colorimétrica. Essa técnica, foi incorporada para o diagnóstico da LV (Srividya et al., 2012) e a LTA (Mettler et al., 2005). Ela oferece maior sensibilidade para a detecção de anticorpos específicos de parasitos de *Leishmania*, permitindo discriminar pacientes com LTA dos que apresentam Doença de Chagas e Malária (Barral & Costa, 2011), contudo os anticorpos precisam de um período de incubação mínimo de 18 h (Srividya et al., 2012).

Uma desvantagem que apresentam as metodologias IFAT e ELISA é que não são adaptadas para uso em campo, pois são técnicas estritamente realizadas dentro de um laboratório e por pessoal qualificado. Entretanto as técnicas descritas anteriormente rk39 e DAT, encontram-se adaptadas para ser executadas em território rural (Committee, 2010).

1.6.2 Diagnóstico da LTA

O teste de hipersensibilidade tardia (DTH – do inglês *Delayed Type Hypersensitivity*) na pele como o Teste de Montenegro ou *Leishmania Skin Test* (MST/LST), é utilizado como método de detecção de prévia exposição da LTA, sendo possível detectar células antígeno específicas mediadoras da imunidade, usando uma injeção intradérmica de antígenos de *Leishmania* (Stockdale & Newton, 2013). Além disso, estudos epidemiológicos baseiam-se na prova para acessar à predominância da doença. Este teste é uma reação de hipersensibilidade tardia (tipo IV), que estimula uma inflamação granulomatosa caracterizada pela presença de um número elevado de linfócitos T no infiltrado celular, apresentando uma fibrose de moderada a grave e uma agressão ao epitélio. Isso ocorre geralmente nas fases tardias das leishmaniose, em pacientes que apresentam uma exacerbada resposta imune celular (Nogueira et al., 2008), explicando a associação positiva entre o tamanho da reação ao teste de

Montenegro e a duração da doença (Martins et al., 2012). Uma reação positiva pode ser detectada após três meses de infecção pelo parasito, tendo uma sensibilidade entre 82 e 100% em pacientes com leishmaniose cutânea. O teste apresenta um diagnóstico limitado em áreas endêmicas, mostrando resultados positivos em pacientes sem lesões, sugerindo uma infecção subclínica por causa de uma infecção assintomática (Nogueira et al., 2008). Uma resposta negativa é normalmente esperada durante a infecção com LV, assim como uma resposta positiva após a cura (Stockdale & Newton, 2013). A detecção de parasitos diretamente na lesão da derme por meio de análises histopatológicas de biópsias, serve como metodologia para o diagnóstico da LTA (Alves et al., 2013).

1.6.3 Tratamento para a LTA e LV

A compreensão da resposta imunológica provocada pela infecção por *Leishmania* e sua consequente indução de uma resposta protetora ou patológica tem levado ao uso de quimioterapia e imunoterapia contra a leishmaniose, entre os tratamentos estão (Barral & Costa, 2011; Mishra et al., 2007; Davidson, 2005):

- ✓ **Antimoniais:** Nos últimos 60 anos era a droga de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose. O antimonial pentavalente existe em duas formas o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) e o stibogluconato de sódio. O mecanismo de ação do antimonial pentavalente ainda não está muito bem conhecido, porém a droga inibe a forma amastigota do parasito e atua sobre as vias glicolítica e oxidativa dos ácidos graxos. Este tipo de droga é recomendada para o tratamento de qualquer forma de leishmaniose cutânea ou cutânea mucosa (Harms et al., 2011). O tratamento com antimoniais pode estar associados à diferentes efeitos colaterais tais como: artralgia, mialgia, náusea, vomito, febre, dor de cabeça, dor abdominal, fraqueza, tontura, insônia, choque pirogênico e insuficiência renal aguda (IRA). Essas queixas são geralmente discretas ou moderadas e raramente exigem a suspensão do tratamento. Porém, na dose de 20 mg Sb+5/kg/dia o antimonial pode atingir o seu limite de toxicidade levando a alterações cardíacas, pancreáticas ou renais que obriguem a suspensão do tratamento, sendo a cardiotoxicidade o principal efeito adverso. Em algumas ocasiões, no início do tratamento, há uma exacerbação do quadro clínico com o aumento do infiltrado, do eritema, das secreções nasal e faríngea. O que pode ser

uma consequência aos antígenos liberados com a morte do parasito (Ministério da Saúde, 2007)

- ✓ **Anfotericina B:** É um antibiótico polêmico por sua ação leishmanicida. É a droga de segunda escolha quando não há uma resposta ao tratamento com antimoniais ou na impossibilidade de uso destes. A droga atua nas duas formas de vida do parasito (promastigota e amastigota), causando um aumento na permeabilidade e influxo de íons. Além disto, existe a Anfotericina B lipossomal, a qual apresenta um custo maior e toxicidade menor. O componente lipídico da anfotericina lipossomal se liga a receptores das células alvo, especialmente macrófagos. A droga é retida no sítio da infecção intracelular, sendo mais disponibilizada para interagir com o ergosterol do parasito menos com o colesterol do hospedeiro, o que favorece a resposta na terapia.
- ✓ **Pentamidinas:** Têm sido realizados poucos estudos nas Américas sobre esta droga para o tratamento da LTA. Entre tanto, a pentamidina interfere na síntese do DNA de *Leishmania*, modificando a morfologia do kinetoplasto e fragmentando a membrana da mitocôndria.
- ✓ **Mitelfosina:** Inicialmente desenvolvida para o tratamento de câncer, teve sua atividade leishmanicida descoberta na década de oitenta. Embora tenha apresentado bons resultados para o tratamento de LV e LTA, estudos mais detalhados são necessários para avaliar corretamente a ação desta droga no tratamento de LTA e sua atividade contra diferentes espécies de *Leishmania*.
- ✓ **Paromomicina:** É um antibiótico amino glicosídeo, originalmente identificado na década dos 60s e tem sido usado em ensaios para as duas manifestações clínicas da leishmaniose.
- ✓ **Imidazóis/Triazóis (Cateconazol, Fluconazol, Itraconazol):** São compostos antifúngicos que estão sendo investigados para o tratamento da LTA. Esses compostos incluem duas classes distintas: imidazólicos (por exemplo, cetoconazol) e triazóis (como, fluconazol e itraconazol). Eles compartilham o mesmo espectro antifúngico e o mecanismo de ação. Uma vantagem é que eles podem ser administrados via oral com efeitos colaterais menos tóxicos em relação com os antimoniais pentavalentes.

Finalmente, a combinação de drogas com antimoniais associadas a Imiquimod, um modulador da resposta imune inata que ativa DCs, macrófagos e outras células pela via do

TLR-7 (receptor tipo Toll), induzindo a síntese de IFN- α e citocinas pro-inflamatórias do tipo Th1 (Stanley, 2002); e Allopurinol, um inibidor do anabolismo das purinas em *Leishmania* spp. tem sido recomendada na tentativa de aumentar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais ou falha na terapêutica com antimoniais. Além disso, a imunoterapia com GM-CSF, IFN- γ e Imiquimod, tem sido relatados como terapia adjuvante ao antimonial, o que tem mostrado resultados favoráveis, mas as eficácias destas terapias ainda não são convincentes e por tanto precisam de mais estudos. (Badaro et al., 2006). Uma alternativa adicional viável para o tratamento de doenças negligenciadas é a identificação de fármacos já existentes por meio da análise do mapa metabólico do parasito, usando screening virtual, para identificação de possíveis alvos (os quais quando modificados pela interação com fármacos, individualmente ou em combinação, interferem na virulência e/ou crescimento do parasito) que sejam semelhantes à alvos de outros patógenos com fármacos já aprovados pelo FDA, melhorando o custo, acesso e esquemas de tratamento (Chavali et al., 2012).

1.7 Células dendríticas (DCs)

As células dendríticas (DCs) são consideradas as células apresentadoras de antígenos (APC) mais eficientes em ativar células T. Os macrófagos também apresentam antígenos para as células T durante a resposta imunológica celular, enquanto os linfócitos B desempenham o papel de APCs para as células T durante a resposta imunológica humoral. As APCs, são células especializadas em capturar microorganismos e outros antígenos, apresentá-los aos linfócitos e fornecer sinais que estimulam a proliferação e diferenciação dos linfócitos (Abbas et al., 2011). Portanto, DCs constituem as principais sentinelas do sistema imune por serem células migratórias, além disso, são uma ponte entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa. Formam uma população heterogênea, que inicialmente foi caracterizada por sua morfologia com aparência de estrela com prolongações citoplasmáticas ou dendritos, descritas pela primeira vez em 1973 (Steinman & Cohn, 1973). Essas células estão distribuídas em quase todos os tecidos periféricos, assim como em órgãos linfoides primários (timo e medula óssea) e secundários (linfonodos, placas de Payer e baço). Classicamente, as DCs são derivadas de células tronco hematopoiéticas que possuem duas origens: i) diferenciadas a partir de precursores mielóide (mDC) as quais expressam CD11c e ii) diferenciadas a partir de precursores linfóides (pDC) que são CD123+ (Shortman & Liu, 2002; Ardavin et al., 2001; Sozzani, 2005).

As células dendríticas derivadas dos precursores mielóides CD34+/CD13+ podem ser classificadas em dois tipos de subpopulações diferentes, as CD1a+ e as CD14+. As células dendríticas CD1a+ conhecidas como células de Langerhans, caracterizam-se por ter grânulos no citoplasma chamados de Birbeck e Langerina, os quais são a forma de distinguir este tipo de células, localizadas na epiderme. Já as células que são CD14+ tem a capacidade de se diferenciar em mDC, portanto não apresentam grânulos de Birbeck e Langerina (Merad et al., 2008). DCs também encontram-se localizadas na derme, submucosa e tecido conectivo e nestes locais são chamadas de DCs intersticiais. As pDC são de origem linfóide e estão presentes na circulação sanguínea e nos órgãos linfóides secundários (Belz & Nutt, 2012). Por outro lado, mDCs podem ser diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos obtidos de células mononucleares de sangue periférico estimulados com citocinas GM-CSF e IL-4. Assim, a primeira metodologia estabelecida para a obtenção *in vitro* de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos humanos obtidos de células mononucleares de sangue periférico foi descrita por Sallusto e colaboradores em 1994. Foi estabelecido com o fim de obter culturas *in vitro* de DCs imaturas sem alterar as características fenotípicas e funcionais, a fim de explorar a capacidade apresentadora de antígeno comparando-as com outras APC, e também a fim de identificar sinais que modulam a função da captura e processamento de antígenos (Sallusto & Lanzavecchia, 1994).

Os monócitos murinos GR-1+ (subtipo de monócito) que expressam o receptor CCR2, altos níveis de CD11c e moléculas do MHC-II, geram em um ambiente inflamatório as denominadas TIP-DCs, as quais são caracterizadas pela alta produção TNF- α e iNOS induzindo a síntese de óxido nítrico (NO), sem a produção de IL-12 e sem a expressão do fator de transcrição e ZBTB46 o qual define a linhagem clássica das DCs (Shortman & Naik, 2007) (Meredith et al., 2012). Essas células foram descritas inicialmente em esplenócitos de camundongos infectadas por *Listeria monocytogenes* (Serbina et al., 2003).

O processo de captura, processamento e apresentação de antígenos pelas DCs começa quando essas células migram aos tecidos periféricos não linfóides para desempenhar sua função de sentinelas do organismo, sítios onde detectam os micro-organismos invasores. Assim, em condições normais, tanto em tecidos como em sangue periférico as mDC e as pDC, encontram-se em um estado basal ou sem atividade funcional, sendo consideradas células imaturas, as quais são capazes de capturar eficientemente antígenos nos sítios de infecção ou inflamação. Uma vez que reconhecem o patógeno, as células são ativadas, migram aos órgãos linfóides secundários e atuam como células maduras, já que apresentam os

antígenos às células T. Como resultado, há regulação positiva de dois sinais: i) aumento da expressão de complexo principal de histocompatibilidade I (para as células T citotóxicas) ou II (para as células T auxiliares) (*MHC-I ou II*) e ii) a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80, CD86 e CD54. Após, esses dois eventos, são ativados a expressão de receptores das quimiocinas e diferentes padrões de produção de citocinas que permitem o recrutamento de outros tipos celulares (Belz & Nutt, 2012; Hopp et al., 2014).

Por conseguinte, moléculas de superfície tais como MHC-II (HLA-DR e DQ) e co-estimulatórias, ICAM-1 (CD54), B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), CD40, FcRI(CD64) comum em macrófagos e monócitos, CD83 (Giacomini et al., 2013) e DC-SIGN (DC-209) (Tailleux et al., 2002) são marcadores essenciais que ajudam a determinar o grau de ativação das DCs em experimentos *in vitro* (Shortman & Liu, 2002).

As DCs capturam antígenos através de diferentes famílias de receptores, como por exemplo a porção Fc do complexo antígeno-anticorpo, os receptores tipo-C das lectinas (CLRs) para as glicoproteínas e o receptor para o reconhecimento de padrões (PRRs) como os receptores tipo Toll (TLRs), os quais permitem às DCs reconhecer diferentes tipos de antígenos (Apostolopoulos et al., 2013).

DCs tem a capacidade de polarizar a resposta das células T, promovendo uma resposta Th1 ou Th2. Inicialmente, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) presentes nos micro-organismos são reconhecidos pelos TLR para o processamento e apresentação do antígeno principalmente em patógenos intracelulares (Brandonisio et al., 2004), secretando principalmente IL-12 ativando o fator de transcrição STAT4 estimulando a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2, característico do perfil Th1. Analogamente, o desenvolvimento da resposta Th2 é caracterizada pela produção da citocina IL-4 ou IL-10, ativando o fator de transcrição STAT6 promovendo a produção de IL-5, IL-6, IL-13 e TGF- β entre outras (Sankar, 2013) (**Figura 4**).

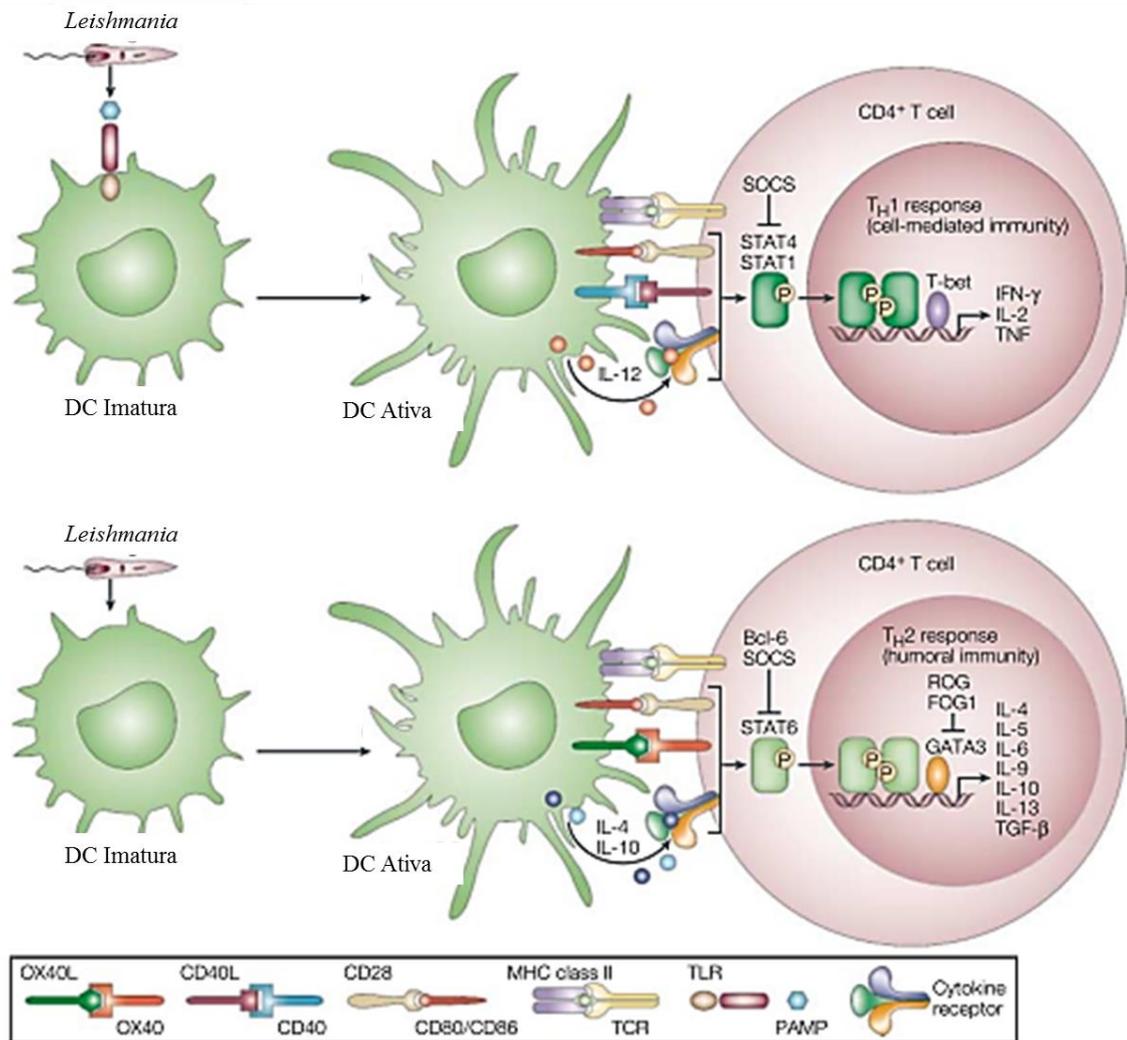


Figura 4: Modelo de resposta Th1/ Th2 em camundongo Figura “adaptada de Sacks & Noben-Trauth, 2002 “.

As DCs, estão implicadas também no desenvolvimento na tolerância imunológica, através da indução de apoptose de células T auto-reativas no timo (tolerância central) e pela indução de tolerância, anergia ou deleção por meio da cooperação com as células T reguladoras (Treg) na periferia (tolerância periférica). Essas células se caracterizam por apresentarem uma expressão baixa de moléculas co-estimulatórias e moléculas do MHC-II, secretando altas concentrações de IL-10 e TGF-β as quais inibem a resposta Th1, promovendo a geração de células Treg (Bettini & Vignali, 2010; Bettini & Vignali, 2010; Chung et al.,2013).

O lúmen intestinal tem grandes quantidades de antígenos desde bactérias comensais, componentes da dieta até microorganismos patogênicos. As DCs presentes na mucosa, participam no processo de homeostasia, induzindo tolerância a antígenos inofensivos, inicializando uma imunidade protetora contra patógenos intestinais e evitando doenças tais como, a doença celíaca e as doenças inflamatórias crônicas (Doença de Crohn e colites). As DCs estão localizadas em toda a lâmina intestinal, e encontram-se associadas ao tecido do intestino linfóide (GALT), placas de Peyer (PPS), folículos linfóides (ILFS) e linfonodos mesentéricos (MLNs) (Persson et al., 2013). Essa proteção é mantida por dois tipos de fenótipos reportados de DCs presentes nas mucosas, as DCs CD103+ que promovem a geração de células Treg CD4+Foxp3+, via ácido retinóico (RA), um metabolito derivado da vitamina A e dependente de TGF- β , além da produção da imunoglobulina IgA a qual está condicionada à síntese de RA; e as DCs CX3CR1+, promovendo a diferenciação das células T CD8 em presença das citocinas IL-10, IL-13, e IL-9 (Chang, & Kweon, 2014).

Além disso, todos os órgãos (rim, pâncreas, fígado, baço, intestino, estômago, pulmão, coração ovários, testículos e cérebro) e tecidos (derme, ossos, medula óssea, íleo) abrigam uma rede de células fagocíticas, macrófagos ou DCs. Essas células apresentam várias funções fisiológicas importantes durante a homeostase, sendo as DCs sensores e sentinelas da tolerância periférica, devido a sua capacidade de processar antígenos próprios e fornecer sinais de tolerância para as células T, protegendo o hospedeiro de patógenos e evitando uma manifestação imunopatologia exacerbada a qual seria controlada por estímulos anti-inflamatórios, direcionando ao mesmo tempo o reparo, a manutenção e a regeneração do órgão/ tecido afetado (Lech et al., 2012).

Vários estudos sugerem a imunoterapia com DCs como ferramenta para combater doenças infecciosas (Brandonisio et al., 2004), pois o papel central está na produção de IL-12 pelas DCs que promovem o desenvolvimento de células T CD4+ Th1, sendo essa citocina um adjuvante para as vacinas contra a Leishmanioses (Okwor & Uzonna, 2009), além de ajudar na redução do número de amastigotas no baço e no fígado. Assim, a imunoterapia com DCs associadas à um medicamento antimonial, tem sido muito efetivo no controle da LV em murinos, já que o tratamento com stibogluconato de sódio mais DCs eletroporadas com antígenos de *L. donovani*, resulta na completa eliminação do parasito (El-On, 2009). Além disso, também é utilizado como um tratamento alternativo para o câncer (Aloysius, Takhar, Robins, & Eremin, 2006). A imunoterapia tumoral consiste na utilização de elementos do sistema imunológico para eliminar ou neutralizar células tumorais ou fatores que ajudem a

sobrevivência do tumor, sem danificar as células normais, reduzindo os efeitos colaterais (Riether et al., 2013). Assim, foram desenvolvidas estratégias com o objetivo de estimular respostas imunes como por exemplo a utilização de citocinas (IFN- γ , IL-12, TNF- α e GM-CSF) como potentes agentes moduladores envolvidos na homeostasia imunológica e regulação da resposta inflamatória (Christian & Hunter, 2012); a utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) para estimular a produção de anticorpos específicos para antígenos expressos por células tumorais (Murray & Shuptrine, 2013); e a estratégia baseada na mobilização de células no sistema imunológico, usando DCs, capazes de induzir uma resposta imune celular pela potente capacidade de apresentar antígenos aos linfócitos T virgens, pois, são as principais produtoras de IL-12 e outras citocinas como GM-CSF, TGF- β , IL-1 β , IL-6 e IL-23 mediando o desenvolvimento das células T para uma resposta Th1 ou Th2 e a proliferação de linfócitos T citotóxicos, e ainda promovendo a tolerância periférica. Isso, tem suscitado um grande interesse na utilização destas células em terapias que apontam bloquear as respostas imunológicas exacerbadas, como as que ocorrem nas doenças autoimunes, alergias e rejeição de transplantes (Skalova et al., 2010; Nguyen-Pham et al., 2012). Assim, existem alguns pontos-chaves no melhoramento da eficácia da imunoterapia baseada nas DCs: i) aumentar a maturação e a ativação das DCs por citocinas que polarizam o perfil Th1 e por indutores do receptor TLR; ii) aumentar a apresentação cruzada de antígenos tumorais pelas DCs; iii) bloquear a atividade imunossupressora, que pode ser criada pelo microambiente tumoral; iv) Regulação da ativação de células Treg; e v) a regulação das características migratórias das DC, através da estimulação da expressão de CCR7 (Nguyen-Pham et al., 2012). As DCs usadas tradicionalmente para imunoterapia são obtidas a partir de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes, e sua maturação é induzida pela combinação de citocinas pro-inflamatórias e por receptores do tipo Toll. Recentemente estão implementando novas metodologias para a geração de DCs a partir de células tronco pluripotentes humanas (hPSCs) em larga escala usando biorreatores, essa abordagem poderia gerar um número elevado de DCs, o que ajudaria a melhorar ao tratamento (Li et al., 2014).

1.7.1 Imunorregulação

Vários eventos acontecem durante a interação patógeno-hospedeiro, especialmente na infecção causada pelos parasitos do gênero *Leishmania*, os quais, ativam vários componentes do sistema imune. Entre eles, encontram-se a maquinaria celular como os neutrófilos e células

apresentadoras de antígenos (macrófagos e DCs); a ativação do sistema complemento e a presença dos mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos, desencadeando uma resposta primária ou inata para o controle da infecção. Ao entrarem em contato os componentes da resposta imune inata com os parasitos de *Leishmania*, ocorre a indução de uma resposta mais específica, desencadeando uma resposta imune adquirida, onde os linfócitos T e B são os principais atores, induzindo, desta forma, resistência contra a infecção, bem como susceptibilidade (Barral & Costa, 2011)

Após o repasto do inseto vetor, formas promastigotas são injetadas na pele do hospedeiro, ativando o sistema complemento. Esta ativação pode causar a morte sobretudo das espécies que causam manifestações cutâneas, em relação às espécies de *Leishmania* causadoras da doença visceral, pois elas tem altas possibilidades de sobrevivência, sendo mais resistentes à lise pelo sistema complemento. Posteriormente o parasito é fagocitado (primeiros minutos de interação), e encontra-se dentro de um compartimento ácido, chamado vacúolo parasitóforo (VP). Tais vacúolos amadurecem quando fusionam com as vesículas da via endocítica, endossomos tardios ou lisossomos da célula hospedeira, assim, os macrófagos ativam os mecanismos microbicidas como é a geração das espécies reativas de oxigênio (ROS) (radical superóxido e peróxido de hidrogênio) as quais são mediadas pelo *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH)*, necessários para o controle do parasito. Portanto, após a internalização pelos macrófagos, promastigotas de *Leishmania* conseguem inibir a biogênese do fagolisossomo. O fator principal dessa inibição é o glicolípido lipofosfoglicano (LPG). Esse glicolípido tem um impacto profundo sobre o fagossoma, causando acúmulo perifagosomal de F-actina, que provoca o rompimento dos lipídeos fagolisossomais e conseqüentemente a inibição da ação da NADPH oxidase, dessa forma, o impedimento da formação do fagolisossomo, sendo uma estratégia de sobrevivência dos parasitos de *Leishmania* dentro dos macrófagos (Moradin & Descoteaux, 2012) .

Assim, formas promastigotas metacíclicas são mais resistentes à lise, ativando a via clássica do complemento (Awasthi et al.,2004) , pois, durante a metaciclogênese sofrem diversas modificações morfológicas, bioquímicas e fenotípicas que aumentam sua virulência e resistência , havendo um espessamento do glicocálice composto basicamente por lipofosfoglicano (LPG), além do glicosilinositol fosfato (GIPLs), o qual também ajuda à proteção da destruição pelos macrófagos permitindo a multiplicação e sobrevivência dentro do ambiente hostil do fagolisossomo (Isnard et al., 2012). Por outro lado, os promastigotas procíclicos, são altamente sensíveis à ação da lise do complemento através da via alternativa,

pois, expressam poucas moléculas de LPG (Awasthi et al., 2004). Portanto, o sistema complemento, é uma das primeiras barreiras do sistema imune inato que o parasito necessita ultrapassar para que a infecção seja bem sucedida (Isnard et al., 2012).

A lise mediada pelo sistema do complemento para o controle de patógenos é realmente importante na imunidade inata. Estudos realizados demonstram que *Leishmania* sp. tem desenvolvido mecanismos de evasão à ação da lise pelo sistema do complemento. Assim, formas promastigotas metacíclicas são capazes de inativar enzimaticamente o fragmento C3b do complemento através da metalloproteínase de 63 kDa (GP63), gerando o componente inativo do complemento C3bi. Imediatamente este fragmento ligado à superfície toda das formas promastigotas, desencadeando um processo chamado de opsonização, que facilita a fagocitose. Logo depois, essas formas que já foram opsonizadas pela porção C3bi, são capazes de se ligar aos receptores do complemento CR1 e/ou CR3, presentes em células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos), tendo como consequência a inativação da ação do complemento, portanto favorecendo a sobrevivência do parasito, conseguindo infectar outras células do hospedeiro sem causar uma resposta inflamatória à entrada do patógeno (Isnard et al., 2012).

Embora, os macrófagos sejam as principais células hospedeiras para a *Leishmania* e as primeiras em serem infectados (Moradin & Descoteaux, 2012), os neutrófilos migram rapidamente e em grande quantidade para o local da infecção fagocitando parasitos de *Leishmania*, ativando mecanismos microbicidas e sintetizando quimiocinas e citocinas, os quais podem propiciar o controle inicial da infecção (Charmoy et al., 2010). Por conseguinte, estudos realizados *in vivo* demonstram que, camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* na superfície da pele da orelha, apresentaram uma lesão cutânea no local da inoculação e por meio de estudos histopatológicos foi demonstrado a presença de neutrófilos no local da infecção (Moura et al., 2005). Deste modo, observou-se em experimentos *in vivo* que a depleção de neutrófilos aumentam a carga parasitária em camundongos BALB/c. Entretanto, após a inoculação de parasitos e neutrófilos vivos, houve uma diminuição da carga parasitária no sítio da lesão e nos linfonodos (Novais et al., 2009). Experimentos *in vitro* também confirmam o papel deste tipo celular. Co-culturas de neutrófilos vivos e macrófagos infectados com *L. braziliensis*, demonstraram uma diminuição na infecção de macrófagos o que estava associado à produção de TNF-alfa e de superóxido (Novais et al., 2009). Acredita-se que a atividade leishmanicida é dependente da produção de TNF- α e elastase dos neutrófilos (Afonso et al., 2008), mas a liberação de elastase inibe a ação imunomoduladora

das DCs diferenciadas a partir de monócitos humanos, já que aumentam os níveis de TGF- β (Maffia et al., 2007).

Outros estudos recentes, têm focado suas pesquisas nos complexos ligante-receptores que inibem o sistema imunológico, entre eles, encontra-se o CD200L e seu receptor CD200R, uma glicoproteína de superfície celular da superfamília das imunoglobulinas expressas em vários tipos de células, particularmente em células linfóides, neurônios e endotélio. Assim, demonstraram que *L. amazonensis*, mas não *L. major*, tem a capacidade de induzir a expressão de CD200 nos macrófagos, resultando na supressão das respostas microbidas dos macrófagos (iNOS) trazendo como consequência a sobrevivência do parasito intracelular (Cortez et al., 2012).

A interação DCs- patógeno, é inicializada pelo reconhecimento entre os receptores das DCs e os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), incluindo lipopolissacarídeo (LPS), glicolipídios e ácidos nucleicos. Os sinais estabelecidos através dos receptores tipo Toll (TLRs), podem induzir a maturação celular e a produção de citocinas, proporcionando uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa. Para a sinalização na infecção com *Leishmania* acontecer é necessário uma proteína adaptadora MyD88, a qual está implicada em várias vias dos TLR, incluindo TLR2, TLR4, TLR7 e TLR9. Por exemplo, MyD88 e TLR4 contribuem para o controle de *L. major* em camundongos C57BL/6. O TLR9 está envolvido na ativação das células NK em modelo animal da leishmaniose visceral (*L. donovani*) e em leishmaniose cutânea (*L. major* e *L. braziliensis*) (Vargas-Inchaustegui et al., 2009), sugerindo que a expressão de TLR9 está diretamente associada com o tamanho da lesão em pacientes com LC (Vieira et al., 2013). Adicionalmente, tanto a liberação de IL-12 quanto de IFN- α/β indicam que as mDCs e pDCs são estritamente dependentes da sinalização por TLR9 após a estimulação com *L. major*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* (Liese et al., 2007). Da mesma forma, TLR2 é importante na ativação *in vitro* das células NK humanas, quando são estimuladas com o LPG de *L. major*. Assim, trabalhos demonstram que MyD88 é indispensável na geração de uma imunidade protetora para *L. braziliensis* (Vargas-Inchaustegui et al., 2009; Bogdan, C 2012) e que o TLR2 é o TLR mais comum expressado pelos macrófagos na forma ativa da infecção em pacientes com LTA (Tuon et al., 2012).

Durante a infecção, a interação *Leishmania*- células dendríticas é complexa, pois envolve uma série de eventos de sinalização celular e produção de citocinas que podem estimular ou inibir as respostas das células T, tendo como consequência o controle ou a

progressão da doença (Liu & Uzonna, 2012; de Assis et al., 2012). A magnitude e perfil da ativação das células dendríticas varia dependendo das espécies e cepas de *Leishmania* (Markikou-Ouni et al., 2012), das diferentes subpopulações de DCs e do estímulo exógeno (de Oliveira et al., 2012). Diversas populações de células dendríticas estão envolvidas na resposta à infecção. Estudos demonstram que mDCs e pDCs podem ser essenciais para ativação *in vivo* de células NK por *Leishmania*, por sua capacidade de liberar grandes quantidades de IL-12 e IFN- γ (Liese et al., 2008).

DCs tem a capacidade de controlar o catabolismo do triptofano, por meio da enzima indoleamina 2, 3 oxigenase (IDO), que converte o triptofano em kynurenine, como mecanismo de regulação imunológica. Assim, IDO produzido pelas DCs inibe os níveis locais de triptofano durante o desenvolvimento policlonal das células T, bloqueando a proliferação das mesmas. Portanto, foi demonstrado que a infecção de *Leishmania* induz a produção de IDO pelas DCs derivadas de monócitos humanos, sugerindo um mecanismo de escape do parasito à ação do sistema imune, favorecendo sua sobrevivência (Donovan et al., 2012).

DCs são a fonte principal de IL-12 na infecção provocada por *Leishmania*, quando as células T CD4⁺ estimuladas, direcionam o estímulo para o perfil Th1, causando a resistência na leishmaniose (Carvalho et al., 2008). De fato, DCs derivadas da pele de camundongos C57BL/6, foram reconhecidas como fonte principal de IL-12p40, após a infecção por *L. major* (Brandonisio et al., 2004). A produção de IL-12 e a maturação de DCs na infecção de *Leishmania*, depende do subtipo de DC e da espécie do parasito. Por exemplo, a infecção *in vitro* de DCs derivadas de medula óssea com promastigotas de *L. mexicana*, apresentam uma falha não simplesmente na produção de IL-12 mas também na ativação de DCs imaturas. Por outro lado, DCs esplênicas murinas, apresentam uma habilidade para produzir IL-12 levando até o fim o processo de internalização e fagocitose para o controle de amastigotas de *L. major* (Brandonisio et al., 2004). Em humanos, a produção de IL-12p70 por mDCs infectadas com *L. major* é um processo dependente de CD40/CD40L. De fato, quando DCs fagocitam promastigotas metacíclicas de *L. major* apresentam um aumento na expressão de moléculas de superfície tais como HLA-DR, CD-86 e CD40 sugerindo o processo de maturação (Marovich et al., 2000).

As infecções causadas por *L. braziliensis* em humanos, tem sido associadas com uma exagerada resposta imune para o controle do parasito, o qual está associado com a expansão das células T CD4⁺ Th1. Por serem produtoras de IFN- γ podem causar resposta exacerbada,

apresentando uma grave imunopatologia conhecida como leishmaniose mucosa (LM) (Tuon et al., 2008). Estudos anteriores indicam, que macrófagos infectados com *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*, aumentam a produção de IFN- β , independente do óxido nítrico endógeno ou exógeno. Paralelamente, IFN- β reduz significativamente a liberação de peróxido tanto em macrófagos humanos não infectados como nos infectados. Essa diminuição foi observada, no aumento dos níveis da proteína superóxido dismutase (SOD1). De acordo com a infecção *in vivo* usando parasitos *L. braziliensis*, é possível detectar níveis altos de IFN- γ e IL-17 secretado pelas células T CD4+, levando à auto-cura em leishmaniose cutânea (Khoury et al., 2009). Conjuntamente, TNF- α tem um papel fundamental na patogênese, pois, células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com LM secretam altos níveis de TNF- α em relação aos indivíduos com LC (Oliveira et al., 2011; Carvalho et al., 2008), além da produção de altos níveis significativos CXCL10 e CCL4 (de Oliveira et al., 2012). Por outro lado, DCs derivadas de medula óssea de camundongos em co-cultura com *L. braziliensis*, regulam a expressão de marcadores de ativação das DCs e produzem níveis consideráveis de IL-12 e TNF- α (Carvalho et al., 2008).

A relação entre o processo inflamatório e uma resposta imune, específica e eficaz é complexa, sendo importante no resultado final da doença. IL-1 é uma citocina pro-inflamatória similar à citocina TNF- α . Ambas são consideradas citocinas de alerta secretada pelos macrófagos, principalmente aqueles residentes nos tecidos. A IL-1 inicia o processo inflamatório pela indução da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e nos leucócitos (Voronov et al., 2010). A produção de IL-1 β é importante para a resistência da infecção, através do receptor IL-1R e da proteína adaptadora MyD88, os quais contribuem a síntese de óxido nítrico sintase para a produção de óxido nítrico, um dos principais mediadores de defesa contra *Leishmania* spp (Lima-Junior et al., 2013). Pesquisas atuais, mostram que um incremento significativo na produção de IL-1 β nos monócitos purificados a partir de células mononucleares de sangue periférico e o acréscimo dessa citocina no soro de pacientes com LCD é maior em relação com os pacientes que apresentam LC, causadas por *L. mexicana*, esse incremento está associado diretamente à carga parasitaria, portanto, IL-1 β tem desempenhado um papel crítico na determinação da severidade da doença nos pacientes com LCD (Fernández-Figueroa et al., 2012).

Vários mediadores inflamatórios produzidos pelo hospedeiro podem contribuir para severidade da infecção por meio do aumento do recrutamento celular, mas IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória que ajuda ao controle exacerbado da resposta

inflamatória, característico da forma cutânea localizada causada por *L. braziliensis* que induz a produção de CXCL-10 e IL-10 em células mononucleares de sangue periférico humano e macrófagos. Adicionalmente, TGF- β tem um papel fundamental na desativação de macrófagos, permitindo um aumento na carga parasitária, sendo tal efeito observado no modelo experimental da infecção por *L. amazonensis* (de Oliveira et al.,2012).

Como foi mencionado anteriormente, DCs são as mediadoras da resposta imune adaptativa, a qual, pode ser protetora ou não, e basicamente está associado à polarização da resposta através das citocinas como mediadoras para desenvolver uma resposta Th1, Th2 ou Treg. Por meio, de estudos em camundongos como modelo experimental, tem-se visto que camundongos BALB/C infectados com *L. major* mostraram-se susceptíveis à infecção, pois foram associados à alta produção de IL-4 (Th2), IL-10 (Treg) e TGF- β (Sacks & Noben-Trauth, 2002), portanto, essas citocinas são supressoras da resposta imune celular, auxiliando a progressão da doença. O efeito oposto, foi observado em camundongos C57BL/6, já que apresentaram resistência à infecção com a mesma espécie de *Leishmania*, esses, apresentaram lesões auto-cicatrizantes com maior produção de IL-12 e IFN- γ (Th1) (Voronov et al., 2010). Estes, experimentos permitiram caracterizar o perfil imunológico das respostas Th1 e Th2 (Alexander & Bryson, 2005).

Camundongos C57BL/6 resistentes à infecção com *L.major* exibem uma carga parasitária baixa no sítio da lesão, e ao mesmo tempo manifestam uma fase silenciosa na qual os parasitos encontram-se em expansão antes de aparecer a lesão e atividade imune. Este fenômeno, pode ser favorecido por vários mecanismos de evasão, como a inibição da maturação das DCs ou a presença das células T regulatórias (Treg). De fato, durante a infecção com *L. major* em camundongos, há uma acúmulo de células Treg CD4+CD25+ dependentes de IL-10 onde os níveis de IL-12 são inibidos e, conseqüentemente, a ação das células T efectoras, gerando um atraso na resposta imune e favorecendo a expansão do parasito (Belkaid, 2003). Além disso, curiosamente, parasitos são eliminados do sítio da infecção após a cura da lesão em camundongos BALB/c infetados com *L. braziliensis* na derme, mas persistindo dentro dos linfonodos, sendo descritas a presença de células T CD4+CD25+ que expressam marcadores de regulação Foxp3, GITR, e CD103, sugerindo mecanismos imunoregulatorios que permitem a sobrevivência do parasito (Falcão et al., 2012). Alguns estudos, tem sido direcionados na avaliação do papel das Treg na LCD causada pelas espécies do subgênero *viannia* e o papel que desempenham na resolução das lesões crônicas após o tratamento com antimonialis pentavalentes. Portanto, observou-se que a não regulação de IFN-

γ pelas Treg encontra-se associada ao desenvolvimento crônico da doença, enquanto, um incremento na função das Treg após o tratamento está relacionado à cura das lesões (Rodriguez-Pinto et al., 2012).

As células T CD8+, também podem contribuir ao controle ou à progressão da doença. Este tipo de células podem ser classificadas em dois subtipos Tc1 e Tc2. Tc1 é capaz de destruir células infectadas com *Leishmania* por meio da ativação de perforinas e mecanismos relacionados com a expressão do Fas/CD95L, iniciando o processo de apoptose pela ativação da via da caspase 8 (Smy, 2002). Além disso, possuem uma alta capacidade de produção de IFN- γ e TNF- α (C. I. de Oliveira & Brodskyn, 2012). Trabalhos realizados, verificaram que a leishmaniose cutânea humana causada por *L. braziliensis*, em estado avançado, mostra maior presença de linfócitos CD8+ expressando granzima A, em relação com os estágios iniciais da doença, tendo uma estreita relação com o processo inflamatório e progressão da infecção (Faria et al., 2009).

Outros estudos revelam que, células obtidas dos linfonodos de pacientes com LCL não ulceradas (fase inicial), registram alta presença de neutrófilos, eosinófilos e células T CD8+. Por outro lado, células B CD19+ e plasmócitos são observadas com maior frequência em pacientes com linfadenopatia apresentando ulcerações (fase crônica). Consequentemente, altos níveis da citocina IL-10 na fase crônica é a responsável por regular a expansão do dano tecidual. Também observam-se níveis altos e similares de IFN- γ e IL-4 em pacientes com LCL e LM, resultando em um perfil cruzado na ativação da resposta Th1-Th2 (de Oliveira et al., 2012).

1.7.2 Mecanismos de escape -Morte Celular Programada (MCP)

A morte celular programada é um processo chave no desenvolvimento, manutenção e homeostase dos tecidos, sendo um processo essencial nos organismos multicelulares, que em situações fisiológicas contribui em processos como embriogênese, metamorfose (em animais), regulação do desenvolvimento e renovação celular e eliminação de patógenos (Suzanne & Steller, 2013)

Existem cinco tipos de MCP descritos até o momento, caracterizadas por diferentes eventos bioquímicos e morfológicos, os quais são: i) A autofagia, processo que ocorre em

resposta a um estresse metabólico, resultando na degradação de componentes celulares o que leva à formação dos autofagossomos, os quais irão se fundir com os lisossomos e, logo depois, o conteúdo deles é degradado pelas hidrolases lisossomais; ii) a necrose, onde as células sofrem aumento de volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana citoplasmática e conseqüentemente ruptura celular. Durante a necrose, as células vizinhas também são afetadas, causando uma reação inflamatória local; iii) A senescência, como processo metabólico ativo essencial para o envelhecimento, envolvendo a deterioração dos telômeros ativando genes supressores tumorais; iv) a mitose catastrófica, envolvendo uma mitose aberrante, resultando em uma segregação cromossômica errônea. Geralmente, não é considerada uma forma de morte, mas sim uma sinalização irreversível para a morte (Weaver & Cleveland, 2005); e v) a apoptose, onde a célula morre por clivagem do DNA, condensação e fragmentação do núcleo, formação de prolongamentos (*blebs*) na membrana celular, concentração citoplasmática e vesiculação da membrana, que leva a fagocitose da célula sem induzir resposta inflamatória. Este tipo de morte é importante no desenvolvimento de linfócitos na regulação das respostas dos linfócitos a antígenos estranhos e na manutenção de tolerância a auto antígenos (Abbas et al., 2011) (Grivicich, Regner, & Rocha, 2007). A apoptose é um processo essencial nos organismos multicelulares, importante na remoção de células indesejadas e na regulação do número de células do organismo, ocorrendo também em organismos unicelulares, apresentando as mesmas características encontradas em metazoários (Horikawa, 2011).

A apoptose também pode ser iniciada quando a célula é exposta a circunstâncias exógenas como por exemplo a lesão do DNA por radiação ou toxinas químicas, situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento (Grivicich et al., 2007). Assim, a apoptose é uma forma de morte celular extremamente regulada e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores. As alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (Grivicich et al., 2007). A indução da morte está geralmente ligada a ativação de um conjunto de enzimas proteolíticas chamadas caspases (*Cysteiny ASPartate-specific proteinASE*) (Horikawa, 2011), que são cisteíno proteases que clivam proteínas imediatamente após resíduos de ácido aspártico (Dorn, 2013).

Existem duas vias principais que levam à apoptose: i) a via mitocondrial ou intrínseca, que é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deficiência de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação da oncogênese, isso, envolve a indução de

proteínas especializadas que induzem o vazamento mitocondrial, aumentando sua permeabilidade por causa da diferença de potencial, e consequentemente a liberação de moléculas pro-apoptóticas para o citoplasma. A instabilidade da diferença de potencial leva à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando as espécies reativas do oxigênio (ROS), tendo como consequência a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. A permeabilidade da membrana, induz a liberação do citocromo c para o citoplasma, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória, ativando a apoptose. Uma vez o citocromo c no citosol forma um complexo com a proteína chamada fator ativador da apoptose 1 (APAF), formando o apoptosomo, o qual ativa a pro-caspase 9, liberando a forma ativa da caspase 9. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (Mariño et al.,2014). A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras da morte por apoptose participando na regulação e estão divididas em três grupos: **a)** Bcl-2 e Bcl-X_L , como proteínas anti-apoptóticas de múltiplos domínios, localizadas na membrana mitocondrial externa, ajudando na estabilidade; **b)** Bax e Bak, como proteínas pró-apoptóticas com múltiplos domínios, mas essas proteínas ativadas podem romper a membrana externa da mitocôndria; e **c)** BH3, que apresenta domínio único, funcionando como sensores de stress , tendo a capacidade de se ligar a proteínas pró e anti-apoptóticas (Grivicich et al., 2007). Essa proteína pode ser ativada por estímulos transcricionais (ativação da p53) e pós-transcricionais (fosforilação ou proteólise) (Mariño et al.,2014). E ii) a via do receptor da morte ou extrínseca, que é ativada pela ligação a receptores de superfície de membrana da família do fator de necrose tumoral (TNF): O receptor 1 do fator de necroses tumoral (rTNFR-1), Fas/CD95, receptor do ligante indutor da apoptose relacionado com TNF (TRAIL).A comunicação entre eles resulta no recrutamento de várias proteínas, incluindo o domínio de morte associada a TNFR1 (TRADD) e o domínio FAS-associado a morte (FADD), que tem a capacidade de recrutar a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (Mariño et al.,2014).

Em condições fisiológicas, células caracterizadas por perda do potencial de membrana da mitocôndria, alterações estruturais de membrana, degradação do DNA, condensação da cromatina nuclear, formação de extrusões e formação de corpos apoptóticos (células em apoptoses ou necrose) além dos patógenos (Grivicich et al., 2007), são rapidamente reconhecidas por células fagocíticas profissionais como os macrófagos e as DCs (Poon et al.,2010). Esse reconhecimento, acontece devido à exposição de ligantes na superfície da célula, conhecidos como padrões moleculares associados a apoptose, como a fosfatidilserina

(PS) (Savill & Fadok, 2000; Peng et al., 2001). Após o reconhecimento das células em apoptose é desencadeado rapidamente um processo de fagocitose e de digestão intracelular provocando uma resposta anti-inflamatória, induzindo a produção de TGF- β , PGE2 e a diminuição nos níveis de TNF- α das células fagocíticas ativadas (macrófagos) (Savill & Fadok, 2000).

Adicionalmente, os neutrófilos são leucócitos de vida curta que morrem por apoptose, necrose ou NETose. Um processo onde os neutrófilos liberam fibras de DNA, histonas e proteínas granulares chamadas redes de neutrófilos extracelulares (NETs), os quais, podem matar bactéria ou fungo, assim, tem reportado que promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* são capazes de induzir a formação de NETs em neutrófilos humanos, desencadeando um processo leishmanicida. Além disso, o LPG de *Leishmania* sp. também induz a formação dos NETs em neutrófilos, causando o mesmo efeito (Guimarães-Costa et al., 2009).

Alguns ensaios realizados com *L. amazonensis*, demonstram que, macrófagos infectados com essa espécie de *Leishmania* fagocitam neutrófilos apoptóticos humanos causando um aumento na carga parasitária, dependentes de TGF- β e PGE2, mas quando, macrófagos infectados fagocitam neutrófilos em estado de necrose, é favorecida a morte de *L. amazonensis*, um processo dependente de TNF- α e elastase produzido pelos neutrófilos o qual está associado à produção de peróxido (Afonso et al., 2008).

Estudos em *Leishmania* mostraram que este parasita é capaz de mimetizar a apoptose por meio da exposição de fosfatidilserina (PS), como um dos mecanismos adaptativos para estabelecer a infecção em mamíferos (El-Hani et al., 2012). Existe um fenômeno chamado "mimetismo apoptótico", que foi observado em formas amastigotas de *L. amazonensis*, as quais foram isoladas das lesões de camundongos infectados, havendo exposição de fosfatidilserina na superfície como característica do processo apoptótico. Deste modo, a fosfatidilserina na superfície das formas amastigotas de *L. amazonensis* serve como um ligante, facilitando o reconhecimento pelos macrófagos que ativa rapidamente o processo endocítico, causando a ativação do sistema anti-inflamatório dos macrófagos, produzindo TGF- β e IL-10 que ao mesmo tempo reduz a síntese de óxido nítrico (NO). Assim, há a formação de um ambiente favorável para as amastigotas dentro dos macrófagos com consequente multiplicação do parasito intracelular. (El-Hani et al., 2012). De tal modo, estudos demonstram que as manifestações clínicas estão relacionadas com as moléculas de

superfície dos parasitos, pois, foi observado uma maior exposição de PS em parasitos (*L. braziliensis*) isolados de pacientes com LC em relação com os parasitos isolados de pacientes com LM, o que poderia explicar a agressividade das lesões, já que as ulcerações cutâneas são menos graves que as lesões cutâneas-mucosas (Farias et al., 2013).

Mecanismos semelhantes tem sido desenvolvido em outros tipos de parasitos como *T. gondii* (Seabra et al., 2004) e *T. cruzi* (Damatta et al., 2007), pois, a exposição de PS pelo parasito inibe a síntese de NO pelos macrófagos durante a infecção, além disso, alguns vírus como o citomegalovírus, utilizam um mecanismo semelhante para conseguir entrar na célula hospedeira (Soares, King, & Thorpe, 2008). Por outra parte, células tumorais também expõem PS sem desencadear a ação apoptótica, contribuindo na progressão da doença, já que é inibido o processo inflamatório, levando a um estado de imunossupressão com a liberação de TGF- β , citocina importante na progressão de tumores malignos (Lima et al., 2009).

Também, *M. tuberculosis* inibe a apoptose de neutrófilos, isso, dificulta o reconhecimento da bactéria por DCs afetando sua maturação e a ativação das células T, evitando a destruição de *M. tuberculosis* contribuindo na propagação da infecção (Blomgran et al., 2012).

Linfócitos T citotóxicos (CTL) e células NK são linfócitos efetores e compartilham vias comuns citotóxicas, importantes para o controle de patógenos. A primeira via, composta por toxinas granulares citoplasmáticas com alta predominância na ruptura da membrana, chamada perforina, similarmente, a granzima, e que se encontra relacionada estruturalmente com a família das serino protease, a qual é secretada por exocitose. As duas em conjunto (perforina- granzima) induzem apoptose nas células alvo, ativando a via das caspase (cisteíno proteases). A segunda via, a apoptose depende basicamente da via das caspase por meio do receptor FAS(CD95) e o ligante FASL. A função principal da via FAS-FASL é eliminar linfócitos auto-reativos (Smy, 2002).

A análise de lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* em pacientes na etapa inicial e tardia da doença mostrou que células granzima A+ e CD8+ granzima A+ apresentam maiores porcentagens em pacientes com lesões tardias em relação com os pacientes que tinham lesões iniciais. Esses dados, propõem uma alta frequência na expressão de granzima A o que tem concordância com o nível de destruição do tecido, portanto células CD8+ é a população envolvida neste processo (Faria et al., 2009). Outro trabalho similar foi reportado recentemente demonstrando que, a maioria de células T CD8+ granzima B+ presentes na lesão

de pacientes com LC, desencadeiam características citotóxicas, o que está correlacionado com o dano tecidual e tamanho da lesão; por outro lado, IFN γ é produzido pelas células T CD4+, citocina essencial para o controle e morte do parasito, mas essa expressão não está correlacionada com o dano tecidual. Assim, esses dados revelaram uma dicotomia na LC: células T CD8+ granzima B+ medeiam o dano tecidual mais do que o controle do parasito, em quanto que, células T CD4+ IFN γ + medeiam a morte do parasito. Esses resultados são importantes para a compreensão da imunopatogenese da LC, pois, poderia contribuir para o planejamento e/ ou desenho de diferentes tratamentos terapêuticos (Santos et al., 2013).

Por outro lado, existe a indução da apoptose nas células do hospedeiro na presença de patógenos, com o fim de criar um mecanismo de evasão, favorecendo a infecção pelo patógeno, a qual seria "silenciosa", com a possibilidade de infectar novas células sem desencadear um processo inflamatório. Esses, mecanismos têm sido evidenciados em vários agentes infecciosos. O vírus de imunodeficiência humana (HIV), o qual induz apoptose em linfócitos infectados ou não com o vírus, por meio da inibição da expressão de proteínas Bcl-2, pertencente à família de proteínas anti-apoptóticas (Gougeon, 2003). Também, estudos recentes, mostram que células epiteliais gástricas humanas sofrem apoptoses pela presença de *H. pylori*, pois, a bactéria induz ativação da via indutora da apoptose TRAIL pela inibição da ação da proteína FLIP (proteína anti-apoptótica), induzindo a ativação da caspase-8 e consequentemente transmitindo o sinal de apoptose (Lin et al., 2014). Da mesma forma *M. tuberculosis*, promove a apoptose em macrófagos através da lipoproteína de 38kDa, a qual é dependente da via das caspases, envolvendo TNF- α e FasL, além da super regulação dos receptores de morte celular TNFR1, TNFR2 e Fas (Sanchez et al., 2009). Assim, três espécies que são as responsáveis por causar leishmaniose cutânea *L. major*, *L. aethiopica* e *L. tropica*, tem sido estudadas na indução de apoptose 48 e 72 h após a infecção pela exposição de PS na superfície, em macrófagos derivados de monócitos humanos, esse evento foi confirmado pela avaliação da integridade da membrana mitocondrial, observando uma instabilidade no potencial eletroquímico de membrana e ativação da via das caspase (Getti et al., 2008). Também, tem reportado que FasL e TRAIL, são expressos nas células da derme localizadas nas lesões ulceradas de LC causada por *L. aethiopica*, essa espécie de *Leishmania* induz apoptose nos queratinócitos humanos, provocando um ambiente inflamatório (Tasew et al., 2010)

Finalmente, a visão de controlar e eliminar doenças tropicais negligenciadas tem alcançado um impulso significativo nos últimos anos. A leishmaniose como parte desse grupo

tem sido foco de estudo, com o fim de elucidar o perfil imunológico da doença, implementando principalmente modelos murinos. DCs como principais células hospedeiras, além dos macrófagos, cumprem um papel fundamental quando interagem com esses parasitos, pois inicializam e direcionam a respostas das células T, influenciando na evolução e no resultado final da doença, o qual depende de fatores do hospedeiro, do parasito e de fatores ambientais, incluindo aí a função do vetor. Neste contexto, é essencial compreender a interação DCs- *L. braziliensis* para visar medidas profiláticas efetivas necessárias para o controle do parasito nos hospedeiros vertebrados.

2. JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose é considerada uma doença tropical negligenciada que acomete grandes populações mundialmente. Nas Américas, constitui um problema de saúde pública devido à sua morbidade e grande expansão geográfica. *L. braziliensis* é a espécie etiologicamente mais importante responsável pela Leishmaniose cutânea no Brasil. Logo, as DCs são células apresentadoras de antígeno por excelência, capazes de criar uma ponte entre a resposta imune inata e a adaptativa, além de ser as células hospedeiras desses parasitos. Portanto, o estudo da caracterização celular e imunológica da interação DCs- *L. braziliensis*, contribuem na construção do perfil imunológico da doença e ajudam ao conhecimento da fisiopatologia dos eventos iniciais da interação, permitindo elucidar o comportamento do sistema imune em resposta à infecção.

3. HIPÓTESE

A interação de células dendríticas (DCs) humanas com *Leishmania braziliensis*, desencadeia estímulos para a produção de citocinas e expressão de moléculas de superfície envolvidas na resposta inflamatória, podendo o parasito, induzir morte celular nas DCs como mecanismo de evasão.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

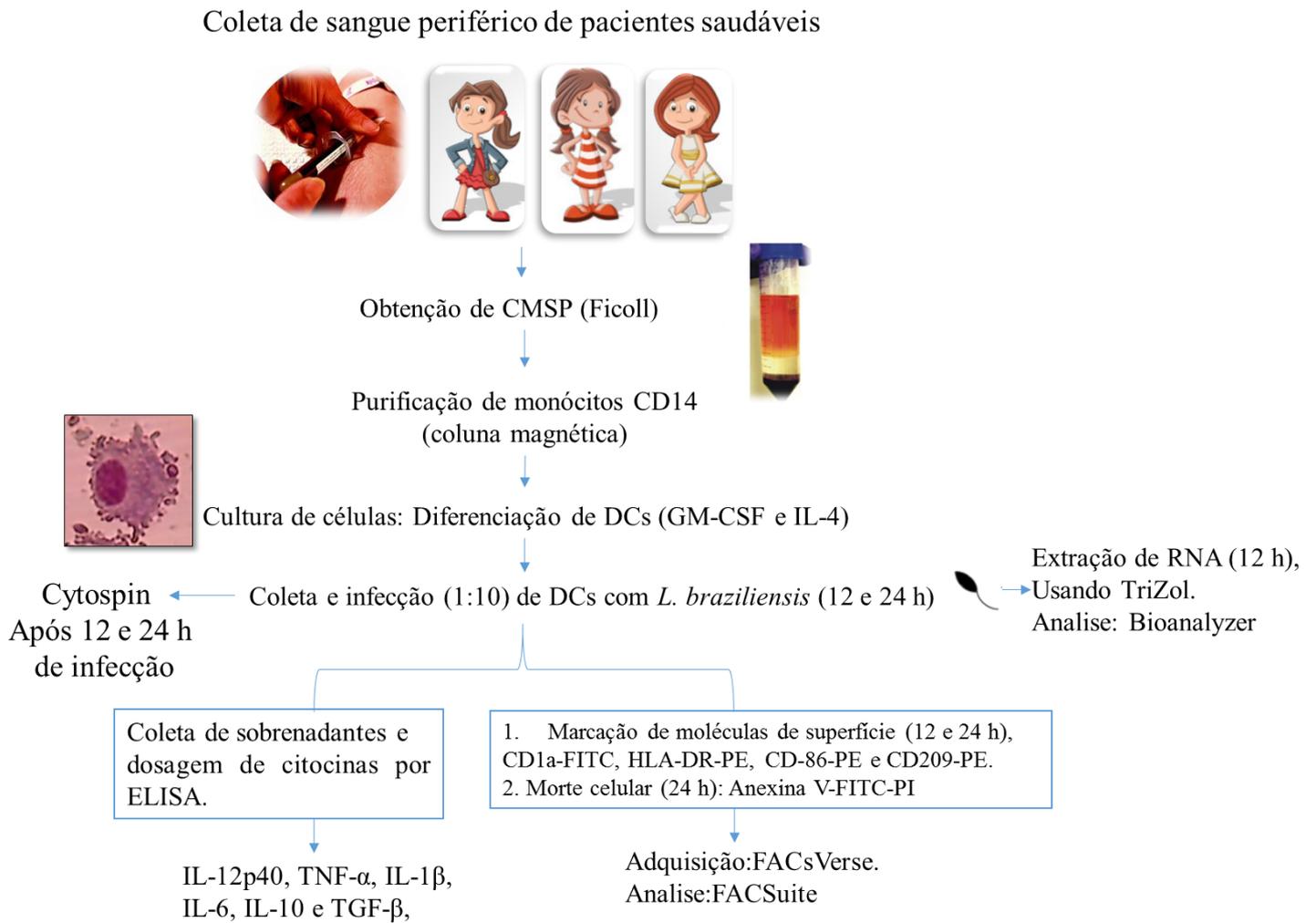
Estudar a interação *in vitro* entre células dendríticas humanas e *Leishmania braziliensis*,

4.2 Atividades

1. Avaliar o perfil de expressão de moléculas de superfície em células dendríticas infectadas por *L. braziliensis*
2. Quantificar a taxa de infecção de DCs infectadas por *L. braziliensis*.
3. Avaliar o perfil de secreção de citocinas após a interação com *L. braziliensis*.
4. Avaliar a morte celular de DCs infectadas com *L. braziliensis*.
5. Extrair RNA das DCs expostas e não expostas a *L. brasiliensis* para análise da modulação genômica funcional.

5. METODOLOGIA

5.1 Desenho experimental



5.2 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

O sangue utilizado nesta pesquisa foi coletado de doadores voluntários saudáveis após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo1). Portanto, 80 ml de sangue venoso foram coletados em tubos heparinizados. As células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) foram separadas por gradiente de densidade utilizando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) para gerar células dendríticas a partir de monócitos (Ebstein et al., 2009). O sangue foi diluído na proporção 1:2 com PBS estéril e foi utilizado 12ml de ficoll. Após a diluição o sangue foi vertido lentamente sobre o ficoll, em seguida centrifugado a 400 x g por 30 minutos a temperatura ambiente, sem freio. Após a centrifugação, a interface de leucócitos que se encontrava acima da camada de hemácias e abaixo do plasma, foi coletada e lavada por três vezes com tampão fosfato salina (PBS) 1X, mediante rotações de 400 x g por 10 minutos a 4°C de temperatura. Após a obtenção das células, estas foram ressuspensas em um volume conhecido de tampão fosfato salina para posterior contagem. Preparou-se uma diluição homogênea na proporção 1:100 em azul de tripan 0.4% (Sigma), logo depois, preencheu-se a câmara de Neubauer com 10µl da diluição, para verificar viabilidade celular, ou seja, as células não viáveis com a membrana celular comprometida deixam atravessar o corante para o interior da célula ficando na cor azul, dessa forma, as células viáveis (não coradas) foram quantificadas.

5.3 Obtenção de monócitos

Os monócitos foram obtidos por separação magnética. Uma concentração de 10^7 CMSP foram ressuspensas em tampão MACS (BSA 0.5%, EDTA 2Mm e PBS 1X com pH=7.2) e marcadas com anticorpos anti-CD14 conjugados à microesferas como sugere o kit CD14 MicroBeads Human (Miltenyi Biotec) (Ebstein et al., 2009), logo foram passadas por uma coluna magnética anti-CD14, para obter a fração positiva CD14 (monócitos). Com isso, a fração CD14 positiva ficou retida na coluna magnética. A coluna foi lavada três vezes com 500µl de tampão MACS permitindo a passagem das células CD14- (fração negativa composta principalmente por linfócitos). Após as lavagens e coleta da fração negativa, a coluna foi retirada do suporte magnético e colocada em outro tubo de 15 ml para coleta da fração positiva (CD14+). Foi adicionado 1 ml de tampão MACS e por pressurização com um êmbolo, a fração positiva foi coletada. As frações negativas e positivas foram quantificadas em câmara de Neubauer por exclusão com azul de tripan.

Imediatamente, foram separadas 10^5 células das frações anteriormente descritas, para serem marcadas com anticorpos anti-CD14 humano conjugado à ficoeritrina (PE) (clone 61D3) (eBioscience), adquiridas e analisadas por Citometria de Fluxo (FACS Verse BD. A expectativa é que a expressão de CD14 na fração positiva seja superior a 80% para a continuidade dos experimentos.

5.4 Cultura de Células Dendríticas

As células CD14+ da fração positiva foram ajustadas para uma concentração de 3×10^5 células/ml cultivadas em placas de 24 poços durante sete dias a 37°C e 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado com penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100mg/ml) e L-glutamina (2mM) (Gibco, Grand Island, NY), 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) inativado, 800UI/ml de IL-4, 50 ng/ml GM-CSF (PreProtec). A cada três dias retirou-se 150 µl de meio e adicionou-se 200 µl de novo meio por poço de meio suplementado com as citocinas descritas acima.

5.5 Cultura dos parasitos

Promastigotas de *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) cepa MHOM/BR/01/BA788 foram cultivadas *in vitro* em meio Schneider (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% (v/v) SFB inativado (Gibco Laboratories, Paisley, Scotland) (de Moura et al., 2007), e 100 µg/ml de gentamicina (Neoquímica) a 26°C sem injeção de CO₂. Os parasitos foram mantidos em cultura, acompanhados por contagens até atingir a fase estacionária de crescimento para utilização nos experimentos de infecção.

5.6 Coleta e interação das células dendríticas com *L. braziliensis*

As células dendríticas (DCs) foram coletadas após sete dias de cultura por lavagens com PBS, uma vez que estas não são aderentes. Cada poço foi lavado com 1ml de PBS 1X estéril fazendo três repetições, armazenando as células em um tubo tipo Falcon de 50 ml e mantendo-as sempre no gelo, posteriormente, as células foram centrifugadas a 400 x g a 4 °C durante 10 minutos. As DCs foram quantificadas em câmara de Neubauer por exclusão com azul de tripan.

O índice de infecção das DCs foi medido após 12 e 24 horas de interação com *L. braziliensis* em uma proporção de 10 promastigotas para cada célula dendrítica. Foram plaqueadas 5×10^5 DCs/ml por poço e incubadas a 37°C.

5.7 Caracterização das células dendríticas

Após 12 e 24 h de infecção as células infectadas foram lavadas três vezes com 1ml de PBS 1X e centrifugadas a 400 x g a 4°C durante 10 minutos. Posteriormente foram separadas e incubadas com tampão FACS (PBS, albumina bovina (BSA) 1% (sigma) e azida sódica 0,001%), para cada 10^5 células/ml foi adicionado 100 µl de tampão FACS, para o bloqueio da porção FcR durante 20 minutos no gelo, como preparação à caracterização fenotípica por Citometria de Fluxo, células foram marcadas com anticorpos conjugados à ficoeritrina (PE) e/ou isotionato de fluoresceína (FITC), como os anticorpos anti-humanos CD1a- PE (clone SK9), anti- humano CD1a-FITC (clone HI149), anti- humano HLA-DR-PE (clone LN3), anti- humano CD86 (B7-2)-PE (clone IT2.2) e anti- humano CD209-PE (clone eB-h209) (todos eBioscience). Marcações simples foram utilizados como controles da marcação. Foram adicionados 20 µl de cada anticorpo diluído 20x e os tubos foram incubados na geladeira e no escuro por 30 min. Em seguida, as amostras foram lavadas com 300 µl de PBS 1X e centrifugadas a 400 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* formado adicionou-se 400 µl de tampão FACS para aquisição da amostra. As células foram adquiridas no citômetro de fluxo (BD FACSVerser BD Bioscience) e analisadas no programa FACSuite (BD Bioscience).

5.8 Taxa de infecção

A carga parasitária foi avaliada após citocentrifugação (Incibrás) das DCs infectadas. Para tanto foram necessárias por cada lâmina 2×10^5 células/ml em 200µl. Após realização e secagem do citospin as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). O número de células infectadas e amastigotas por célula foram analisadas de forma aleatória, sem sobreposição de campos. Foram contadas um total de 100 DCs por lâmina, no microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) com um aumento total de 1000X.

5.9 Detecção da morte celular em células dendríticas

Após 24h de infecção, 10^5 células/ml foram coletadas e lavadas com 200 μ l de PBS 1X, centrifugadas à temperatura ambiente 400 x g por 10 minutos e em seguida despregado o sobrenadante. Adicionou-se às células 195 μ l de tampão de ligação 1X e 5 μ l de Anexina V-FITC, e incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente. Passado este tempo, as DCs foram lavadas novamente na mesma condição anterior. Em seguida, adicionou-se 190 μ l de tampão de ligação 1X e 10 μ l de iodeto de propídeo (PI), seguindo as recomendações do fabricante (*Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit* (eBioscience)). As DCs foram marcadas e adquiridas no menor tempo possível no citômetro (BD FACSVerse BD Bioscience), detectando assim células em apoptose inicial, apoptose tardia ou em necrose. Células positivas para Anexina V-FITC e negativas para PI foram consideradas no início da apoptose, as positivas para PI em necrose, e DCs duplo positivo apresentam apoptose tardia ou necrose. A população de células duplo negativo representam as células viáveis.

Como controle positivo da apoptose, 10^5 células/ml foram expostas a radiação ultravioleta por 30 minutos e marcadas como descrito anteriormente.

5.10. Dosagem de citocinas

As concentrações das citocinas IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, IL-12+p40, IL-10 e IL-6 presentes nos sobrenadantes coletados para as duas condições experimentais, controle e infectado após 12 e 24 horas com *L. braziliensis*, foram mensuradas através de ensaios de ELISA utilizando-se kits comerciais específicos (eBioscience) e (Novex, Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. As placas de 96 poços Corning Costar 9018 para dosar IL-1 β (eBioscience) e NUNC MaxiSorp microplates para dosar TNF- α , TGF- β 1, IL-12+p40, IL-10 e IL-6 (Novex, Life Technologies), foram sensibilizadas e incubadas durante a noite a 4°C com o anticorpo de captura para cada uma das citocinas anteriormente mencionadas. No dia seguinte, o anticorpo de captura foi removido com a solução de lavagem (PBS 1X/ TWEEN 20 0.05%). Em seguida, a placa foi bloqueada usando a solução de bloqueio (componentes reservados pelo fabricante) durante uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 100 μ l das amostras e a curva padrão. Tal curva iniciou-se com uma concentração de 2000 pg/ml seguida de diluições seriadas de 2x (limite mínimo de detecção de 15 pg/ml). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por duas horas. A placa foi lavada com a solução de lavagem cinco vezes. Após este procedimento, foi colocado

100 µl do anticorpo de detecção e foi realizada uma incubação de 1 hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem, adicionou-se 100 µl da enzima Avidin-HRP em cada poço, deixou-se em incubação por trinta minutos à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas por cinco vezes. Após isso, 100µl do substrato 3,3,5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados em cada poço. A reação se desenvolveu à temperatura ambiente no tempo de quinze a trinta minutos, permitindo o desenvolvimento de cor. Finalmente, a reação enzimática foi parada após a adição de 100 µl por poço da solução de parada 1M H₃PO₄ ou 2N H₂SO₄. Realizou-se uma Reação Mista de Linfócitos (RML) como controle positivo da ELISA.

As leituras das reações colorimétricas foram realizadas a 450 nm em leitor de placas SpectraMAX M5 Multi-Mode Microplate Readers (Molecular Devices). As concentrações das citocinas dos sobrenadantes das amostras analisadas foram determinadas a partir dos valores obtidos com a curva padrão realizada com as diferentes diluições de cada uma das citocinas recombinantes.

5.11 Extração de RNA

Após 12 h de infecção, para cada uma das condições experimentais foram separadas aproximadamente 10⁶ células/ml, colocadas em tubos tipo Eppendorf de 1.5 ml, lavadas com PBS 1X e recuperadas por centrifugação (400 x g por 10 minutos a 4°C), ao *pellet* formado colocou-se 1ml de TRIzol (Invitrogen, EUA) e incubado durante 5 minutos à temperatura ambiente para o isolamento do RNA total. Em seguida, 200 µl de clorofórmio foram adicionados e após agitação vigorosa por 15 segundos os tubos foram incubados à temperatura ambiente entre 2-3 minutos, e posteriormente, foram sometidos à centrifugação (12000 x g por 15 minutos a 4°C). Após este passo, a solução foi separada em uma fase inferior fenol-cloroformio rosa, uma interfase de proteínas, e uma fase aquosa na parte superior do tubo. O RNA encontra-se exclusivamente na fase aquosa, a qual foi transferida para um novo tubo, este RNA obtido foi precipitado usando 1µl de GlycoBlue (15 mg/ml) (Ambion) e álcool isopropílico (Sigma), deixou-se em incubação durante a noite toda a -80°C. No dia seguinte, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas a 12000 x g por 20 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* formado de RNA foi lavado imediatamente com 500µl de etanol 75% (Sigma) e submetido a uma nova centrifugação (12000 x g por 10 minutos a 4°C). Depois, o precipitado foi secado à temperatura ambiente para posteriormente ser ressuspensão em 20µl de água MilliQ livre de

RNase. Finalmente, o RNA total foi tratado com Turbo DNase 2U/ μ l (Ambion) como sugere o fabricante. Sua integridade foi avaliada utilizando o equipamento Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) e quantificado no QUBIT usando o kit Qubit RNA HS Assay. O RNA total foi armazenado à -80°C , para ser utilizado em procedimentos posteriores. É importante ressaltar que todos os reagentes usados neste procedimento foram RNase-free.

5.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa GraphPad-Prism 6.0. Para conhecer a significância estatística entre as condições controle e infectado nos diferentes experimentos realizados, o *test Kolmogorov-smirnov* foi usado para detectar a normalidade dos dados. Para um comportamento paramétrico, *test-t student* foi aplicado, e para, dados não paramétricos *Mann-Whitney* o foi empregado. Considerou-se significância estatística com um valor $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Purificação de monócitos

Após a obtenção das células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) por gradiente de densidade Ficoll-Paque Plus, os monócitos foram purificados por separação magnética, e 10^5 células/ml, da fração negativa e da fração positiva foram analisados por citometria de fluxo quanto à expressão de CD14+. A expressão de CD14 na fração positiva foi em geral superior a 80%, o que deu continuidade aos experimentos (**Figura 5**).

Na **figura 5A** observou-se a presença de duas populações distintas, monócitos em P3 (CD14+) com uma porcentagem de 18,83% e linfócitos em P4 (CD14-) com uma porcentagem de 57,57%. Na **figura 5B** observou-se a análise da fração negativa, aqui a maioria das células se concentra em P4, com um enriquecimento na população de 68,67% e a presença de raras células em P3 (4,67%). Já na **figura 5C**, o enriquecimento da população de monócitos em P3 é evidente, tendo uma porcentagem de 82,28% e uma mínima presença de linfócitos em P4 de 5,88%. A **figura 5D**, apresenta a porcentagem de monócitos purificados (98,89%).

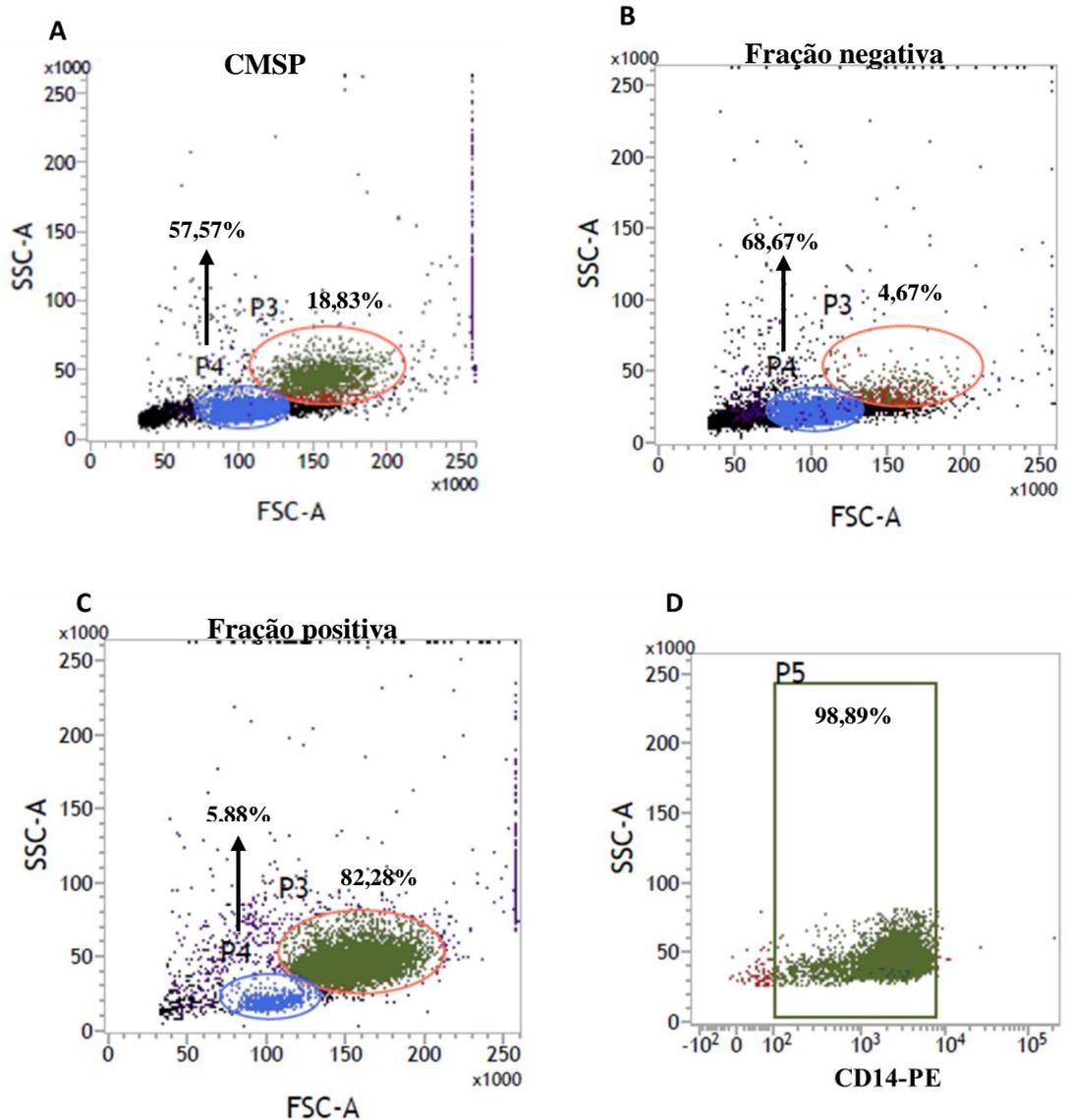


Figura 5: Purificação de monócitos. Dot plot representativo de Citometria de Fluxo, mostrando a purificação da população de monócitos de um doador representativo (n=8). Populações analisadas por tamanho (*Forward Scatter* ou *FSC*) vs granulosidade (*Side Scatter* ou *SSC*). P3 gate em laranja, representa os monócitos e P4 gate em azul, representa a população de linfócitos. (A) CMSP antes da separação magnética para a obtenção de monócitos, mostrando as populações P3 e P4. (B) Fração negativa depois da separação magnética. Mostrando poucas células na população P3 e uma presença alta de células na população P4. (C) Fração positiva depois da separação magnética. Aumento considerável na população de monócitos P3 e um empobrecimento das células na população P4. (D) Monócitos purificados CD14+ (P5), analisados pelo fluorocromo PE vs *SSC*.

6.2 Caracterização de células dendríticas

As DCs diferenciadas a partir de monócitos foram coletadas após sete dias de cultura, e cultivadas na presença de *L. braziliensis* (LB). Após 12 e 24 h de infecção as DCs foram coletadas novamente, marcadas e adquiridas no citômetro de fluxo para avaliar a expressão da

molécula CD1a. CD1 é uma proteína de membrana de tipo 1, amplamente utilizada como um marcador de diferenciação de células dendríticas em humanos.

Para ter uma confiabilidade de todos os resultados obtidos nesta pesquisa no momento da aquisição e análise no citômetro de fluxo, utilizou-se um grupo de células não marcadas e foram empregadas como referência para cada um dos fluorocromos usados (PE e FITC) e descartar autofluorescência.

Após a marcação com anti-CD1a (FITC), verificamos a existência de populações CD1a+ e CD1a- nos tempos de 12 h (**Figura 6**) e 24 h (**Figura 7**), após o contato com *L. braziliensis*. Após a marcação simples com o fluorocromo FITC, foi utilizada uma estratégia de *gate* para selecionar a população de interesse P1 (**Figura 6A, E e 7A, E**), representando a população total de células nas condições controle e infectado. As **figuras 6B, F e 7B, F** demonstram a população P5 correspondente à células positivas que expressam a molécula CD1a com uma mediana de 64,79±13,24% para a condição controle e 65,17±17,98% para a condição infectado no tempo de 12 h com um valor $p=0.6859$, igualmente para o tempo de 24 h se reporta uma mediana de 70,49±23,31% na condição controle e 87,92±5,77% na condição infectado com um valor ($p=0.0119$).

Continuando a análise das mesmas figuras, a população P4 indica a porção de células que não expressam o marcador CD1a, com uma mediana de 29,24±8,542 na condição controle e 21,28±7,849 na condição infectado para o tempo correspondente a 12 h com um valor $p=0,6175$, do mesmo modo, para o tempo de 24 h a quantificação das células com esta característica tiveram uma mediana de 26,87±21,22 para a condição controle e 25,95±23,08 na condição infectado com um valor $p=0,9551$.

Os dados expostos anteriormente não tiveram diferença significativa na expressão do marcador CD1a ao comparar as duas condições de estudo, exceto após 24 h, permitiram conhecer a presença de DCs.

Os histogramas apresentados nas figuras **6C, D, G, H e 7C, D, G, H** confirmam mais uma vez a expressão do marcador CD1a conjugado com o fluorocromo FITC nas populações P1 e P5 principalmente.

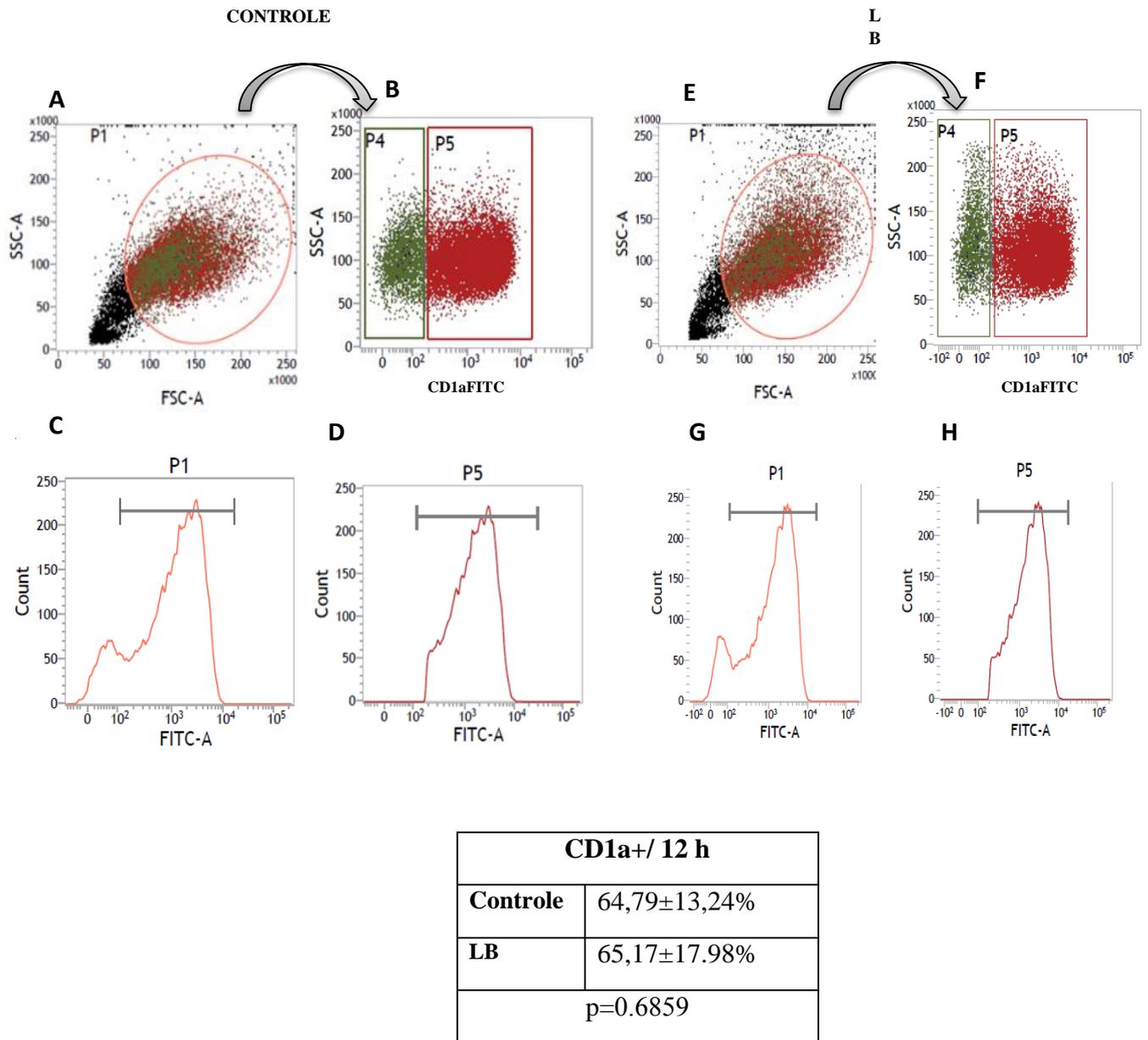


Figura 6: Dot plot representativo de citometria de fluxo da expressão do marcador de superfície CD1a de células dendríticas 12h depois da interação com *L. braziliensis*. Perfil característico da população celular P1 (gate laranja) (A) População P1 da condição controle analisada por tamanho (*Forward Scatter* ou *FSC*) vs granulosidade (*Side Scatter* ou *SSC*), mostrando o total de células (B) População P4 (gate verde) mostra as células com fenótipo CD1a- e a população P5 (gate vermelho) sugere a fração de células positivas para CD1a+ da condição controle. (C, D) Histograma mostrando a intensidade do fluorocromo FITC da população P1 (células totais CD1a+) e P5 (porção de células positivas para CD1a+) da condição controle (E) População P1 da condição infectada analisada por tamanho (*Forward Scatter* ou *FSC*) vs granulosidade (*Side Scatter* ou *SSC*), apresentando o total de células (F) População P4 (gate verde) mostra as células com fenótipo CD1a- e a população P5 (gate vermelho) resalta porção de células positivas para CD1a+ da condição infectado. As duas populações foram analisadas pelo fluorocromo FITC vs granulosidade. (G, H) Histograma mostrando a intensidade do fluorocromo FITC da população P1 (células totais CD1a+) e P5. O teste *Kolmogorov-smirnov* foi aplicado para verificar normalidade e o teste *Mann-Witney* para comparar duas condições (n=3).

Também, analisou-se graficamente a porcentagem de expressão do marcador CD1a, representando cada ponto um doador. Na **figura 8A**, observou-se uma distribuição heterogênea do marcador para o tempo de 12 h em cada uma das condições estudadas. Apesar dos dados não terem uma significância estatística, a condição controle teve um intervalo entre 40 -80% de expressão aproximadamente, tendo a presença da maioria dos dados na porcentagem de 65%. Já, a condição infectado (LB) teve uma distribuição dos dados um pouco mais ampla cobrindo desde 36% até quase 90% na expressão de CD1a.

Do mesmo modo, a **figura 8B**, a porcentagem de expressão da molécula CD1a no tempo de 24 h. observou-se que na condição controle a expressão foi mais ampla, pois, os dados cobrem um intervalo aproximadamente entre 30-98%. Agora, a condição infectado teve um aumento considerável, mantendo a expressão deste marcador entre 80-100%, sendo este aumento significativo e induzido pela *L. braziliensis*.

Outro parâmetro importante para análise, foi a *Mean Fluorescence Intensity* (MFI). A **figura 8C**, mostra o MFI de CD1a no tempo de 12 h. observou-se que na condição controle os valores tiveram um ponto de localização entre os valores de 500-1000, excetuando um ponto que alcança um valor de 1600 da MFI. Assim, se reporta uma mediana de 736 ± 317.8 . Do mesmo modo, a condição infectado teve o mesmo comportamento em relação com o controle, mas o ponto que ficou fora dos outros alcançou aproximadamente 1800 da MFI. Uma mediana de 741 ± 406.8 foi reportada para esta condição com um valor $p = 0,8236$.

Semelhantemente, a **figura 8D**, apresenta um desvio padrão muito grande e uma distribuição semelhante dos dados, relacionando as condições de pesquisa no tempo de 24 h. observou-se um ponto comum de 3500 da MFI e uma mediana de 901.01 ± 1002 para a condição controle e 1061 ± 969.9 para a condição LB com um valor $p = 0,9319$. Observou-se que os dados não tiveram relevância estatística.

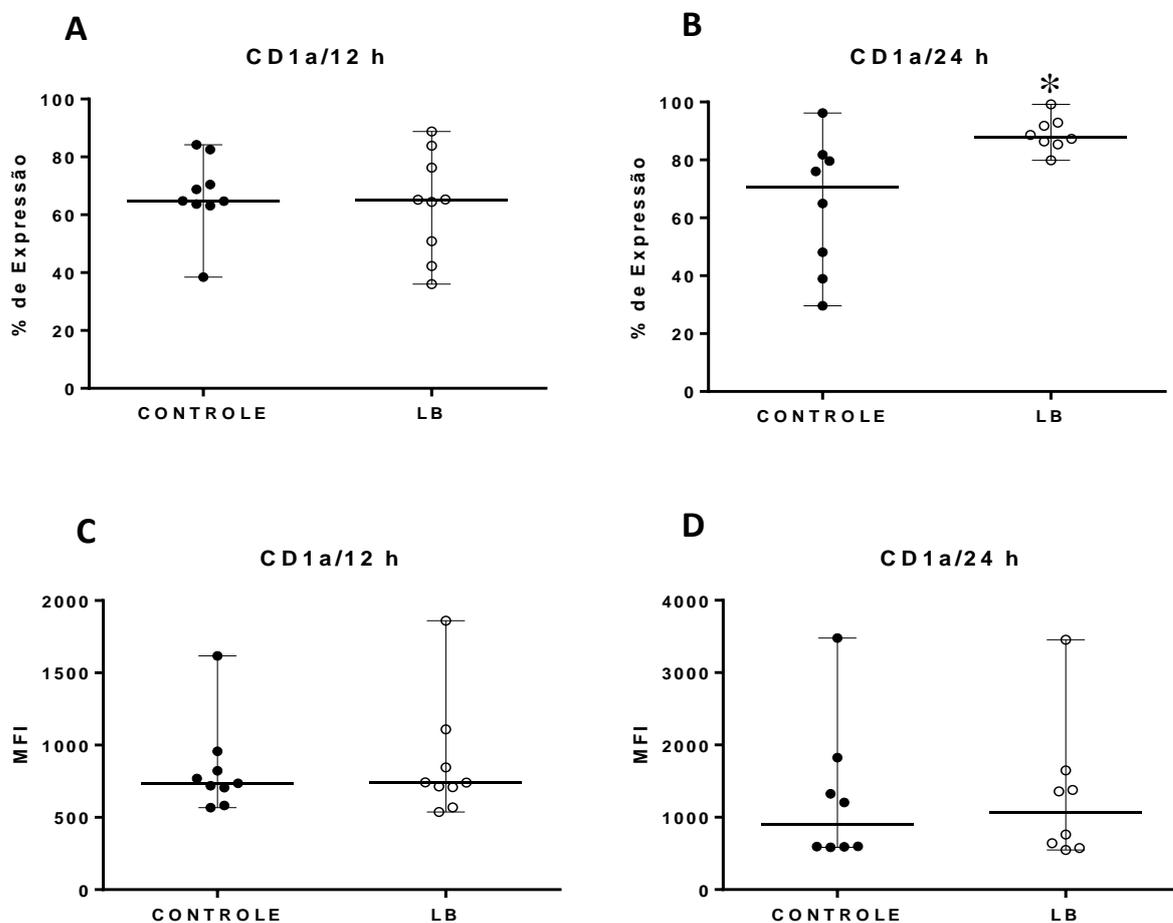


Figura 8: Expressão percentual da molécula CD1a+ de DCs na interação com *L. braziliensis* após sete dias de cultura (A) 12 h (B) 24 h. MFI do fluorocromo FITC, no marcador de diferenciação CD1a para DCs na interação com *L. braziliensis* após sete dias de cultura (C) 12 h (D) 24 h. Cada ponto no gráfico representa um doador.

Posteriormente, analisou-se a porcentagem de células positivas para o fenótipo CD1a, observando o comportamento crescente ou decrescente da molécula ao comparar as duas condições de pesquisa. Assim, observou-se na **figura 9A** que após 12 h de infecção a porcentagem de células positivas para o fenótipo CD1a+ no doador 2 (D2), teve uma diminuição de 65,77% da condição controle para 52,83% da condição infectada, tendo uma diminuição total de 12,94%. Os outros dois doadores (D1 e D3) tiveram uma porcentagem de células positivas entre 65% e 70% para as duas condições de estudo.

Depois de 24 h (**Figura 9B**), observou-se uma distribuição heterogênea na porcentagem de células positivas para o fenótipo CD1a+, excetuando os doadores D7 e D8 que apresentaram entre 30 e 40% de células positivas entre as duas condições, controle e

infectado; o qual representa uma porcentagem baixa. Pelo contrário, os doadores D1, D2, D3, D4, D5 e D6 mantiveram uma porcentagem de células positivas entre 60% e 95% para cada condição, controle e infectado. É importante ressaltar, que o doador D2 após 24 horas de interação com o patógeno aumentou a porcentagem de células positivas deste marcador para 80%, independente da condição.

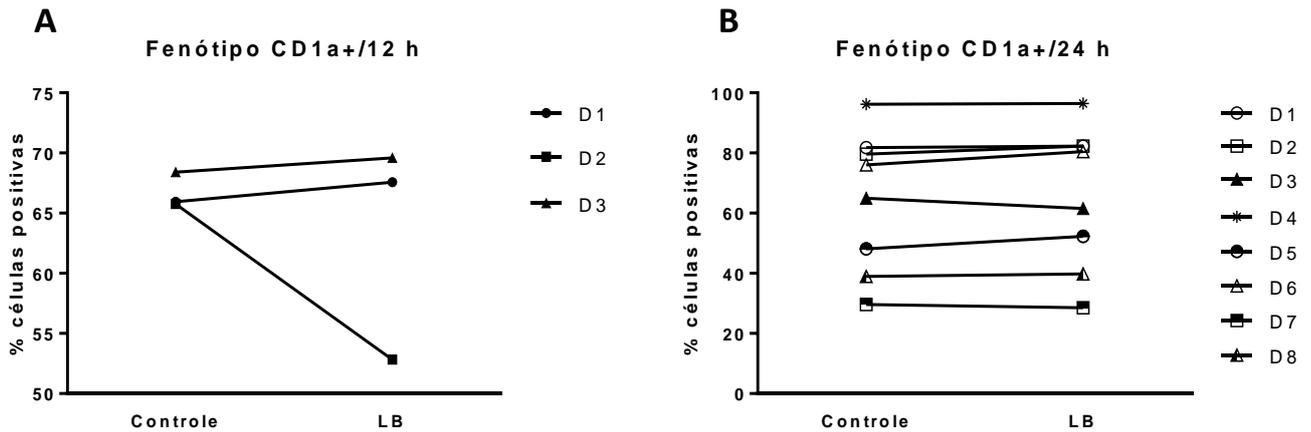


Figura 9: Porcentual de células positivas obtidas a partir de citometria de fluxo, em quanto a expressão do marcador CD1a. (A) 12h após da interação com *L. braziliensis* (n=3) (B) 24h após da interação com *L. braziliensis* (n=8) Cada ponto no gráfico representa um doador.

6.3. Taxa de infecção com *L. braziliensis*

A partir da padronização na obtenção de células dendríticas geradas a partir de monócitos humanos sete dias após a sua diferenciação em estado imaturo na presença das citocinas IL-4 e GM-CSF, observa-se na **figura 10** uma fotografia de uma cultura desse tipo de células, as quais, apresentam uma morfologia irregular de forma arredondada; moveis e não aderentes em cultura, já que possuem extensões citoplasmáticas chamadas dendritos.

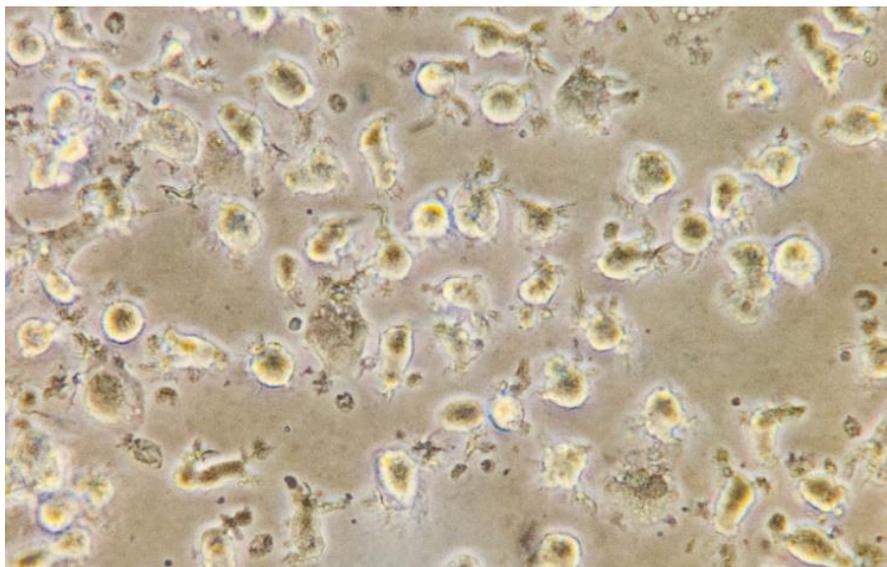


Figura 10: Fotografia capturada no microscópio eletrônico ótico invertido (ZEISS PrimoVert) no aumento total de 400X. Cultura de DCs em meio RPMI suplementado com citocinas IL-4 e GM-CSF, após sete dias de diferenciação.

A partir disso, as DCs foram expostas aos parasitos de *L. braziliensis* durante 12 h e 24 h, para avaliar a taxa de infecção e a carga parasitária. Passados cada um dos tempos observou-se uma mediana de $46 \pm 3,564$ no tempo de 12 h e $52,50 \pm 24,04$ no tempo de 24 h, com um valor $p=0,1840$ (**Figura 11A**). Ademais, o número de amastigotas por 100 células foi contabilizado. Na **figura 11B**, observa-se que a mediana de amastigota/célula para o tempo de 12 h foi de $7,140 \pm 0,5459$ e $6,100 \pm 1,612$ para o tempo de 24 h, com um valor $p=0,4976$.

Observou-se uma boa taxa de infecção nos tempos 12 e 24 h como foi mostrado na **figura 11A** e uma carga parasitaria coerente como foi descrito anteriormente, em relação com a proporção da infecção, já que, foram usados dez parasitos por cada célula dendrítica, embora os resultados não demonstrarem relevância estatística.

Novamente, fotografias de DCs foram capturadas no microscópio eletrônico ótico, que confirmam e mostram com mais detalhe a morfologia irregular arredondada com extensões citoplasmáticas deste tipo de células, como é mostrado nas **figura 11C, D, E e F**.

A **figura 11C**, mostrou DCs sem a forma amastigota de *L. braziliensis* no interior da célula, logo, nas **figuras 11E e D**, DCs apresentaram formas amastigotas de *L. braziliensis* no citoplasma da células, e tiveram uma maior quantidade células expostas durante 12h (14 amastigotas) em comparação com 24 h (9 amastigotas). Finalmente a **figura 11F**, mostrou a

formação do vacúolo parasitóforo, induzido por parasitos de *L. braziliensis* em DCs após 24 h de interação.

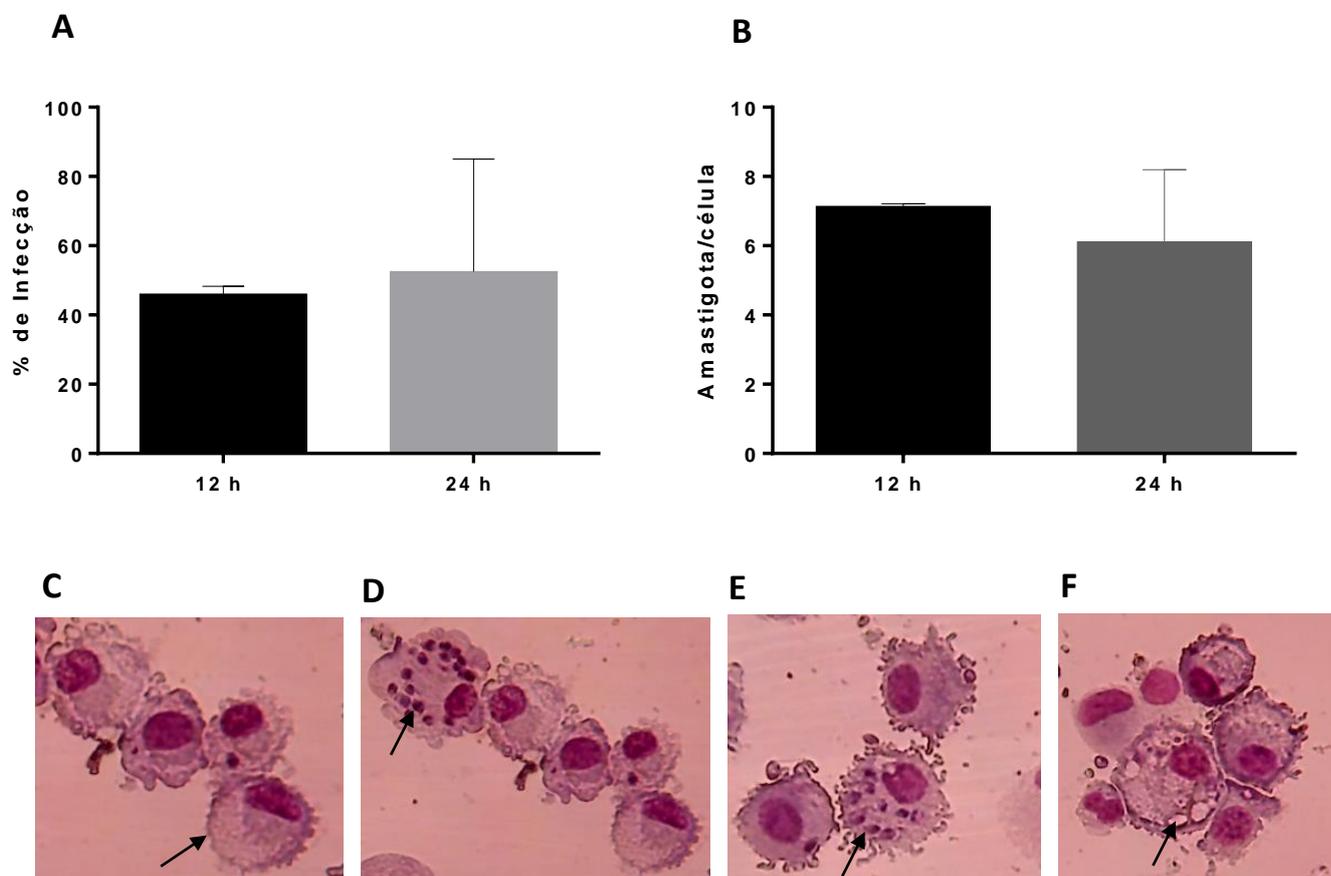


Figura 11: Taxa de infecção de DCs infectadas com *L. braziliensis* após 12 h e 24 h de interação (A). Carga parasitária de DCs infectadas com *L. braziliensis* após 12 h e 24 h de interação (B). Fotografias representativas capturadas no microscópio eletrônico ótico (Nikon Eclipse E200), no aumento total de 400X. Aparência de DCs não infectadas (seta)(C). DCs infectadas após 12 h de interação (seta)(D). DCs infectadas após 24 h de interação (seta)(E). DCs infectadas após 24 h de interação apresentando formação de vacúolo parasitóforo (seta)(F).

6.4 Expressão de moléculas de superfície

Depois de avaliar o marcador de diferenciação CD1a como foi descrito anteriormente nas células, após 12 e 24 h de interação com *L. braziliensis*, as moléculas de superfície HLA-DR, CD86 e CD209 (DC-SIGN) foram analisadas para detectar sua expressão por citometria de fluxo. É importante ressaltar que estas moléculas foram analisadas dentro das populações de DCs com ambos fenótipos, o fenótipo CD1a+ e fenótipo CD1a-.

6.4.1 Expressão da molécula HLA-DR

Estudou-se a expressão da molécula HLA-DR em DCs na condição controle e infectada nos tempos de 12h e 24h após da infecção com *L. braziliensis*, para conhecer o nível de ativação da célula, pois, este tipo de molécula está presente exclusivamente em células apresentadoras de antígeno como as DCs.

A **figura 12** demonstra um gráfico *dot plot* gerado no citômetro de fluxo. Após a marcação simples com o fluorocromo PE, que permitiu observar a população de células que expressaram HLA-DR no tempo de 12 h de interação com o patógeno.

Na **figura 12A, E** observou-se a estratégia de *gate* escolhido para analisar a população P1, a qual é o conjunto de células de interesse, para a condição controle e a condição infectado no tempo de 12 h. Da mesma forma a **figura 12B, F**, demonstra a população P2 correspondente à células que expressam HLA-DR na superfície, com uma mediana de $72 \pm 11,80\%$ na condição controle e $84,35 \pm 2,69\%$ na condição infectado, com um valor $p=0,700$. A população P3 não expressa HLA-DR na superfície da célula, por tanto não teve relevância.

Os histogramas apresentados na **figura 12C, D, G, H** confirmam mais uma vez a expressão do marcador HLA-DR conjugado com o fluorocromo PE nas populações P1 e P2 principalmente

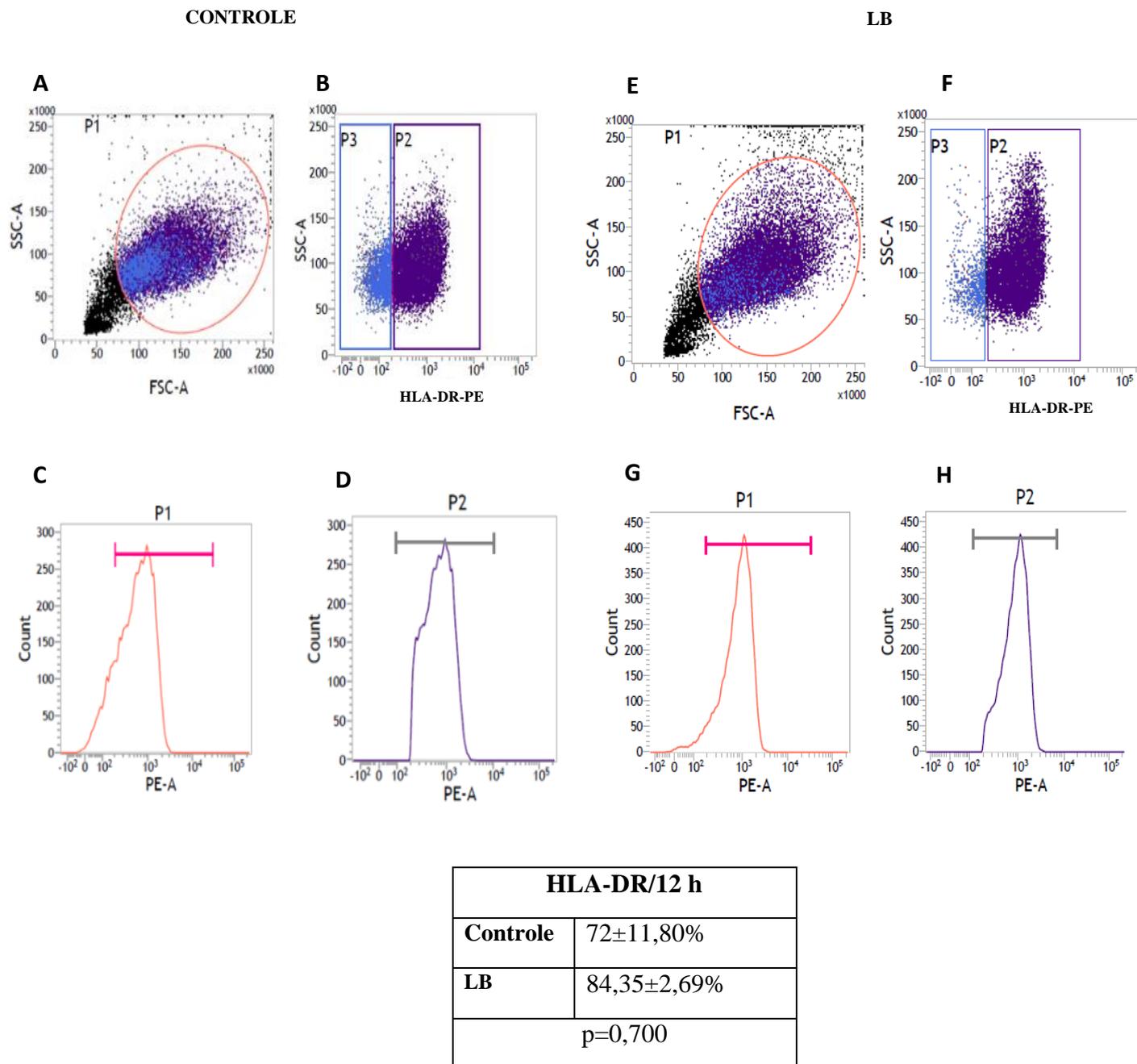
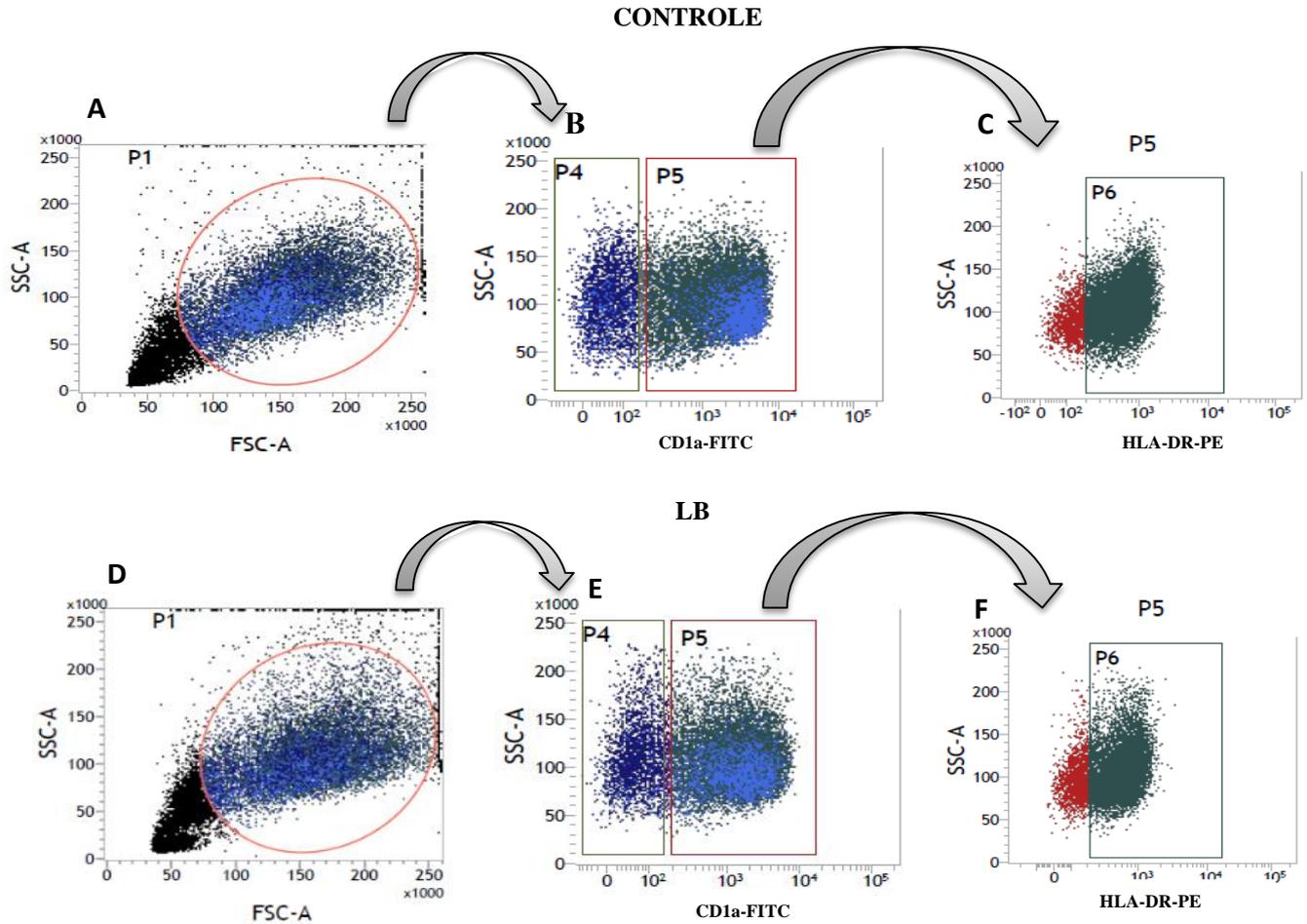


Figura 12: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão da molécula de superfície HLA-DR de células apresentadoras de antígeno (DCs) 12h depois da interação com *L. braziliensis*. Perfil característico da população celular P1 (*gate* laranja). (A) População P1 da condição controle analisada por tamanho (*FSC*) vs granulosidade (*SSC*) mostrando o total de células. (B) População P2 (*gate* roxo) positiva para o marcador de superfície HLA-DR e população P3 (*gate* azul) sem expressão do marcador de superfície HLA-DR, da condição controle e foram analisadas pelo fluorocromo PE vs granulosidade. (C, D) Histograma mostrando a intensidade do fluorocromo PE da população P1e P2 da condição controle (E) População P1 da condição infectada analisada por tamanho (*FSC*) vs granulosidade (*SSC*) apresentando o total de células. (F) População P2 (*gate* roxo) positiva para o marcador de superfície HLA-DR e a população P3 (*gate* azul) sem expressão do marcador de superfície HLA-DR, da condição infectado e foram analisadas pelo fluorocromo PE vs granulosidade. (G, H) Histograma mostrando a intensidade do fluorocromo PE da população P1e P2 da condição infectada. O *test Kolmogorov-smirnov* foi aplicado para verificar normalidade e o *Mann Whitney* para comparar duas condições (n=3).

No experimento de 24 h as células obtidas foram analisadas por dupla marcação (CD1a-FITC e HLA-DR-PE) no citômetro de fluxo, fazendo possível a obtenção de dois fenótipos CD1a+/HLA-DR+ e CD1a-/HLA-DR+. Portanto, as **figuras 13, 14**, apresentam um gráfico *dot plot* gerado no citômetro de fluxo.

Primeiramente, para analisar o fenótipo CD1a+/HLA-DR+, foi necessário escolher a estratégia de *gate* para a população P1 correspondente às células de interesse (**Figura 13A, D**). Observou-se na **figura 13B, E** a população P5 analisada anteriormente que pertence à população de células que expressaram CD1a na superfície, assim, dentro deste grupo de células foi avaliada a expressão do marcador de superfície HLA-PE, correspondente a P6 na condição controle com uma mediana de $87,92 \pm 23,31\%$ (**Figura 13C**) e na condição infectado com uma mediana de $89,99 \pm 5,77\%$ (**Figura 13F**), com um valor $p=0,8362$.



CD1a+/HLA-DR/24 h	
Controle	87,92±23,31 %
LB	89,99±5,77 %
p=0.8362	

Figura 13: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão de HLA-DR 24 h depois da interação com *L. braziliensis* em células com fenótipo CD1a+/HLA-DR+. Perfil característico da população celular P1 (gate laranja). (A) Marcação dupla das células pertencentes à população P1 da condição controle analisada por tamanho (FSC) vs granulosidade (SSC). (B) População P4 com fenótipo CD1a- e população P5 com fenótipo CD1a+, pertencentes na condição controle, analisada pelo fluorocromo FITC vs granulosidade. (C) População P6 (gate azul) com fenótipo CD1a+/HLA-DR+ da condição controle analisada pelo fluorocromo PE vs granulosidade, analisada dentro da população P5 (D) Marcação dupla da população P1 da condição infectada analisada por tamanho (FSC) vs granulosidade (SSC). (E) População P4 com fenótipo CD1a- e população P5 com fenótipo CD1a+, pertencentes na condição infectado analisada pelo fluorocromo FITC vs granulosidade. (F) População P6 (gate azul) com fenótipo CD1a+/HLA-DR+ da condição infectado analisada pelo fluorocromo PE vs granulosidade, analisada dentro da população P5. O *test Kolmogorov-smirnov* foi aplicado para verificar normalidade e o *Mann Whitney* para comparar duas condições (n=8).

Analogamente, para o fenótipo CD1a-/HLA+, a estratégia de *gate* foi selecionada para a população P1 correspondente às células de interesse (**Figura 14A, D**). Observou-se na **Figura 14B, E** a população P4 que foi mencionada acima, pertencente à população de células que não expressaram CD1a na superfície, de tal modo que, dentro deste grupo de células foi estudada a expressão do marcador de superfície HLA-PE, correspondente a P7 na condição controle com uma mediana de $92,07 \pm 5,75$ (**Figura 14C**) e na condição infectado com uma mediana de $91,32 \pm 24,86$ (**Figura 14F**), com um valor $p=0,4029$.

Os dados expostos anteriormente não tiveram diferença significativa na expressão do marcador HLA-DR ao comparar as duas condições de estudo.

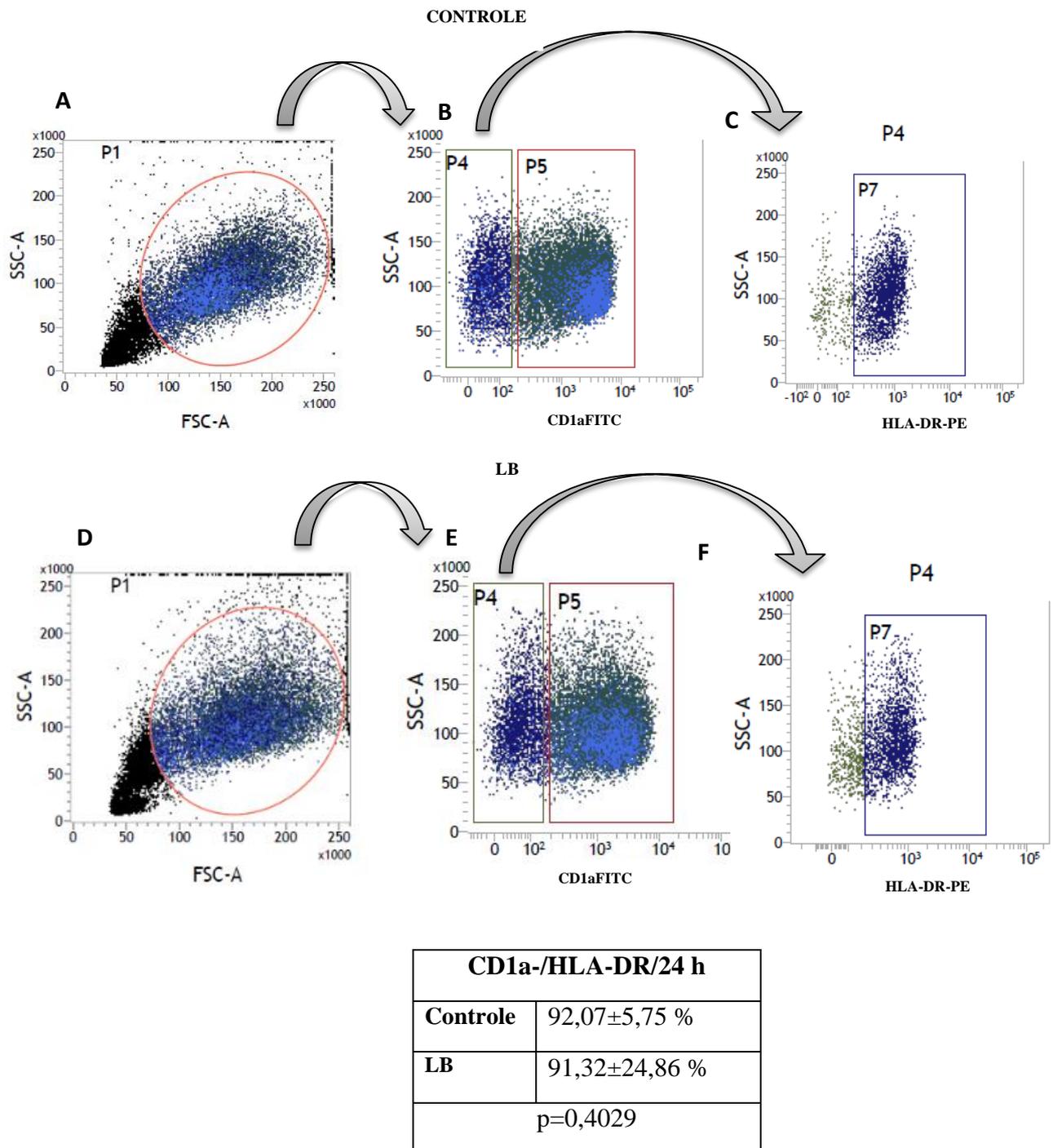


Figura 14: Dot plot representativo de citometria de fluxo da expressão de HLA-DR 24 h depois da interação com *L. braziliensis* em células com fenótipo CD1a-/HLA-DR+. Perfil característico da população celular P1 (*gate* laranja). (A) Marcação dupla das células pertencentes à população P1 da condição controle analisada por tamanho (*FSC*) vs granulosidade (*SSC*). (B) População P4 com fenótipo CD1a- e população P5 com fenótipo CD1a+, pertencentes na condição controle, analisada pelo fluorocromo FITC vs granulosidade. (C) População P7 (*gate* azul) com fenótipo CD1a-/HLA-DR+ da condição controle analisada pelo fluorocromo PE vs granulosidade, analisada dentro da população P4 (D) Marcação dupla da população P1 da condição infectada analisada por tamanho (*FSC*) vs granulosidade (*SSC*). (E) População P4 com fenótipo CD1a- e população P5 com fenótipo CD1a+, pertencentes na condição infectado analisada pelo fluorocromo FITC vs granulosidade. (F) População P7 (*gate* azul) com fenótipo CD1a-/HLA-DR+ da condição infectado analisada pelo fluorocromo PE vs granulosidade, analisada dentro da população P4. O *test Kolmogorov-smirnov* foi aplicado para verificar normalidade e o *Mann-Whitney* para comparar duas condições (n=8).

Apesar dos dados não apresentar uma significância estatística, no experimento de 12 h, observou-se em geral uma tendência no aumento da expressão de HLA-DR. A porcentagem de células positivas na condição controle foi de 71,37% e 72% para os doadores D1 e D2 respectivamente e 86,50% para D3, em relação com a condição infectado, D1 teve um aumento 26,25% para 97,62% e D2 teve um aumento de 22,52% para 94,52% na porcentagem de células positivas de HLA-DR, D3 somente teve um aumento total de 10,46% para 96,96% na expressão deste marcador (**Figura 15A**). No experimento de 24h a porcentagem de expressão da molécula de superfície foi heterogênea e amplamente dispersa ao comparar as duas condições. Porém, é importante ressaltar, que o doador D6 foi o único que teve uma diminuição de 16,71% na expressão da molécula HLA-DR da condição controle (92,90%) para a condição infectada (76,19%) (**Figura 15B**). Também, células com fenótipo CD1a- mantiveram uma expressão homogênea, pois o intervalo se manteve entre 80 e 98% de células positivas para as duas condições controle e infectado. Com exceção do doador D6 que apresentou uma diminuição considerável na expressão desta molécula da condição controle (93,95%) para a condição infectada (22,54%), com uma diminuição total de 71.41% na expressão de HLA-DR (**Figura 16A**)

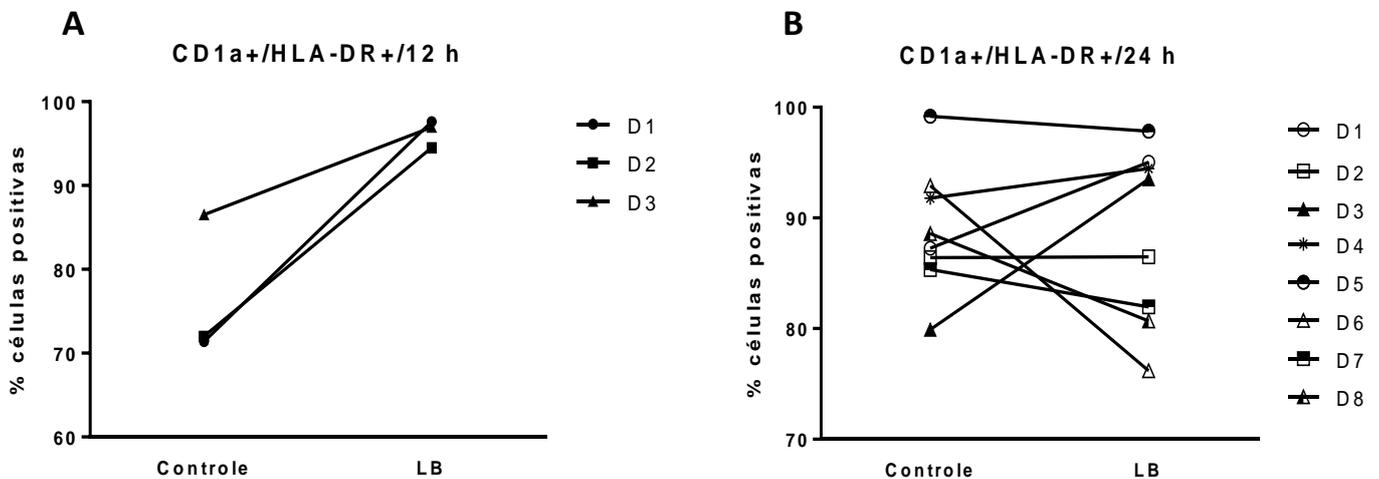


Figura 15: Porcentual de células positivas obtidas a partir de citometria de fluxo, em quanto a expressão do marcador de superfície HLA-DR em células com fenótipo CD1a+/HLA-DR+ (A) 12h após da interação com *L. braziliensis* (n=3) (B) 24h após da interação com *L. braziliensis* (n=8). Cada ponto no gráfico representa um doador.

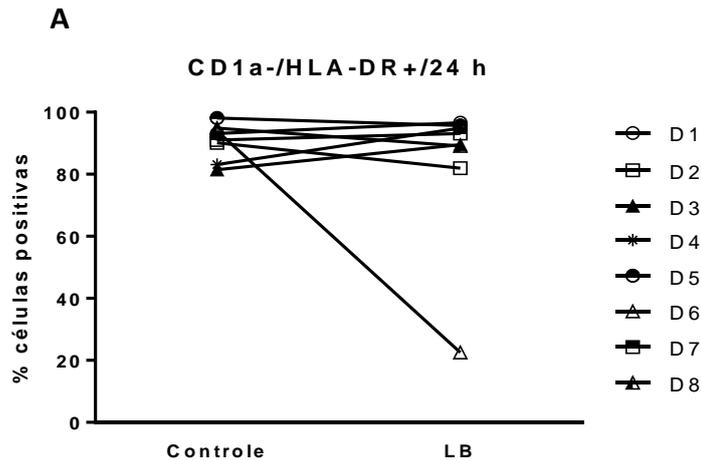


Figura 16: Porcentual de células positivas obtidas a partir de citometria de fluxo, em quanto a expressão do marcador de superfície HLA-DR em células com fenótipo CD1a-/HLA-DR+ (A) 24h após da interação com *L. braziliensis* (n=8). Cada ponto no gráfico representa um doador.

6.4.2 Expressão da molécula CD86 (B7-2)

Continuando com o estudo da expressão de moléculas de superfície, estudou-se a molécula co-estimulatória CD86 (B7-2) em DCs na condição controle e infectada nos tempos 12 e 24 h, após a interação com *L. braziliensis*.

Assim, a **figura 17** demonstra um gráfico *dot plot* gerado no citômetro de fluxo. Após a marcação simples com o fluorocromo PE, que permitiu observar a população de células que expressaram a molécula co-estimulatória CD86 (B7-2) no tempo de 12 h de interação com o patógeno.

Na **figura 17A**, E observou-se a estratégia de *gate* escolhido para analisar a população P1, como a população de estudo, para as duas condições de estudo. No tempo de 12 h. Igualmente, a **figura 17B**, F, demonstra a população P2 correspondente à células que expressam CD86 (B7-2) na superfície, com uma mediana de $62,77 \pm 9,38\%$ na condição controle e $84,35 \pm 5,43\%$ na condição infectado, com um valor $p=0,200$. A população P3 não expressa CD86 (B7-2) na superfície da célula, por tanto não teve importância para análise.

Os histogramas apresentados na **figura 17C, D, G, H** confirmam mais uma vez a intensidade de expressão do marcador CD86 (B7-2) conjugado com o fluorocromo PE nas populações P1 e P2 principalmente.

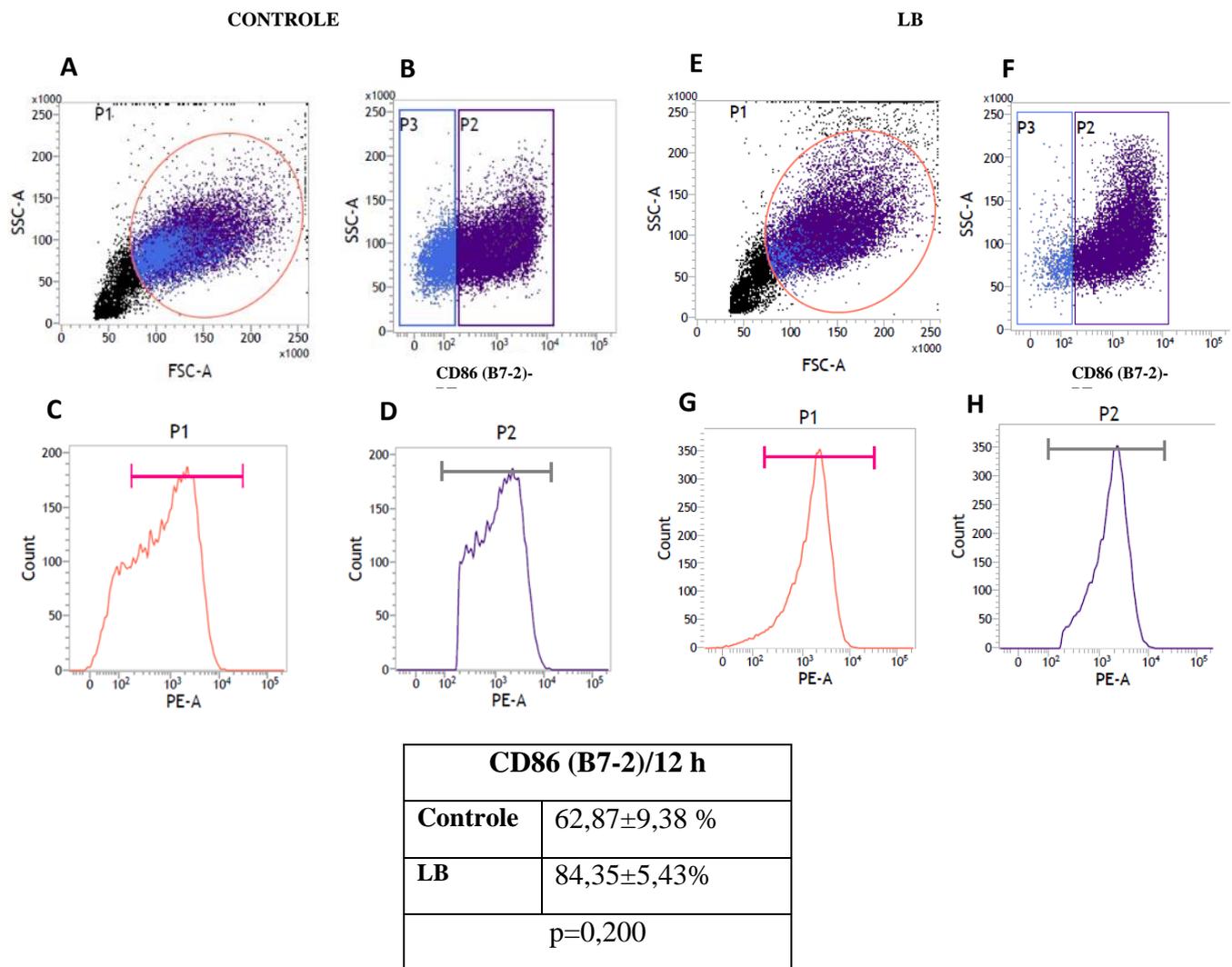


Figura 17: *Dot plot* representativo de citometria de fluxo da expressão da molécula co-estimularoria CD86 (B7-2) em DCs, 12h depois da interação com *L. braziliensis*. Perfil característico da população celular P1 (*gate* laranja). (A) População P1 da condição controle analisada por tamanho (*FSC*) vs granulosidade (*SSC*). (B) População P2 (*gate* roxo) expressa o marcador de superfície CD86 (B7-2) e a população P3 (*gate* azul) sem expressão do marcador de superfície CD86 (B7-2) da condição controle, analisado pelo fluorocromo PE vs granulosidade. (C, D) Histograma mostrando a intensidade do fluorocromo PE da população P1e P2 da condição controle. (E) População P1 da condição infectada analisada por tamanho (*FSC*) vs granulosidade (*SSC*), representando o total de células (F) População P2 (*gate* roxo) expressa o marcador de superfície CD86 (B7-2) e a população P3 (*gate* azul) sem expressão do marcador de superfície CD86 (B7-2) da condição infectado, avaliado pelo fluorocromo PE vs granulosidade (G, H) Histograma mostrando a intensidade do fluorocromo PE da população P1e P2 da condição infectada. O test *Kolmogorov-smirnov* foi aplicado para verificar normalidade e o *Mann-Whitney* para comparar duas condições (n=3).

No ensaio de 24 h as células obtidas foram analisadas por dupla marcação (CD1a-FITC e CD86 (B7-2)-PE) no citômetro de fluxo, fazendo possível a obtenção de dois fenótipos CD1a+ / CD86 (B7-2)+ e CD1a- / CD86 (B7-2)+. Portanto, as **figuras 18, 19**, apresentam um gráfico *dot plot* gerado no citômetro de fluxo.

Inicialmente, para analisar o fenótipo CD1a+/ CD86 (B7-2)+. Foi necessário escolher a estratégia de *gate* para a população P1 correspondente às células de interesse (**Figura 18A, D**). Observou-se na **figura 18B**, E a população P5 analisada anteriormente que pertence à população de células que expressaram CD1a na superfície, assim, dentro deste grupo de células foi avaliada a expressão da molécula co-estimulatória CD86 (B7-2)+, correspondente a P6 na condição controle com uma mediana de 84,52±7,14% (**Figura 18C**) e na condição infectado com uma mediana de 98,25±8,97% (**Figura 18F**), com um valor $p=0,0104$.

Os dados apresentados anteriormente demonstraram uma significância estatística ao comparar a condição controle em relação com a condição infectado.

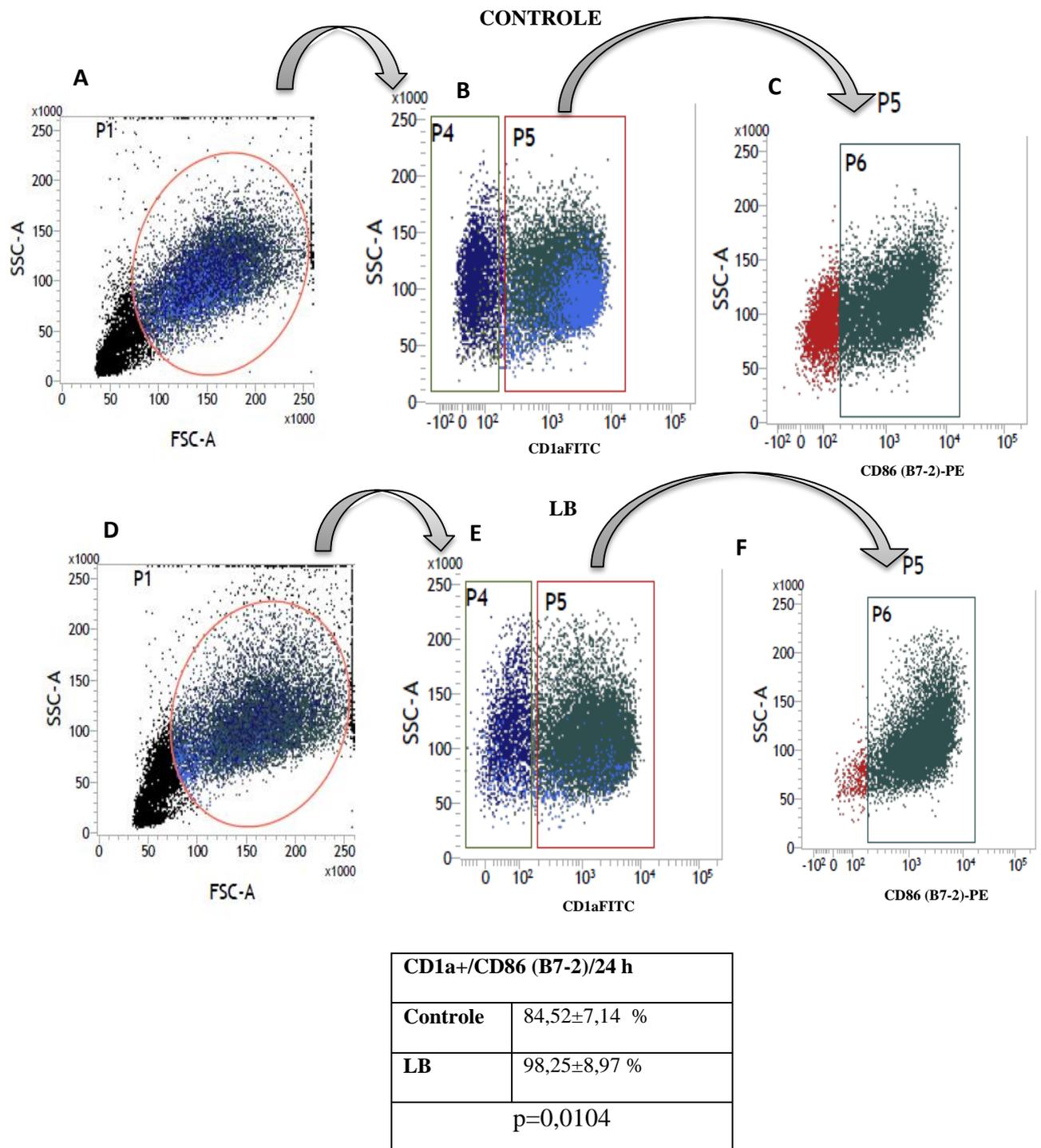


Figura 18: Dot plot representativo de citometria de fluxo da expressão da molécula co-estimularia CD86 (B7-2) em DCs com fenótipo CD1a+/ CD86(B7-2), 24h depois da interação com *L. braziliensis*. Perfil característico da população celular P1 (gate laranja). (A) Marcação dupla das células pertencentes à população P1 da condição controle analisada por tamanho (FSC) vs granulicidade (SSC). (B) População P4 com fenótipo CD1a- e população P5 com fenótipo CD1a+ pertencentes na condição controle, analisada pelo fluorocromo FITC vs granulicidade. (C) População P6 (gate azul) com fenótipo CD1a+/ CD86 (B7-2) + da condição controle analisada pelo fluorocromo PE vs granulicidade, dentro da população P5. (D) Marcação dupla da população P1 da condição infectada analisada por tamanho (FSC) vs granulicidade (SSC). (E) População P4 com fenótipo CD1a- e população P5 com fenótipo CD1a+, pertencentes na condição infectado analisada pelo fluorocromo FITC vs granulicidade (F) População P6 (gate azul) com fenótipo CD1a+/ CD86 (B7-2) + da condição infectado analisada pelo fluorocromo PE vs granulicidade, dentro da população P5. O test Kolmogorov-smirnov foi aplicado para verificar normalidade e o test-t student para comparar duas condições (n=8).

Da mesma maneira, para o fenótipo CD1a-/CD86(B7-2)+, a estratégia de *gate* foi selecionada para a população P1 correspondente às células de interesse (**Figura 19A,D**). Observou-se na **figura 19B**, E a população P4 que foi mencionada acima, pertencente à população de células que não expressaram CD1a na superfície, de tal modo que, dentro deste grupo de células foi estudada a expressão da molécula co-estimulatória CD86 (B7-2)+, correspondente a P7 na condição controle com uma mediana de 94,027±6.52% (**Figura 19C**) e na condição infectado com uma mediana de 97,33±3.31% (**Figura 19F**), com um valor $p=0,0704$.

Pelo contrário, os dados expostos anteriormente não tiveram diferença significativa na expressão do marcador CD86(B7-2)+, ao comparar as duas condições de estudo, para o fenótipo CD1a-/CD86(B7-2)+.

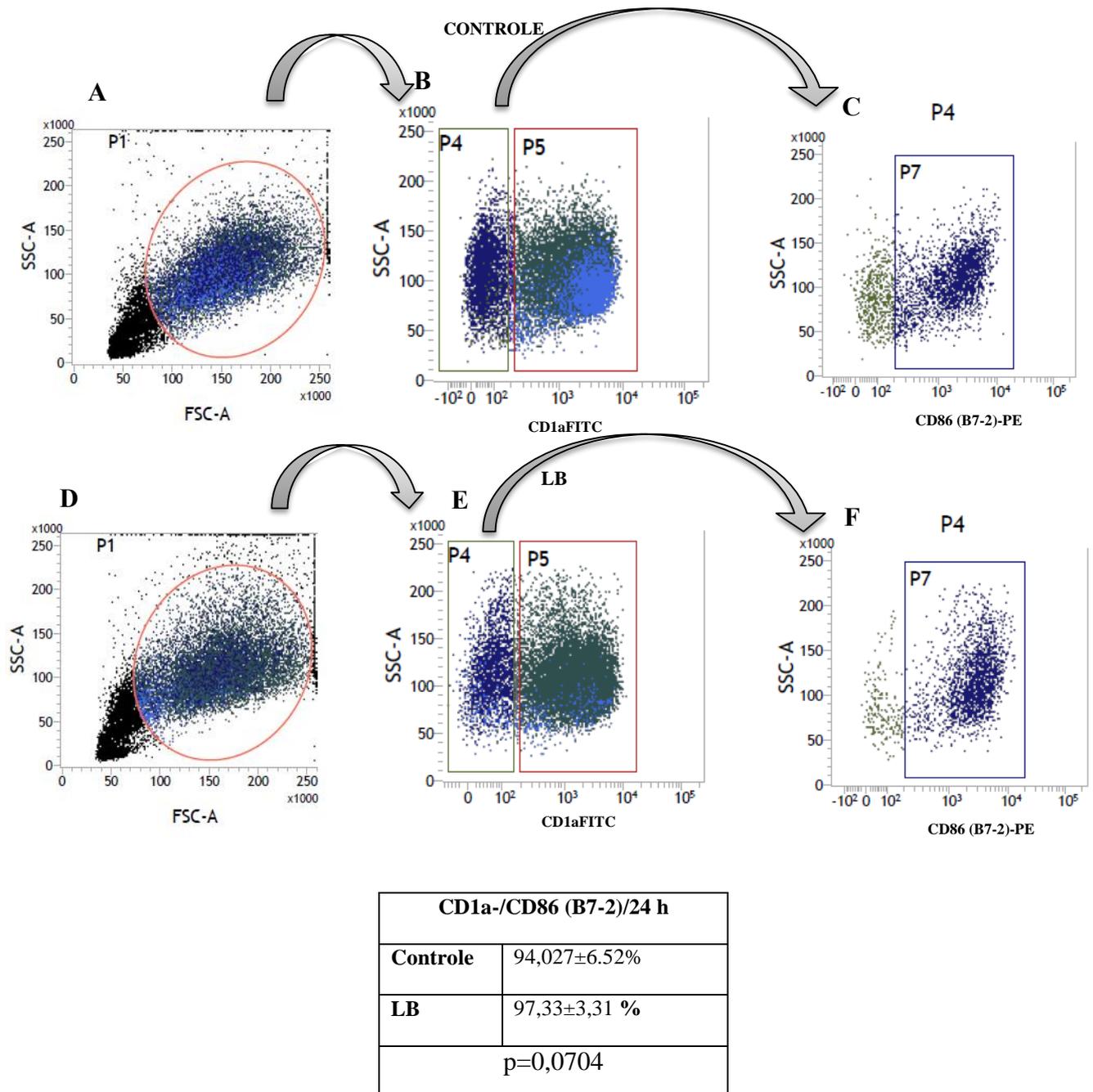


Figura 19: Dot plot representativo de citometria de fluxo da expressão da molécula co-estimularoria CD86(B7-2) em DCs com fenótipo CD1a-/ CD86 (B7-2), 24h depois da interação com *L. braziliensis*. Perfil característico da população celular P1 (gate laranja). (A) Marcação dupla das células pertencentes à população P1 da condição controle analisada por tamanho (FSC) vs granulicidade (SSC). (B) População P4 com fenótipo CD1a- e população P5 com fenótipo CD1a+ pertencentes na condição controle, analisada pelo fluorocromo FITC vs granulicidade. (C) População P7 (gate azul) com fenótipo CD1a-/ CD86 (B7-2) + da condição controle analisada pelo fluorocromo PE vs granulicidade, dentro da população P4. (D) Marcação dupla da população P1 da condição infectada analisada por tamanho (FSC) vs granulicidade (SSC). (E) População P4 com fenótipo CD1a- e população P5 com fenótipo CD1a+, pertencentes na condição infectado analisada pelo fluorocromo FITC vs granulicidade (F) População P7 (gate azul) com fenótipo CD1a-/ CD86 (B7-2) + da condição infectado analisada pelo fluorocromo PE vs granulicidade, dentro da população P4. O test Kolmogorov-smirnov foi aplicado para verificar normalidade e o Mann-Whitney para comparar duas condições (n=8).

A pesar da diferença não ser estatisticamente significativa ao comparar a condição controle com a condição infectada, em quanto a porcentagem de expressão da molécula co-estimulatória CD86 (B7-2), no tempo de 12 h, os três doadores apresentaram um aumento na expressão desta molécula (**Figura 20A**).

Já, no experimento das 24 h como é mostrado na **figura 20B**, foi avaliada a expressão de CD86 (B7-2) em células com fenótipo CD1a+/ CD86 (B7-2), estatisticamente significante e observou-se que houve um comportamento crescente da condição controle para a condição infectada após a interação com *L. braziliensis*. É importante ressaltar que no tempo de 24h o doador D7 teve uma diminuição total de 11.12% na porcentagem de expressão da molécula co-estimulatória da condição controle (84,02%) em relação com a condição infectada (72.90%). Células com fenótipo CD1a-/CD86 (B7-2)+, mantiveram um aumento gradual nos níveis de CD86 (B7-2)+. O doador D7 apresenta tendência na diminuição na expressão de CD86(B7-2)+ 24 h depois da interação com o patógeno (**Figura 21A**).

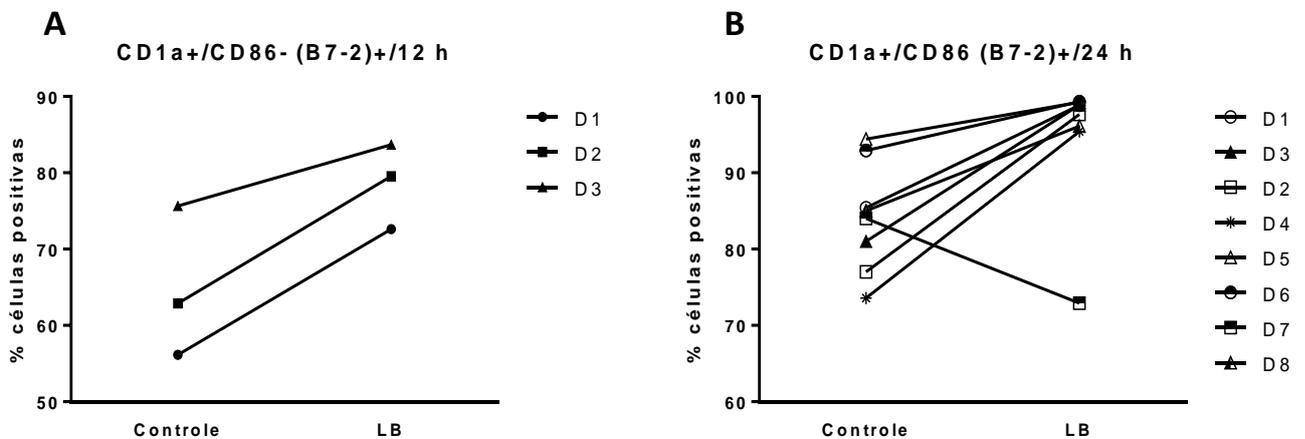


Figura 20: Porcentual de células positivas obtidas a partir de citometria de fluxo, em quanto a expressão do marcador de superfície CD86 (B7-2) em células com fenótipo CD1a+/ CD86(B7-2)+ (A) 12 h após da interação com *L. braziliensis*.(n=3) (B) 24 h após da interação com *L. braziliensis* (n=8). Cada ponto no gráfico representa um doador.

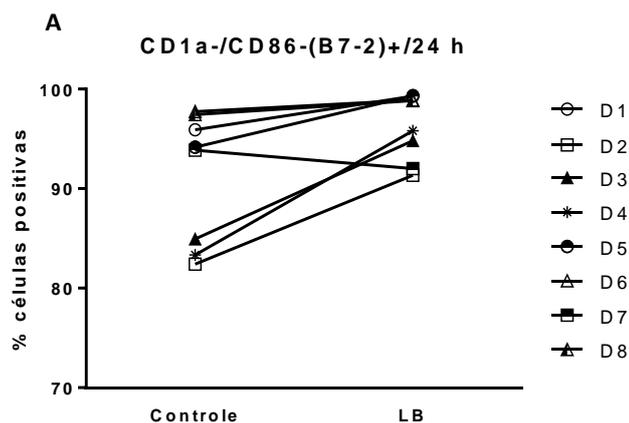


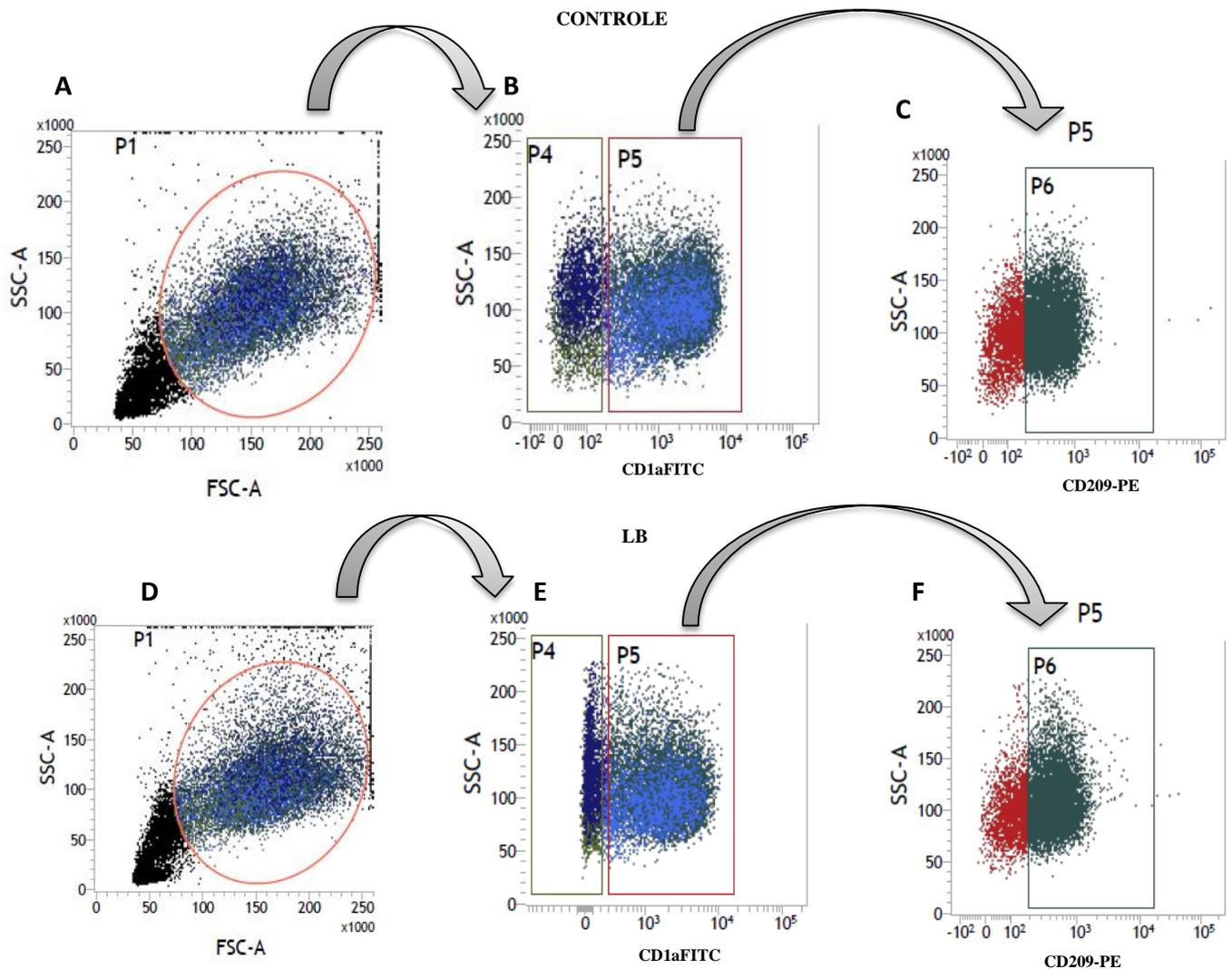
Figura 21: Porcentual de células positivas obtidas a partir de citometria de fluxo, em quanto a expressão do marcador de superfície CD86 (B7-2) em células com fenótipo CD1a-/ CD86 (B7-2)+ (A) 24 h após da interação com *L. braziliensis*. Cada ponto no gráfico representa um doador.

6.3.4 Expressão da molécula DC-SIGN (CD209)

Juntamente como CD86 (B7-2), a molécula DC-SIGN exerce um papel co-estimulatório importante na ligação e internalização das partículas antigênicas pelas DCs. Portanto, analisou-se a expressão desta molécula em células controle e infectadas após 24h de interação com *L. braziliensis*.

Neste ensaio de 24 h as células obtidas foram analisadas por dupla marcação (CD1a-FITC e CD209-PE) no citômetro de fluxo, fazendo possível a obtenção de dois fenótipos CD1a+/ CD209+ e CD1a-/ CD209+. Portanto, as **figuras 22, 23**, apresentam um gráfico *dot plot* gerado no citômetro de fluxo.

Em seguida, para analisar o fenótipo CD1a+/ CD209+, foi necessário escolher a estratégia de *gate* para a população P1 correspondente às células de interesse (**Figura 22A, D**). Observou-se na **figura 22B, E** a população P5 analisada anteriormente que pertence à população de células que expressaram CD1a na superfície, assim, dentro deste grupo de células foi avaliada a expressão da molécula co-estimulatória CD209+, correspondente a P6 na condição controle com uma mediana de $97,54 \pm 6,77\%$ (**Figura 22C**) e na condição infectado com uma mediana de $97 \pm 6,33\%$ (**Figura 22F**), com um valor $p=0,744$.

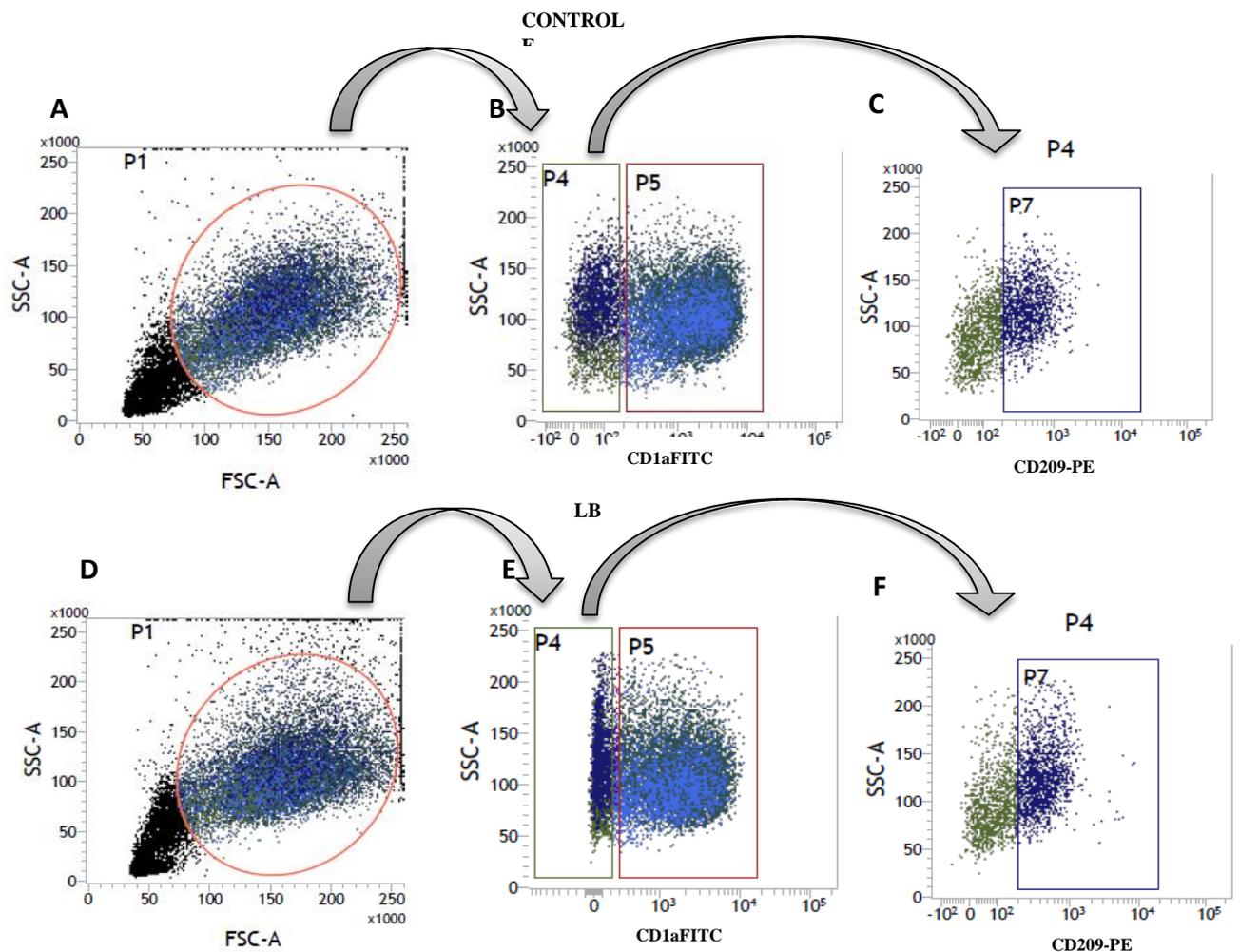


CD1a+/CD209/24 h	
Controle	97,54±6,77%
LB	97±6,33%
p=0,744	

Figura 22: Dot plot representativo de citometria de fluxo da expressão da molécula co-estimularia CD209 (DC-SIGN) em DCs com fenótipo CD1a+/ CD209, 24h depois da interação com *L. braziliensis*. Perfil característico da população celular P1 (gate laranja). (A) Marcação dupla das células pertencentes à população P1 da condição controle analisada por tamanho (FSC) vs granulosidade (SSC). (B) População P4 com fenótipo CD1a- e população P5 com fenótipo CD1a+ pertencentes na condição controle, analisada pelo fluorocromo FITC vs granulosidade. (C) População P6 (gate azul) com fenótipo CD1a+/ CD209 + da condição controle analisada pelo fluorocromo PE vs granulosidade, dentro da população P5. (D) Marcação dupla da população P1 da condição infectada analisada por tamanho (FSC) vs granulosidade (SSC). (E) População P4 com fenótipo CD1a- e população P5 com fenótipo CD1a+, pertencentes na condição infectado analisada pelo fluorocromo FITC vs granulosidade (F) População P6 (gate azul) com fenótipo CD1a+/ CD209 + da condição infectado analisada pelo fluorocromo PE vs granulosidade, dentro da população P5. O test Kolmogorov-smirnov foi aplicado para verificar normalidade e o Mann-Whitney para comparar duas condições (n=8).

Da mesma forma, para o fenótipo CD1a-/CD209+, a estratégia de *gate* foi selecionada para a população P1 correspondente às células de estudo (**Figura 23A, D**). Observou-se na **figura 23B, E** a população P4 que foi mencionada acima, pertencente à população de células que não expressaram CD1a na superfície, de tal modo que, dentro deste grupo de células foi estudada a expressão da molécula co-estimulatória CD209+, correspondente a P7 na condição controle com uma mediana de 89,32±21,10% (**Figura 23C**) e a condição infectado com uma mediana de 91,15±22,77% (**Figura 23F**), com um valor $p=0,8473$.

Todos os dados expostos anteriormente não tiveram diferença significativa na expressão do marcador CD209, ao comparar as duas condições de estudo, para os fenótipos CD1a+/CD209+ e CD1a-/



CD1a-/CD209/24 h	
Controle	89,32±21,10%
LB	91,15±22,77%
p= 0,8473.	

Figura 23: Dot plot representativo de citometria de fluxo da expressão da molécula co-estimularia CD209 (DC-SIGN) em DCs com fenótipo CD1a-/ CD209, 24h depois da interação com *L. braziliensis*. Perfil característico da população celular P1 (gate laranja). (A) Marcação dupla das células pertencentes à população P1 da condição controle analisada por tamanho (FSC) vs granulicidade (SSC). (B) População P4 com fenótipo CD1a- e população P5 com fenótipo CD1a+ pertencentes na condição controle, analisada pelo fluorocromo FITC vs granulicidade. (C) População P7 (gate azul) com fenótipo CD1a-/ CD209 + da condição controle analisada pelo fluorocromo PE vs granulicidade, dentro da população P4. (D) Marcação dupla da população P1 da condição infectada analisada por tamanho (FSC) vs granulicidade (SSC). (E) População P4 com fenótipo CD1a- e população P5 com fenótipo CD1a+, pertencentes na condição infectada analisada pelo fluorocromo FITC vs granulicidade (F) População P7 (gate azul) com fenótipo CD1a-/ CD209 + da condição infectada analisada pelo fluorocromo PE vs granulicidade, dentro da população P4. O test Kolmogorov-smirnov foi aplicado para verificar normalidade e o Mann-Whitney para comparar duas condições (n=8).

Como foi mencionado anteriormente os dados não tiveram relevância estatística, mas, células com fenótipo CD1a+/ CD209+, mantiveram um nível de expressão alto na faixa de 78% até 98% aproximadamente entre duas condições, controle e infectado (**Figura 24A**). Analogamente, para as células com fenótipo CD1a-/CD209+, observou-se na **figura 24B** um comportamento homogêneo para alguns doadores, pois, os níveis de expressão de DC-SIGN (CD209), ficaram no intervalo de 80-90% em cada uma das condições, com exceção, do doador D2 que teve uma expressão baixa de 54,76% na condição controle e 57,54% na condição infectado, claramente não observou-se variação; o doador D4 teve uma leve diminuição de 9.91%, da condição controle (43,73%) para a condição infectado (33.92%), nos níveis de CD209.

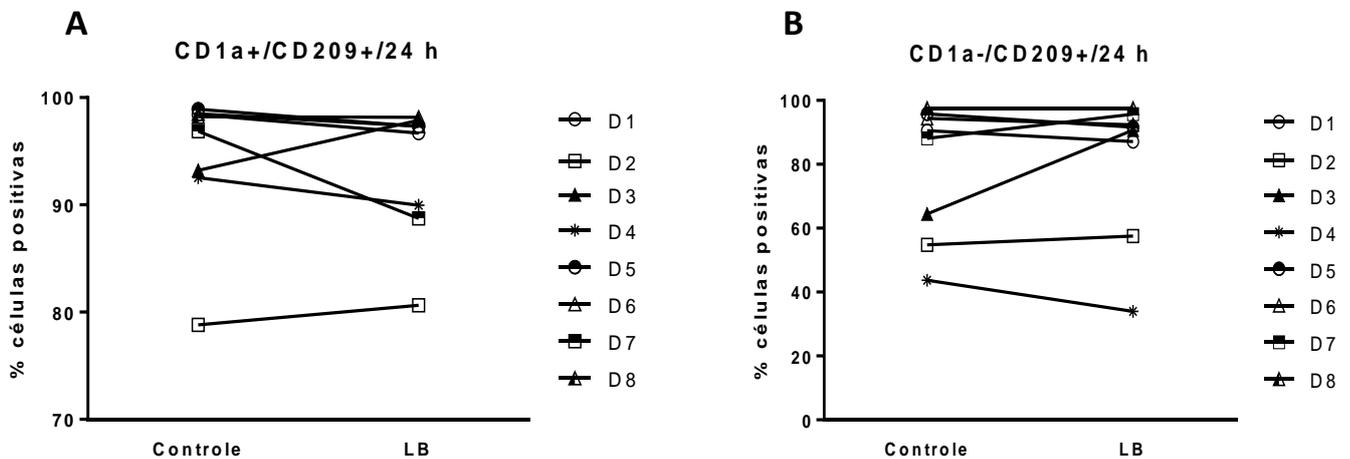


Figura 24: Porcentual de células positivas obtidas a partir de citometria de fluxo, em quanto a expressão do marcador de superfície DC-SIGN (CD209) em células com fenótipo (A) CD1a+/ DC-SIGN (CD209)+ e (B) CD1a-/ DC-SIGN (CD209)+, após 24 h da interação com *L. braziliensis*. Cada ponto no gráfico representa um doador.

Finalmente, a **Figura 25** apresenta uma síntese de todos os dados gerados pelos diferentes marcadores HLA-DR, CD86 (B7-2) e DC-SIGN (CD209) avaliados em quanto ao nível de expressão na superfície das células com fenótipo CD1a+ e CD1a-, em cada uma das condições, controle e infectado, nos tempos 12 e 24 h após a interação com *L. braziliensis*.

A **figura 25A** apresenta a porcentagem de expressão das moléculas HLA-DR e CD86 12 h após o contato com o parasito em células com fenótipo CD1a+. Observou-se que os dois marcadores tiveram uma expressão heterogênea. HLA-DR na condição controle teve uma porcentagem de expressão em uma faixa de 65,42-86,50%. Esta molécula aumenta na condição infectado (80-85%). CD86, também manteve um amplo intervalo na expressão da

molécula. Na condição controle foi desde 57,35% como o menor ponto, até 75,65% como o ponto máximo.

Já na condição infectado, observou-se um aumento na expressão da CD86 (72,92-83,70%) induzido pela *L. braziliensis*.

A **figura 25B**, apresenta a porcentagem de expressão das moléculas HLA-DR, CD86 e DC-SIGN (CD209) 24 h após o contato com o parasito em células com fenótipo CD1a+. HLA-DR teve uma distribuição dispersa, mas com uma boa expressão, já que, 79,90% foi o ponto mínimo e 99,20% o máximo na condição controle; 76,19% o ponto mínimo e 97,85 o máximo na condição infectado. O comportamento de CD86 foi variável na condição controle, mostrando valores desde 73,59% até 94,42%. Já, a condição infectado manteve uma expressão localizada e alta, aproximadamente 98%, com exceção do ponto com 72,90%. O marcador CD209 manteve uma expressão elevada para as duas condições, com um valor aproximado de 95%, excetuando, os pontos que ficaram com uma expressão menor.

A **figura 25C**, apresenta a porcentagem de expressão das moléculas HLA-DR, CD86 e DC-SIGN (CD209) 24 h após o contato com o parasito em células com fenótipo CD1a-. Os marcadores HLA-DR e CD86, apresentaram um comportamento similar. Mostraram níveis altos (80-90%) na expressão dos marcadores nas duas condições de estudo, excetuando aquele ponto que ficou fora do padrão (22,54%) para a condição infectado da molécula HLA-DR. Observou-se um comportamento variável na expressão de DC-SIGN (CD209), mostrando 43,73% como ponto mínimo e 97,50% como o máximo de expressão para a condição controle; por outro lado, 33,92% foi o ponto mínimo e 97,58% foi o ponto máximo para a condição infectado na porcentagem de expressão.

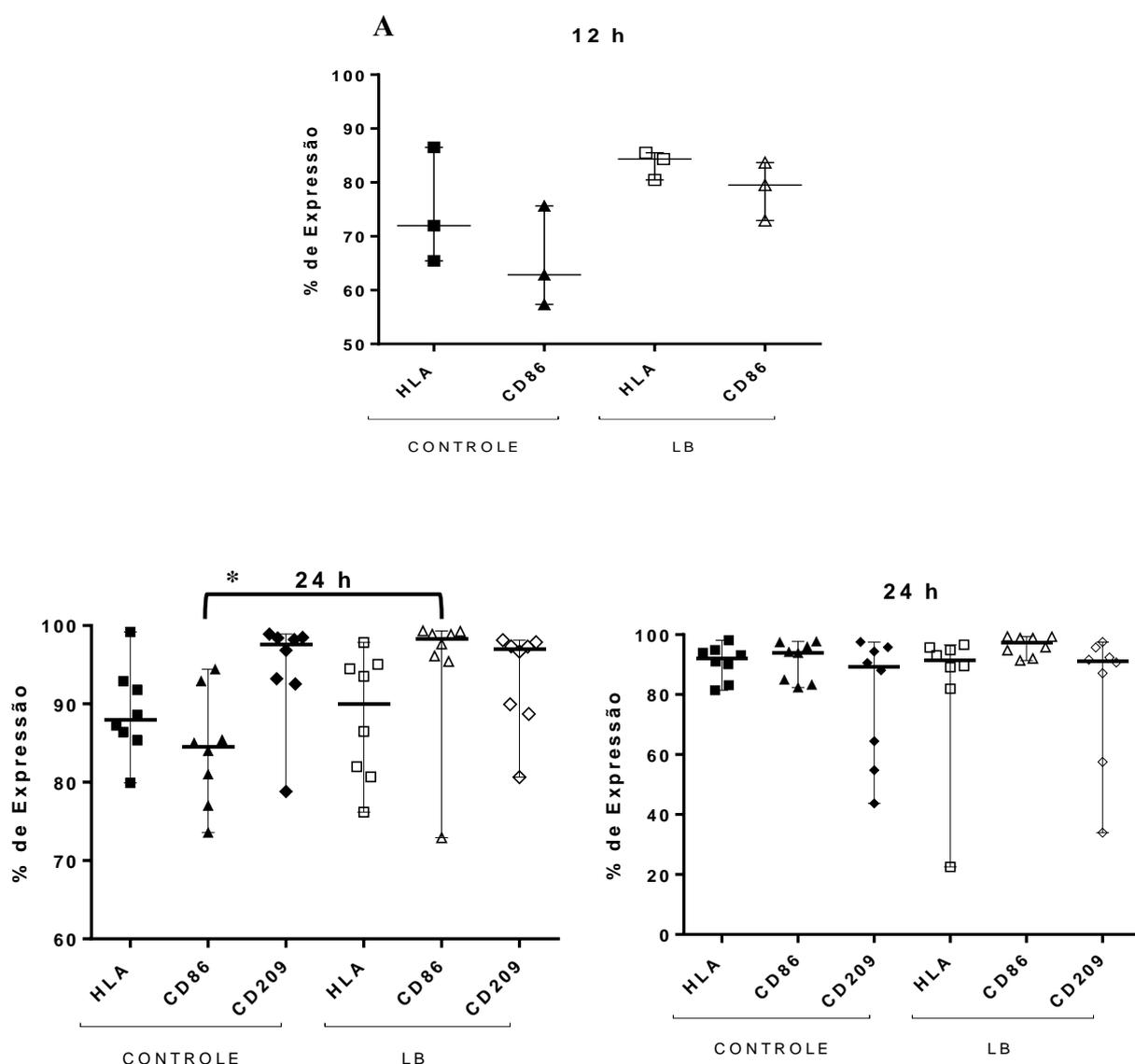


Figura 25: Expressão porcentual dos marcadores de superfície para a caracterização de DCs nas condições controle e infectado com *L. braziliensis* (A) após 12h de infecção em células com fenótipo CD1a+, (n=3). (B) Após 24h de infecção em células com fenótipo CD1a+ (n=8). (C) Após 24h de infecção em células com fenótipo CD1a-, (n=8). (*) Estatisticamente significativo. Cada ponto no gráfico representa um doador.

Outro parâmetro analisado nas moléculas de superfície, foi *Mean Fluorescence Intensity* (MFI). A **figura 26A**, mostra a MFI das moléculas de superfície HLA-DR e CD86 (B7-2) no tempo de 12 h, em células com fenótipo CD1a+. Observou-se que o marcador HLA-DR teve uma mediana de 2517 ± 1402 na condição controle e $2550 \pm 961,2$ para condição infectado, com um valor $p=0,900$; os dados reportam um desvio padrão grande na intensidade da fluorescência do PE. Da mesma forma, CD86 apresenta uma mediana de $970,3 \pm 123,8$ na condição controle e 1168 ± 1772 na condição infectado, com valor $p=0,400$. Observou-se que os dados não tiveram relevância estatística.

De maneira análoga, a **figura 26B**, apresenta a MFI das moléculas de superfície HLA-DR, CD86 (B7-2) e DC-SIGN (CD209), no tempo de 24 h, em células com fenótipo CD1a+. Verificou-se uma mediana de 647 ± 211.6 na condição controle e 643 ± 241.6 na condição infectado para o marcador HLA-DR ($p = 0,7429$); conjuntamente, para CD86 foi reportado uma mediana de 870 ± 272.2 e 1757 ± 834.3 para as condições controle e infectado respectivamente, apresentando uma significância estatística $p = 0,0148$. Por último, DC-SIGN (CD209) teve uma mediana de $1037 \pm 323,6$ na condição controle e $954 \pm 324,5$ na condição infectado ($p = 0,5914$). Assim, de forma geral, observou-se um comportamento homogêneo na intensidade do fluorocromo PE nas diferentes moléculas, as quais, mostraram uma intensidade razoavelmente elevada.

Finalmente, a **figura 26C**, apresenta a MFI das moléculas de superfície HLA-DR, CD86 (B7-2) e DC-SIGN (CD209), no tempo de 24 h, em células com fenótipo CD1a-. De tal modo, foi reportado uma mediana de $712.5 \pm 241,1$ na condição controle e $734,5 \pm 221$ na condição infectado para o marcador HLA-DR ($p = 0,8163$); igualmente, para CD86 foi mostrada uma mediana de $1446 \pm 387,4$ e 2593 ± 1031 para as condições controle e infectado respectivamente, apresentando uma significância estatística $p = 0,0191$. Por último, DC-SIGN (CD209) teve uma mediana de $884 \pm 313,9$ na condição controle e 908.5 ± 333.3 na condição infectado ($p = 0,7718$). Todos os marcadores de superfície, embora, não apresentaram significância estatística excetuando a molécula CD86, apresentaram uma intensidade no fluorocromo PE consideravelmente alta.

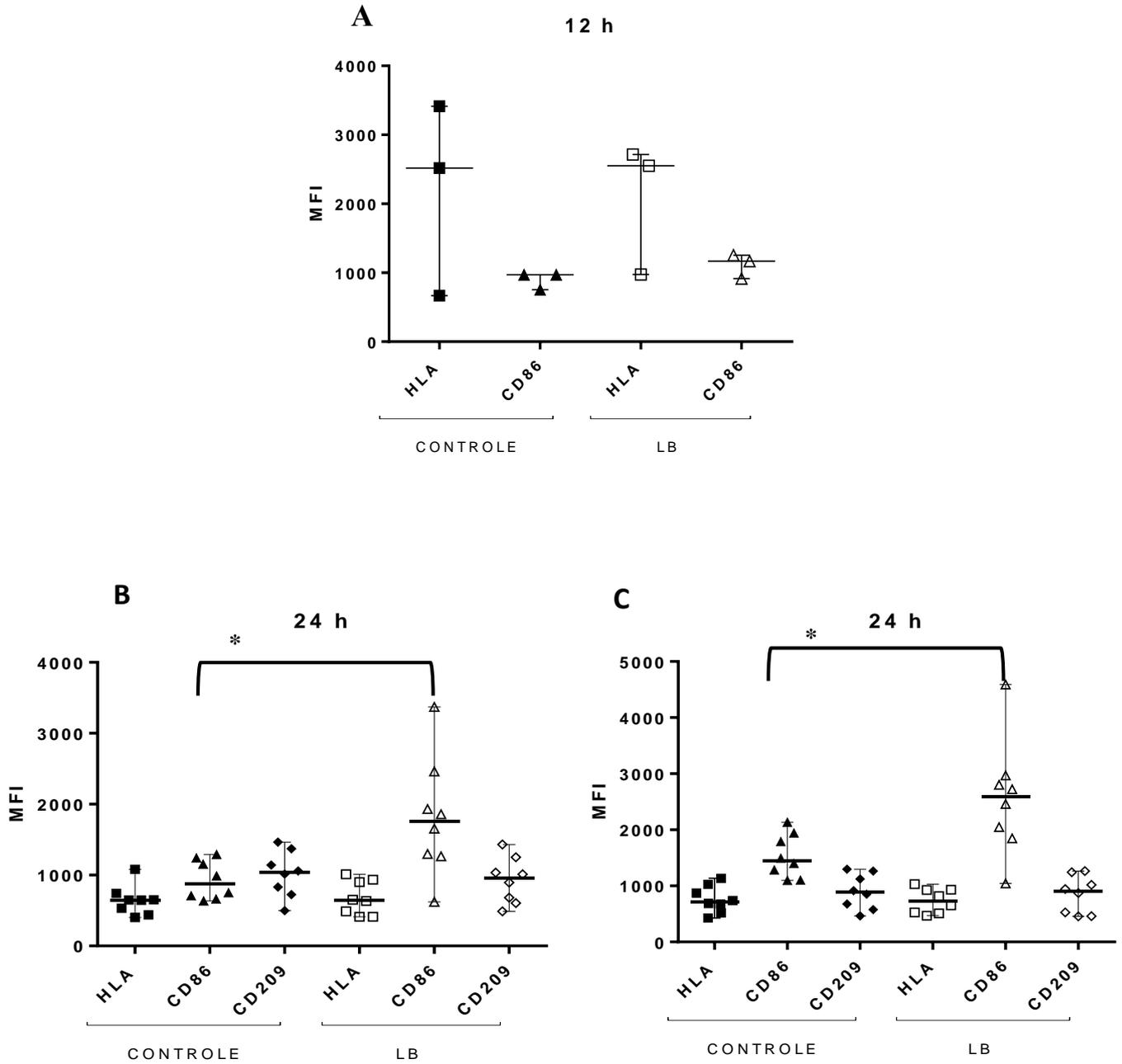


Figura 26: Intensidade média de fluorescência dos marcadores de superfície das DCs nas condições controle e infectado com *L. braziliensis* (A) após 12h de infecção interação em células com fenótipo CD1a+, (n=3). (B) Após 24h de infecção em células com fenótipo CD1a+ (n=8). (C) Após 24h de infecção em células com fenótipo CD1a-, (n=8). (*) Estatisticamente significativo. Cada ponto no gráfico representa um doador.

6.5 Produção de citocinas

Além de analisar a expressão das moléculas de superfície das DCs avaliamos também a produção de citocinas nas condições controle e infectado. Assim, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as citocinas IL-12+p40, IL-1 β , TNF- α , IL-10, IL-6 e TGF- β 1, dosadas por ELISA.

6.5.1 Níveis da Interleucina 12 (IL-12+p40)

Foi avaliada a produção de IL-12+p40 nos sobrenadantes da cultura de DCs, observando que 12h após infecção (**Figura 27A**) apresentou-se um aumento na produção dessa citocina para a condição controle com uma mediana de 103,8 \pm 60,49 pg/ml em relação com a condição infectado com uma mediana de 52,64 \pm 59,61 pg/ml, apesar de não ser dados estatisticamente significativos ($p=0,1167$) A condição controle apresenta uma distribuição heterógena dos dados, mostrando um intervalo de produção de IL-12+p40 de 38,605 até 196,535 pg/ml. Analogamente, a condição infectada embora apresentou níveis menores, manteve uma faixa de 9,471 até 76,711 pg/ml, excetuando o ponto que mostrou maior produção de IL-12+p40 (200,154 pg/ml).

Por outro lado, apresentasse na **Figura 27B** os níveis de IL-12+p40 24h após a interação com *L. braziliensis*, os quais apresentaram uma mediana de 118,5 \pm 71,49 pg/ml para a condição controle e 160,2 \pm 152,4 pg/ml para a condição infectado. Os dados não mostraram significância estatística ($p=0,2078$), no entanto, observou-se um aumento nos níveis de IL-12+p40 na condição infectado tendo um intervalo entre 77,09 pg/ml até 203,76 pg/ml, excetuando o ponto com um nível maior de 515,85 pg/ml, em relação com a condição controle, pois, os níveis detectáveis foram levemente menores, mantendo uma faixa entre 45,205 pg/ml e 126,176 pg/ml, excetuando o ponto fora do intervalo (253,92 pg/ml).

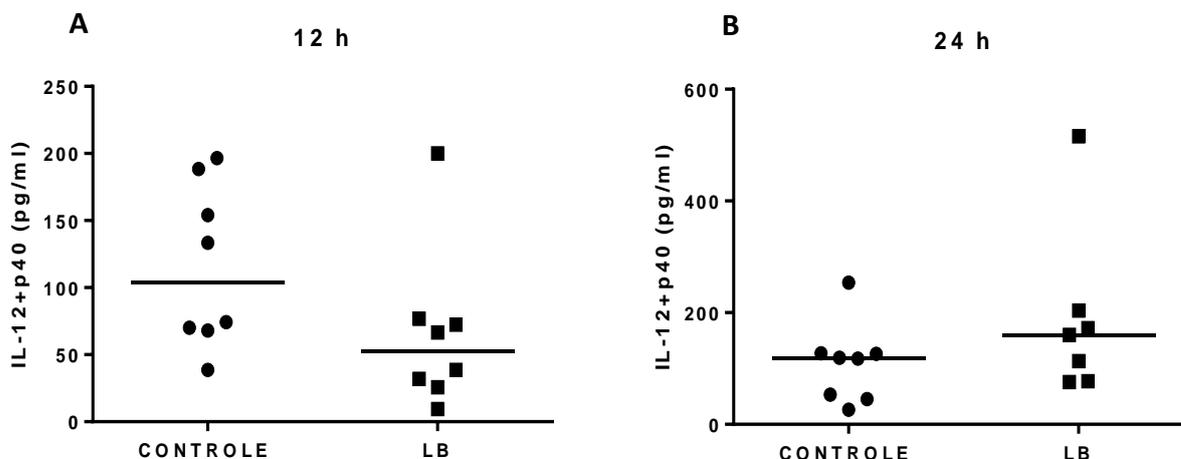


Figura 27: Produção de IL-12p+40 para cada uma das condições de estudo (controle e infectado). Sobrenadantes da cultura de DCs (A) 12 h (n=3) e (B) 24 h (n=8) após a interação com *L. braziliensis*.

6.5.2 Níveis do fator de necrose tumoral (TNF- α)

Como é mostrado na **Figura 28A**; 12 h após a infecção observou-se uma produção de TNF- α em um intervalo de 7,8 pg/ml até 178,7 pg/ml, excetuando o ponto que encontra-se fora do intervalo (904,9 pg/ml), com uma mediana de $64,82 \pm 280,5$ pg/ml. Já a condição infectado, apresenta uma distribuição heterogênea e dispersa, tendo um intervalo de produção desde 64,8 pg/ml até 976,1 pg/ml, com uma mediana de $164,5 \pm 288,7$. Salvo os dados não serem significativos ($p=0,4249$), foram detectados níveis maiores na condição infectado em relação com a condição controle.

Da mesma forma, a **Figura 28B** mostra os resultados após 24 h da infecção, os quais, revelaram que a condição controle teve uma produção de TNF- α entre 22,1 pg/ml e 36,3 pg/ml excetuando os valores fora do intervalo (207,2 pg/ml e 249,9 pg/ml) com uma mediana de $22,10 \pm 97,36$ pg/ml. Consequentemente, a condição infectado mostrou uma distribuição ampla dos dados, pois, apresentam um nível de TNF- α a partir de 22,1 pg/ml até 335,5 pg/ml com uma mediana de $107,5 \pm 116,0$ pg/ml. Não obstante, os dados não sejam estatisticamente significativos ($p=0,3504$), observou-se uma produção maior de TNF- α na condição infectado em relação com a condição controle.

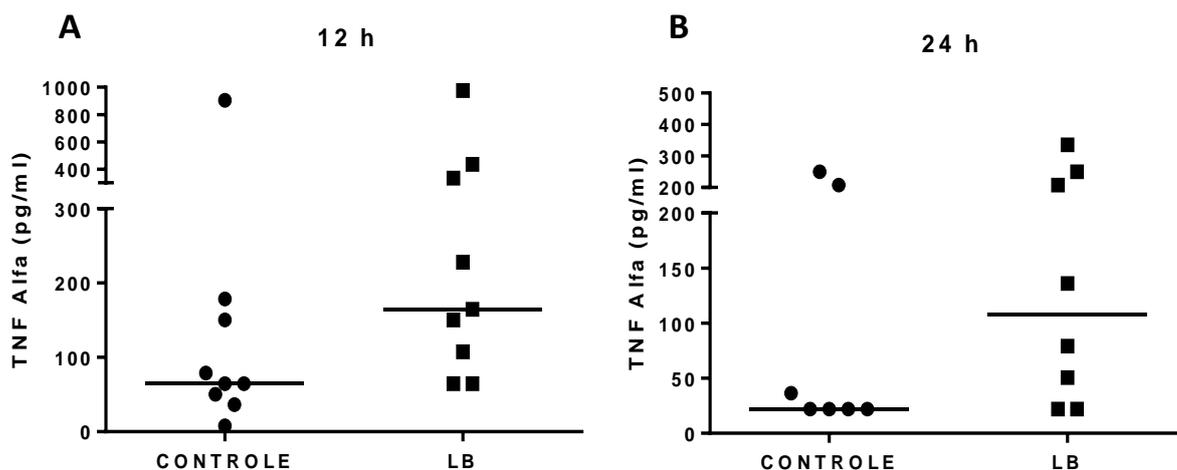


Figura 28: Produção de TNF- α para cada uma das condições de estudo (controle e infectado). Sobrenadantes da cultura de DCs (A) 12 h (n=3) e (B) 24 h (n=8) após a interação com *L. braziliensis*.

É importante mencionar que não foram detectáveis níveis de produção nas citocinas IL-10, TGF- β , IL-6, IL-1 β , após de 12 e 24 h de interação com *L. braziliensis*. Os dados não foram apresentados.

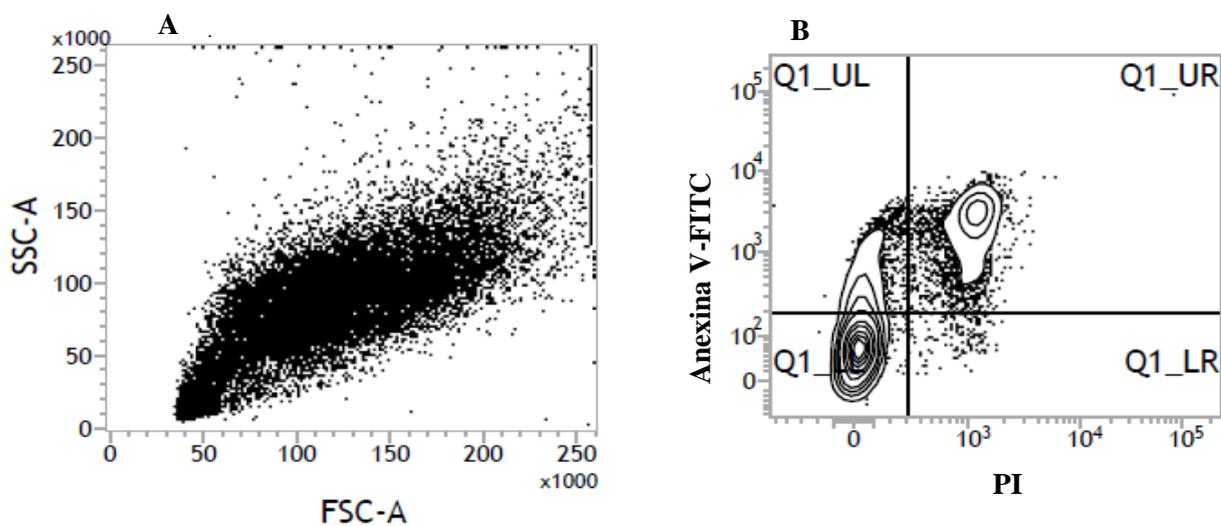
6.6 Morte Celular

Com o objetivo de saber se a *L. braziliensis* é capaz de induzir a apoptose das DCs, estas células foram colocadas para interagirem com o parasito durante 24 h.

A **Figura 29A, C** mostra os gráficos gerados ao analisar as células totais no citometro de fluxo. Assim, células que apresentaram morte celular (inicial ou tardia), encontram-se distribuídas em quatro quadrantes (**Figuras 29 B, C**).

Células nos quadrantes Q2_UL apresentam apoptose inicial (Anexina+/PI-), com uma mediana de 9,930 \pm 5,78% na condição controle e 7,490 \pm 5,929% na condição infectado, com um valor p=0,5604; Q2_LR células em necrose (Anexina-/PI+) com uma mediana de 0,660 \pm 0,7135% na condição controle e 1,405 \pm 1,722% na condição infectado, com um valor p=0,123; Q2_UR células em apoptose tardia o necrose (Anexina+/PI+) com uma mediana de 15,12 \pm 4,604% na condição controle e 17,03 \pm 4,939% na condição infectado, com um valor p=0,5919; Q2_LL representam a quantidade de células viáveis.

CONTROLE



LB

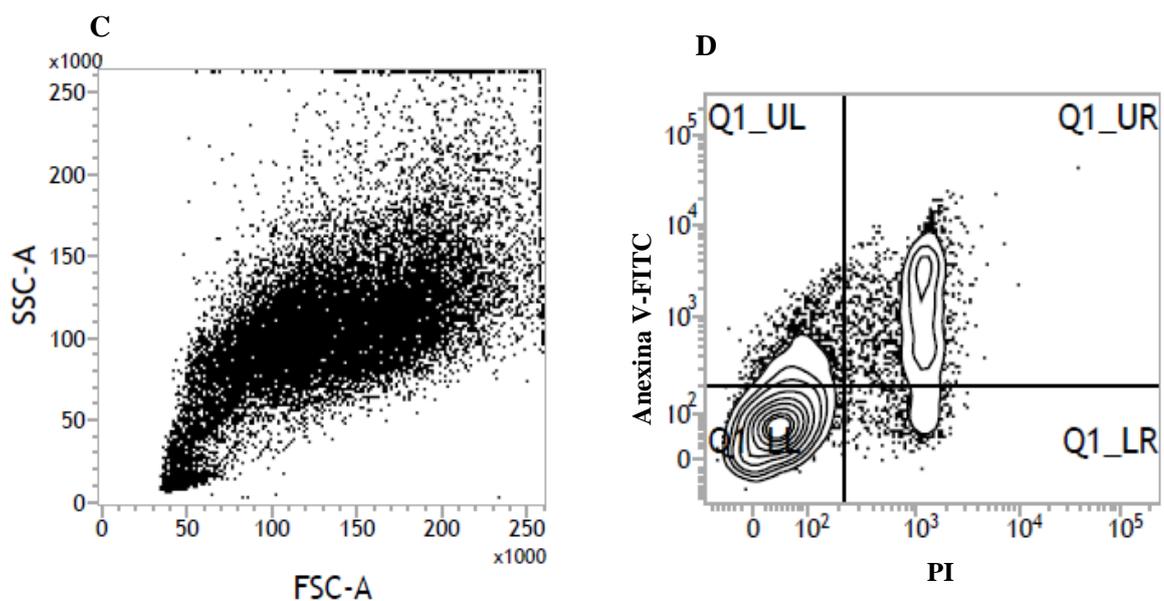


Figura 29: Dot plot representativo de citometria de fluxo apresentando morte celular de DCs 24 h após a interação com *L. braziliensis*. (A) Marcação dupla do total de células da condição controle analisada por tamanho (*FSC*) vs granulidade (*SSC*). (B) Marcação dupla Annexina V-FITC/PI da condição controle. (C) Marcação dupla do total de células da condição infectada analisada por tamanho (*FSC*) vs granulidade (*SSC*). (D) Marcação dupla Annexina V-FITC/PI da condição infectado. O *test Kolmogorov-smirnov* foi aplicado para verificar normalidade e o *Mann Whitney* para comparar duas condições.

Analisou-se a porcentagem de DCs que tiveram uma apoptose inicial após 24 h de interação com *L. braziliensis* (Figura 30A), por tanto, observou-se, uma distribuição heterogênea nos dados, os doadores D1, D3, D4 e D6, mantiveram um comportamento

decrecente da condição controle em relação com a condição infectado. Na **figura 30B**, as DCs tiveram um comportamento igual e/ou decrescente da condição controle para a condição infectado na porcentagem de células duplo positivo (Anexina+/PI+), células em apoptose tardia ou necrose. Também, foi avaliado a porcentagem de DCs que entraram em necrose (**Figura 30C**), e observou-se que as DCs apresentam baixa porcentagem de células positivas para PI. Por conseguinte, Os resultados sugerem uma possível inibição da apoptose das DCs, embora os dados não sejam significativos.

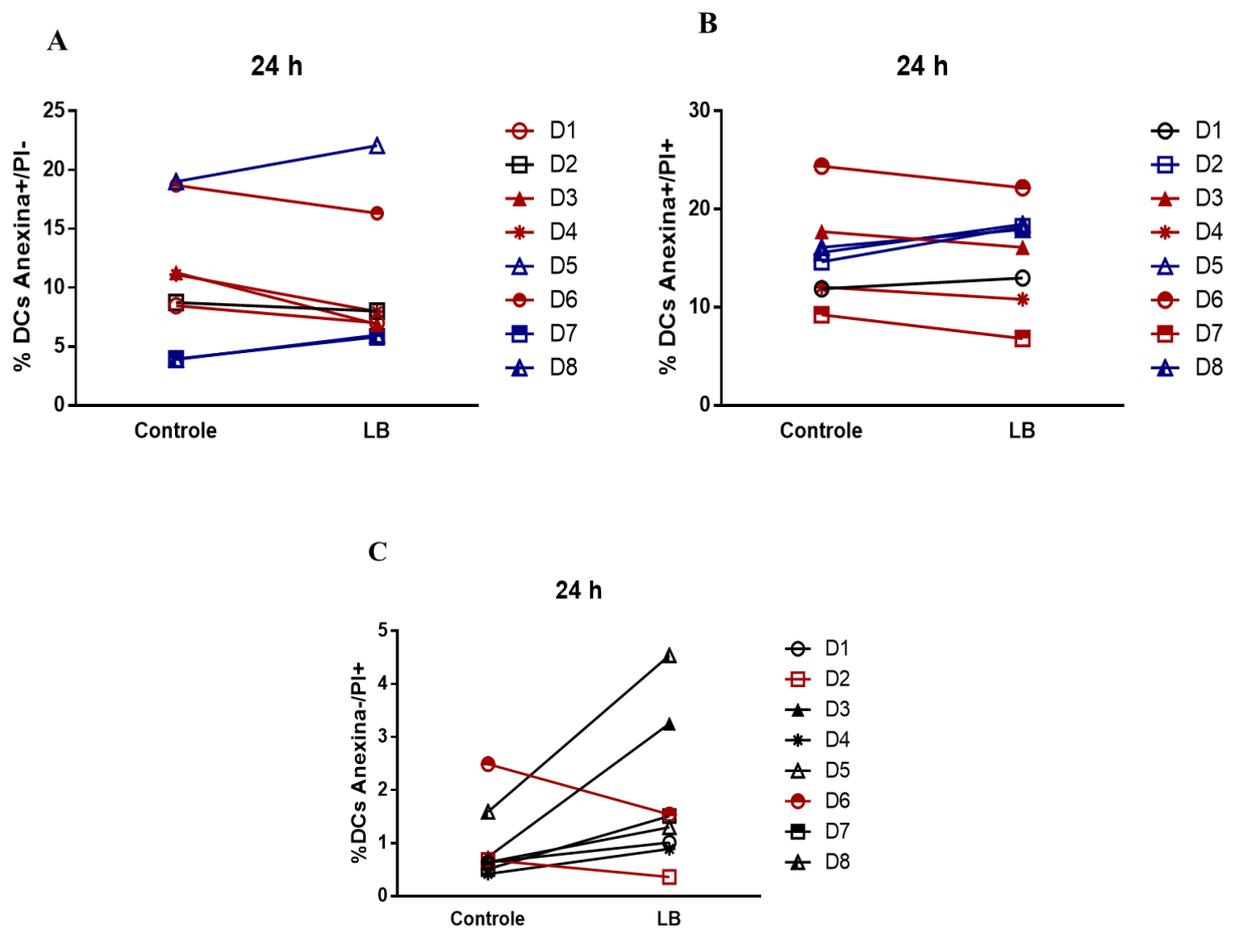


Figura 30: Quantificação da taxa da morte celular de DCs na interação após 24 h, com *L. braziliensis*, avaliada na condição controle e infectado. (A) Percentual de células positivas para Anexina+/PI- (B) Percentual de células positivas para Anexina+/PI+ (C) Percentual de células positivas para Anexina-/PI+, (n=8).

6.7 Extração de RNA

O trizol foi usado como solução para realizar a extração do RNA total das DCs nas condições controle e infectado após 12 h de interação com *L. braziliensis*. Assim, o RNA total obtido foi quantificado no Qubit (**Tabela 1**) e sua integridade foi avaliada no Bioanalyzer obtendo como resultado o número de RIN (*RNA Integrity Number*) (**Tabela 2**) o qual é uma escada numérica que tem um intervalo de 1 até 10, para um valor de 1, o perfil do RNA está mais degradado e um valor de 10 significa que o perfil do RNA tem uma ótima integridade, no entanto, para valores acima de 7 são considerados bons. Este tipo de análise, apresentam maior sensibilidade que os géis de agarose, deste modo a leitura do electroferograma é muito mais simples na hora de saber a confiabilidade dos resultado.

Tabela 1: Quantificação no Qubit do RNA total extraído das DCs nas condições controle e infectado após 12 h de interação com *L. braziliensis*. Os experimentos foram feitos em replicata.

Doador	Células Totais	Concentração (µg/ml)
D1 CONTROLE (1)	9.75×10^5	85.7
D1 INFECTADO (1)	15.32×10^5	96.3
D1 CONTROLE (2)	7.75×10^5	19.3
D1 INFECTADO (2)	8.7×10^5	17.5
D2 CONTROLE (1)	3.25×10^5	12.4
D2 INFECTADO (1)	7.2×10^5	38.0
D2 CONTROLE (2)	3.25×10^5	0.89
D2 INFECTADO (2)	2.45×10^5	16.6
D3 CONTROLE (1)	1.125×10^5	11.2
D3 INFECTADO (1)	0.325×10^5	7.67
D3 CONTROLE (2)	5.75×10^5	74.8
D3 INFECTADO (2)	6.45×10^5	57.8

Tabela 2: Número de RIN do RNA extraído das DCs nas condições controle e infectado após 12 h de interação com *L. braziliensis*

Doador	Número de RIN
D1 CONTROLE (1)	2.20
D1 INFECTADO (1)	2.30
D1 CONTROLE (2)	7.70
D1 INFECTADO (2)	6.40
D2 CONTROLE (1)	8.10
D2 INFECTADO (1)	8
D2 CONTROLE (2)	5
D2 INFECTADO (2)	5.20
D3 CONTROLE (1)	8.80
D3 INFECTADO (1)	7.80
D3 CONTROLE (2)	8.30
D3 INFECTADO (2)	8.30

Observe-se que na **Figura 31**, os doadores D1 C (1) e D1 I (1) não apresentaram resultados satisfatórios, pois o RNA encontra-se degradado no caso de D1 C (1) tendo um número de RIN de 2.20, para amostra D1 I (1) apresentou-se contaminação com DNA ou degradação, o número de RIN é correspondente a 2.30. Da mesma forma, o número de RIN para as amostras D2 C (2) e D2 I (2) foi de 5 e 5.20 respectivamente, o qual, representa a baixa qualidade delas, apesar de perceber as subunidades ribossomais 18S e 28S no gel. O resto das amostras pertencentes aos doadores D3 C (1), D3 C, I (2), D1 C, I (2), D2 C, I (1) apresentaram um número de RIN superior ou igual a sete.

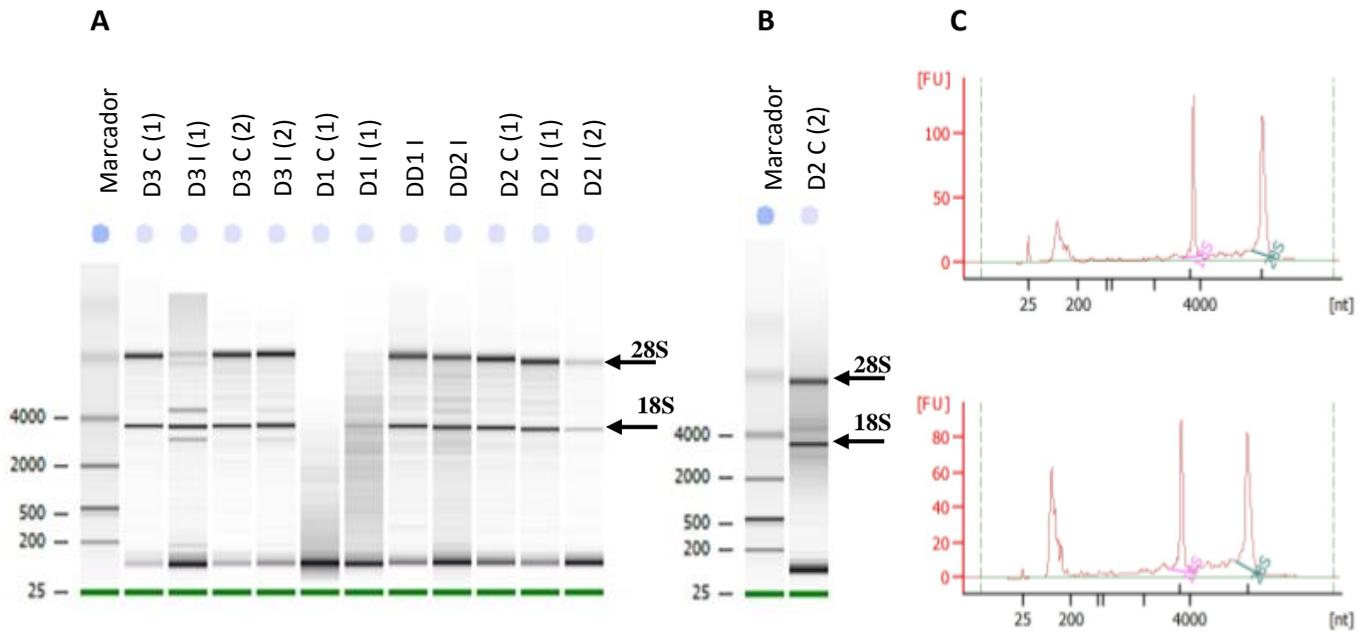


Figura 31: Imagem do gel de RNA gerado com RNA 6000 Pico LabChip na plataforma do Bioanalyzer. (A, B) Análise da integridade do RNA extraído das DCs nas condições controle (C) e infectado (I) após 12 h de interação com *L. braziliensis*. (C) Electroferogramas representativos de duas amostras D3 C (1) e D2 C (1), mostrando o RNA total com as subunidades ribossômicas 18S e 28S.

7. DISCUSSÃO

Células dendríticas (DCs) são elementos chaves da imunidade, que em estado imaturo são capazes de capturar, processar e apresentar antígenos para os linfócitos T, tendo a capacidade de polarizar a resposta efetora do sistema imune (Brandonisio et al., 2004). Trabalhos realizados demonstram que DCs desempenham um papel fundamental na resposta contra a infecção causada por parasitos intracelulares *Leishmania*, apesar dos macrófagos serem as principais células hospedeiras desses parasitos (Liu & Uzonna, 2012). Nesse trabalho o estudo está direcionado em elucidar os acontecimentos iniciais na interação DCs-*L. braziliensis*, já que essa espécie de *Leishmania* é a responsável pela manifestação clínica mais comum no Brasil e nas Américas, caracterizada por úlceras simples ou múltiplas na pele, mostrando usualmente a cura espontânea (Faria et al., 2009).

Para desenvolver o objetivo proposto, foi utilizado uma abordagem experimental baseado na diferenciação *in vitro* de DCs a partir de monócitos obtidos de células mononucleares de sangue periférico de doadores saudáveis que posteriormente foram colocadas em cultura para interagir durante 12 e 24 h com *L. braziliensis*, avaliando o padrão de produção de citocinas, moléculas co-estimulatórias e morte celular.

Inicialmente, como é reportado na literatura, DCs humanas representam uma rara e heterogênea população originadas de células troco hematopoiéticas CD34+. A proteína de membrana tipo 1 CD1, é amplamente utilizada como marcador de DCs humanas, expressado durante o desenvolvimento e/ou diferenciação (Gogolak et al., 2007) e são expressas principalmente em células apresentadoras de antígenos como macrófagos, células B e DCs (Vincent et al., 2003) Sua expressão aparece em DCs derivadas de monócitos obtidos de sangue periférico e estimuladas com as citocinas GM-CSF e IL-4 após seis dias de cultura (Shortman & Liu, 2002) por essa razão, a caracterização das DCs nesse estudo foi realizada por meio do marcador de superfície CD1a devido à semelhança que apresentam com as DCs presentes no tecido da pele. Após a realização desse protocolo, detectamos duas populações distintas com fenótipo CD1a+ e CD1a-, sendo isso possível por terem sido diferenciadas *in vitro*. Porém, ainda não foi identificado um fator exógeno natural ou a via regulatória que modula o fenótipo de mDCs (células dendríticas de origem mielóide) para CD1a+ e CD1a- (Gogolak et al., 2007). Assim, tem sido demonstrado que mDCs imaturas CD1a- apresenta maior capacidade de internalizar os antígenos em relação às CD1a+. Ambos subtipos ativados teriam o mesmo potencial migratório, porém diferem no perfil de produção de citocinas o qual

estaria impactando na polarização da resposta efetora dos linfócitos T. Além disso, na diferenciação *in vitro* das mDCs, o soro presente no meio é crítico, pois as lipoproteínas contidas ali direcionam a geração de mDCs com fenótipo CD1a-, em relação com o fenótipo CD1a+ que é inibido (Jakobsen et al., 2004). Em monócitos, a citocina IL-4 mostra uma super regulação da 12/15- lipoxigenase, o qual está associado à geração de ligantes endógenos e ativação do receptor gama da atividade proliferadora do peroxissoma (PPAR- γ) (Spanbroek et al., 2001). O anterior encontra-se associado com o fenótipo CD1a-, pois, internalizam eficientemente lipoproteínas do soro, ajudando na ativação de ligantes para o receptor PPAR- γ , em relação com o fenótipo CD1a+ que não possui essa capacidade (Gogolak et al., 2007).

Nos humanos são expressas quatro isoformas de CD1; CD1a, CD1b, CD1c e CD1d, com papel de apresentar lipídios próprios ou estranhos para as células T, potencialmente induzindo a produção de citocinas do perfil Th1 (T auxiliador tipo I). Em contraste, estudos em humanos infectados naturalmente com *Mycobacterium tuberculosis*, corroboram o papel da CD1, gerando células T de memória, pela apresentação de lipídios pelo CD1c. Adicionalmente, a vacinação em *guinea pigs* (porquinhos da Índia) com lipídios micobacterianos demonstram um efeito protetor, resultando na redução da patologia pulmonar e na diminuição de colônias bacterianas, sugerindo que CD1 é restrito às células T, contribuindo na resposta de memória no modelo animal (Vincent et al., 2003).

Assim a expressão de CD1a na superfície das DCs não é dependente da maturação das mesmas, já que as CD1 tem a capacidade de apresentar lipídeos às células T independentemente do MHC de classe I/II. Porém pouca informação é conhecida sobre a regulação transcricional desse processo, sendo CD1 e MHC I/II relacionados na ativação de moléculas co-estimulatórias e produção de citocinas (Vincent et al., 2003; (Gogolak et al., 2007).

Logo depois da caracterização das DCs, verificou-se a taxa de infecção na interação DCs-*L. braziliensis*, a qual mostra que o parasito tem a capacidade de infectar DCs humanas derivadas de monócitos com baixa variação após 12h e depois das 24 h com uma maior variabilidade. O mesmo foi observado com *L. amazonensis* conseguindo infectar DCs humanas derivadas de monócitos, mostrando pouca variabilidade estatística após 12 e 24 h da infecção (Favali, Clare, & Brodskyn, 2007). Além disso, estudos mostram que a virulência de promastigotas de *Leishmania* é dependente do ciclo celular e restrito à fase estacionária de crescimento (Farias et al., 2013). Consequentemente, esse efeito promove, a ativação da

célula, a apresentação dos antígenos e a produção de citocinas envolvidas na resposta inflamatória (Giudice et al., 2012).

Como anteriormente foi mencionado, as DCs são especialistas na apresentação de antígenos, portanto, sua ativação é essencial no início da regulação da resposta imune. Para tanto, são necessários dois sinais, o primeiro que é o reconhecimento do antígeno associado as moléculas do MHC e o segundo sinal gerado pelas moléculas co-estimulatórias, presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno, com o fim, de criar um desenvolvimento eficiente da resposta imune. Na ausência da co-estimulação, a célula ficará anérgica, um estado não responsivo. Assim, nesse trabalho foram avaliadas as moléculas de superfície presentes nas DCs com fenótipo CD1a+ e CD1a-, avaliando o grau de maturação referente ao estímulo gerado pelos antígenos de *L. braziliensis*, tais como, HLA-DR e moléculas co-estimulatórias CD86 e DC-SIGN/CD209 envolvidos na apresentação e ativação das células T. Favali et al., (2005), descreve a importância das moléculas co-estimulatórias na resposta imunológica de pacientes com leishmaniose cutânea, havendo um destaque para a via CD28-B7. Nossos resultados mostram, que a interação *L. braziliensis* com DCs modula a expressão das moléculas de superfície mencionadas anteriormente, independentemente do tempo de interação e fenótipo da célula (CD1a+/ CD1a-), iniciando uma resposta imune ao patógeno, além da produção de citocinas. A população CD1a- apresentou maior expressão de moléculas de superfície enquanto HLA-DR e CD86 em relação às CD1a+, sugerindo um grau de maturação maior ou diferentes estádios de diferenciação (Gogolak et al., 2007); (Jakobsen et al., 2004). Já DC-SIGN/CD209 apresentou uma expressão similar nos dois fenótipos celulares obtidos.

As moléculas do MHC humano são chamadas de antígeno leucocitário humano (HLA). Nesse trabalho foi detectado a expressão da molécula de superfície HLA-DR, pois ela desempenha o papel de apresentar antígenos peptídicos às células T, o que é fundamental para sua ativação. As moléculas do MHC demonstram uma especificidade muito ampla respeito à ligação de antígenos, devido a que esses genes são os mais polimórficos do genoma humano, mas uma especificidade fina no reconhecimento dos antígenos reside principalmente nos receptores dos antígenos dos linfócitos T. O anterior criou questionamentos sobre, se os genes do HLA estavam correlacionados com a susceptibilidade ou a resistência à infecção causada por *L. braziliensis*, assim, os estudos de Ribas-Silva et al., (2013) e Olivo-Díaz et al., (2004) mostram que uma alta frequência em alguns alelos HLA-DR, estão envolvidos na progressão da infecção em pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose cutânea mucosa. Por isso,

é razoável sugerir que a modulação dessas moléculas na superfície das DCs na interação com parasitos do gênero de *Leishmania* depende basicamente da variabilidade genética de cada indivíduo e suas condições étnicas (Brodszyn, Krey, & Titus, 2001); Olivo-Díaz et al., 2004).

Dados obtidos em experimentos baseados em modelo animal, sugerem que a interação entre o receptor CD28 expresso nas células T e as moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) expressas nas células apresentadoras de antígeno especializadas fornece o sinal co-estimulatório mais importante (Subauste et al., 1998), por conseguinte, é necessário para o desenvolvimento da resposta imune inicial, levando à resistência ou susceptibilidade (Elloso & Scott, 1999). Brodszyn et al., (2001) evidencia a importância do papel das moléculas co-estimulatórias para ativação dos linfócitos T, fundamentando como hipótese a dependência da molécula co-estimulatória CD40 na resposta à infecção com *L. major* em macrófagos humanos, além da importante influência das moléculas CD80 e CD86. Afirmando a hipótese, foi observado que bloqueando CD40 e CD86 havia uma diminuição significativa da produção de citocinas IL-12, TNF- α , com produção inesperada da IL-5, pois essa última citocina é indicadora do perfil Th2. Enquanto, com o bloqueio de CD80, observou-se que somente os níveis de IL-12 foram significativamente reduzidos, sugerindo que essas três moléculas co-estimulatórias apresentam um papel crítico na resposta ao antígenos de *L. major* em macrófagos humanos cultivados com PBL (*peripheral blood leukocytes*) *in vitro*, além do papel de CD40 e CD86 no possível desenvolvimento das respostas Th1 e Th2. Por outro lado, estudos realizados em macrófagos derivados de medula óssea infectados com *Trypanosoma cruzi*, evidenciam que a infecção estimula a ligação CD28-B7(CD80-CD86) (Bogdan & Rölinghoff, 1999), assim como também monócitos humanos infectados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (Subauste et al., 1998). Por outro lado, durante vários anos foram desconhecidos os mecanismos pelos quais os parasitos do gênero de *Leishmania* poderiam interferir na indução da imunidade protetora e na resposta das células T. Logo depois, evidenciou-se que uma possível causa à susceptibilidade à infecção incluiria a supressão da molécula do complexo MHC de classe II e a falta de co-estimulação pelas moléculas CD80 e CD86 (Bogdan & Rölinghoff, 1999), como no caso de macrófagos de camundongo infectados com *L. donovani* e *Mycobacterium tuberculosis*, esses efeitos são uma das estratégias utilizadas pelo parasito como mecanismo de evasão, favorecendo sua sobrevivência já que, tem a capacidade de induzir anergia e conseqüentemente uma supressão do sistema imune (Brodszyn et al., 2001).

Outros tipos de moléculas co-estimulatórias estão envolvidas na ativação das células T, como o caso da DC-SIGN/CD209 descoberta anos atrás (Geijtenbeek et al., 2000). Essa molécula expressa na superfície das DCs é uma lectina tipo C dependente de cálcio, tendo um domínio para o reconhecimento de carboidratos (CRD), reconhecendo moléculas ricas em manose (Tailleux et al., 2002), devido à ação estimuladora da citocina IL-4 a qual é chave para a aquisição de DC-SIGN nas DCs (Svajger et al., 2011). DC-SIGN foi descrito como o melhor receptor para ICAM-3/2 presente nas células T, pois apresenta maior afinidade em comparação com outras moléculas expressas na superfície das DCs, entre elas as integrinas LFA-1(α L β 2) e α D β 2 (Geijtenbeek et al., 2000), desencadeando uma sinapse imunológica eficiente entre DCs e linfócitos T *naive* (Tailleux et al., 2002). DC-SIGN também foi descrito como um receptor característico de DCs no reconhecimento de vários patógenos, tais como, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Leishmania* e *Schistosoma mansoni* (Appelmelk et al., 2003). Apesar de não ser estatisticamente significativos, nossos dados demonstram uma alta expressão dessa molécula na superfície das DCs, tanto na condição controle como as células expostas aos antígenos de *L. braziliensis*, sugerindo uma importante interação, a qual favorece a captura e internalização do patógeno (Plazolles et al., 2011). Porém, esse evento não garante o controle da infecção, já que DC-SIGN é capaz de modular a resposta imunológica para um perfil Th1 ou Th2 (Bergman et al., 2004), como acontece, quando DC-SIGN/CD209 interage com o lipoglicano poli-manosilado lipoarabinomanan (LAM) característico na superfície das micobactérias, na infecção *in vitro* de DCs obtidas de CMSP com *M. tuberculosis* (Tailleux et al., 2002). Tal interação desencadeia um mecanismo de escape, já que favorece a inibição da função efetora das DCs e ao mesmo tempo que estimula a produção da citocina IL-10, favorecendo a sobrevivência da bactéria e consequentemente a persistência do perfil Th2 (van Kooyk & Geijtenbeek, 2003). Semelhantemente, DCs interagem com o citomegalovírus pela via DC-SIGN (Halary et al., 2002), favorecendo a entrada do vírus na célula resultando em uma forte infecção (Plazolles et al., 2011).

Como foi mencionado anteriormente, DC-SIGN é um receptor que está associado ao reconhecimento de parasitos do gênero *Leishmania*, apresentando uma afinidade variável pelas diferentes espécies causadoras da leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea e de diferentes formas de vida do parasito (amastigota e promastigota) (Colmenares et al., 2004). Assim, DC-SIGN é um importante receptor para amastigotas de *L. pifanoi* (Colmenares et al., 2002) e *L. mexicana* (Appelmelk et al., 2003) mas não para *L. major*, sugerindo uma

variabilidade na resposta imune do hospedeiro, restrito às diferentes espécies de *Leishmania*, partindo dos eventos que acontecem na interação das DCs com as células T (Colmenares et al., 2004).

A complexa interação entre *Leishmania* e células apresentadoras de antígeno, trazem um efeito fundamental no resultado final da doença, já que, tanto macrófagos como DCs são as células mediadoras da resistência ou susceptibilidade durante a infecção (Liu & Uzonna, 2012). Assim, após ativação e maturação das APC, citocinas imunoregulatórias são produzidas para desencadear o papel efetor das células envolvidas na patogênese da doença (Giacomini et al., 2013). Por essa razão, neste trabalho verificou-se a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12p40, TNF- α , IL-6 e IL-1 β ; e anti-inflamatórias TGF- β e IL-10 nos sobrenadantes das culturas após 12 e 24 h da interação DCs-*L. Braziliensis*. Dados da literatura demonstram a importância da citocina IL-12, pois DCs são a fonte principal dessa citocina no primeiro contato com parasitos de *Leishmania* gerando uma resposta protetora Th1, além da produção de IFN- γ (Brandonisio et al., 2004). De fato, DCs isoladas da pele de camundongos C57BL/6 infectadas com promastigotas *L. major*, apresentaram uma produção de IL-12p40 após 20h de incubação (Konecny et al., 1999), enquanto, a produção da IL-12p70 a qual é dependente de IFN- γ somente é detectada nos sobrenadantes após 72 h de interação (Stebuty et al., 1998).

A citocina IL-12 é um heterodímero, ligado por pontes dissulfeto, composta por duas subunidades de 35 kDa (p35) e 40 kDa (p40), formando IL-12p70, e IL-12p40 forma um homodímero quando a subunidade p40 é sintetizada (Charmoy et al., 2007). O receptor dessa citocina, é composto por duas cadeias, IL-12R β 1 e IL-12R β 2, esses são expressos nos linfócitos T pela ativação do TCR ou pela ação do IFN- γ (Rugeles et al., 2009). O excesso das unidades monoméricas da IL-12p40 poderia formar homodímeros mais estáveis de IL-12p40 os quais, ligam-se ao receptor IL-12R β 1 e servem como antagonistas para IL-12p70, mas um excesso dos homodímeros da IL-12p40 poderia promover uma resposta Th2 (T auxiliador Tipo II), pois, uma superprodução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em macrófagos estimulados com LPS estimula a produção de IL-4 (Obata et al., 2006). Além disso, dados na literatura demonstram que neutrófilos polimorfonucleares infectados com *L. major* isolados da medula óssea de camundongos resistentes C57BL/6, produzem altas concentrações de IL-10 e IL-12p70 associado com IL-12p35 a forma bioativa dessa citocina, mostrando um perfil Th1. O efeito contrário é observado em camundongos susceptíveis BALB/c, pois apresentam altos

níveis de IL-12p40 relacionados à não detecção da citocina IL-10 e conseqüentemente a polarização da resposta Th2 (Charmoy et al., 2007).

Estudos anteriores, demonstram que *L. braziliensis* induz *in vivo* a maturação das DCs caracterizadas pela migração para as áreas das células T (linfonodos), regulando a expressão de moléculas co-estimulatórias (Antonelli et al., 2004). Analogamente, DCs em co-cultura com *L. braziliensis*, também estimulam os marcadores de ativação, produzindo conseqüentemente IL-12 e TNF- α (de Oliveira & Brodskyn, 2012). Uma importante evidência da importância da IL-12p40 no controle da infecção, foi quando, camundongos infectados com *L. braziliensis* deficientes em IL-12p40 foram propensos ao desenvolvimento de lesões cutâneas duas vezes mais que nos camundongos C57BL/6 do tipo selvagem, adicionalmente, esses dois tipos de camundongos permaneceram em observação durante 12 semanas. Passado esse tempo, foi visto que os camundongos deficientes mantiveram a lesão sem progressão clínica ou causando letalidade em comparação com os de tipo selvagem que terminaram curando as lesões cutâneas (Rocha et al., 2007). Assim, como a IL-12, TNF- α é uma citocina chave no desenvolvimento do processo inflamatório mediado pelas células T, pois, encontra-se envolvida no recrutamento de leucócitos pelo aumento da expressão de moléculas de adesão do endotélio vascular aumentando a angiogênese (Carvalho et al., 2008). O trabalho realizado por Giudice et al., (2012) avalia a produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de macrófagos isolados de pacientes com LC (leishmaniose cutânea), LM (leishmaniose cutânea mucosa), SC (*subclinical infection*) e HS (sadios), infectados com *L. braziliensis* após 48 h de interação, onde altos níveis de TNF- α foram achados nos pacientes com LC e LM, em relação com os pacientes HS e SC, concluindo que a *Leishmania* consegue sobreviver dentro dos macrófagos dos pacientes LC e LM, produzindo altas quantidades de citocinas pro-inflamatórias, atraindo neutrófilos, monócitos e células T ativadas induzindo uma resposta inflamatória, contribuindo na patologia associada com *L. braziliensis* (Giudice et al., 2012). DCs diferenciadas partir de monócitos, quando essas são infectadas com *L. amazonensis* também produzem altos níveis de TNF- α (Favali et al., 2007). Analogamente, Carvalho et al., (2008), avalia os níveis de TNF- α em cultura de DCs expostas a *L. braziliensis*, encontrando-se na mesma cultura DCs infectadas e DCs não infectadas (*bystandar*), esse experimento demonstrou a produção de TNF- α nos dois tipos de DCs presentes na cultura. Os autores desse estudo propõem que DCs *bystandar* tem um papel crítico na infecção com *L. braziliensis*, pois, além de contribuir no controle do parasito através da produção de TNF- α , estimulam a ativação das células T por meio da alta expressão do

MHC-II, moléculas co-estimuladoras e a citocina IL-12 em comparação com as DCs infectadas. De fato, experimentos com camundongos de fenótipo TNF- α ⁻/⁻, desenvolvem lesões cutâneas não auto curativas quanto infectados por *L. braziliensis* (Rocha et al., 2007).

Por outra parte, não foram detectáveis níveis das citocinas IL-6, IL-1 β , TGF- β e IL-10 nos sobrenadantes das culturas de DCs em presença de *L. braziliensis* após 12 e 24 h de interação, as quais são importantes para derivar o tipo de resposta imune específico para o parasito. Resultados similares reportou Giacomini et al.,(2013) no seu trabalho, quando avaliava a produção de citocinas nos sobrenadantes das culturas de DCs derivadas de monócitos humanos infectadas com *M. tuberculosis*, pois, essas citocinas são críticas para formar e manter o granuloma.

IL-6 é uma citocina multifuncional e participa na defesa do hospedeiro, regulando o início da resposta inflamatória junto com as citocinas TNF- α e IL-1 β . Também promove a resposta das células T e B, além de regular o processo de maturação das DCs, aliás, é considerada como um potente regulador da transição da imunidade inata para a imunidade adquirida (Jones, 2005). Uma evidência do impedimento da maturação das DCs derivadas de monócitos, foi observado no trabalho realizado por Favali et al., (2007), já que os níveis dessa citocina diminuem significativamente nas culturas de DCs do dia 6 para o dia 3 de diferenciação em presença de *L. amazonensis*, possivelmente pela diferenciação de monócitos em macrófagos, e não em DCs na presença de *L. amazonensis*. A deficiência da IL-6, impede o desenvolvimento de uma adequada resposta imune inata e posteriormente uma resposta adquirida (Jones, 2005). Estudos em células humanas dirigidos à interação *M. tuberculosis*-macrófagos/DCs, revelam que as citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10 são produzidas e detectáveis em macrófagos após 24 ou 48 h, enquanto, DCs não apresentam níveis detectáveis de IL-6 e IL-10, mas IL-1 β e TNF- α apresentam níveis de produção baixos, mas quando DCs foram expostas a uma carga bacteriana maior, os níveis das citocinas mencionadas anteriormente aumentaram. Esse estudo sugere, que as DCs requerem um estímulo maior que os macrófagos, mostrando que esses dois tipos celulares respondem à infecção por *M. tuberculosis* de formas diferentes (Giacomini et al., 2013).

IL-1 β é uma citocina pro-inflamatória produzida por vários tipos celulares como monócitos, macrófagos, células de Langerhans e DCs. Sua função é semelhante à do TNF- α (Murphy et al., 2000). Os efeitos biológicos da IL-1, dependem da quantidade de citocina produzida. Por isso, quando secretada em baixa concentração a IL-1 atua como um mediador

da inflamação local, estimulando células endoteliais a aumentar a expressão de moléculas de superfície que mediam a adesão de leucócitos, como ligantes para integrinas. Por outro lado, quando secretada em quantidades maiores, a IL-1 entra na corrente sanguínea exercendo efeitos endócrinos. Assim a presença sistêmica da citocina induz febre, síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda produzidas pelo fígado, direta ou indiretamente estimuladas pela IL-6 e recrutamento de neutrófilos (Abbas et al., 2011). No nosso trabalho, a IL- β não apresentou níveis detectáveis. Dados da literatura demonstram um resultado similar observado na infecção por *L. major* e *L. amazonensis*, pois DCs derivadas de medula óssea de murinos infectadas com estas duas espécies de *Leishmania*, apresentaram poucos níveis de produção, sugerindo um papel negativo da IL-1 β no desenvolvimento da resposta imune protetora (Xin et al., 2007). Dados recentes na literatura demonstram que o inflamossoma é uma plataforma crucial na imunidade inata para o reconhecimento de *Leishmania* spp. A ativação do inflamossoma inclui o desenvolvimento dos mecanismos efetores dos macrófagos (Lima-Junior et al., 2013). Esse evento é regulado por IFN e IL-1 β , facilitando a expressão da enzima oxido nítrico sintase (NOS₂) para a produção do oxido nítrico (NO) evitando a multiplicação da *Leishmania* spp. dentro dos macrófagos (Mukbel et al., 2007). Assim, a produção da IL-1 β é muito importante para a determinação da severidade da doença em humanos, pelos polimorfismos associados ao gene *IL1B*, pois podem desencadear casos severos de LV em pacientes infectados com *L. infantum chagasi* (Moravej et al., 2012) ou formas difusas descontroladas da LC em pacientes infectados com *L. mexicana* (Fernández-Figueroa et al., 2012). Entretanto, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos e camundongos C57BL/6 deficientes no receptor (IL-1R) da IL-1B, *caspl*, *Asc* ou *Nlrp3* apresentam susceptibilidade à infecção com *L. amazonensis*, sugerindo que a sinalização da IL-1 é importante para mediar a formação e ativação do inflamossoma, já que é dependente da vias das caspase-1 e consequentemente o controle da replicação da *Leishmania* spp (Lima-Junior et al., 2013).

IL-10 e TGF-B são duas citocinas com efeito imunossupressor, que modulam a resposta imune exacerbada, a imunopatologia nas alergias, a autoimunidade e as doenças infecciosas. Em relação à IL-10, o trabalho realizado por Favali et al.,(2007) reporta resultados similares aos dados obtidos neste trabalho, pois, DCs diferenciadas a partir de monócitos em presença ou ausência de *L. amazonensis* não apresentaram níveis detectáveis de IL-10, possivelmente porque o parasito modula negativamente a produção desta citocina, impedindo uma adequada ativação da resposta imune celular. A LTA causada por *L. braziliensis*, promove altos níveis de IFN- γ e TNF- α que em ausência da IL-10 causa uma

resposta inflamatória severa, tendo como consequência a destruição do tecido na LC e LM, evidenciando-se o papel protetor da IL-10 (Oliveira et al., 2014). Além disso, IL-10 e TGF- β formam encontradas em biópsias de pacientes com LC causada por *L. major*, as quais foram associadas à forma crônica da infecção (SH Hejazi et al., 2012). Por outro lado, recentemente foi observado que IL-10 e TGF- β podem atenuar a produção de IFN- γ e TNF- α , na infecção da leishmaniose cutânea diminuindo as consequências da patologia, já que, TGF- β inibe a produção de IL-12 e IFN- α e a atividade dos macrófagos, DCs e células NK (Yoshimura, Wakabayashi, & Mori, 2010) mas esse efeito imunomodulador não está presente em células T já ativadas, pois, os níveis de TGF- β são mínimos (Oliveira et al., 2014).

Macrófagos e DCs são os principais células hospedeiras dos parasitos intracelulares do gênero *Leishmania*. A apoptose induzida em células infectadas por patógenos intracelulares, é uma defesa importante para o controle das infecções (Poon et al., 2010; Valdés-Reyes et al., 2009). Entretanto, a inibição da apoptose é uma estratégia utilizada por bactérias como *M. tuberculosis*, *Helicobacter pylori* e *Listeria monocytogenes* (Lancellotti et al., 2006); vírus como o Adenovirus e Citomegalovirus (Brien, 1998); e parasitos como *Toxoplasma gondii* (Nash et al., 1998), para assegurar a sobrevivência dentro das células infectadas do hospedeiro. Assim, os ensaios realizados neste trabalho, sugerem que embora promastigotas de *L. braziliensis* sejam capazes de infectar DCs, os parasitos não induzem a morte celular, pelo contrário, a presença delas dentro da célula retardam a apoptose como mecanismo de sobrevivência para manter a infecção. Um resultado similar foi observado, quando neutrófilos humanos foram infectados com *L. major*, pois, após 24 h horas de interação não apresentaram aspecto apoptótico, afirmando que o parasito consegue viver dentro de neutrófilos, pela inibição da via das caspase-3, uma enzima chave na apoptose espontânea (Aga et al., 2002). Dados da literatura demonstram também que DCs derivadas de monócitos humanos infectados com amastigotas de *L. mexicana*, inibem a apoptose da célula evitando a translocação da fosfatidilserina, a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA nuclear e a ativação da caspase-3, sugerindo que a sobrevivência dos parasitos dentro de DCs é uma propriedade intrínseca da *Leishmania*, já que é importante para a proliferação do parasito e a patogênese da infecção (Gutiérrez-Kobeh et al., 2013; Valdés-Reyes et al., 2009). Uma estratégia utilizada por *L. donovani* na infecção de neutrófilos, encontra-se baseada na formação de um compartimento não lítico incapaz de se fundir com o lisossomo, mostrando uma dependência de LPS para a manutenção do parasito nesses compartimentos. Esta estratégia seria essencial para a transferência dos parasitos aos macrófagos e o

estabelecimento dos mesmos nos hospedeiros mamíferos (Gueirard et al., 2008). Além disso, promastigotas de *Leishmania* ativam vias nos macrófagos tais como NF- κ B, PI3K e MAPK p38 para inibir a apoptose, evidenciando-se mais uma vez a sobrevivência do parasito (Ruhland et al., 2007). Por outro lado, DCs na derme de camundongos C57BL/6 que capturam neutrófilos apoptóticos apresentaram atraso na sua ativação e conseqüentemente na ativação dos linfócitos, retardando a resposta imune adaptativa em resposta à infecção com *L. major* (Ribeiro-Gomes et al., 2012). Os dados reportados na literatura junto com os obtidos neste trabalho, sugerem que a inibição da apoptose depende do estado de vida do parasito e o grau de infecção nas células nos diferentes tipos celulares presentes no hospedeiro, já que são eventos impactantes na expressão gênica da regulação da apoptose (Gutiérrez-Kobeh et al., 2013).

Avanços recentes em *high-throughput sequencing*, apresentam uma oportunidade para estudar profundamente o transcriptoma de diferentes organismos. Por isso, nesse trabalho foi extraído o RNA após 12 h de interação DCs humanas-*L. braziliensis* e posteriormente a avaliação da sua integridade, já que é um passo crítico na análise da expressão gênica (Mueller & Schroeder, 2004). O RNA será sequenciado usando a plataforma *Illumina-RNA-seq* (Wang, Gerstein, & Snyder, 2009), a mesma tecnologia empregada na realização do transcriptoma de lesões iniciais cutâneas em pacientes infectados com *L. braziliensis* (Maretti-Mira et al., 2012) e *Plasmodium falciparum* (Otto et al., 2010). Essas tecnologias tem começado a se direcionar aos estudos com *Leishmania*, permitindo o sequenciamento do genoma de algumas espécies (Myler et al., 2001) a análise dos níveis de expressão diferencial de genes (Maretti-Mira et al., 2012), ou os padrões de expressão das diferentes espécies e cepas do parasito, assim como os mapas proteômicos de algumas espécies (Menezes et al., 2013). Finalmente, o estudo do transcriptoma ajudará elucidar as importantes vias biológicas que poderiam ser potentes alvos terapêuticos na resposta do hospedeiro à infecção por *L. braziliensis* (Maretti-Mira et al., 2012).

Na literatura já há várias descrições da imunobiologia e da patogênese da Leishmaniose Tegumentar Americana (Alves et al., 2013). Os desafios propostos por essa doença permanecem na compreensão na biologia da leishmaniose, as respostas do hospedeiro aos parasitos e como usar esse conhecimento para desenvolver novas formas de combater a infecção. No entanto, os avanços ao longo dos últimos anos fornecem um roteiro para descobertas futuras (Kaye & Scott, 2011). Assim, este trabalho é a primeira etapa da

caracterização da interação DCs-*L. braziliensis*, sendo importante para a análise do perfil transcricional, a qual que será realizada no futuro.

8. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados deste trabalho, pôde-se observar que, DCs derivadas de monócitos humanos caracterizadas pela expressão CD1a, são especialistas na construção da resposta imune, já que, são células capazes de capturar antígenos de *L. braziliensis*. Isso é evidenciado pela expressão do complexo principal de histocompatibilidade (HLA-DR), DC-SIGN (CD209) e o aumento significativo da molécula co-estimulatória CD86. A ativação da célula leva à produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-12p40 e TNF- α , as quais, são importantes na resposta imune para o controle do parasito. Entretanto, as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , além das pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 β não foram detectadas. Além disso, a possível inibição da apoptose pode tanto favorecer a apresentação dos antígenos quanto a disseminação do parasito.

9. PERSPECTIVA

Com o isolamento do RNA total das DCs infectadas com *L. braziliensis* realizado neste trabalho, pretende-se analisar o transcrito, da interação DCs-*L. braziliensis*, empregando uma plataforma de sequenciamento de segunda geração: o RNA-seq. Esta tecnologia por sua alta cobertura e sensibilidade permitirá a identificação de genes diferencialmente expressos, da célula hospedeira no momento do seu contato com o patógeno. Essa técnica tem a capacidade de caracterizar e quantificar diferentes transcritos (incluindo os de baixa abundância) de mRNAs, micro-RNAs, RNAs não codificantes, polimorfismos de nucleotídeos/mutações, detecção de eventos de splicing alternativo e outras modificações pós-transcricionais, sendo uma ferramenta altamente útil na pesquisa básica.

10. REFERÊNCIAS

- Abbas, Abul K, Lichtman, Andrew H, P. S. (2011). *Imunologia Celular e Molecular* (Sexto., p. 278). Elsevier Ltd.
- Afonso, L., Borges, V. M., Cruz, H., Ribeiro-Gomes, F. L., DosReis, G. a, Dutra, A. N., ... Brodskyn, C. I. (2008). Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *Journal of leukocyte biology*, 84(2), 389–96. doi:10.1189/jlb.0108018
- Aga, E., Katschinski, D. M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Müller, K., ... Laskay, T. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(2), 898–905. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097394>
- Alexander, J., Bryson, K. (2005). T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology letters*, 99(1), 17–23. doi:10.1016/j.imlet.2005.01.009
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., den Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS one*, 7(5), e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- Alves, C. F., Alves, C. F., Figueiredo, M. M., Souza, C. C., Machado-Coelho, G. L. L., Melo, M. N., ... Tafuri, W. L. (2013). American tegumentary leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin. *PLoS one*, 8(5), e63343. doi:10.1371/journal.pone.0063343
- Andrade, B. B., de Oliveira, C. I., Brodskyn, C. I., Barral, A., Barral-Netto, M. (2007). Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scandinavian journal of immunology*, 66(2-3), 122–7. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01964.x
- Anjili, C. O., Mbatia, P. A., Mwangi, R. W., Githure, J. I., Olobo, J. O., Robert, L. L., Koech, D. K. (1995). The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta tropica*, 60(2), 97–100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8610544>
- Antonelli, L. R. V., Dutra, W. O., Almeida, R. P., Bacellar, O., Gollob, K. J. (2004). Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clinical and experimental immunology*, 136(2), 341–8. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02426.x
- Apostolopoulos, V., Thalhammer, T., Tzakos, A. G., Stojanovska, L. (2013). Targeting Antigens to Dendritic Cell Receptors for Vaccine Development. *Journal of drug delivery*. doi:10.1155/2013/869718
- Appelmelk, B. J., Die, I. Van, Vliet, S. J. Van, Vandenbroucke-graals, C. M. J. E., Teunis, B. H., Kooyk, Y. Van. (2003). Cutting Edge: Carbohydrate Profiling Identifies New Pathogens That Interact with Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin on Dendritic Cells Ben. *Journal of immunology*, 170(4), 1635–1639.
- Ardavín, C., Martínez del Hoyo, G., Martín, P., Anjuère, F., Arias, C. F., Marín, a R., ... Hernández, H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends in immunology*, 22(12), 691–700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17059691>

- Awasthi, A., Mathur, R. K., Saha, B., Leishman, W., & Donovan, C. (2004). Immune response to Leishmania infection, (June), 238–258.
- Badaro, R., Lobo, I., Munos, A., Netto, E. M., Modabber, F., Campos-Neto, A., Reed, S. G. (2006). Immunotherapy for drug-refractory mucosal leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, 194(8), 1151–9. doi:10.1086/507708
- Barral, A., & Costa, J. (2011). *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas*.
- Belkaid, Y. (2003). The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in Leishmania infection. *Expert opinion on biological therapy*, 3(6), 875–85. doi:10.1517/14712598.3.6.875
- Belz, G. T., & Nutt, S. L. (2012). Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nature reviews. Immunology*, 12(2), 101–13. doi:10.1038/nri3149
- Bergman, M. P., Engering, A., Smits, H. H., van Vliet, S. J., van Bodegraven, A. a, Wirth, H.-P., Appelmelk, B. J. (2004). Helicobacter pylori modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *The Journal of experimental medicine*, 200(8), 979–90. doi:10.1084/jem.20041061
- Besteiro, S., Williams, R. A M., Coombs, G. H., Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in Leishmania. *International journal for parasitology*, 37(10), 1063–75. doi:10.1016/j.ijpara.2007.03.008
- Bettini, M., & Vignali, D. A. (2010). Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Current opinion in immunology*, 21(6), 612–618. doi:10.1016/j.coi.2009.09.011.Regulatory
- Blomgran, R., Desvignes, L., Briken, V., Ernst, J. D. (2012). Mycobacterium tuberculosis inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell host & microbe*, 11(1), 81–90. doi:10.1016/j.chom.2011.11.012
- Boelaert, M., El-Safi, S., Hailu, a, Mukhtar, M., Rijal, S., Sundar, S., Peeling, R. W. (2008). Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(1), 32–40. doi:10.1016/j.trstmh.2007.09.003
- Bogdan, C., & Röllinghoff, M. (1999). How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitology today (Personal ed.)*, 15(1), 22–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10234174>
- Bogdan, Christian. (2012). Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2(May), 69. doi:10.3389/fcimb.2012.00069
- Brandonisio, O., Spinelli, R., & Pepe, M. (2004). Dendritic cells in Leishmania infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 6(15), 1402–9. doi:10.1016/j.micinf.2004.10.004
- Brelaz, M. C. A., de Oliveira, A. P., de Almeida, A. F., de Assis Souza, M., Medeiros, Â. C. R., de Brito, M. E. F., Pereira, V. R. A. (2012). Antigenic fractions of Leishmania (Viannia) braziliensis: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. *Parasite immunology*, 34(4), 236–9. doi:10.1111/j.1365-3024.2012.01351.x
- Brien, V. O. (1998). Viruses and apoptosis. *Journal of General Virology*, 79, 1833–1845.

- Brodskyn, C. I., Krey, G. K. D. E., Titus, R. G. (2001). Influence of Costimulatory Molecules on Immune Response to *Leishmania major* by Human Cells In Vitro, *69*(2), 665–672. doi:10.1128/IAI.69.2.665
- Carvalho, L. P., Pearce, E. J., Scott, P. (2008). 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 Responses. *The Journal of Immunology*, *181*(9), 6473–6480.
- Chang, S.-Y., Ko, H.-J., Kweon, M.-N. (2014). Mucosal dendritic cells shape mucosal immunity. *Experimental & molecular medicine*, *46*(3), e84. doi:10.1038/emm.2014.16
- Charmoy, M., Auderset, F., Allenbach, C., Tacchini-Cottier, F. (2010). The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *Journal of biomedicine & biotechnology*, *2010*, 719361. doi:10.1155/2010/719361
- Charmoy, M., Megnekou, R., Allenbach, C., Zweifel, C., Perez, C., Monnat, K., Tacchini-Cottier, F. (2007). *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *Journal of leukocyte biology*, *82*(2), 288–99. doi:10.1189/jlb.0706440
- Chavali, A. K., Blazier, A. S., Tlaxca, J. L., Jensen, P. a, Pearson, R. D., Papin, J. A. (2012). Metabolic network analysis predicts efficacy of FDA-approved drugs targeting the causative agent of a neglected tropical disease. *BMC systems biology*, *6*(1), 27. doi:10.1186/1752-0509-6-27
- Christian, D. A., & Hunter, C. A. (2012). Particle-mediated delivery of cytokines for immunotherapy. *Immunotherapy*, *4*(4), 425–441. doi:10.2217/imt.12.26.Particle-mediated
- Chung, C. Y. J., Ysebaert, D., Berneman, Z. N., Cools, N. (2013). Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance. *Clinical & developmental immunology*. doi:10.1155/2013/972865
- Colmenares, M., Corbí, A. L., Turco, S. J., Rivas, L. (2004). The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *172*(2), 1186–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707095>
- Colmenares, M., Puig-Kröger, A., Pello, O. M., Corbí, A. L., Rivas, L. (2002). Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania amastigotes*. *The Journal of biological chemistry*, *277*(39), 36766–9. doi:10.1074/jbc.M205270200
- Committee, W. H. O. E. (2010). Control of the leishmaniases. *World Health Organization technical report series*, (949), xii–xiii, 1–186, back cover. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3307017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cortez, M., Huynh, C., Fernandes, M., Kennedy, A., Aderem, A., Andrews, N. (2012). *Leishmania* promotes its own virulence by inducing expression of the host immune inhibitory ligand CD200. *Cell host & microbe*, *9*(6), 463–471. doi:10.1016/j.chom.2011.04.014.*Leishmania*
- Damatta, R. a, Seabra, S. H., Deolindo, P., Arnholdt, A. C. V, Manhães, L., Goldenberg, S., de Souza, W. (2007). *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion

- mechanism. *FEMS microbiology letters*, 266(1), 29–33. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00495.x
- Davidson, R. N. (2005). Leishmaniasis. *Medicine*, 33(8), 43–46. doi:10.1383/medc.2005.33.8.43
- De Assis, R. R., Ibraim, I. C., Nogueira, P. M., Soares, R. P., Turco, S. J. (2012). Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(9), 1354–65. doi:10.1016/j.bbagen.2011.11.001
- De Moura, T. R., Oliveira, F., Novais, F. O., Miranda, J. C., Clarêncio, J., Follador, I., de Oliveira, C. I. (2007). Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. *PLoS neglected tropical diseases*, 1(2), e84. doi:10.1371/journal.pntd.0000084
- De Oliveira, C. I., & Brodskyn, C. I. (2012). The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Frontiers in immunology*, 3(June), 145. doi:10.3389/fimmu.2012.00145
- Donovan, M. J., Tripathi, V., Favila, M. a, Geraci, N. S., Lange, M. C., Ballhorn, W., McDowell, M. a. (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induced by *Leishmania* infection of human dendritic cells. *Parasite immunology*, 34(10), 464–72. doi:10.1111/j.1365-3024.2012.01380.x
- Dorn, G. W. (2013). Molecular mechanisms that differentiate apoptosis from programmed necrosis. *Toxicologic pathology*, 41(2), 227–34. doi:10.1177/0192623312466961
- Ebstein, F., Lange, N., Urban, S., Seifert, U., Krüger, E., & Kloetzel, P.-M. (2009). Maturation of human dendritic cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(5), 1205–15. doi:10.1016/j.biocel.2008.10.023
- El-Hani, C. N., Borges, V. M., Wanderley, J. L. M., & Barcinski, M. A (2012). Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2(July), 96. doi:10.3389/fcimb.2012.00096
- Elloso, M. M., & Scott, P. (1999). Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(11), 6708–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10352289>
- El-On, J. (2009). Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*, 11(10), 623–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20077951>
- Falcão, S., de Moura, T. R., Clarêncio, J., Brodskyn, C., Barral, A., de Oliveira, C. I. (2012). The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. *International journal for parasitology*, 42(8), 771–80. doi:10.1016/j.ijpara.2012.05.006
- Faria, D. R., Souza, P. E. a, Durães, F. V, Carvalho, E. M., Gollob, K. J., Machado, P. R., Dutra, W. O. (2009). Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology*, 31(8), 432–9. doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01125.x
- Farias, L. H. S., Rodrigues, A. P. D., Silveira, F. T., Seabra, S. H., DaMatta, R. a, Saraiva, E. M., Silva, E. O. (2013). Phosphatidylserine exposure and surface sugars in two *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* strains involved in cutaneous and mucocutaneous

- leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, 207(3), 537–43.
doi:10.1093/infdis/jis689
- Favali, C., Clare, J., Brodskyn, C. I. (2007). Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells, 82(December), 1401–1406.
doi:10.1189/jlb.0307187
- Favali, C., Costa, D., Afonso, L., Conceição, V., Rosato, A., Oliveira, F., Brodskyn, C. I. (2005). Role of costimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 7(1), 86–92.
doi:10.1016/j.micinf.2004.09.015
- Feasey, N., Wansbrough-Jones, M., Mabey, D. C. W., Solomon, A. W. (2010). Neglected tropical diseases. *British medical bulletin*, 93, 179–200. doi:10.1093/bmb/ldp046
- Fernández-Figueroa, E. a, Rangel-Escareño, C., Espinosa-Mateos, V., Carrillo-Sánchez, K., Salaiza-Suazo, N., Carrada-Figueroa, G., ... Becker, I. (2012). Disease severity in patients infected with Leishmania mexicana relates to IL-1 β . *PLoS neglected tropical diseases*, 6(5), e1533. doi:10.1371/journal.pntd.0001533
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., Figdor, C. G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, 100(5), 575–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10721994>
- Getti, G. T., Cheke, R. A., & Humber, D. P. (2008). Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for Leishmania parasites. *Parasitology*, 135(12), 1391–9.
doi:10.1017/S0031182008004915
- Giacomini, E., Iona, E., Ferroni, L., Fattorini, L., Orefici, G. (2013). Infection of Human Macrophages and Dendritic Cells with Mycobacterium tuberculosis Induces a Differential Cytokine Gene Expression That Modulates T Cell Response. *the journal of immunology*, 166(12), 7033–7041.
- Giudice, A., Vendrame, C., Bezerra, C., Carvalho, L. P., Delavechia, T., Carvalho, E. M., Bacellar, O. (2012). Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with Leishmania braziliensis infection. *BMC infectious diseases*, 12(1), 75. doi:10.1186/1471-2334-12-75
- Gogolak, P., Rethi, B., Szatmari, I., Lanyi, A., Dezso, B., Nagy, L., Rajnavolgyi, E. (2007). Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR γ . *Blood*, 109(2), 643–52. doi:10.1182/blood-2006-04-016840
- Gougeon, M.-L. (2003). Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nature reviews. Immunology*, 3(5), 392–404. doi:10.1038/nri1087
- Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A. (2007). Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol*, 53(3), 335–343. Retrieved from http://www.inca.gov.br/Rbc/n_53/v03/pdf/revisao4.pdf
- Gueirard, P., Laplante, A., Rondeau, C., Milon, G., Desjardins, M. (2008). Trafficking of Leishmania donovani promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cellular microbiology*, 10(1), 100–11. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01018.x
- Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T. C., Froment, G. S., Soares, R. P. P., Morgado, F. N., Conceição-Silva, F., Saraiva, E. M. (2009). Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 106(16), 6748–53.
doi:10.1073/pnas.0900226106

- Gutiérrez-Kobeh, L., de Oyarzabal, E., Argueta, J., Wilkins, A., Salaiza, N., Fernández, E., Becker, I. (2013). Inhibition of dendritic cell apoptosis by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Parasitology research*, 112(4), 1755–62. doi:10.1007/s00436-013-3334-2
- Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houllès, C., Déchanet-Merville, J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity*, 17(5), 653–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433371>
- Harms, G., Scherbaum, H., Reiter-Owona, I., Stich, A., & Richter, J. (2011). Treatment of imported New World cutaneous leishmaniasis in Germany. *International journal of dermatology*, 50(11), 1336–42. doi:10.1111/j.1365-4632.2011.04987.x
- Hopp, A.-K., Rupp, A., Lukacs-Kornek, V. (2014). Self-Antigen Presentation by Dendritic Cells in Autoimmunity. *Frontiers in immunology*, 5(February), 55. doi:10.3389/fimmu.2014.00055
- Horikawa, M. M. (2011). Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania* : estratégias para uma infecção bem sucedida successful infection, c, 32–37.
- Hotez, P. J., Remme, J. H. F., Buss, P., Alleyne, G., Morel, C., Breman, J. G. (2004). Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(6), 871–8. doi:10.1086/382077
- Isnard, A., Shio, M. T., & Olivier, M. (2012). Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2(May), 72. doi:10.3389/fcimb.2012.00072
- Jakobsen, M. a, Møller, B. K., Lillevang, S. T. (2004). Serum concentration of the growth medium markedly affects monocyte-derived dendritic cells' phenotype, cytokine production profile and capacities to stimulate in MLR. *Scandinavian journal of immunology*, 60(6), 584–91. doi:10.1111/j.0300-9475.2004.01515.x
- Jones, S. a. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(6), 3463–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148087>
- Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis : complexity at the host – pathogen interface. *Nature Publishing Group*, 9(8), 604–615. doi:10.1038/nrmicro2608
- Khouri, R., Bafica, A., Silva, M. D. P. P., Noronha, A., Kolb, J.-P., Wietzerbin, J., Van Weyenbergh, J. (2009). IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(4), 2525–31. doi:10.4049/jimmunol.0802860
- Konecny, P., Stagg, a J., Jebbari, H., English, N., Davidson, R. N., Knight, S. C. (1999). Murine dendritic cells internalize *Leishmania* major promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation in vitro. *European journal of immunology*, 29(6), 1803–11. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199906)29:06<1803::AID-IMMU1803>3.0.CO;2-F
- Lancellotti, M., Brocchi, M., & Dias, W. (2006). Bacteria-induced apoptosis : an approach to bacterial pathogenesis. *Journal of Morphological Science*, 23(1), 75–86.

- Lech, M., Gröbmayer, R., Weidenbusch, M., & Anders, H.-J. (2012). Tissues use resident dendritic cells and macrophages to maintain homeostasis and to regain homeostasis upon tissue injury: the immunoregulatory role of changing tissue environments. *Mediators of inflammation*. doi:10.1155/2012/951390
- Li, Y., Liu, M., & Yang, S.-T. (2014). Dendritic cells derived from pluripotent stem cells: Potential of large scale production. *World journal of stem cells*, 6(1), 1–10. doi:10.4252/wjsc.v6.i1.1
- Liese, J., Schleicher, U., Bogdan, C. (2007). TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. *European journal of immunology*, 37(12), 3424–34. doi:10.1002/eji.200737182
- Liese, J., Schleicher, U., Bogdan, C. (2008). The innate immune response against Leishmania parasites. *Immunobiology*, 213(3-4), 377–87. doi:10.1016/j.imbio.2007.12.005
- Lima, L. G., Chammas, R., Monteiro, R. Q., Moreira, M. E. C., Barcinski, M. A. (2009). Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer letters*, 283(2), 168–75. doi:10.1016/j.canlet.2009.03.041
- Lima-Junior, D. S., Costa, D. L., Carregaro, V., Cunha, L. D., Silva, A. L. N., Mineo, T. W. P., Zamboni, D. S. (2013). Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. *Nature medicine*, 19(7), 909–15. doi:10.1038/nm.3221
- Lin, W.-C., Tsai, H.-F., Liao, H.-J., Tang, C.-H., Wu, Y.-Y., Hsu, P.-I., Hsu, P.-N. (2014). Helicobacter pylori sensitizes TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells through regulation of FLIP. *Cell death & disease*, 5, e1109. doi:10.1038/cddis.2014.81
- Lindoso, J. A. L., & Lindoso, A. A. B. P. (2009). Neglected tropical diseases in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 51(5), 247–253. doi:10.1590/S0036-46652009000500003
- Liu, D., & Uzonna, J. E. (2012). The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2(June), 83. doi:10.3389/fcimb.2012.00083
- Maffia, P. C., Zittermann, S. E., Scimone, M. L., Tateosian, N., Amiano, N., Guerrieri, D., Chuluyan, H. E. (2007). Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor-beta1-secreting cells and reduces allostimulatory ability. *The American journal of pathology*, 171(3), 928–37. doi:10.2353/ajpath.2007.061043
- Maretti-Mira, A. C., Bittner, J., Oliveira-Neto, M. P., Liu, M., Kang, D., Li, H., Craft, N. (2012). Transcriptome patterns from primary cutaneous Leishmania braziliensis infections associate with eventual development of mucosal disease in humans. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(9), e1816. doi:10.1371/journal.pntd.0001816
- Mariño. Guillermo, Niso-santano. Mireia, Baehrecke. Eric H, K. G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis Guillermo. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 81–94. doi:10.1038/nrm3735.Self-consumption
- Markikou-Ouni, W., Ben Achour-Chenik, Y., Meddeb-Garnaoui, a. (2012). Effects of Leishmania major clones showing different levels of virulence on infectivity, differentiation and maturation of human dendritic cells. *Clinical and experimental immunology*, 169(3), 273–80. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04611.x

- Marovich, M. A., McDowell, M. A., Thomas, E. K., Nutman, T. B. (2000). IL-12p70 production by Leishmania major-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(11), 5858–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10820265>
- Martins, A. L. G. P., Barreto, J. A., Lauris, J. R. P., Martins, A. C. G. P. (2012). American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. *Anais brasileiros de dermatologia*, 89(1), 52–8. doi:10.1590/abd1806-4841.20142226
- Menezes, J. P. B., Almeida, T. F., Petersen, a L. O. a, Guedes, C. E. S., Mota, M. S. V, Lima, J. G. B., Veras, P. S. T. (2013). Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with Leishmania amazonensis or Leishmania major. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 15(8-9), 579–91. doi:10.1016/j.micinf.2013.04.005
- Merad, M., Ginhoux, F., & Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature reviews. Immunology*, 8(12), 935–47. doi:10.1038/nri2455
- Meredith, M. M., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Kamphorst, A. O., Schreiber, H. A, Guermonprez, P., Nussenzweig, M. C. (2012). Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *The Journal of experimental medicine*, 209(6), 1153–65. doi:10.1084/jem.20112675
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., Deplazes, P. (2005). Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays , an Immunofluorescent-Antibody Test , and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Leishmania Infections in Dogs Evaluation. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5515–5519. doi:10.1128/JCM.43.11.5515
- Ministério da Saúde. (2007). *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília, DF.
- Mishra, J., Saxena, A., Singh, S. (2007). Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Current medicinal chemistry*, 14(10), 1153–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456028>
- Moradin, N., & Descoteaux, A. (2012). Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2(September), 121. doi:10.3389/fcimb.2012.00121
- Moravej, A., Rasouli, M., Kalani, M., Asaei, S., Kiany, S., Najafipour, S., Abdollahi, A. (2012). IL-1 β (-511T/C) gene polymorphism not IL-1 β (+3953T/C) and LT- α (+252A/G) gene variants confers susceptibility to visceral leishmaniasis. *Molecular biology reports*, 39(6), 6907–14. doi:10.1007/s11033-012-1517-z
- Moura, T. R. De, Novais, F. O., Oliveira, F., Clarêncio, J., Noronha, A., Barral, A., Clare, J. (2005). Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis. *Infection and immunity*, 73(9), 5827–5834. doi:10.1128/IAI.73.9.5827
- Mueller, O., & Schroeder, A. (2004). RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control Application. *Agilent Technologies*, (5989-1165EN).

- Mukbel, R. M., Patten, C., Gibson, K., Ghosh, M., Petersen, C., & Jones, D. E. (2007). Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 76(4), 669–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426168>
- Murphy, J. E., Robert, C., Kupper, T. S. (2000). Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. *The Journal of investigative dermatology*, 114(3), 602–8. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00917.x
- Murray, J. C., & Shuptrine, C. W. (2013). Antibody-based immunotherapy of cancer: New insights, new targets. *Cell*, 148(6), 1081–1084. doi:10.1016/j.cell.2012.02.034.Antibody-based
- Muskus, C. E., Marín, M., Villa, M. M. (2002). Metaciclologénesis : un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*, 22, 167–177.
- Myler, P. J., Beverley, M., Cruz, A. K., Dobson, D. E., Mcdonagh, P. D. (2001). The *Leishmania* genome project : new insights into gene organization and function. *Medical Microbiology and Immunology*, 190, 12–15. doi:10.1007/s004300100070
- Nash, P. B., Purner, M. B., Leon, R. P., Clarke, P., Duke, R. C., Curiel, T. J. (1998). *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(4), 1824–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9469443>
- Nguyen-Pham, T.-N., Lee, Y.-K., Kim, H.-J., & Lee, J.-J. (2012). Immunotherapy using dendritic cells against multiple myeloma: how to improve? *Clinical & developmental immunology*, 2012, 397648. doi:10.1155/2012/397648
- Nogueira, A. C., Monteiro, T., Escobar V, J. P. (2013). Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de leishmaniasis. Retrieved from <http://www.idsn.gov.co/images/documentos/laboratorio/03vigientleshma.pdf>
- Nogueira, M. F., Sotto, M. N., Cucé, L. C. (2008). American tegumentary leishmaniasis: Langerhans cells in Montenegro skin test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50(5), 283–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949347>
- Novais, F. O., Santiago, R. C., Báfica, A., Khouri, R., Afonso, L., Borges, V. M., de Oliveira, C. I. (2009). Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(12), 8088–98. doi:10.4049/jimmunol.0803720
- Obata, F., Hoshino, a, Toyama, a. (2006). Hydrogen peroxide increases interleukin-12 p40/p70 molecular ratio and induces Th2-predominant responses in mice. *Scandinavian journal of immunology*, 63(2), 125–30. doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01718.x
- Okwor, I., & Uzonna, J. (2009). Vaccines and vaccination strategies against human cutaneous leishmaniasis. *Human vaccines*, 5(5), 291–301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19221514>
- Oliveira, F., Báfica, A., Rosato, A. B., Favali, C. B. F., Costa, J. M., Cafe, V., Barral, A. (2011). Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85(1), 70–3. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0680

- Oliveira, F., Jochim, R. C., Valenzuela, J. G., Kamhawi, S. (2009). Sand flies, Leishmania, and transcriptome-borne solutions. *Parasitology international*, 58(1), 1–5. doi:10.1016/j.parint.2008.07.004
- Oliveira, W. N., Ribeiro, L. E., Schrieffer, A., Machado, P., Carvalho, E. M., Bacellar, O. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*, 66(2), 127–32. doi:10.1016/j.cyto.2013.12.016
- Olivo-Díaz, A., Debaz, H., Alaez, C., Islas, V. J., Pérez-Pérez, H., Hobart, O., Gorodezky, C. (2004). Role of HLA class II alleles in susceptibility to and protection from localized cutaneous leishmaniasis. *Human immunology*, 65(3), 255–61. doi:10.1016/j.humimm.2003.12.008
- OPS. (2013). *Leishmaniasis: Informe Epidemiológico de las Américas*.
- Otto, T. D., Wilinski, D., Assefa, S., Keane, T. M., Sarry, L. R., Böhme, U., Llinás, M. (2010). New insights into the blood-stage transcriptome of Plasmodium falciparum using RNA-Seq. *Molecular microbiology*, 76(1), 12–24. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.07026.x
- Peng, L., Jiang, H., & Bradley, C. (2001). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on lymphoma cells undergoing apoptosis. *Hua xi yi ke da xue xue bao = Journal of West China University of Medical Sciences Huaxi yike daxue xuebao / [bian ji zhe, Hua xi yi ke da xue xue bao bian wei hui]*, 32(4), 602–4, 620. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12528562>
- Persson, E. K., Scott, C. L., Mowat, A. M., Agace, W. W. (2013). Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: ontogeny and function. *European journal of immunology*, 43(12), 3098–107. doi:10.1002/eji.201343740
- Plazolles, N., Humbert, J.-M., Vachot, L., Verrier, B., Hocke, C., Halary, F. (2011). Pivotal advance: The promotion of soluble DC-SIGN release by inflammatory signals and its enhancement of cytomegalovirus-mediated cis-infection of myeloid dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*, 89(3), 329–42. doi:10.1189/jlb.0710386
- Poon, I. K. H., Hulett, M. D., Parish, C. R. (2010). Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell death and differentiation*, 17(3), 381–97. doi:10.1038/cdd.2009.195
- Raymond, F., Boisvert, S., Roy, G., Ritt, J.-F., Légaré, D., Isnard, A., Corbeil, J. (2012). Genome sequencing of the lizard parasite Leishmania tarentolae reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic acids research*, 40(3), 1131–47. doi:10.1093/nar/gkr834
- Ribas-Silva, R. C., Ribas, A. D., Dos Santos, M. C. G., da Silva, W. V., Lonardoní, M. V. C., Borelli, S. D., Silveira, T. G. V. (2013). Association between HLA genes and American cutaneous leishmaniasis in endemic regions of Southern Brazil. *BMC infectious diseases*, 13, 198. doi:10.1186/1471-2334-13-198
- Ribeiro-Gomes, F. L., Peters, N. C., Debrabant, A., Sacks, D. L. (2012). Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS pathogens*, 8(2), e1002536. doi:10.1371/journal.ppat.1002536
- Riether, C., Schürch, C., Ochsenbein, A. F. (2013). From “magic bullets” to specific cancer immunotherapy. *Swiss medical weekly*, 143(January), w13734. doi:10.4414/smww.2013.13734

- Rocha, F. J. S., Schleicher, U., Mattner, J., Alber, G., Bogdan, C. (2007). Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in mice. *Infection and immunity*, 75(8), 3823–32. doi:10.1128/IAI.01335-06
- Rodriguez-Pinto, D., Navas, A., Blanco, V. M., Ramírez, Lady, Garcerant, D., Cruz, A., Saravia, N. G. (2012). Regulatory T cells in the pathogenesis and healing of chronic human dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) species. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(4), e1627. doi:10.1371/journal.pntd.0001627
- Rugeles López, M. T, Patino Grajales, P. J, Montoya Guarin, C. J. (2009). *Inmunologia Una Ciencia Activa* (Segunda., p. 350). Editorial Universidad de Antioquia.
- Ruhland, A., Leal, N., & Kima, P. E. (2007). *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cellular microbiology*, 9(1), 84–96. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00769.x
- Sacks, D., & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews. Immunology*, 2(11), 845–58. doi:10.1038/nri933
- Sallusto, B. F., & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor alpha. *The Journal of Experimental Medicine*, 179(April).
- Sanchez, a, Espinosa, P., Esparza, M. a, Colon, M., Bernal, G., Mancilla, R. (2009). Mycobacterium tuberculosis 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. *Scandinavian journal of immunology*, 69(1), 20–8. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02193.x
- Sankar, O. H. and G. (2013). NF-κB: Roles and Regulation In Different CD4+ T cell subsets. *Immunological reviews*, 252(1), 41–51. doi:10.1111/imr.12033.NF-
- Santos, C. D. S., Boaventura, V., Ribeiro Cardoso, C., Tavares, N., Lordelo, M. J., Noronha, A., Brodskyn, C. I. (2013). CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFNγ(+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *The Journal of investigative dermatology*, 133(6), 1533–40. doi:10.1038/jid.2013.4
- Savill, J., & Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407(6805), 784–8. doi:10.1038/35037722
- Seabra, S. H., de Souza, W., Damatta, R. a. (2004). *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(2), 744–52. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.114
- Selvapandiyam, A., Dey, R., Gannavaram, S., Lakhali-Naouar, I., Duncan, R., Salotra, P., Nakhasi, H. L. (2012). Immunity to visceral leishmaniasis using genetically defined live-attenuated parasites. *Journal of tropical medicine*, 2012, 631460. doi:10.1155/2012/631460
- Serbina, N. V, Salazar-mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A., Pamer, E. G. (2003). TNF / iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection University of Texas at Austin. *Immunity*, 19, 59–70.
- SH Hejazi, SG Hoseini, SH Javanmard, SH Zarkesh, A. K. (2012). Interleukin-10 and Transforming Growth Factor-β in Early and Late Lesions of Patients with *Leishmania major* Induced Cutaneous Leishmaniasis. *Iranian J Parasitol*, 7(3), 16–23.

- Shortman, K., & Liu, Y.-J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews. Immunology*, 2(3), 151–61. doi:10.1038/nri746
- Shortman, K., & Naik, S. H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature reviews. Immunology*, 7(1), 19–30. doi:10.1038/nri1996
- Skalova, K., Mollova, K., Michalek, J. (2010). Human myeloid dendritic cells for cancer therapy: Does maturation matter? *Vaccine*, 28(32), 5153–5160. doi:10.1016/j.vaccine.2010.05.042
- Smy, J. (2002). Functional significance of the perforin/ granzyme cell death pathway. *Nature reviews. Immunology*, 2, 735–747.
- Soares, M. M., King, S. W., Thorpe, P. E. (2008). Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. *Nature medicine*, 14(12), 1357–62. doi:10.1038/nm.1885
- Sozzani, S. (2005). Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(6), 581–92. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.04.008
- Spanbroek, R., Hildner, M., Köhler, a, Müller, a, Zintl, F., Kühn, H., Habenicht, a J. (2001). IL-4 determines eicosanoid formation in dendritic cells by down-regulation of 5-lipoxygenase and up-regulation of 15-lipoxygenase 1 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5152–7. doi:10.1073/pnas.091076998
- Srividya, G., Kulshrestha, A., Singh, R., Salotra, P. (2012). Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitology research*, 110(3), 1065–78. doi:10.1007/s00436-011-2680-1
- Stanley, M. a. (2002). Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clinical and experimental dermatology*, 27(7), 571–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12464152>
- Stebut, B. E. Von, Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D. L., Udey, M. C. (1998). Uptake of *Leishmania major* Amastigotes Results in Skin – derived Dendritic Cells : Implications for the Initiation of Anti- *Leishmania* Immunity. *The Journal of experimental medicine*, 188(8).
- Steinman, R., & Cohn, Z. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral Morphology of Mouse Spleen Adherent Cells . -. *The Journal of Experimental Medicine*, 137, 1142–1162.
- Stockdale, L., & Newton, R. (2013). A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(6), e2278. doi:10.1371/journal.pntd.0002278
- Subauste, C. S., de Waal Malefyt, R., Fuh, F. (1998). Role of CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) in the immune response to an intracellular pathogen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(4), 1831–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9469444>
- Suzanne, M., & Steller, H. (2013). Shaping organisms with apoptosis. *Cell death and differentiation*, 20(5), 669–75. doi:10.1038/cdd.2013.11
- Svajger, U., Obermajer, N., Anderluh, M., Kos, J., Jeras, M. (2011). DC-SIGN ligation greatly affects dendritic cell differentiation from monocytes compromising their normal function. *Journal of leukocyte biology*, 89(6), 893–905. doi:10.1189/jlb.0810463

- Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J.-L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, a., Neyrolles, O. (2002). DC-SIGN Is the Major Mycobacterium tuberculosis Receptor on Human Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 197(1), 121–127. doi:10.1084/jem.20021468
- Tasew, G., Nylén, S., Lieke, T., Lemu, B., Meless, H., Ruffin, N., Eidsmo, L. (2010). Systemic FasL and TRAIL neutralisation reduce leishmaniasis induced skin ulceration. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(10), e844. doi:10.1371/journal.pntd.0000844
- Tuon, F. F., Fernandes, E. R., Duarte, M. I. S., Amato, V. S. (2012). Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary american leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 54(3), 159–164. doi:10.1590/S0036-46652012000300008
- Tuon, F. F., Gomes-Silva, A., Da-Cruz, A. M., Duarte, M. I. S., Neto, V. A., Amato, V. S. (2008). Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 128(3), 442–6. doi:10.1016/j.clim.2008.05.007
- Valdés-Reyes, L., Argueta, J., Morán, J., Salaiza, N., Hernández, J., Berzunza, M., Gutiérrez-Kobeh, L. (2009). Leishmania mexicana: inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Experimental parasitology*, 121(3), 199–207. doi:10.1016/j.exppara.2008.10.020
- Van Kooyk, Y., & Geijtenbeek, T. B. H. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature reviews. Immunology*, 3(9), 697–709. doi:10.1038/nri1182
- Vargas-Inchaustegui, D. a, Tai, W., Xin, L., Hogg, A. E., Corry, D. B., Soong, L. (2009). Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during Leishmania braziliensis infection in mice. *Infection and immunity*, 77(7), 2948–56. doi:10.1128/IAI.00154-09
- Vieira, É. L. M., Keesen, T. S. L., Machado, P. R., Guimarães, L. H., Carvalho, E. M., Dutra, W. O., Gollob, K. J. (2013). Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite immunology*, 35(2), 65–72. doi:10.1111/pim.12012
- Vincent, M. S., Gumperz, J. E., Brenner, M. B. (2003). Understanding the function of CD1-restricted T cells. *Nature immunology*, 4(6), 517–23. doi:10.1038/ni0603-517
- Voronov, E., Dotan, S., Gayvoronsky, L., White, R. M., Cohen, I., Krelin, Y., Apte, R. N. (2010). IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *International immunology*, 22(4), 245–57. doi:10.1093/intimm/dxq006
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, 10(1), 57–63. doi:10.1038/nrg2484
- Weaver, B. a a, & Cleveland, D. W. (2005). Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer cell*, 8(1), 7–12. doi:10.1016/j.ccr.2005.06.011
- WHO. (2006). Neglected Tropical Diseases.
- WHO. (2009). Neglected tropical diseases.
- WHO. (2012). Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical.
- Xin, L., Li, Y., & Soong, L. (2007). 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. *Infection and immunity*, 75(10), 5018–26.
doi:10.1128/IAI.00499-07

Yoshimura, A., Wakabayashi, Y., Mori, T. (2010). Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *Journal of biochemistry*, 147(6), 781–92.
doi:10.1093/jb/mvq043

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: Caracterização celular e imunológica da interação células dendríticas- *Leishmania braziliensis*.

1. O motivo que nos leva a estudar a Leishmaniose é o grande número de pessoas doentes principalmente nos países pobres como o Brasil. Essa doença está atingindo ainda mais a região centro-oeste. O tratamento não é simples e ainda não existe uma boa vacina disponível. A pesquisa se justifica pela necessidade de se buscar uma forma de entender como o parasita se comporta quando está infectando o ser humano.
2. O objetivo desse projeto é estudar a infecção de uma espécie de *Leishmania*, causador da Leishmaniose, e verificar o que acontece num tipo de célula importante para que a pessoa doente consiga eliminar o parasita
3. Para fazer esse tipo de estudo podemos trabalhar com as células do sangue de pessoas saudáveis como você
4. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento.
5. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição na qual está sendo atendido.
6. Esta pesquisa não causará risco potencial e/ ou dano à sua saúde
7. Existe um desconforto e risco mínimo na coleta de sangue periférico porém o benefício relacionado com sua participação é a geração de informações importantes para o desenvolvimento da vacina contra a leishmaniose
8. O sangue será coletado uma única vez por punção venosa
9. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.
10. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação, pois serão tratados apenas os resultados dos testes.
11. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.
12. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Laboratório Interação Patógeno-Hospedeiro da Universidade de Brasília Campus Darcy Ribeiro e outra será , fornecida a você.
13. A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional

DADOS DO PESQUISADOR PRINCIPAL (ORIENTADOR)

JAIME MARTINS DE SANTANA

Nome

Assinatura

**Endereço completo: LABORATÓRIO INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA CAMPUS DARCY RIBEIRO ASA NORTE BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL CEP 70910-900**

Endereço eletrônico: jsantana@unb.br

Telefone: 31073053

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Faculdade de Medicina que funciona no Campus Universitário Darcy Ribeiro, localizado na ASA NORTE BRASÍLIA DISTRITO FEDERAL CEP 70910-900 (61) 3307-2520 e 3273-4069

Brasília, _____ de _____ de 20__

Sujeito da pesquisa *