



Leonardo Gomes Vaz

**O papel do receptor 1 do TNF na infecção por
Leishmania amazonensis: promoção e regulação da inflamação**

Belo Horizonte — MG

2016

Leonardo Gomes Vaz

**O papel do receptor 1 do TNF na infecção por
Leishmania amazonensis: promoção e regulação da inflamação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Prof^ª. Dr^ª. Leda Quercia Vieira (Orientadora)

Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Matheus Batista Heitor Carneiro (Co-Orientador)

Snyder Institute for Chronic Diseases,
Department of Microbiology, Immunology and Infectious Diseases
University of Calgary

Belo Horizonte —MG

2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

851

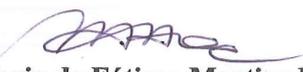


Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

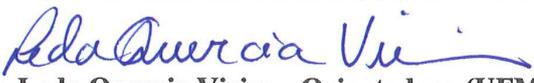


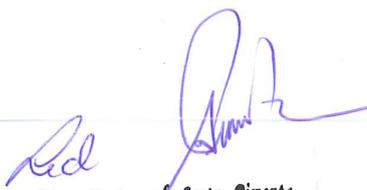
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LEONARDO GOMES VAZ. Aos dois dias do mês de dezembro de 2016 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "" O papel do receptor 1 do TNF na infecção por *Leishmania amazonensis*: promoção e regulação da inflamação"", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof^a. Leda Quercia Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Maria de Fátima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Matheus Batista Heitor Carneiro - Co-Orientador (University of Calgary), aprovado; Dr. Leda Quercia Vieira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 02 de dezembro de 2016.


Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)


Dra. Maria de Fátima Martins Horta (UFMG)


Dr. Matheus Batista Heitor Carneiro - Co-Orientador (University of Calgary)


Dr. Leda Quercia Vieira - Orientadora (UFMG)


Prof. Adriano Monteiro de Castro Pimenta
Sub-Coordenador do Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

Dedicado aos meus familiares.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, fonte de amor inesgotável cuja inteligência nos proporciona grandes mistérios que tentamos desvendar ininterruptamente. Aos meus pais, Rosângela e Armando e também à Soraya. Aos meus irmãos Thiago, Guilherme, Amanda e Jonathan, bem como os cunhados Dayane, Marquinhos e Paula por me incentivarem a progredir sempre. Aos meus sobrinhos queridos João Victor, Iago, Rafaella e Vítor que tanto me ensinam. Em cada etapa já superada desta existência tem uma grande parte de vocês.

À minha esposa Michelle que todos os dias me impele a melhorar, na área profissional, mas principalmente no aspecto humano. Aos meus sogros, Joana e Carlos pelo apoio nas horas mais difíceis e também pelos momentos felizes que me proporcionaram. Ao meu cunhado Léo pela amizade, minha cunhada Camilla pelas boas conversas e incentivo incondicional. A todos os parentes que *vieram* com o casamento, cada um é uma dádiva em minha vida.

Aos meus avós José (*in memoriam*), Yvone, Waldemar e Aurora pelo exemplo de caráter reto, honesto, o qual sou imensamente grato. Obrigado pelos bons conselhos, puxões de orelha e, principalmente, pelo carinho.

À Professora Leda Quercia Vieira pela orientação, pela oportunidade no seu laboratório e a boa convivência. Com ela aprendi a trabalhar no ramo da pesquisa científica com ética, moral, humildade e muita dedicação.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Bioquímica e Imunologia pela contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao longo dos dois anos do meu mestrado.

Aos membros que compõem essa banca, pela oportunidade de discussão deste trabalho e pela possibilidade de enriquecimento do mesmo.

Ao Doutor Matheus Batista Heitor Carneiro que além de co-orientador é um grande amigo. Graças a ele realizo esta dissertação, cuja participação abrange todo o projeto.

Ao Pierre pela ajuda nestes tempos tão corridos do mestrado. E que espero, fique ao meu lado, para nos ajudarmos mutuamente em nossa formação.

Aos demais membros e amigos do LAGI, Grazielle, Diego, Caio e Paula, Ana Clara, Mateus, Peter, Débora, Ana Elisa, João, Aline e Thiago, obrigado pela ajuda, disponibilidade e pelos bons momentos de convivência. À minha amiga Liliane por sua fundamental contribuição durante os experimentos de citometria.

"Uma lei, já o dissemos, rege a evolução do pensamento, como evolução física dos seres e dos mundos; a compreensão do universo se desenvolve com os progressos do espírito humano.

Essa compreensão geral do universo e da vida foi expressa de mil maneiras, sob mil formas diversas no passado. Ela o é hoje em outros termos mais latos, e o será sempre com mais amplitude, à medida que a humanidade for subindo os degraus de sua ascensão.

A Ciência vê alargar-se, sem cessar, seu campo de exploração. Todos os dias, com auxílio de seus poderosos instrumentos de observação e análise, descobre novos aspectos da matéria, da força e da vida; mas o que esses instrumentos verificam já há muito tempo havia que o espírito o discernira, porque o voo do pensamento precede e excede os meios de ação da ciência positiva. Os instrumentos nada seriam sem a inteligência, sem vontade que os dirige.

A Ciência é incerta e mutável, renova-se sem cessar. Os seus métodos, teorias e cálculos, com grande custo arquitetados, desabam ante uma observação mais atenta ou uma indução mais profunda, para darem lugar a novas teorias, que não terão maior estabilidade. A teoria do átomo indivisível, por exemplo, que, há dois mil anos, servia de base a Física e a Química, é atualmente qualificada como hipótese e puro romance pelos nossos químicos mais eminentes.

Quantas decepções análogas não têm demonstrado no passado a fraqueza do espírito científico, que só chegará à realidade quando se elevar acima da miragem dos fatos materiais para estudar as causas e as leis!

Dessa maneira foi que a Ciência pôde determinar os princípios imutáveis da Lógica e das matemáticas. Não sucede o mesmo nos outros campos de investigação. A maior parte das vezes, o sábio para eles leva os seus preconceitos, tendências, práticas rotineiras, todos os elementos de uma individualidade acanhada, como se pode verificar no domínio dos estudos psíquicos, principalmente na França, onde até agora poucos sábios houve bastante corajosos e suficientemente ilustrados para seguirem a estrada já amplamente traçada pelas mais belas inteligências de outras nações.

Não obstante, o espírito humano avança passo a passo no conhecimento do ser e do universo; o nosso saber, quanto à força e à matéria modifica-se dia a dia; a individualidade humana revela-se com aspectos inesperados. À vista de tantos fenômenos verificados experimentalmente, em presença dos testemunhos que de toda parte se acumulam, nenhum espírito perspicaz pode continuar a negar a realidade da outra vida, a esquivar-se às consequências e às responsabilidades que ela acarreta.

O que dizemos da Ciência poder-se-ia, igualmente, dizer das filosofias e das religiões que se têm sucedido através dos séculos. Constituem elas outros tantos estágios ou trechos percorridos pela humanidade, ainda criança, elevando a planos espirituais cada vez mais vastos e que se ligam entre si. No seu encadeamento, essas crenças diversas nos aparecem como desenvolvimento gradual do ideal divino, que o pensamento reflete, com tanto mais brilho e pureza quanto mais delicado e perfeito se vai tornando.

É essa razão porque as crenças e os conhecimentos de um tempo ou de um meio parecem, para o tempo ou meio onde reinam, a representação da verdade tal qual a podem alcançar e compreender os homens dessa época, até que o desenvolvimento das suas faculdades e consciências os torne capazes de perceber uma forma mais elevada, uma radiação mais intensa dessa verdade."¹

¹DENIS, Léon. *O problema do ser, do destino e da dor: os testemunhos, os fatos, as leis: estudos experimentais sobre os aspectos ignorados do ser humano; as personalidades duplas; a consciência profunda; a renovação da memória; as vidas anteriores e sucessivas etc.* 32. ed. 4. imp. — Brasília: FEB, 2014, pág. 19-20.

RESUMO

A dicotomia T_H1/T_H2 que tanto elucida os modelos de resistência e suscetibilidade nas infecções por *Leishmania major* não é aplicável à infecção por *L. amazonensis*. Nesta infecção observam-se respostas imunológicas mistas, sem efetivamente polarizar para nenhum perfil conhecido, diferenciando os paradigmas envolvidos na suscetibilidade e na resistência a parasitos. O TNF é uma citocina pleiotrópica, atua na mediação da inflamação, desenvolvimento e homeostasia do tecido linfóide, destruição da matriz extracelular, e tantas outras. A atuação do TNF se dá via dois receptores, TNFR1 e TNFR2, ambos desencadeiam a resposta inflamatória, mas exclusivamente através do TNFR1 o TNF auxilia na regulação e supressão desta resposta através da apoptose via caspase 8/3. Assim, nosso trabalho visou a identificação do papel do TNFR1 no curso de infecção e desenvolvimento das lesões cutâneas em camundongos infectados por *L. amazonensis*. Nossos dados revelaram a importância do TNFR1 no controle da lesão, embora não no controle parasitário. Este controle se mostrou mais eficaz no modelo de infecção subcutâneo, onde além de promover o controle da lesão, foi importante para manutenção tecidual do órgão infectado, possivelmente pela contínua produção de IL-10. Ainda, na fase aguda da infecção, atua no recrutamento de células mielóides e linfócitos para o sítio de infecção e, na fase crônica, regula o recrutamento celular, apenas na via subcutânea. A apoptose via TNFR1 foi inibida durante a infecção intradérmica por *L. amazonensis*, sendo utilizada uma via alternativa, porém que, segundo nossos dados, parece ser inibida pela sinalização pró-inflamatória do TNFR1, uma vez que a apoptose foi menor nos camundongos selvagens. Em conclusão, nossos dados sugerem o envolvimento do TNFR1 na resistência à infecção por *L. amazonensis*, pois foi observado atuando tanto na promoção da inflamação como na sua regulação. Esta regulação é crucial para a manutenção do órgão acometido, parece estar relacionada com a produção ininterrupta de IL-10, observada principalmente na infecção subcutânea. As diferentes vias de infecção evoluem para diferentes tipos de resposta, parece que na via intradérmica a falta de controle das células necróticas está associada à perda massiva de tecido, enquanto que na via subcutânea o controle do recrutamento celular está envolvido com a manutenção do órgão infectado.

Palavras-chaves: leishmaniose; TNF; TNFR1; *Leishmania amazonensis*

ABSTRACT

The Th1/Th2 paradigm that explains most models of infection with *Leishmania major* does not apply to the experimental models of infection with *L. amazonensis*. In this latter model, mixed immunological responses rather than polarization are observed, in contrast with the Th1/Th2 paradigm of resistance and susceptibility. TNF is a pleiotropic cytokine that mediates inflammation, lymphoid tissue development and homeostasis, extracellular matrix destruction, among other functions. TNF binds to two receptors, TNFR1 and TNFR2. Both receptors trigger inflammatory responses but only by binding to TNFR1 TNF mediates regulation or suppression of inflammation, through induction of apoptosis via caspase 8/3. Hence, our work aimed at the identification of the role of TNFR1 the mouse model of infection with *L. amazonensis*. Our data reveal the importance of TNFR1 in the control of lesion development, but not on the control of parasite replication. This control was more efficient in the subcutaneous model of infection where, in addition to promoting lesion control, TNFR1 was important in the maintenance of tissue homeostasis, probably due to IL-10 production. Furthermore, in the acute phase of the subcutaneous infection, TNFR1 mediated recruitment of myeloid cells and lymphocytes to the site of infection and, in the chronic phase, regulated cell recruitment. TNFR1-mediated apoptosis was inhibited during intradermic infection by *L. amazonensis*, and an alternative pathway was in play. However, our data indicate that apoptosis seems to be inhibited by the pro-inflammatory signaling through TNFR1, since apoptosis was lesser in wild-type mice. In conclusion, our data suggest the involvement of TNFR1 in resistance to *L. amazonensis*. This conclusion is supported by the fact that TNFR1 acts both in the promotion and in the regulation of inflammation. Regulation is crucial for preservation of the infected tissue, and seems to be related to continuous production of IL-10, observed mainly in the subcutaneous infection. The two different routes of infection evolve into different types of responses: the intradermic route the lack of control of necrosis is associated to massive tissue loss, while the subcutaneous route control of cell recruitment preserves the affected tissue.

Key words: leishmaniasis, TNF, TNFR1, *Leishmania amazonensis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento das lesões cutâneas em camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	30
Figura 2. Avaliação da carga parasitária e atividade de arginase I nas lesões de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	31
Figura 3. Histologia e imuno-histoquímica da pele de orelha de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	33
Figura 4. Análise histopatológica das lesões cutâneas de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados nas orelhas com <i>L. amazonensis</i>	34
Figura 5. Avaliação das concentrações de IFN- γ , TNF, IL12p70 e IL-1 β , IL-10 e IL-6 nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	36
Figura 6. Avaliação das concentrações de IFN- γ , TNF, IL-12p70 e IL-10 por células dos linfonodos drenantes de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados via intradérmica com <i>L. amazonensis</i>	38
Figura 7. Avaliação das concentrações de IFN- γ e IL-10 por células dos linfonodos drenantes de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados via subcutânea com <i>L. amazonensis</i>	39
Figura 8. Dot plots com as estratégias de gates das células CD11b+ das orelhas dos camundongos.	41
Figura 9. Avaliação do perfil de células da imunidade inata nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	42
Figura 10. Avaliação do perfil da subpopulação de monócitos Ly6C+ nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	44
Figura 11. Avaliação do perfil da subpopulação de células Ly6C-/low nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	46
Figura 12. Avaliação da sinalização de morte celular entre as células CD11b+ nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	50
Figura 13. Avaliação da sinalização de morte celular em macrófagos das orelhas de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	54
Figura 14. Avaliação da sinalização de morte celular em neutrófilos das orelhas de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	55
Figura 15. Avaliação da população linfocítica das orelhas de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	59
Figura 16. Avaliação da população do perfil celular na lesão de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i> na pata.	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS

- ASK1:** Apoptosis signal-regulating kinase (Sinal-regulação da apoptose quinase 1)
- AMP:** Adenosine monophosphate (Adenosina monofosfato)
- APC:** Antigen-presenting cell (Células apresentadoras de antígeno)
- ATP:** Adenosine triphosphate (Adenosina trifosfato)
- CARD:** Caspase recruitment domain (Domínio de recrutamento de caspase)
- CAT:** Cationic amino acid transporter (Transportador catiônico de aminoácido)
- CCL:** CC chemokine ligands (Ligantes de receptores de quimiocinas CC)
- CCR:** CC chemokine receptors (Receptores de quimiocinas CC)
- cIAP:** cellular inhibitor of apoptosis (inibidor celular de apoptose)
- CD:** Cluster of differentiation (Grupamento de diferenciação)
- c-FLIP:** Cellular FLICE-like inhibitory protein (Proteína celular inibitória tipo FLICE)
- CL:** Cutaneous leishmaniasis (Leishmaniose cutânea)
- CRD1:** Cys-rich domain 1 (domínio rico em cisteína 1)
- CXCL:** Chemokine (CXC motif) ligand (Ligante de quimiocinas com motivo CXC)
- DC:** Dendritic cell (Células dendríticas)
- DCL:** Diffuse cutaneous leishmaniasis (Leishmaniose cutânea difusa)
- DD:** Death domain (Domínio de morte)
- DED:** Death effector domain (Domínio efetor de morte)
- ERK:** Extracellular signal-regulated protein kinases (Quinase associada à sinalização extracelular)
- FADD:** Fas-associated death domain (Domínio de morte associado FAS)
- FLICE:** FADD-like IL-1 β converting enzyme (Enzima conversora de IL-1 β tipo FADD)
- GM-CSF:** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos)
- IC:** Immune complex (Imunocomplexo)
- ICAM:** Intercellular Adhesion Molecule (Molécula de adesão intercelular)
- IFN:** Interferon
- Ig:** Imunoglobulina
- IKK:** I κ B kinase (I κ B kinase)
- I κ B α :** inhibitor of kappa B (Inibidor de κ B)

IRF: Interferon regulatory factor (Fator regulador de interferon)

iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase (Óxido nítrico sintase indutível)

JNK: c-Jun N-terminal kinases (Quinase c-Jun N-terminal)

LCL: Leishmaniose cutânea localizada

LT: Lymphotoxin (Linfotoxina)

LNd: Linfonodo drenante

LPL: Lipoprotein lipase (Lipoproteína lipase)

LPS: Lipopolysaccharide (Lipopolissacarídeo)

MAPK: Mitogen-activated protein kinase (Proteína quinase ativadora de mitógeno)

MCL: Mucocutaneous leishmaniasis (Leishmaniose mucocutânea)

MHC: Major histocompatibility complex (Complexo principal de histocompatibilidade)

NF- κ B: Nuclear factor kappa B (Fator nuclear kappa B)

NIK: NF- κ B-Inducing Kinase (Quinase indutora de NF- κ B)

NK: Natural killer cell (células natural killer)

NO: Nitric oxide (Óxido nítrico)

NTD: Neglected tropical diseases (Doenças tropicais negligenciadas)

PAMP: Pathogen associated molecular pattern (Padrões moleculares associados a patógenos)

PBK/Akt: Protein kinase B/serine-threonine kinase (Proteína quinase B/quinase serina-treonina)

PI3K: phosphoinositide 3-kinase (Fosfoinosítido 3-quinase)

PKDL: Post-kala-azar dermal leishmaniasis (Leishmaniose dérmica pós-calazar)

PLAD: Pre-ligand assembly domain (Domínio de montagem pré-ligante)

PRR: Pattern recognition receptors (Receptores de reconhecimento de padrões)

PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (fosfatase homóloga à tensina deletada no cromossomo 10)

PYD: Pyrin domain (Domínio de pirina)

RAG: Recombination-activating gene (Gene ativador de recombinação)

ROS: Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)

RIP: Receptor interacting protein

SOCS: Suppressor of cytokine signaling (Supressor da sinalização de citocinas)

STAT: Signal transducer and activator of transcription (Ativadores de transdução de sinais de transcrição)

sTNF: TNF solúvel

sTNFR: Receptor solúvel doTNF

TACE: TNF- α converting enzyme (Enzima conversora de TNF- α)

T_{FH}: T Follicular Helper (Células T auxiliares foliculares)

TGF- β : Transforming growth factor beta (Fator de transformação do crescimento beta)

T_H: T helper cells (células T auxiliares)

T_{H1}: Type 1 T helper cells (Células T auxiliares do tipo 1)

T_{H2}: Type 2 T helper cells (Células T auxiliares do tipo 2)

THD: TNF homology domain (Domínio de homologia do TNF)

TIM: TRAFF interacting motif (Motivo de interação com TRAF)

TLR: Toll like receptor (Receptor tipo *Toll*)

TNF: Tumor necrose factor (Fator de necrose tumoral)

TNFR1: Receptor tipo 1 do TNF

TNFR2: Receptor tipo 2 do TNF

TNFSF: Tumor necrose factor superfamily (Superfamília do tumor de necrose tumoral)

TRADD: TNF receptor-associated death domain (domínio de morte associado ao receptor de TNF)

TRAF: TNF receptor associated factor (Fator associado ao receptor de TNF)

Treg: regulatory T cells (Células T auxiliares regulatórias)

tmTNF: TNF transmembranar

WHO: World Health Organization (Organização mundial de saúde)

VL: Visceral leishmaniasis (Leishmaniose visceral)

LISTA DE SÍMBOLOS

#: número absoluto de células

$M\phi$: macrófagos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO-----	1
1.01 — Leishmanioses	1
1.02 — Imunologia das leishmanioses	4
1.02.1 — Resposta imunológica a <i>Leishmania major</i>	5
1.02.2 — Resposta imunológica a <i>Leishmania amazonensis</i>	10
1.03 — A superfamília do fator de necrose tumoral	13
1.03.1 — Fator de necrose tumoral	15
1.03.1 — O TNFR1 em modelos de leishmaniose	18
2. OBJETIVOS -----	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS -----	22
3.01 – Animais	22
3.02 – Parasitos	22
3.03 – Infecção dos camundongos por <i>L. amazonensis</i>	23
3.04 – Quantificação de parasitos	24
3.05 – Dosagem da atividade da enzima arginase I	24
3.06 – Análise histopatológica	25
3.07 – Análise de imuno-histoquímica.....	25
3.08 — Obtencção do índice apoptótico	26
3.09 – Extração de tecido para dosagem de citocinas na lesão	26
3.10 – Detecção de citocinas por ELISA	27
3.11 – Citometria de fluxo.....	27
3.12 – Análise estatística	28
4. RESULTADOS -----	29
4.01 — Curso da infecção de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	29
4.02 — Avaliação da carga parasitária e atividade de arginase I em camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	31
4.03 — Histologia e imuno-histoquímica das lesões nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados com <i>L. amazonensis</i>	32
4.04 — Avaliação das concentrações IFN- γ , TNF, IL-12p70, IL-1 β , IL-10 e IL-6 nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados com <i>L. amazonensis</i>	35
4.05 — Avaliação das concentrações IFN- γ , TNF, IL-12p70 e IL-10 nos linfonodos drenantes de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados com <i>L. amazonensis</i>	37

4.06 — Avaliação do perfil de células mielóides nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i>	40
4.07 — Análise da sinalização de morte celular entre as células mielóides na orelha de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados com <i>L. amazonensis</i>	48
4.08 — Análise da da população linfocítica na orelha de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados com <i>L. amazonensis</i>	58
4.09 — Análise do perfil celular na lesão de camundongos selvagens e TNFR1-/- infectados por <i>L. amazonensis</i> na pata.....	61
5. DISCUSSÃO -----	63
6. CONCLUSÃO-----	71
7. BIBLIOGRAFIA-----	72
ANEXOS -----	87
ANEXO A	87
ANEXO B	88
ANEXO C	89
ANEXO D.....	90
ANEXO E	91
ANEXO F	92
ANEXO G.....	93
ANEXO H.....	94
ANEXO I	95
ANEXO J.....	96
ANEXO K.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.01 — Leishmanioses

Leishmanioses são um complexo de doenças cujos agentes etiológicos, parasitos do gênero *Leishmania*, são transmitidos durante o repasto sanguíneo dos vetores — fêmeas do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (DESJEUX, 2004). Quatro formas clínicas distintas da doença já foram descritas: a leishmaniose visceral (VL); leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL); leishmaniose cutânea (CL); e leishmaniose mucocutânea (MCL). As leishmanioses são classificadas como antroponoses, quando exclusivas da espécie humana, ou zoonoses, quando naturalmente transmitidas entre humanos e animais vertebrados (WHO, 2016). Após o inóculo do parasito, os indivíduos podem permanecer assintomáticos por período indeterminado, sendo considerados naturalmente resistentes; ou manifestarem os sintomas da doença, variando com o grau de suscetibilidade inerente aos acometidos. Espécie do parasito, variação genética do hospedeiro, dose e local da infecção e a resposta imunológica apresentada são os fatores que contribuem para a resistência ou variados graus de suscetibilidade dos indivíduos, acarretando na grande gama de manifestações clínicas e diversidade de sintomas apresentados no decurso da leishmaniose (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Lutzomyia e *Phlebotomus* são gêneros taxonômicos classificados dentro da classe Insecta, ordem Diptera, família Psychodidae. Muito embora se conheçam mais de setecentas espécies, cerca de trinta delas apenas têm capacidade vetorial demonstrada. Atualmente, o gênero *Leishmania* está subdividido em três subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*) e *Leishmania* (*Sauroleishmania*), diferenciadas entre si pela porção que colonizam do trato digestório do hospedeiro invertebrado, dado suportado por análise filogenética baseada na sequência de DNA (ANEXO A) (CROAN; MORRISON; ELLIS, 1997; NOYES et al., 2002). Durante a hematofagia, fêmeas de flebotomíneos adquirem dos mamíferos infectados os parasitos da leishmaniose que se apresentam sob duas formas distintas durante o ciclo evolutivo. Uma das formas é intracelular, ovoide e com flagelo interno, encontrada em macrófagos e outras células fagocitárias do hospedeiro vertebrado, denominada amastigota (HANDMAN; BULLEN, 2002). A segunda forma é mais afilada, flagelada e móvel, e se

encontra presente no trato digestório do vetor invertebrado, denominada promastigota; sendo esta a forma infectante do parasito (BATES, 1994).

As amastigotas livres ou interiorizadas em células fagocitárias, usualmente presentes na pele do hospedeiro vertebrado infectado, alcançam o trato intestinal dos insetos logo após o repasto sanguíneo. Uma vez neste ambiente, a temperatura menor e o pH elevado em relação a pele dos mamíferos desencadeiam o desenvolvimento dos parasitos, acompanhado de uma série de alterações morfológicas. Contidas na matriz peritrófica, as formas amastigotas passam a apresentar flagelo e motilidade reduzida, com alta taxa de replicação; desenvolvendo, então, para a forma denominada promastigota procíclica. Inicia-se, subsequentemente, a metaciclogênese. Após alguns dias da instalação no hospedeiro invertebrado, a taxa de replicação decresce, os parasitos se alongam e adquirem alta motilidade e, portanto, se tornam migratórios; formas denominada promastigota nectomona. As formas promastigotas nectomonas alcançam a válvula do estomodeu, onde algumas diminuem de tamanho, constituindo a forma denominada promastigota leptomona. Outras aderem ao epitélio da válvula, e esta forma é denominada promastigota haptomona. Aquelas que se desenvolveram em promastigotas leptomona completam a metaciclogênese, atingindo a forma promastigota metacíclica, infectante, que será transmitida ao hospedeiro vertebrado na próxima alimentação do vetor (ANEXO B) (BATES, 2007; BATES; ROGERS, 2004, BLUM, 1993, SACKS; KAMHAWI, 2001).

Em contato com os humanos, os parasitos do gênero *Leishmania* ocasionam a leishmaniose, cujas manifestações clínicas são variáveis. Ainda, a leishmaniose cutânea pode ser subdividida em diferentes manifestações clínicas, apresentando-se como lesão única, nodular ou ulcerativa, bem determinada; lesões múltiplas, geralmente nódulos, ao longo do corpo (BARRAL et al., 1995), desenvolvidas, principalmente, em indivíduos imunossuprimidos. Estas subformas são denominadas de leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose cutânea difusa (DCL) respectivamente. Em casos crônicos de DCL, há registros de acometimento das mucosas da face, por contiguidade das lesões na região. As principais espécies do parasito relacionados com a LCL são: *Leishmania major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*, no Velho Mundo; e *L. mexicana* e *L. amazonensis* no Novo Mundo. Já as espécies associadas à DCL são: *L. aethiopica*, no Velho Mundo e *L. mexicana* e *L. amazonensis*, no Novo Mundo. A forma mucocutânea é caracterizada pelo comprometimento

da mucosa nasobucofaringea, por disseminação sistêmica — via linfohematogênica. No Velho Mundo está associada as espécies *L. donovani* e *L. major*, quando o afetado apresenta imunossupressão. Já no Novo Mundo, os parasitos do subgênero *Leishmania* (*Viannia*), mormente as espécies *L. braziliensis* e *L. panamensis*, estão associadas à manifestação mucocutânea da leishmaniose. Por fim, as espécies *L. donovani* e *L. infantum* estão associadas à forma visceral da doença, ambas são encontradas no Velho Mundo, mas apenas a segunda é endêmica do Novo Mundo. A leishmaniose visceral é a mais grave manifestação de leishmaniose, acomete fígado e baço, ocasionando hepatoesplenomegalia, sendo letal quando não tratada, (BATES, 2007, CROAN; MORRISON; ELLIS, 1997, DESJEUX, 2004).

As leishmanioses se enquadram na categoria de doenças tropicais negligenciadas (NTD), ou seja, doenças que prevalecem nas regiões tropicais e subtropicais, afetando mais de um bilhão de pessoas e, conseqüentemente, geradora de um alto custo econômico. Além disso, a população acometida é geralmente a de baixa renda, que vive em habitações sem saneamento básico adequado, em contato estreito com vetores e reservatórios destas doenças. Embora medidas públicas de combate sejam regulamente postas em prática, tais se mostram muitas vezes ineficazes, inacessíveis ou complexas, sem a geração e utilização de drogas como tratamento para as mesmas. Atualmente, as intervenções têm sido estudadas e direcionadas segundo as peculiaridades epidemiológicas locais, no intuito de melhorar a detecção da doença, bem como a prevenção e medidas de controle (YAMEY; HOTEZ, 2007; WHO). Estima-se que a incidência anual de novos casos de leishmaniose no mundo ultrapasse 1,5 milhão, sendo duzentos a quatrocentos mil novos casos de VL e setecentos mil a um milhão e duzentos mil de CL (ALVAR et al., 2012). Há registros da doença em 102 países, sendo que 90% dos casos de VL ocorrem em apenas seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. Já 70% dos casos de CL ocorrem em dez países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria (ANEXO C) (WHO, 2016). Estimam-se quarenta mil óbitos anualmente causados pela forma visceral. As demais formas, embora não gerem mortalidade, impactam na morbidade das referidas doenças. Apesar de toda a abrangência das leishmanioses e seus impactos na população mundial, as pesquisas e o combate contra a doença são negligenciados pelos órgãos de saúde e institutos de pesquisa (ALVAR et al., 2012), sendo de grande importância estudos para melhor

compreender os aspectos das leishmanioses e, conseqüentemente, gerar novos alvos de combate ou aprimorar as mediadas profiláticas, bem como os tratamentos.

1.02 — Imunologia das leishmanioses

A resposta inflamatória contra patógenos é influenciada por fatores inerentes ao hospedeiro tais como; o perfil genético, resposta imunológica, bem como fatores intrínsecos ao agente etiológico; virulência da espécie, forma evolutiva do parasito, tamanho e local do inóculo. Devido à grande variabilidade de espécies dos parasito e diversidade gênica da população humana, um complexo de manifestações clínicas da doença é observado, tanto no aspecto histopatológico quanto no imunopatológico.

Com os avanços dos estudos imunobiológicos, identificaram-se dois grupos distintos de célula T auxiliares (helper CD4⁺ T cell — T_H), baseados nos perfis de atividades de interleucinas (IL), expressão proteica e de fatores de transcrição. Um grupo identificado foi denominado células T auxiliares do tipo 1 (T_{H1}), e o outro células T auxiliares do tipo 2 (T_{H2}) (MOSMANN et al., 1986). Tal identificação proporcionou um grande avanço nos conhecimentos sobre a imunologia geral, principalmente acerca das leishmanioses, destacando-se a infecção por *L. major* (HEINZEL et al., 1989). Por explicar incrivelmente bem as resposta imunológicas categorizadas em resistência e suscetibilidade a alguns parasitos, acreditou-se que o paradigma T_{H1}/T_{H2} era a chave para resolução ou suscetibilidade de diversos outros modelos de doenças infecciosas. Embora a descoberta de subpopulações de células T auxiliares tenha sido um passo importante acerca dos conhecimentos imunobiológicos, a imunologia por muito tempo se assentou sobre esta dicotomia de forma vendada, resultando em atrasos na construção de outras implicações ainda mais engrandecedoras no que tange as subpopulações de células T auxiliares.

Atualmente, novas populações de células T auxiliares foram descritas, tais como células T auxiliares regulatórias (Treg), T_{H17}, T_{H9}, T_{H22} e células T auxiliares foliculares (T_{FH}), o que tem proporcionado uma reavaliação do paradigma T_{H1}/T_{H2}; não só pela influência destas populações na resolução de várias doenças (BETTELLI; OUKKA; KUCHROO, 2007, CROTTY, 2011, JÄGER; KUCHROO, 2010, KORN et al., 2009), como também pelo crescimento da visão de que estas linhagens celulares não são terminantemente

diferenciadas, não obstante sejam específicas ao antígeno apresentado. Alguma destas diferentes linhagens celulares podem expressar mais de um fator de transcrição no decorrer de sua vida, até mesmo alterar a expressão dos mesmos, modificando o perfil de citocinas expressas ao longo do tempo (LEE et al., 2009; O'SHEA; PAUL, 2010; ZHOU, X., et al., 2009; ZHOU, L.; CHONG; LITTMAN, 2009). Assim, patenteou-se ainda mais a plasticidade nas funções das diferentes populações de células T auxiliares, simultaneamente ampliando os conhecimentos acerca das interações entre patógeno e hospedeiro, esclarecendo relatos anteriores tidos até então como anômalos (ANEXOS D e E) (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012).

Embora estes avanços acerca da imunobiologia das células T tenham conduzidos o conhecimento contra um paradigma bem estabelecido e funcional para um modelo, os debates no intuito de entender essa rede imunológica mais complexa são muito salutares para desenvolver o conhecimento (O'SHEA; PAUL, 2010). A adaptação ao novo panorama exige esforços ingentes para acomodar o olhar àquela visão flexível e plástica das células T, ao invés daquela fixa, monolítica. Um educador francês, Hippolyte Léon Denizard Rivail, sob a alcunha de Allan Kardec, adverte-nos em um de seus livros que, embora os homens ignorantes, bem como as crianças, sejam mais felizes que os sábios, ou adultos, essa felicidade advém da brutalidade, da ignorância. Segundo ele, a marcha para o progresso é inevitável, uma vez conquistado, o conhecimento não mais se retrograda².

1.02.1 — Resposta imunológica a *Leishmania major*

O modelo imunológico mais bem conhecido no estudo das leishmanioses é a resposta de camundongos frente à infecção experimental por *Leishmania major*, assentado sob a dicotomia T_H1/T_H2 , de fundamental importância para a resolução ou persistência, respectivamente, do parasito (HEINZEL et al., 1989). Em infecções experimentais por algumas cepas de *L. major*, diversas linhagens murinas, entre elas a C57BL/6, C3H/HeJ e CBA, apresentam a resposta imune protetiva T_H1 , iniciada, primeiramente, pela produção de IL-12 por células *natural killer* (NK) e, em seguida, por células T auxiliares do tipo 1 (SCHARTON-KERSTEN et al., 1995). Os parasitos são fagocitados pelas células

² KARDEC, Allan. *O livro dos espíritos*. 93. ed. 1. imp. Brasília: FEB, 2013, q. 776-778, p. 351-352.

apresentadoras de antígenos (APC) e através dos receptores tipo *Toll* (TLR), um receptor de reconhecimento de padrão (PRR), reconhecem os padrões moleculares associados à patógenos (PAMP). Em seguida, as APCs passam a expressar CD40, que age aumentando a expressão do TLR9 e ambos induzem a expressão de IL-12. Além de CD40, as APCs aumentam a expressão de CD80, CD86 e CCR7, sendo as duas primeiras moléculas coestimulatórias na ativação de células T, via receptor de células T (TCR). Já o CCR7 tem a função de endereçar as APCs para órgãos linfóides secundários, como os linfonodos drenantes (LN_d), através da interação com seus dois ligante — CCL19 e CCL21 (FÖRSTER; DAVALOS-MISLITZ; ROT, 2008, LEE et al., 2002). Após o contato das células apresentadoras de antígenos com as células T *naïve*, as células T se desenvolvem especificamente em resposta ao antígeno apresentado, comprometidas e polarizadas para combater o organismo invasor. Uma vez ocorrido isso, as células T migram para o local de infecção e passam a expressar, em infecções por *L. major* em camundongos resistentes, as citocinas IFN- γ e IL-2, características do perfil T_{H1}.

Observou-se que o perfil de citocinas característico de cada subpopulação de células T auxiliares influencia na ativação das principais células efetoras no modelo por *L. major*, os macrófagos, reiterando a importância deste perfil imunológico T_{H1} na resolução da infecção. Macrófagos infectados por amastigotas de *L. major*, em presença de IFN- γ , produzem óxido nítrico (NO) e tornam-se aptos a matar o parasito, dependentemente de L-arginina, cujo metabolismo é requerido para a produção de NO (GREEN et al., 1990b). Outro sinal indispensável à síntese de NO na morte dos parasitos é a citocina TNF, produzida por diversas células, como queratinócitos, células NK, granulócitos, células T, macrófagos entre outras (GREEN et al., 1990a). O sinergismo entre IFN- γ e TNF medeia a morte do parasito através da produção de NO, crucial para o controle do parasitismo no modelo em questão, no qual não parece ser relevante a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) (ASSREUY et al., 1994; LIEW; LI; MILLOTT, 1990). Este fato é também observado em modelos de infecção por *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi* (LANGERMANS et al., 1992; VESPA; CUNHA; SILVA, 1994).

Embora diferentes perfis imunológicos possam ativar diferentemente os macrófagos, não existem, em absoluto, populações variadas de macrófagos e, sim, fenótipos distintos quando na presença de determinados estímulos, abrangendo um largo espectro de ativação

(MILLS et al., 2000; MURRAY et al., 2014). A ativação de macrófagos é associada a uma alteração substancial na expressão gênica dependendo do estímulo, muitas vezes com alguns marcadores sendo encontrados em mais de um fenótipo. Sugere-se que se utilize o máximo de marcadores possíveis para a caracterização macrofágica, desde fatores de transcrição ativados no interior celular até combinações de marcadores de superfície celular. Estudos no intuito de estabelecer uma padronização nas nomenclaturas das linhagens de macrófagos e melhor entendê-las têm sido feitos. A partir deles, verificou-se o conceito de espectro desta população, em cujas extremidades encontram-se os macrófagos denominados M1 e M2. Em camundongos, o subtipo M2 se divide em três grupos. O primeiro, denominado M(IL-4), é caracterizado pela ativação dos fatores de transcrição STAT6 e pela alta expressão do gene para SOCS2 e arginase I (Arg1). A segunda linhagem é a M(IC), expressando as citocinas IL-10 e IL-6 e a enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS). A terceira e última, chamada de M(IL-10) apresenta o fator de transcrição STAT3 ativo, expressa SOCS3, além da produção de IL-10 bem caracterizada. As linhagens ditas M1 se dividem também em três, sendo a primeira M(LPS), caracterizada pelo ativação dos fatores de transcrição STAT1, STAT6 e produção de TNF, IL-6 e IL-27, ainda uma expressão dos genes para SOCS1, Arg1 e da enzima iNOS. A segunda, denominada M(LPS + IFN- γ), apresenta, além de todos os marcadores da linhagem anterior, a produção das citocinas IL-23 e IL-12, com a expressão de iNOS bem mais robusta que anterior. Já a última, do outro ponto extremo do espectro, chamada de M(IFN- γ), apresenta expressão de SOCS1, uma forte ativação de STAT1, bem como grande expressão da enzima iNOS, não expressando ativamente o gene Arg1 (ANEXO F) (MURRAY et al., 2014).

Os macrófagos dentro da linhagem M2 são fundamentais no entendimento da suscetibilidade observada em camundongos BALB/c, devido a sua ativação ser em resposta a citocinas do perfil imunológico T_H2; a outra face da dicotomia. Durante a infecção por *L. major*, camundongos BALB/c apresentam produção contínua de IL-4, impossibilitando a produção de NO pelos macrófagos e favorecendo a metabolização da L-arginina pela enzima arginase I, expressa também em células dendríticas (DC) nas mesmas condições. Dessarte, ocorre a produção de poliaminas, essenciais na replicação parasitária (CORRALIZA et al., 1995; MODOLELL et al., 1995; MUNDER et al., 1999). O equilíbrio da expressão entre iNOS e arginase I leva ao favorecimento da replicação parasitária, quando deslocado para a

arginase I, em contrapartida, quando deslocado para a expressão de iNOS, leva à morte do parasito. Ainda, quando o equilíbrio está deslocado para a expressão de arginase I, ocorre a imunossupressão de células T no sítio inflamatório, consequentemente, diminui a produção de IFN- γ , persistindo a infecção (MODOLELL et al., 2009).

Diversos estudos publicados corroboram a ideia da associação da resistência à resposta T_H1 e suscetibilidade à T_H2 . Scott e colaboradores (1988) mostraram que a transferência de células com perfil T_H1 para animais BALB/c previamente irradiados conferiu resistência a infecção por *L. major*. Heinzl e colaboradores (1989) observaram a expressão continuada de mRNA de IL-4 exclusivamente na linhagem murina BALB/c. Outros tantos trabalhos, a partir da depleção de IL-4 em animais suscetíveis e IFN- γ em animais resistentes, elucidaram a importância de ambas dentro da dicotomia (BELOSEVIC et al., 1989; CHATELAIN et al., 1999; SADICK et al., 1990). Estabelecida a função central de IL-12 para a polarização T_H1 , trataram animais BALB/c com o recombinante desta citocina e observou-se resolução da lesão (HEINZEL et al., 1993; SYPEK et al., 1993). Embora esses trabalhos possam criar a ideia simplista no entendimento acerca da resposta imune à *L. major*, devemos enfatizar outros aspectos associados à resistência e suscetibilidade, contidos em outros trabalhos.

Além da IL-4, outra citocina do perfil T_H2 , a IL-13 foi descrita como fator de suscetibilidade independentemente de IL-4 (MATTHEWS et al., 2000). IL-10 foi outra citocina que se revelou importante na suscetibilidade, pois amastigotas opsonizadas por IgG induzem a produção desta citocina ao serem fagocitadas por macrófagos, supostamente um mecanismo de evasão. Estas observações foram reiteradas em estudos utilizando-se camundongos BALB/c deficientes para IL-10 (IL-10^{-/-}). Estes camundongos controlam a lesão e a carga parasitária (KANE; MOSSER, 2001; NOBEN-TRAUTH et al., 2003). Corroborando essa ideia, em animais C57BL/6 a supressão das células Treg (CD4⁺CD25⁺), por mecanismo dependente ou independente de IL-10, é fundamental para a eliminação do parasito, impedindo recidivas (BELKAID et al., 2002). Sabe-se que a depleção de Treg impactam na tolerância a antígenos próprios por inibirem a ativação descontrolada de células T auxiliares, propiciando o desenvolvimento de doenças autoimunes (SAKAGUCHI et al., 1995). Além disso, animais suscetíveis, mesmo não apresentando o gene para IL-4, BALB/c IL4^{-/-}, mostraram-se incapazes de controlar a infecção (NOBEN-TRAUTH; KROPF; MULLER, 1996), pois células dendríticas necessitam de IL-4 em baixos níveis para iniciar a

produção de IL-12 e, conseqüentemente, polarizar a resposta para o tipo 1 (BIEDERMANN et al., 2001). Observou-se que camundongos C57BL/6 em resposta à cepa Sd de *L. major* apresentam altos níveis de IL-12, portanto ocorre a polarização T_H1, e IFN- γ , porém não se observe a cura da doença neste modelo (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005). Neste caso, a IL-10 proveniente das células T auxiliares proporciona tal suscetibilidade (ANDERSON et al., 2007). Já para a cepa BH49, não é requerido IFN- γ para a resolução, pois apresenta baixa infectividade (SILVA et al., 2009). Assim, temos uma variada gama de fatores que influenciam no desenvolvimento da doença.

Provavelmente, a resposta imunológica direcionada para o perfil T_H1 interfere no mecanismo de ativação de macrófagos, pois favorece a produção de NO, por aumentar a expressão de iNOS, através da ação sinérgica de IFN- γ e TNF. O mesmo não ocorre com populações T_H2, cuja produção de IL-4 inibe a produção de NO (TAUB; COX, 1995). Quando as linhagens resistentes têm a via de TNF comprometida, seja pela falta da citocina, um de seus receptores ou mesmo os dois (TNF^{-/-}, TNFR1^{-/-}, TNFR2^{-/-} ou TNFR^{-/-}), a resolução da infecção por *L. major* também fica comprometida. Animais TNFR1^{-/-} falham no controle da lesão, embora controlem a carga parasitária (VIEIRA et al., 1996). Diversos estudos relacionam o TNF com a diferenciação de monócitos em células dendríticas, bem como a maturação e infiltração destas células no local de infecção (RITTER et al., 2008). Importa ressaltar que o controle parasitário pelo TNF é dependente da cepa; *L. major* da cepa FRIEDLIN desenvolve uma doença progressiva e letal, já a cepa BNI é naturalmente controlada em animais C57BL/6 sem a expressão de TNF (RITTER, et al., 2004). O papel do TNF na resposta imune à *L. major* tem sido analisado amplamente, muitas vezes com resultados contraditórios, talvez em razão das diferentes cepas. Tratamentos com TNF recombinante resultaram na redução da lesão e carga parasitária (TITUS; SHERRY; CERAMI, 1989; LIEW, et al., 1991), bem como o tratamento com anticorpos anti-TNF agravaram os sintomas da doença (TITUS; SHERRY; CERAMI, 1989; LIEW; LI; MILLOTT, 1990; THEODOS, 1991). Estes resultados sugerem que o TNF atue na infecção juntamente a outras citocinas, cuja importância foi evidenciada (ANEXO G).

1.02.2 — Resposta imunológica a *Leishmania amazonensis*

Fatores de resistência e suscetibilidade identificados no modelo *L. major* não foram suficientes para elucidar o complexo panorama da infecção por *L. amazonensis*. O paradigma T_H1/T_H2 não explica a progressão da doença, pois há evidências que levam a acreditar que citocinas destes dois perfis, além de outros tipos celulares, atuem de forma independente e simultânea neste modelo. Assim, identificar os fatores que equilibram os mecanismos efetores e a regulação da resposta imune ante a infecção por *L. amazonensis* é crucial para melhor compreensão e, conseqüentemente, à descoberta de alvos terapêuticos, a fim de desenvolver tratamentos eficazes.

Dentre as muitas linhagens murinas resistentes à *L. major*, apenas a C3H/HeJ também o é à frente de *L. amazonensis* (AFONSO; SCOTT, 1993; JI; SUN; SOONG, 2003; JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000; DE SOUZA et al., 2000). Estes animais apresentam menor produção de IL-4 e IL-10 nos linfonodos drenantes, contudo a produção de IFN- γ é similar a de camundongos BALB/c. Ainda, amastigotas de *L. amazonensis* induzem o aumento da produção IL-12 pelas células dendríticas nos animais resistentes, não ocorrendo o mesmo na linhagem suscetível. Não obstante a maior produção de IL-10 nos linfonodos drenantes da lesão pelos camundongos BALB/c, a captura dos parasitas induz níveis similares de produção desta citocina pelas células dendríticas das duas linhagens. Entretanto, em animais C3H/HeJ, estas mesmas células não produzem níveis detectáveis de IL-4, ao contrário dos animais suscetíveis, cuja indução de IL-4 é observada, sugerindo diferenças entre a população de células T ativadas no decorrer da infecção entre as duas linhagens (JI et al., 2002; QI; POPOV; SOONG, 2001). Embora a quantidade de IL-4 e IL-10 sejam maiores nos animais suscetíveis infectados por *L. amazonensis*, os níveis de IL-4 ainda são bem menores que no modelo BALB/c quando infectados com *L. major*, não determinando a polarização T_H2 (AFONSO; SCOTT, 1993; HEINZEL et al., 1993; JI et al., 2002).

De maneira análoga, os baixos níveis de IFN- γ em resposta a *L. amazonensis* não são suficientes para a polarização T_H1 (JI et al., 2002; JI; SUN; SOONG, 1993; VIEIRA et al., 1996). Corroborando essa ideia, a produção de IL-12, fundamental para desencadear a resposta T_H1 , é diminuída nas células dendríticas neste modelo de infecção em relação à *L. major* (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000; XIN; LI; SOONG, 2008; XIN; LI; SOONG,

2007). Este efeito está associado ao prejuízo da maturação de células dendríticas, ocasionado por *L. amazonensis*. Este parasito acarreta, em comparação à *L. major*, uma baixa expressão de expressão de CD40, CD80, CD83, CD86, MHC II, além das citocinas IL-1 β e IL-6 (FAVALI et al., 2007; PRINA et al., 2004,; SOONG, 2008; XIN; LI; SOONG, 2007). Há também uma inibição da transdução de sinal da STAT1 e STAT2, inibição da fosforilação de STAT3 e ERK1/2, redução da expressão de IRF-1 e IRF-8, também produção menor de IFN- γ , CCL3, CCL4, CCL5 e dos receptores CCR1, CCR2 e CCR5 em animais C57BL/6 (JI; SUN; SOONG, 2003; XIN; LI; SOONG, 2008). Este prejuízo na maturação de células dendríticas suscita, por fim, deficiência na estimulação de células T *naïve* ou na reestimulação de células T ativadas (XIN; LI; SOONG, 2008). Estas mesmas células, sob estímulo antigênico do parasito, produzem simultaneamente, ainda que em níveis mais baixos que na infecção por *L. major*, as citocinas IL-2, IFN- γ , TNF, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (COURRET et al., 2003; JI et al., 2002). Acrescido a isso, encontra-se que a maioria destas alterações está mais fortemente associada à forma amastigota do parasito. Esta própria forma evolutiva de *L. amazonensis* mostrou capacidade inerente de hidrolizar ATP e AMP extracelular, culminando no aumento da citocina IL-10 e, principalmente, diminuição de TNF e IL-12 no hospedeiro (GODING; HOWARD, 1998; MAIOLI, et al., 2004). Em conjunto, estes dados esclarecem o porquê de não se encontrar polarização definida na resposta imune à *L. amazonensis* e, sim, diversas citocinas em baixos níveis referentes aos mais variados perfis imunológicos.

Consonante a tudo isso, células T auxiliares são consideradas fator de patogênese neste modelo de infecção. Soong e colaboradores (1997) verificaram que a ausência tanto de MHC II, quanto de β 2-microglobulina e também a ausência dos componentes linfoide-específicos da recombinase (RAG-1 e RAG-2) conferem aos camundongos de fundo genético C57BL/6 maior resistência do que a observada em camundongos selvagens. As amastigotas de *L. amazonensis* inibem, ainda, a maturação de células NK — importante fonte de IFN- γ ante *L. major* — resultando também na inibição da ativação de células dendríticas. Células NK ativadas por IL-2 favorecem a eliminação do parasito, bem como a posterior ativação macrofágica direcionada para a linhagem M1 (ARANHA et al., 2005; SANABRIA et al., 2008; SCHARTON; SCOTT, 1993). Neste cenário, os fatos observados indicam as células T CD4⁺ de camundongos infectados por *L. amazonensis* são menos responsivas à IL-12 em comparação àquelas de camundongos infectados por *L. major* (RAMER; VANLOUBBEECK;

JONES, 2006), evidenciando ainda mais a não polarização da resposta imune. Um tipo celular pouco estudado neste modelo de infecção são os linfócitos B, que tem-se demonstrado patogênicos, uma vez que animais sem esta célula apresentam lesões menores. Infere-se que seja pela capacidade destas células tanto de ativar linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, quanto de retê-los no sítio de infecção, que, como dito acima, não favorece a resolução (WANASEN; XIN; SOONG, 2008). Contraditoriamente, durante a infecção concomitante por *L. amazonensis* e *L. major*, a presença imunoglobulinas (Ig) seria fator de resistência em animais C57BL/6 (GIBSON-CORLEY et al., 2010).

O microambiente criado na infecção por *L. amazonensis*, com baixos níveis de IFN- γ , IL-4, TNF e relativo índice de IL-10, parece favorecer a replicação parasitária através da inibição da enzima iNOS, devido à ativação de macrófagos pender para as linhagens M2, mais precisamente a M(IL-10) (BALESTIERI et al., 2002). Mesmo produzindo mais IFN- γ e IL-12 e expressando mais iNOS nesta infecção, animais IL-10^{-/-} não a controlam igualmente (JONES et al., 2002). Contudo, a transferência de células Treg, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, produtoras em larga escala de IL-10 e TGF- β , para camundongos C57BL/6, diminuiu a lesão, bem como a carga parasitária nestes animais. Importa ressaltar que esta transferência celular ocasionou também a redução da produção de IL-2, IL-4 e IFN- γ , não atribuindo esta resistência a IL-10 exclusivamente. Dessarte, o mecanismo por trás deste fenômeno necessita ainda de elucidação (JI et al., 2005). O IFN- γ , citocina central na resolução da infecção por *L. major*, teve a função protetora observada apenas na fase crônica da infecção por *L. amazonensis* (CARNEIRO et al., 2015; COLMENARES et al., 2003; PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007). Intrigantemente, baixos níveis desta citocina favorecem a replicação de amastigotas *in vitro* no interior de macrófagos (QI et al., 2004), autonomamente a IL-10 e TGF- β ou arginase I induzida pelo parasito, proporcionada pelo aumento de CAT-2B, transportador de L-arginina. Com os baixos níveis de TNF, associado aos baixos níveis de IFN- γ , há o impedimento da produção de NO, disponibilizando L-arginina para síntese de poliaminas durante a reprodução do parasito (WANASEN et al., 2007). Quanto ao TNF na infecção por *L. amazonensis*, poucos estudos foram feitos. Sabe-se que a ausência do receptor 1 do TNF acarreta, neste modelo, em esplenomegalia e exacerbação da lesão, culminando na perda da pata lesionada (CARGNELUTTI et al., 2014).

Vale considerar também o papel de neutrófilos na infecção por *L. amazonensis*. Diferentemente do que ocorre em infecções por *L. major*, a depleção destas células elucidaram o papel protetivo delas nos tempos iniciais da doença em animais BALB/c, aparentemente por mecanismos dependentes de IL-10 e IL-17. O mesmo não foi observado na linhagem C57BL/6 (SOUSA et al., 2014). A IL-17 é reconhecidamente um fator importante no recrutamento de neutrófilos para os sítios de infecção (XIN; LI; SOONG, 2007). Os neutrófilos secretam TNF quando capturam promastigotas do parasito. Porém, em resposta à fagocitose da forma amastigota, os neutrófilos passam a secretar principalmente IL-10. Por serem as primeiras células a alcançarem o local de infecção, os neutrófilos apresentam um importante papel na imunomodulação da resposta inflamatória, podendo auxiliar na eliminação do parasito, ou na persistência do mesmo, uma vez que podem contribuir para o silenciamento da inflamação (CARLSEN et al., 2013; GUIMARAES-COSTA et al., 2014). Assim, temos um papel ambíguo relacionados aos neutrófilos neste modelo de infecção.

Camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*, quando tratados com IL-1 β , apresentam recrudescimento da lesão e elevada carga parasitária. Células dendríticas destes animais, *in vitro*, incubadas com células T naïve induzem uma população de células T auxiliares caracterizadas por IFN- γ low, IL-10high e IL-17high e o aumento da produção de IL-17, está correlacionado com a diminuição de IFN- γ (XIN; LI; SOONG, 2007).

Diante do exposto, vemos uma rede imunológica mais intrincada associada à resposta imune contra *L. amazonensis*, do que aquela vista durante a infecção por *L. major*. Desta maneira, patenteia-se a necessidade de maiores estudos acerca deste modelo de infecção, que nos permitam vislumbrar não apenas medidas mais eficazes de intervenção no decurso da doença, como também um maior e melhor conhecimento da biologia do sistema imunológico, elevando o patamar de recursos imunoterapêuticos em diversas outras condições prejudiciais.

1.03 — A superfamília do fator de necrose tumoral

A história do TNF remonta aos idos de 1868, quando o médico alemão Bruns reportou a regressão de tumores após infecção bacteriana. Mais tarde, descobriu-se a endotoxina, um lipopolissacarídeo presente na membrana de bactérias Gram-negativas (LPS), que levava tumores à necrose hemorrágica. Posteriormente, foi visto que a ação do LPS era indireta,

através da sua capacidade de induzir um fator no soro dos pacientes, denominado fator necrosante de tumor, renomeado para fator de necrose tumoral (TNF), pelo grupo do eminente pesquisador Lloyd Old (AGGARWAL, 2003). Carswell e colaboradores (1975) creditaram macrófagos como a fonte de TNF, enquanto Kolb e Granger (1968) reportaram linfócitos como fonte de linfotoxina (LT). Paralelamente, estudos de coelhos infectados com *Trypanosoma brucei* revelaram a caquexina, tida como um hormônio supressor da atividade da lipoproteína lipase (LPL) que levava a caquexia. Neste estado, os animais apresentavam hipertrigliceridemia, perda acentuada de peso e alta mortalidade, efeitos relacionados a deficiência adquirida na enzima responsável pela captura de triacilgliceróis da corrente sanguínea. Subseqüentes estudos de cDNA demonstraram que a caquexina e o TNF eram a mesma molécula (BEUTLER et al. 1985a; BEUTLER et al. 1985b; TRACEY; LOWRY; CERAMI, 1988), prevalecendo o nome de TNF. Na seqüência, estudos revelaram a homologia entre LT e TNF, indicando a provável existência de uma superfamília de TNF (TNFSF) (AGGARWAL et al., 1985; AGGARWAL; MOFFAT; HARKINS, 1984). A partir deste evento, mais uma vez estas citocinas foram renomeadas, passando o TNF a ser conhecido como TNF- α e LT como TNF- β (AGGARWAL, 2003).

Desde 1998, quando a nomenclatura do TNF foi novamente revista, voltou-se ao uso dos nomes anteriores, assim o TNF- α foi renomeado TNF e o TNF- β renomeado LT (TRACEY et al., 2008). Entretanto, ainda se busca uma catalogação precisa que abranja toda a TNFSF. Hoje, em mamíferos, conhecem-se cerca de vinte ligantes da superfamília de TNF e trinta receptores, muitos dos quais conservam os domínios de morte (DD) (ANEXOS H e I) (WIENS; GLENNEY, 2011). A superfamília dos DD compreende as famílias DD, Domínios efetores de morte (DED), Domínio de recrutamento de caspase (CARD) e Domínios de pirina (PYD), com importantes funções na montagem e ativação dos complexos inflamatórios e apoptóticos (PARK; LO; LIN, 2007). Os ligantes da TNFSF são identificados pelo domínio de homologia do TNF (THD) inicialmente expressos como trímeros de proteínas transmembrana tipo II, excetuando a LT α , cujo domínio transmembrana é perdido. Muitos destes ligantes têm o domínio extracelular clivado por proteases, sendo liberados como trímeros solúveis (FIGGETT et al., 2014). A trimerização pode ocorrer após a interação entre o ligante e o receptor, o qual sofrerá também a trimerização após este estímulo. Contudo, estudos revelam que para alguns receptores da TNFSF, dentre eles o TNFR1, a trimerização

ocorra antes mesmo da interação com ligante, sendo esta última essencial para mudança conformacional do receptor, o que permite o recrutamento de proteínas citosólicas adaptadoras e, conseqüentemente, o desencadeamento da sinalização. Esta pré-montagem se dá via domínio de montagem pré-ligante (PLAD), contido no domínio rico em cisteína 1 (CRD1) na porção extracelular dos receptores (CHAN et al., 2000; FIGGETT et al., 2014; VANDENABEELE et al., 2010).

1.03.1 — Fator de necrose tumoral

O TNF, em particular, é importante como mediador inflamatório que atua no choque endotóxico contra bactérias Gram-negativas, modulação de atividades metabólicas de diversos tecidos, além de apresentar importantes efeitos autócrinos sobre macrófagos, a sua principal origem celular, ativando-os e aumentando o seu potencial citotóxico (COLLART; BAEUERLE; VASSALLI, 1990). Destacando ainda mais a pleiotropia do TNF, esta citocina atua determinadamente no desenvolvimento e homeostasia nos tecidos linfóides durante infecções. Chamado de alarme de incêndio do corpo, o TNF inicia a resposta contra danos locais, fato reiterado pela observação do aumento de seus níveis em tecidos lesionados como resultado do desencadeamento da resposta imune inata e adaptativa. Então, o TNF modula uma variedade de efeitos patogênicos e induz a produção de outros tantos mediadores inflamatórios e promove a destruição da matriz tecidual. Logo, é tido não como desencadeador da cascata inflamatória, mas um importante desencadeador de uma rede inflamatória intrincada, mais complexa que uma simples cascata (TRACEY et al., 2008). O TNF pode ocasionar a diminuição da reatividade de células T, através da regulação da cadeia CD3 ζ do receptor de célula T (ISOMAKI et al., 2001), cuja reversão, através de antagonistas de TNF, retoma os níveis de reatividade (COPE et al., 1994; BERG et al., 2001). A depleção do TNF está correlacionada como a suscetibilidade a patógenos (LISTING et al., 2005). Assim, o TNF é uma citocina pró-inflamatória, como também o são a IL-1 e a IL-17, considerado o iniciador das respostas de defesa contra injúria local, mediador inflamatório, indutor de outros mediadores inflamatórios e destruição da matriz extracelular. Em baixos níveis nos tecidos, é capaz de atuar aumentando os mecanismos de defesa contra infecções,

porém, em altos níveis pode acarretar injúria dos órgãos devido a exacerbação da inflamação (FELDMANN; STEINMAN, 2005; TRACEY, 2008).

A produção de TNF é altamente controlada, majoritariamente na fase pós-transcrição, podendo ser induzida em macrófagos por uma grande gama de estímulos, tais quais bactérias, vírus, imunocomplexos (IC), citocinas (IL-17, IL-1, GM-CSF, IFN- γ), componentes do complemento, células tumorais, hipóxia (HAN; BROWN; BEUTLER, 1990). A tradução do RNA mensageiro do TNF resulta na produção do homotrímero pró-TNF, que após perder o peptídeo sinal, alcança a membrana plasmática da célula. O homotrímero de TNF pode tanto permanecer na membrana na forma transmembranar (tmTNF) e atuar na interação célula-célula, quanto ser clivado pela enzima convertora do TNF- α (TACE), apresentando-se na forma solúvel (sTNF) (SCHLÜTER, D; DECKERT, 2000). Uma enorme variedade de células são reconhecidas como produtoras de TNF: macrófagos, células T, mastócitos, granulócitos, células NK, fibroblastos, neurônios, queratinócitos e células da musculatura lisa, muitas delas mesmo em estado quiescente. A regulação desta citocina se dá por retroalimentação positiva ou negativa. Ela induz IL-1, IFN- γ e IL-2 que, por sua vez, induzem TNF. O TNF também induz IL-10, prostaglandinas e corticosteroides que, em contrapartida, inibem a transcrição do TNF (TRACEY, 2008).

O TNF, tanto na forma sTNF quanto na tmTNF, atua através de dois receptores, TNFR1 (TNFRp55, TNFRSF1a ou CD120a) ou TNFR2 (TNFRp75, TNFRSF1b ou CD120b), que utilizam vias distintas de sinalização para mediar funções biológicas, algumas das quais se sobrepõem (TARTAGLIA, et al., 1991; TARTAGLIA; GOEDEL, 1992). Há indícios de que o sTNF atue pelo TNFR1, enquanto o tmTNF atua TNFR2, preferencialmente (GRELL, 1998; HU et al., 2014). Além do TNF, LT α_3 também interage com receptores de TNF. Ambos os receptores, TNFR1 e TNFR2, são glicoproteínas de membrana do tipo I, diferentes entre si pelas células que os expressam, afinidades pelos ligante e mecanismo e estruturas citoplasmáticas (TRACEY, 2008). O TNFR1 possui duas vias de sinalização, a primeira que promove sobrevivência celular e ativação de mediadores pró-inflamatórios através do NF- κ B1 ou, alternativamente, induz apoptose através da via extrínseca, dependente de caspase 8 e 3, pelo domínio de morte contido em sua porção citosólica. Quando o receptor é internalizado, após o contato com o ligante, a via ativada é a da apoptose, caso contrário, em que ele permanece na membrana, ativa-se o NF- κ B1 (MUPPIDI; TSCHOPP; SIEGEL, 2004).

Ademais, a via apoptótica é suprimida pela enzima conversora de IL-1 β tipo FADD (FLICE), induzida pelo NF- κ B1. Entretanto, o comprometimento da ativação do NF- κ B1, como geralmente ocorre em células infectadas por patógenos, torna a via apoptótica dominante (HEHLGANS; PFEFFER, 2005; WARE, 2005).

Já o TNFR2, diferentemente do TNFR1, não possui os domínios de morte na porção citoplasmática. Contudo, assim como o TNFR1, mantém-se associado em sua porção citoplasmática ao motivo de interação com o fator associado ao receptor do TNF — TRAF — (TIM), pelo qual desencadeia cascatas intracelulares que ocasionam diferenciação e proliferação celular (DECLERCQ et al., 1998; DECOSTER et al., 1995). Além disso, outras diferenças entre os dois receptores foram observadas, TNFR1 é expresso constitutivamente por todos os tipos celulares, exceto eritrócitos, já o TNFR2 é indutível e expresso preferencialmente em células endoteliais e da linhagem hematopoiética. Ainda referente à sinalização do TNF, o tmTNF ligado a um de seus receptores pode induzir uma sinalização reversa, ativando a célula portadora da citocina transmembranar. Esta sinalização reversa pode ocasionar ativação celular, supressão da produção de citocinas ou apoptose na célula carreadora do tmTNF (EISSNER; KOLCH; SCHEURICH, 2004). Em caso de lesão na pele, TNFR1 é expresso nos queratinócitos da epiderme e na rede de células dendríticas acima dos vasos sanguíneos, já o TNFR2, nas mesmas condições, é expresso na derme, acima dos vasos sanguíneos, bem como nas células do infiltrado perivascular. A sinalização do TNF induz a diferenciação de monócitos em células dendríticas, assim como promove a produção de uma variedade de quimiocinas, a fim de facilitar a migração deste tipo celular e iniciar a resposta imune com a maturação das mesmas células dendríticas. Na resposta a antígenos por células T, TNFR2 e CD28 são importantes na produção de IL-2 e sobrevivência destas células. Ainda, a sinalização via TNF não apenas estimula a proliferação de células T, como desencadeia a apoptose nestas mesmas células ao final da resposta imunológica (CHOMARAT et al., 2003; KIM, E. Y.; TEH, 2004; KOLLIAS et al., 2001; VAN LIESHOUT, 2005). O TNF também promove a quimiotaxia de células T através de CXCL-10, aumentando a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (MANES; POBER; KLUGER, 2006). Por fim, a sinalização do TNF via TNFR1 pode resultar em uma clivagem do TNFR2 através da TACE, apresentando-se de forma solúvel (sTNFR2) (HIGUCHI; AGGARWAL, 1994). A forma solúvel do TNFR1 (sTNFR1) também já foi observada, infere-se que ambas as formas

solúveis dos receptores de TNF atuam como antagonistas naturais da citocina (ROUX-LOMBARD et al., 1993). Um esquema da sinalização do TNF via receptores pode ser visto no ANEXO J.

Embora avanços científicos extremamente produtivos e importantes tenham ocorrido, ainda não se sabe precisamente qual dessas várias funções e moléculas são importantes nos diversos tipos de doenças e infecções ou terapias por agentes anti-TNF. Pode soar paradoxal, mas estes avanços atuaram encobrendo lacunas do conhecimento. Faz-se mister a exploração detalhada da ação desta citocina, inclusive nas doenças parasitárias, a fim de preencher os hiatos na atuação do TNF (WALLACH, 2014).

1.03.1 — O TNFR1 em modelos de leishmaniose

Nas leishmanioses, o TNF atua em diferentes funções biológicas, a depender do tempo de infecção. A primeira função a ser desencadeada é na promoção da inflamação, por induzir quimiocinas e favorecer a citotoxicidade celular, ativando e recrutando linfócitos T e macrófagos para a resposta inicial. Na fase crônica da lesão, o TNF auxilia no remodelamento tecidual após a morte dos parasitos, em casos de resistência (CÔRTEZ et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2012; VIEIRA et al., 1996). Em humanos, nos casos crônicos, altos níveis séricos de TNF se correlacionam com a patologia, dado reiterado pelos estudos de casos crônicos de leishmaniose em modelo murino (NOVAIS et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2012; VIEIRA et al., 1996). Camundongos C57BL/6 são naturalmente resistentes contra *L. major*, entretanto, na ausência do TNF, estes camundongos rapidamente sucumbem à infecção (WILHELM et al., 2001). Já animais mutantes, que apresentam apenas uma forma do TNF não acessível à TACE, mostraram-se capazes de controlar a lesão e a carga parasitária, bem como ativar a resposta protetora TH1 (ALLENBACH et al., 2008). Ainda que no modelo anterior a forma solúvel do TNF seja depletada, o TNF ainda é produzido e sua sinalização pelos dois receptores, provavelmente, não fica comprometida. Camundongos C57BL/6 deficientes para o TNFR1 (TNFR1^{-/-}) não controlam a lesão causada por *L. major*, mas controlam o parasitismo (VIEIRA et al., 1996). Estudos acerca do perfil imunopatológico, também neste modelo murino, permitiram a caracterização das lesões. Atribuiu-se a falta do controle da lesão à incapacidade do camundongo TNFR1^{-/-} de regular a inflamação, devido à

baixa taxa de apoptose em fases avançadas. A baixa taxa de apoptose parece ser devida à ausência do TNFR1, que medeia apoptose (NAUDÉ et al., 2011) em diversas doenças infecciosas (KANALY et al., 1999). A partir do exposto, é patente a falta de controle da infecção por *L. major* nos animais TNFR1^{-/-}, cujo infiltrado inflamatório — com alta taxa de células T auxiliares, células T citotóxicas e Ly6G⁺ — é caracterizado por liberação contínua de mediadores de inflamação (IFN- γ e TNF). A carga parasitária não explica a lesão exacerbada, pois é igual a de camundongos selvagens (OLIVEIRA et al., 2012), reiterando a falta de regulação da lesão, devido a menor taxa de apoptose.

Camundongos TNFR1^{-/-} também se mostraram suscetíveis à *Citrobacter rodentium*, à colite experimental, e *Mycobacterium tuberculosis*, modelos nos quais, mais uma vez, a ausência deste receptor foi associado à não reparação tecidual (FLYNN et al., 1995; GONÇALVES et al., 2001). Todos estes dados indicam claramente um papel central do TNF solúvel na defesa contra *L. major*. Alguns dados divergem dos citados acima, talvez a razão seja as diferentes cepas utilizadas para as infecções. Conforme publicado, as diferentes cepas de *L. major* evoluem para diferentes resultados em animais deficientes de TNF (RITTER et al., 2004). Em relação à *L. amazonensis*, pouco se sabe da importância da sinalização pelo receptor 1 do TNF. Um único estudo revelou a falta de controle das lesões nas patas nos tempos finais de infecção. A análise histológica mostrou uma inflamação grave dez semanas após a infecção em animais TNFR1^{-/-} e selvagens. Já na décima quinta semana após o inóculo, os animais selvagens apresentaram uma redução na inflamação, o mesmo não ocorrendo com os TNFR1^{-/-}, que ao contrário, apresentaram massiva perda de tecido (CARGNELUTTI et al. 2014).

Além dos hiatos acerca da função do TNF e seus receptores nos modelos de leishmaniose, poucos estudos foram feitos para melhor elucidar o papel desta citocina ou de seus receptores. Este quadro é mais grave para *L. amazonensis*, cuja escassez produtiva é ainda maior. O TNF e sua sinalização ocupam papéis centrais ao longo da inflamação, sendo de suma importância a caracterização destes nos modelos de leishmaniose. Entender o mecanismo de atuação do TNF via TNFR1 na infecção por *L. amazonensis* pode contribuir para o melhor entendimento da doença e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, bem como esclarecer pontos diversos sobre a biologia imunológica como um todo. O paradigma T_H1/T_H2 foi um grande marco para imunologia, contudo, atualmente, este mesmo paradigma

falha em explicar resistência e suscetibilidade para outros modelos de infecções, sendo necessário o desenvolver maior cabedais de conhecimentos. Estudos acerca de novos modelos de infecção podem ampliar a rede de interações imunológicas conhecida.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar o papel do TNFR1 na infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos.

Objetivos específicos:

- Analisar o desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos TNFR1^{-/-} e selvagens infectados com *L. amazonensis*;
- Analisar a carga parasitária nas lesões cutâneas dos camundongos TNFR1^{-/-} e selvagens infectados com *L. amazonensis*;
- Determinar o perfil das citocinas IFN- γ , TNF, IL-12p70, IL-1 β , IL-10 e IL-6 nas lesões cutâneas dos camundongos TNFR1^{-/-} e selvagens infectados com *L. amazonensis*;
- Determinar o perfil das citocinas IFN- γ , TNF, IL-12p70 e IL-10 nos linfonodos drenantes dos camundongos TNFR1^{-/-} e selvagens infectados com *L. amazonensis*;
- Avaliar o perfil do infiltrado celular nas lesões cutâneas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados com *L. amazonensis*;
- Avaliar a sinalização de morte celular nas lesões cutâneas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados com *L. amazonensis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.01 – Animais

Camundongos C57BL/6 foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO). Camundongos knockout para o receptor 1 (p55) do TNF (TNFRp55^{-/-}, TNFR1^{-/-}) foram obtidos dos Drs. Klaus Pfeffer (Institute of Medical Microbiology, Dusseldorf, GER) e Phillip Scott (University of Pennsylvania, PA, EUA) e mantidos em colônia no biotério de criação do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB- UFMG em microisolador ventilado, recebendo ração, cama e água estéreis.

Os animais experimentais passaram por dois ciclos de vermifugação, nos quais foram submetidos a banhos de deltrametrina (TRIATOX® Coopers Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e receberam ricobendazol (Ouro Fino, Ribeirão Preto, SP, Brasil) diluído 1:200 por via oral no primeiro e no sétimo dia após a entrada no biotério experimental. Estes animais foram mantidos sob condições de temperatura e fotoperíodo controladas, em espaço com barreiras ambientais. Foi oferecida ração convencional para camundongos (Labina, Purina, Paulínea, SP, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Camundongos fêmeas com idade entre quatro a seis semanas foram utilizados ao início dos experimentos.

Todos os procedimentos foram executados de acordo com os protocolos institucionais e internacionais que regulam a experimentação em animais (protocolo CEUA 336 / 2012).

3.02 – Parasitos

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em *Grace's Insect Medium* (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco BLR Life Technologies).

As culturas foram mantidas em estufa BOD (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 25°C, e repicadas a cada dois ou três dias, até no máximo 10 repiques. Após a décima passagem, os

parasitos foram novamente isolados das patas de camundongos BALB/c, previamente infectados. Para o isolamento das culturas, os animais foram anestesiados com 100 µL de solução anestésica contendo cloridrato de ketamina (Vertbrands, Jacareí, SP, Brasil) a 15 mg/mL e cloridrato de xilazina (Vertbrands) a 5 mg/mL, e tiveram suas patas higienizadas com álcool. Em seguida, com o auxílio de uma seringa contendo uma agulha de calibre 26 G1/2, através da punção das patas, o conteúdo da seringa foi transferido para o primeiro poço de uma placa de 96 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) contendo 200 µL de meio Grace's (GIBCO) completo. Posteriormente, foram transferidos 50 µL do conteúdo do primeiro poço para o segundo poço e deste para o terceiro, e assim sucessivamente. A placa foi, então, selada e mantida em estufa BOD a 25°C. Após sete dias, formas promastigotas de *Leishmania* foram recuperadas da placa e mantidas em garrafas de cultura de 25 cm³ (TPP).

3.03 – Infecção dos camundongos por *L. amazonensis*

Para realização das infecções foram utilizadas 1×10^4 formas metacíclicas do parasito, com quatro dias de cultura. As promastigotas metacíclicas foram obtidas por separação de parasitos da fase estacionária através de gradiente de densidade como descrito anteriormente (SPÄTH; BEVERLEY, 2001). Em síntese, as culturas de *Leishmania* em fase estacionária foram centrifugadas a $2.000 \times g$ a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento recuperado em 2 mL de PBS, sendo este transferido para um tubo contendo gradiente de Ficoll (Ficoll® 400, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA), o qual é composto por uma fase de Ficoll 20% e uma fase de Ficoll 10%. Esse material foi centrifugado a $1.250 \times g$ por 10 minutos a 4°C, e a fase contendo as formas metacíclicas foi coletada e lavada duas vezes com PBS antes de ser usada para a infecção. O volume do inóculo injetado na orelha dos camundongos foi de 10 µL. A lesão induzida na orelha desses camundongos foi acompanhada semanalmente, com o auxílio de um paquímetro digital (Starrett, Itu, SP, Brasil).

3.04 – Quantificação de parasitos

A quantificação de parasitos foi realizada pela técnica de diluição limitante (VIEIRA et al., 1996), em que diluições sucessivas foram feitas a partir dos homogenatos das orelhas infectadas dos camundongos experimentais.

Primeiramente, as amostras foram maceradas em um homogeneizador de tecidos estéril. O homogenato foi centrifugado a $140 \times g$ por 4 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Esse sobrenadante foi centrifugado a $2000 \times g$ por 15 minutos. O sedimento foi suspenso em 200 μL de meio de Grace (GIBCO). Em uma placa estéril de poliestireno com 96 poços e fundo chato (TPP), foram colocados 150 μL /poço de meio de Grace's (GIBCO) completo, exceto na primeira coluna de poços, onde foi colocada 200 μL da suspensão do órgão macerado. Em seguida, foram feitas diluições sucessivas 1:4, tomando-se o cuidado de trocar o conjunto de ponteiros da pipeta multicanal a cada diluição para evitar o arraste de parasitas e um consequente resultado falso-positivo. As placas foram mantidas a 25°C em estufa BOD e a leitura dos resultados foi feita de 7-14 dias após o início da cultura.

3.05 – Dosagem da atividade da enzima arginase I

A atividade de arginase I foi mensurada a partir do lisado de células do homogenato das patas, como descrito por Corraliza (CORRALIZA et al., 1994), com algumas modificações (KROPF et al., 2005). As patas, infectadas ou não, foram maceradas, como descrito anteriormente, e do homogenato obtido, 35 μL foram utilizados para o ensaio. As células que se encontravam no homogenato foram lisadas com 50 μL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) por 30 minutos em agitação. Após a lise, a arginase I foi ativada com a adição de seus co-fatores: 50 μL de 10 mM MnCl_2 e 50 μL de 50 mM TrisHCl (pH 7,5) a 55°C por 10 minutos. Em seguida a amostra obtida foi transferida para outra placa de 48 poços em duas diferentes concentrações. Em um dos poços foi feita a transferência da amostra pura, 55 μL , e a partir desta foi feita uma diluição de 1:10 (5 μL de amostra + 45 μL de H_2O destilada). Para que fosse mensurada a atividade da enzima foi adicionado às amostras o seu substrato, 50 μL de 0,5 mM de L-arginina (Sigma Aldrich) (pH 9,7), após o que, as amostras foram incubadas a 37°C por 60 minutos. Em seguida a reação foi parada com a adição de 400 μL de uma solução

de ácidos ($H_2SO_4-H_3PO_4-H_2O$) na proporção de 1:3:7. Foram então adicionados 25 μ L de α -isonitrosopropiofenol (Sigma Aldrich) 9% em etanol 100%. A placa foi então incubada a 95°C por 45 minutos. A curva padrão foi feita a partir de uréia (Sigma Aldrich) 1 mg/mL diluída sucessivamente 1:2. Após os 45 minutos de incubação a 95°C, 100 μ L de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços e foi realizada leitura em leitor de microplacas a 540 nm. O resultado é expresso como unidade de atividade de arginase por órgão. Cada unidade é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol uréia/minuto.

3.06 – Análise histopatológica

As lesões das orelhas foram removidas e fixadas em formalina tamponada com fosfato a 10% (pH 7,2), desidratadas e posteriormente diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes histológicos seriados de 5 μ m de espessura em micrótomo de rotação SPENCER (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), que foram montados em lâminas e corados segundo as técnicas de Hematoxilina-Eosina (CARDIFF; MILLER; MUNN, 2014). As análises histológicas foram desenvolvidas sob microscopia de luz usando de 10 a 400 vezes de aumento.

3.07 – Análise de imuno-histoquímica

Antes do início do ensaio as lâminas ficaram por uma hora na estufa a 57°C para que o excesso de parafina fosse removido. No primeiro dia do ensaio as lâminas foram passadas em xilol I, II e III (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), 20 minutos em cada, para garantir remoção completa da parafina. Em seguida, passaram por um processo de desidratação: álcool absoluto (I, II e III) e álcool 90%, 80% e 70%. As lâminas ficaram por cinco minutos em cada solução. Em seguida foram lavadas por três vezes em PBS para a retirada do álcool; cada lavagem foi feita em imersão por cinco minutos. Logo após foram realizados os três bloqueios da reação. O primeiro deles realizado em imersão, com solução de PBS 10% de peroxidase, por 30 minutos. Posteriormente foram realizadas três lavagens de cinco minutos cada em PBS. O segundo bloqueio foi feito com solução de soro albumina 2% (Sigma-Aldrich), por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas, uma vez, em PBS por cinco minutos. Por fim,

foi realizado o bloqueio com solução de PBS a 0,2% de soro albumina, 5% de soro normal de cabra, por 30 minutos. Após este bloqueio as lâminas não foram lavadas, apenas enxugou-se o excesso de solução ao redor dos cortes.

3.08 — Obtenção do índice apoptótico

As células apoptóticas foram em lâminas marcadas no Shorr, por um único observador, considerando simultaneamente a presença de pelo menos três peculiaridades do padrão morfológico deste processo (MORO et al., 2004). “Shruken anoykic cells” (retração celular, desidratação e perda da aderência entre as células e a base da membrana); condensação do núcleo e do citoplasma (cromatina nuclear em massas de densidade homogêneas, alinhamento na parede interna da membrana plasmática, em alguns casos formando imagens “crescentes” ou “de buracos pretos”); fragmentação nuclear (convolução e fragmentação da membrana nuclear — sem “karyorrhexis ou ruptura); fragmentação celular (com formação de corpos apoptóticos). O índice apoptótico (IA) foi determinado pela seguinte fórmula :

$$IA = \frac{(\sum \text{média de células apoptóticas})}{(\sum \text{média de células totais})}$$

3.09 – Extração de tecido para dosagem de citocinas na lesão

Nos tempos determinados para o estudo das lesões cutâneas, os camundongos foram sacrificados como descrito acima e as orelhas dos animais infectados e não infectados foram retiradas e congeladas a -70°C para posterior dosagem de citocinas. Após o descongelamento dos tecidos, as orelhas foram pesadas e foi adicionada solução para extração de citocinas: uma cápsula do inibidor de proteases (ROCHE, Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) diluída em 50 mL de PBS, na proporção de 1000 µL desta solução para 50 mg de tecido. O tecido foi, então, macerado com homogeneizador elétrico e centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, e congelado a -70°C até a realização do ELISA.

3.10 – Detecção de citocinas por ELISA

As dosagens de TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12p70 a partir do sobrenadante do homogenato das células dos linfonodos e da orelha foram feitas com a utilização de kits (BD Pharmingen, São Diego, CA, EUA) exclusivos para a detecção dessas citocinas e o procedimento foi feito exatamente como recomenda o fabricante. O limite de detecção foi de 32 pg/mL nas duas citocinas.

A detecção de IFN- γ foi feita a partir de kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as especificações do fabricante. O limite de detecção foi de 30 pg/mL.

3.11 – Citometria de fluxo

Orelhas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} foram coletadas após infecção por *L. amazonensis*. As amostras foram cortadas em pedaços menores e incubadas por 1h 30min em 1 mL de meio RPMI (GIBCO) sem SFB contendo 62,5 μ g/mL de liberase TL (Roche) e 0,5 mg/mL de desoxiribonuclease I (Sigma Aldrich). Após este período foi adicionado mais 1 mL de RPMI 10% SFB por amostra. As amostras foram então maceradas, e o homogenato centrifugado a 400 x g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, os precipitados das amostras foram incubados por 20 minutos a 4°C com anticorpo anti Fc- γ III/II CD16/32 (clone 2.4G2) e os seguintes marcadores de superfície: anti-Ly6G (clone 1A8); anti-Ly6C (clone HK1.4); anti-F4/80 (clone BM8) (eBioscience); anti-CD11c (clone HL3); anti-MHC II (clone M5/114,15,2); anti-CD11b (clone M1/70); anti-CD8 (clone 53-6.72); anti-CD3 (clone 145-2C11); anti-CD4 (clone GK1.5); anti-TCR- β (clone H57-497); anti-CD19 (1D3) e anti-FOXP3 (clone MF23). Foi utilizado, também, o kit para avaliação de viabilidade celular LIVE/DEAD (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) seguindo as especificações do fabricante. Exceto quando especificado o contrário, todos os anticorpos utilizados foram da BD (BD Biosciences Pharmingen, São Jose, CA, EUA). Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS a 4°C e as amostras foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4°C para remoção de excesso de anticorpos. As amostras foram adquiridas logo em seguida. Cem mil células foram adquiridas para cada amostra de orelha, usando o citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD

Bioscience). As análises foram realizadas no software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

A coloração pelo 7AAD baseia-se na diferença da permeabilidade da membrana de células vivas, apoptóticas e mortas perante o corante marcador de DNA. Como o 7AAD é um composto químico que apresenta fluorescência e que se intercala entre as bases de DNA de dupla fita, ele serve como marcador de apoptose em análises por citometria de fluxo (BRONS; VAN ERP; PENNING, 1994). As células com membranas intactas excluem o 7AAD, enquanto as membranas de células danificadas e mortas são permeáveis ao 7AAD. A anexina V é uma proteína ligadora de fosfolípido dependente de Ca^{2+} que possui alta afinidade pelo fosfolípido fosfatidilserina (PS), utilizada para identificar células apoptóticas com PS exposta. A associação dos reagentes (anexina V + 7AAD) é capaz de identificar: células positivas à coloração pela anexina V e negativas pelo 7AAD: células que sofrem apoptose; células positivas tanto para anexina V quanto para 7AAD: células em apoptose tardia; células negativas à coloração pela anexina V e positivas pelo 7AAD: estão em necrose, ou já mortas (VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000).

3.12 – Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão (EP) para cada grupo. Nos ensaios de cinética de produção de citocinas foi realizado o teste Two-Way ANOVA, seguido de Bonferroni para determinar diferenças entre os tempos e os grupos avaliados. Para determinar diferenças entre dois grupos, foi utilizado o teste t de Student usando distribuição bi-caudal com amostras não pareadas, após a aplicação do teste de normalidade e verificação da simetria dos dados. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Para análise estatística de correlação foi realizado o teste de Spearman.

4. RESULTADOS

4.01 — Curso da infecção de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis*

Camundongos C57BL/6 são modelos de resistência em infecção por *Leishmania major* devido à capacidade de eliminação destes parasitos justamente através da ação sinérgica das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF (LIEW; LI; MILLOTT, 1990). Quanto à infecção por *L. amazonensis*, o modelo murino C57BL/6 apresenta suscetibilidade. Ainda, nosso laboratório havia, anteriormente, mostrado que camundongos que não expressam o receptor 1 do TNF (TNFR1^{-/-}) apresentam resposta inflamatória exacerbada ao parasita *L. major*. Já a infecção por *L. amazonensis* é mais silenciosa que a por *L. major* (SOONG et al., 1997). Resolvemos, então, estudar a resposta à *L. amazonensis* em camundongos TNFR1^{-/-}, a fim de verificar a participação deste receptor do TNF na infecção por *L. amazonensis*.

Assim, foram infectadas orelhas (via intradérmica) de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-}, ambos em fundo genético C57BL/6, com a cepa PH8 de *L. amazonensis* para avaliação do desenvolvimento da doença até a sétima semana após o inóculo. Observou-se que os animais TNFR1^{-/-} apresentam desenvolvimento tardio da lesão em comparação com os selvagens. As lesões se igualam na quarta semana após a infecção, mas há um aumento progressivo das lesões nos animais deficientes de TNFR1. Já os animais selvagens apresentam, a partir da quarta semana, um controle parcial no tamanho desta lesão (Figura 1A). Embora os camundongos selvagens controlem parcialmente a lesão, ambas as linhagens apresentaram destruição do tecido da orelha por necrose, sendo que nos animais selvagens esta perda tecidual é, apenas, retardada.

Como já estabelecido, na infecção por *L. major*, um dos fatores que diferenciam o desenvolvimento da doença é o local do inóculo (RIBEIRO-GOMES et al., 2014). A fim de verificar se o mesmo se dá em *L. amazonensis*, camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} foram infectados na pata posterior direita, via subcutânea, com este mesmo parasito. Observou-se, nos camundongos selvagens, lesão maior na sexta semana de infecção, igualando-se aos camundongos TNFR1^{-/-} posteriormente, até a oitava semanas após o inóculo. Contudo, a lesão nos camundongos selvagens regrediu, enquanto se desenvolveu continuamente nos TNFR1^{-/-}

(Figura 1B). Foi observada, também, necrose com massiva perda de tecido nas patas dos animais deficientes de TNFR1, diferentemente do que ocorreu nos animais selvagens.

Estes dados sugerem maior resistência ao parasito pelos animais selvagens, além de diferença na progressão da infecção dependente do local do inóculo para os camundongos selvagens, uma vez que, em ambos os modelos, os animais TNFR1^{-/-} apresentam perda de tecido.

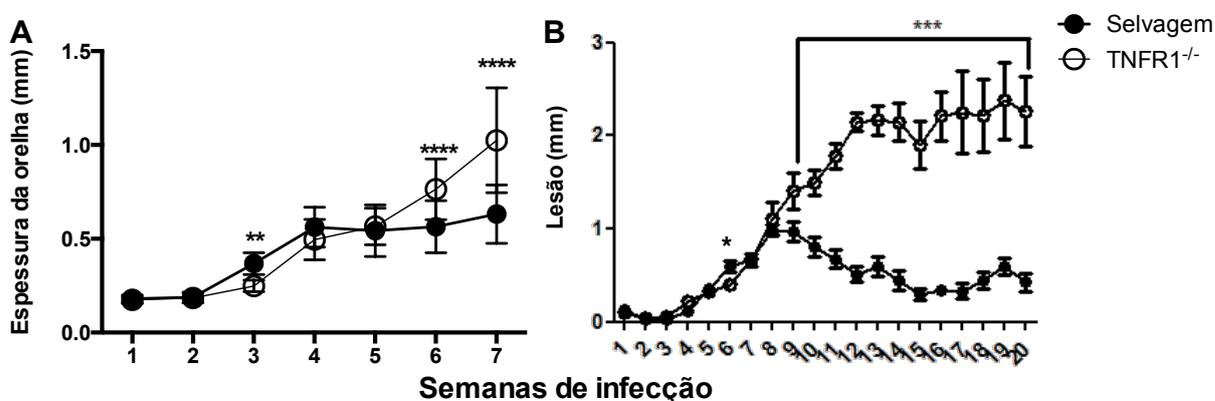


Figura 1. Desenvolvimento das lesões cutâneas em camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis*. Os camundongos foram infectados na orelha (A) ou na pata (B) com 1×10^4 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e as lesões foram medidas semanalmente. Os dados representam as medidas das orelhas dos camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} até a oitava semana de infecção. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$). Os resultados são representativos de três experimentos desenvolvidos independentemente.

4.02 — Avaliação da carga parasitária e atividade de arginase I em camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis*.

Camundongos TNFR1^{-/-} infectados por *L. major* não controlam a lesão, contudo controlam a carga parasitária, desta maneira, avaliou-se o parasitismo na infecção por *L. amazonensis*. Apesar das diferenças no tamanho da lesão encontradas ao longo do curso de infecção, nenhuma diferença na carga parasitária foi observada ao longo de todo o tempo experimental, tanto na orelha (Figura 2A) quanto na pata (Figura 2B) em relação aos camundongos selvagens e TNFR1^{-/-}. De maneira similar, a avaliação da atividade de arginase durante os cursos de infecção não indicou diferenças entre as linhagens murinas em ambos os sítios, em quaisquer dos tempos estudados (Figuras 2C e 2D).

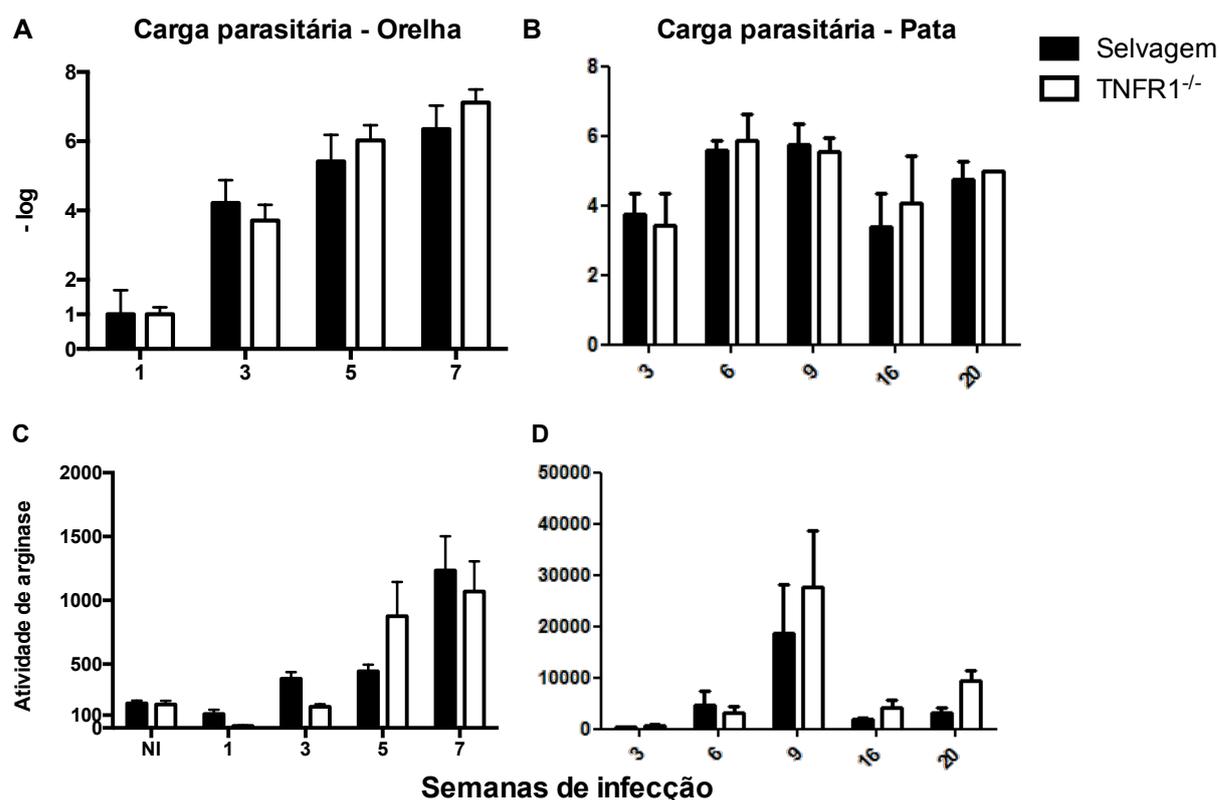


Figura 2. Avaliação da carga parasitária e atividade de arginase I nas lesões de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis*. Nos tempos indicados de infecção, os camundongos foram eutanasiados e as lesões foram processadas para determinação da carga parasitária por meio da técnica de diluição limitante na orelha (A) e na pata (B), apresentada as médias das diluições máximas de cada grupo foram expressas pelo logaritmo negativo do título (última diluição positiva). Foi avaliada a atividade da enzima arginase I a partir do lisado de células das orelhas (C) e patas (D) infectadas nos tempos indicados. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são representativos de três experimentos desenvolvidos independentemente. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.03 — Histologia e imuno-histoquímica das lesões nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados com *L. amazonensis*.

A Figura 3 é meramente representativa das técnicas de histologia e imuno-histoquímica utilizadas para avaliar a média celular nas orelhas dos animais, bem como a média de células em apoptose (Figura 3B) por campo. As médias celulares foram obtidas após a contagem microscópica de células em campos no aumento de 40x, dividindo, posteriormente a soma do número de células totais ou apoptóticas contadas pelo número de campos obtidos.

Observou-se que o número médio de células por campo aumenta progressivamente ao longo da infecção nos dois grupos experimentais, contudo de forma mais lenta nos camundongos TNFR1^{-/-}, pois na quinta semana de infecção estes apresentaram a média celular menor do que os selvagens (Figura 4A). Já a média de células apoptóticas foi maior entre os camundongos selvagens não infectados e na primeira semana de infecção. Na terceira semana, com o decréscimo desta média entre os camundongos selvagens, as médias de células em apoptose dos grupos experimentais se igualaram, apresentando crescimento nos tempo seguintes da infecção, também nos dois grupos (Figura 4B). O índice apoptótico revelou que a frequência da média de células apoptóticas em relação as média celular total diminui a partir da terceira semana de infecção nos camundongos selvagens somente, mantendo-se similar nos camundongos TNFR1^{-/-} ao longo do experimento (Figura 4C).

Estes resultados indicam que a infecção diminui a proporção de células em apoptose em relação ao número total de células nos animais selvagens. Muito provavelmente, diminui a via de ativação de caspases dependente de TNFR1, uma vez que animais não deficientes para este receptor não tiveram essa proporção afetada. Ainda, sugerem que, após a terceira semana experimental, outra via indutora de apoptose independente de TNFR1 é ativada na infecção por *L. amazonensis*, pois a média de células apoptóticas apresentam aumento similares, tanto nos camundongos selvagens quanto nos deficientes de TNFR1.

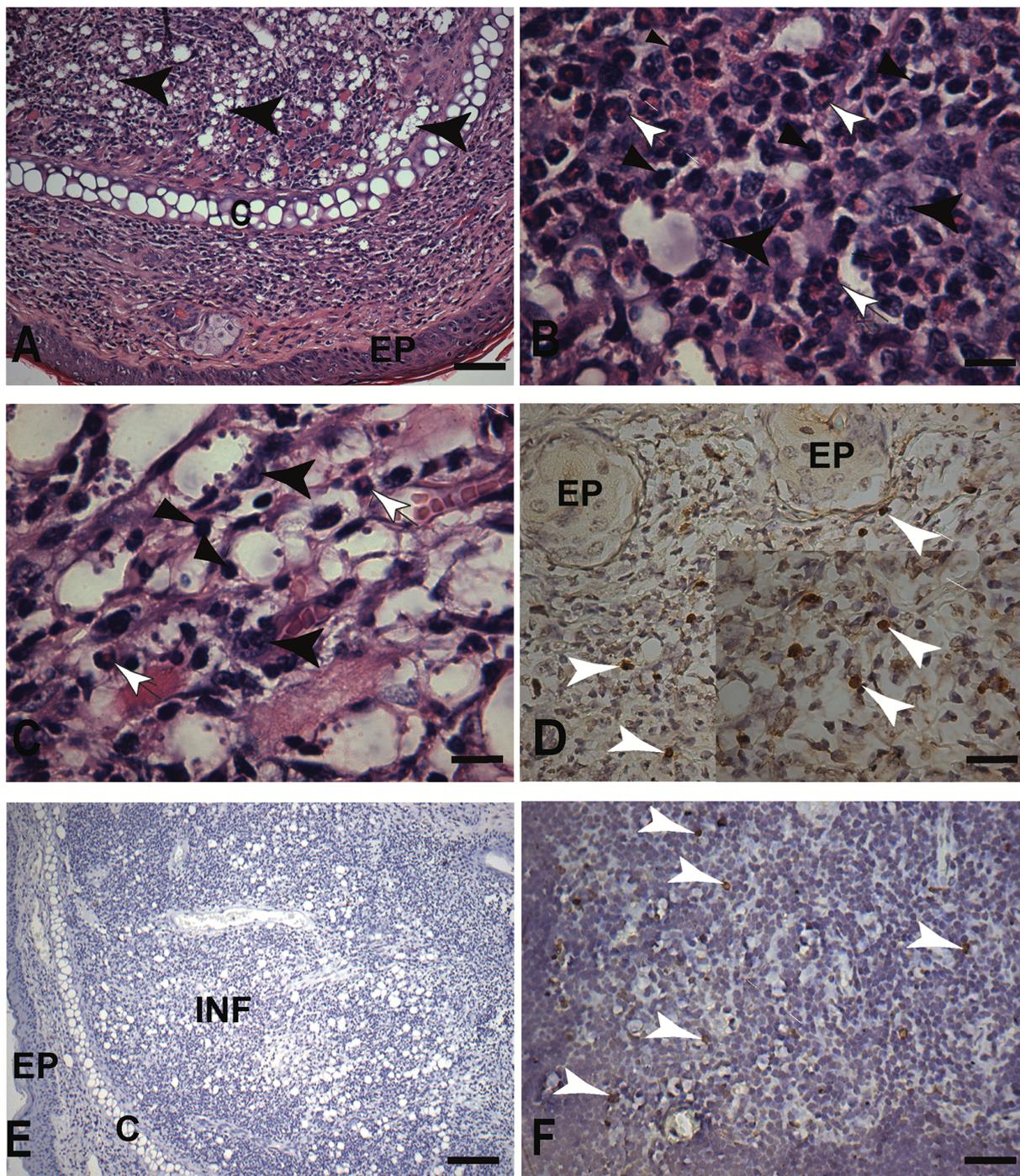


Figura 3. Histologia e imuno-histoquímica da pele de orelha de camundongos selvagens e $TNFR1^{-/-}$ infectados por *L. amazonensis*. A inflamação variou de discreta a moderada (A) atingindo regiões superficiais e profundas da derme ventral e dorsal da orelha e apresentando macrófagos vacuolizados (cabeça de setas grandes e negras) repletos de forma amastigotas, detalhe em (C). Em (B) inflamação com predomínio de polimorfo mononuclear, macrófagos (cabeça de setas grandes negras), linfócitos (cabeça de setas pequenas e negras) e neutrófilos (setas pequenas brancas). (D) Imuno-histoquímica para identificação de células em apoptose (cabeça de setas grandes branca) Em (E) pele de orelha, controle negativo e (F) timo, controle positivo da reação imuno-histoquímica para células em apoptose. EP – epiderme; C – cartilagem e INF - inflamação. A - C coloração pela H&E, D – F Imuno-histoquímica. Barra em A 32 μ m (200 x), B, C e F 6 μ m (1000 x) e D 16 μ m (400 x).

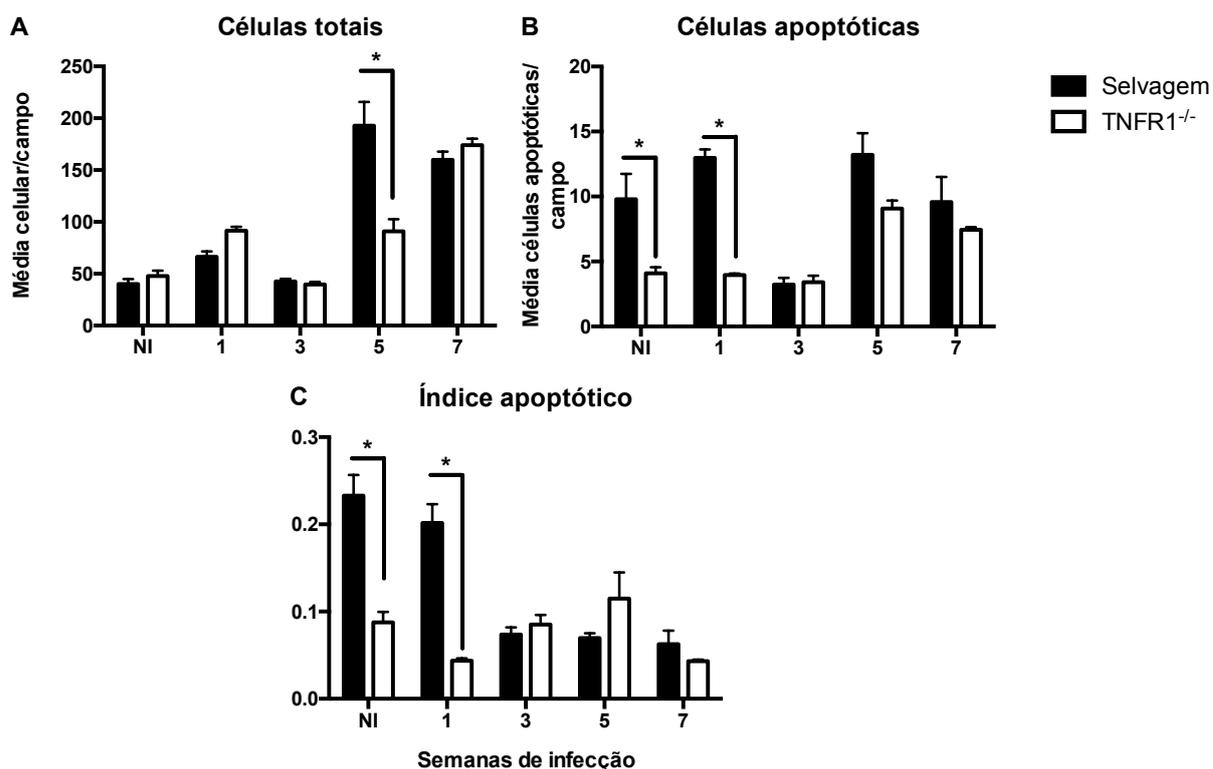


Figura 4. Análise histopatológica das lesões cutâneas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados nas orelhas com *L. amazonensis*. Média de células por campo (A) presentes na orelha dos camundongos de ambos os grupos ao longo do curso de infecção. Média de células apoptóticas por campo (B) presentes na orelha nos tempos indicados, e Índice apoptótico (C) obtido pela razão entre as médias das células apoptóticas pela média das células totais. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente. NI – Não infectado.

4.04 — Avaliação das concentrações IFN- γ , TNF, IL-12p70, IL-1 β , IL-10 e IL-6 nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados com *L. amazonensis*.

A Figura 5 mostra a avaliação das concentrações das citocinas IFN- γ (A), TNF (B), IL-12p70 (C), IL-1 β (D), IL-10 (E) e IL-6 (F) nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis*, bem como camundongos das duas linhagens não infectados.

A produção de IFN- γ observada foi similar em ambos os grupos em todos os tempos analisados, sendo induzida apenas no tempo de sete semanas de infecção quando comparada ao grupo não infectado nas linhagens murinas ($p=0,0002$ e $p<0,0001$ para os animais selvagens e TNFR1^{-/-} respectivamente) (Figura 5A). Já no tocante ao TNF, foi observada maior produção desta citocina pelo grupo de animais selvagens apenas no tempo de cinco semanas após a infecção (Figura 5B).

A produção de IL-12p70 não se mostrou diferente entre os grupos ao longo dos tempos experimentais, sendo induzida pela infecção, em relação ao grupo não infectado, apenas no tempo de sete semanas após o inóculo parasitário ($p=0,0120$ e $p=0,0472$ entre os animais selvagens e TNFR1^{-/-} respectivamente) (Figura 5C). Tanto a produção de IL-1 β quanto de IL-6 foram iguais entre os grupos experimentais, além de não se apresentarem em níveis maiores do que o não infectado em quaisquer dos tempos estudados (Figuras 5D e 5F). Por fim, os camundongos selvagens infectados apresentaram maior produção de IL-10 do que os não infectado na terceira semana experimental ($p=0,0095$), contudo essa diferença não persistiu nos demais tempos. Os camundongos TNFR1^{-/-} infectados apresentaram níveis maiores de IL-10 somente na sétima semana de infecção ($p=0,0006$), o qual foi maior do que os observados nos camundongos selvagens neste mesmo tempo (Figura 5E).

Coletivamente, estes resultados sugerem que a infecção por *L. amazonensis* não induz produção de citocinas em larga escala, aumentando apenas nos tempos finais, quando outros fatores podem atuar como indutores da produção de citocinas e, não propriamente, o parasito. Contudo, a diferença na cinética de produção da IL-10 sugere maior controle da lesão, retardando a perda de tecido observada nos camundongos selvagens em relação aos camundongos deficientes de TNFR1.

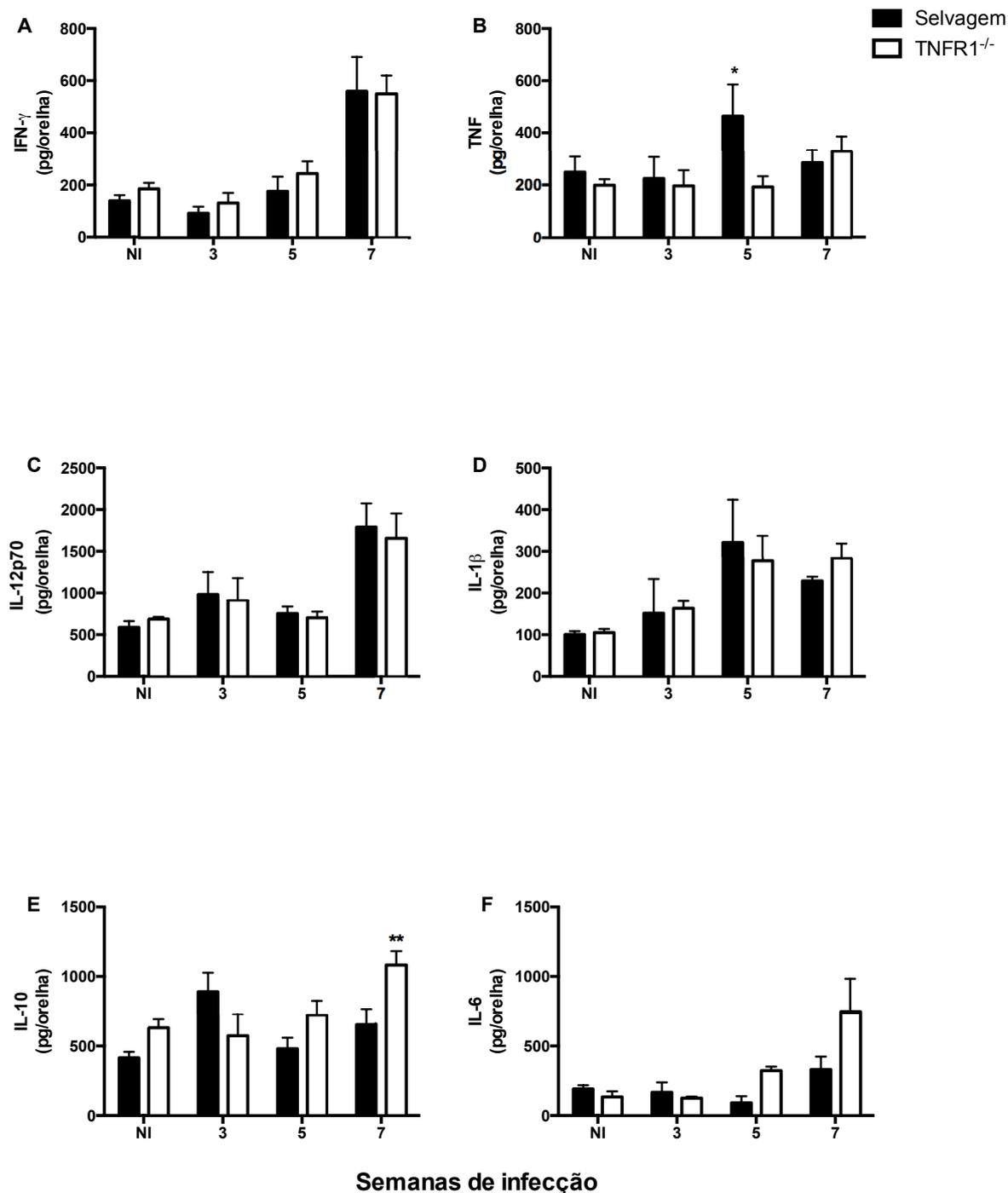


Figura 5. Avaliação das concentrações de IFN- γ , TNF, IL12p70 e IL-1 β , IL-10 e IL-6 nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados com *Leishmania amazonensis*. Camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} (quatro por grupo) foram infectados com 1×10^4 promastigotas de *L. amazonensis* na orelha direita e nos tempos indicados os camundongos foram sacrificados e as orelhas foram coletadas e maceradas em solução com inibidores de proteases e os níveis de (A) IFN- γ , (B) TNF, (C) IL-12p70, (D) IL-1 β , (E) IL-10 e (F) IL-6 foram determinados por ELISA. (*p < 0,05, **p < 0,01). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são a média de dois experimentos independentes. NI – Não infectado.

4.05 — Avaliação das concentrações IFN- γ , TNF, IL-12p70 e IL-10 nos linfonodos drenantes de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados com *L. amazonensis*.

A figura 6 mostra a avaliação das concentrações das citocinas IFN- γ (A), TNF (B), IL12p70 (C) e IL-10 (D) nos linfonodos drenantes de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados na orelha por *L. amazonensis*.

A produção de IFN- γ observada foi similar em ambos os grupos em todos os tempos analisados, sendo induzida apenas no tempo de sete semanas de infecção quando comparada ao grupo não infectado nas linhagens murinas ($p=0,0238$ e $p=0,0121$ para os animais selvagens e TNFR1^{-/-} respectivamente) (Figura 6A). Já no tocante ao TNF, esta citocina foi observada em níveis elevados nos camundongos selvagens infectados já a partir da terceira semana de infecção ($p=0,0190$) em relação aos não infectados, permanecendo aumentada até a quinta semana ($p=0,0317$). Embora esta diferença não apareça após sete semanas de infecção, os níveis de TNF dos camundongos selvagens são superiores aos dos deficientes de TNFR1 neste período, grupo experimental cujas concentrações de TNF se mantiveram similares em todos os tempos analisados (Figura 6B).

Em relação a produção de IL-12p70, observaram-se níveis maiores desta citocina nos camundongos TNFR1^{-/-} do que os selvagens nos tempos de três e cinco semanas de infecção. Ademais, em relação ao grupo não infectado, a produção de IL-12p70 foi maior a partir da terceira semana do inóculo parasitário nos animais deficientes de TNFR1 ($p=0,0357$), apresentando níveis similares no decurso da infecção entre os camundongos selvagens (Figura 6C). Por fim, ambos os animais apresentaram a produção de IL-10 aumentada na sétima semana de infecção em relação ao grupo não infectado ($p=0,0095$ e $p=0,0357$ entre os animais selvagens e TNFR1^{-/-} respectivamente), contudo, no comparativo dos dois grupos não se observaram diferenças de concentração de IL-10 em nenhum dos tempos de estudo (Figura 6E).

Estes dados, coletivamente, sugerem que na infecção por *L. amazonensis* na orelha, as células do linfonodo drenante dos camundongos selvagens produzem TNF em níveis maiores aos dos animais não infectados e, na última semana experimental, maior até que os camundongos TNFR1^{-/-}, enquanto que no linfonodo drenante destes animais ocorre a pronta produção de IL12p70. Assim, podem-se aventar duas alternativas: ou a produção continuada

de TNF auxilia no controle da lesão; ou níveis mais altos de IL-12p70 são danosos ao órgão infectado. Fato é, mesmo em maiores níveis de produção de IL-12p70 por camundongos TNFR1^{-/-}, não ocorre a polarização da resposta imune para T_H1, uma vez que a produção de IFN- γ não foi induzida no início da infecção. Ainda, a indução tardia de IL-10 nos linfonodos drenantes dos camundongos dos dois grupos se mostrou ineficaz no controle da inflamação e também no reparo tecidual.

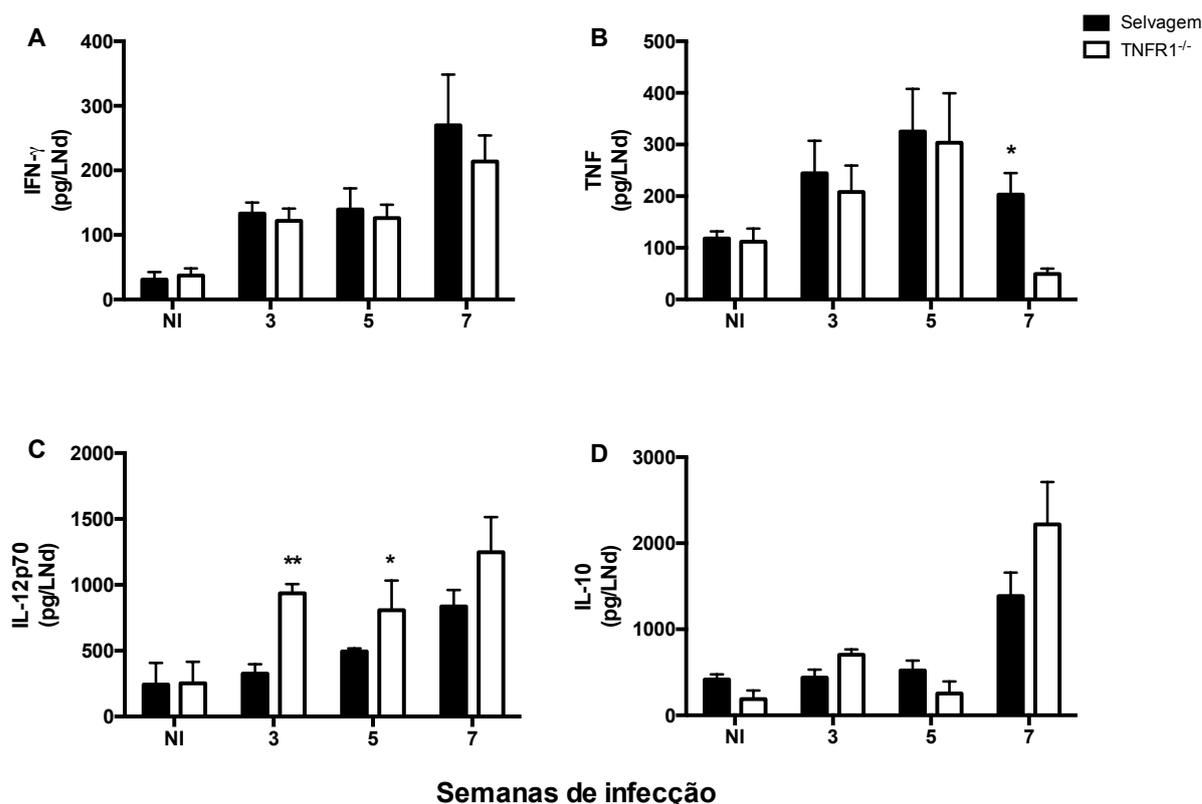


Figura 6. Avaliação das concentrações de IFN- γ , TNF, IL-12p70 e IL-10 por células dos linfonodos drenantes de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados via intradérmica com *L. amazonensis*. Camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} (quatro por grupo) foram infectados com 1×10^4 promastigotas de *L. amazonensis* na orelha direita e nos tempos indicados os camundongos foram sacrificados e os linfonodos retromaxilares foram coletadas e maceradas em solução com inibidores de proteases e os níveis de (A) IFN- γ , (B) TNF, (C) IL-12p70 e (D) IL-10 foram determinados por ELISA. (*p < 0,05 e **p < 0,001). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são a média de dois experimentos independentes. NI – Não infectado.

Ná na figura 7 estão os resultados da avaliação da produção das citocinas IFN- γ (A) e IL-10 (B) de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados na pata posterior por *L. amazonensis*.

A produção de IFN- γ por células do linfonodo drenante observada foi similar em ambos os grupos infectados na pata em todos os tempos analisados (Figura 7A). Com a análise da produção de IL-10, verificaram-se níveis de concentrações de IL-10 similares ao

tempo de nove semanas de infecção entre as linhagens murinas, contudo, nos tempo subsequentes, a produção desta citocina foi detectada apenas pelas células dos linfonodos drenantes de camundongos selvagens (Figura 7B).

Como dito anteriormente, durante a infecção intradérmica ocorre, apesar da diferença no tamanho da lesão, intensa perda de tecido, tanto pelos camundongos selvagens quanto os TNFR1^{-/-}. Assim, o fato disto ocorrer, em infecção subcutânea pode estar associado à produção de IL-10, apenas nos animais TNFR1^{-/-}. Esta citocina não foi detectada nos linfonodos de camundongos deficientes de TNFR1 nos tempo finais de infecção, ao contrário dos camundongos selvagens. Além disso, os níveis de IFN- γ decaem em ambos os grupos no modelo de infecção intradérmica, indicando supressão da inflamação, ao contrário do observado no modelo intradérmico. Portanto, estes dados sugerem que a produção continuada de IL-10 e a diminuição da produção de IFN- γ nos linfonodos de camundongos selvagens infectados na pata podem estar envolvidas com o controle e regressão da lesão e no reparo tecidual na infecções por *L. amazonensis*.

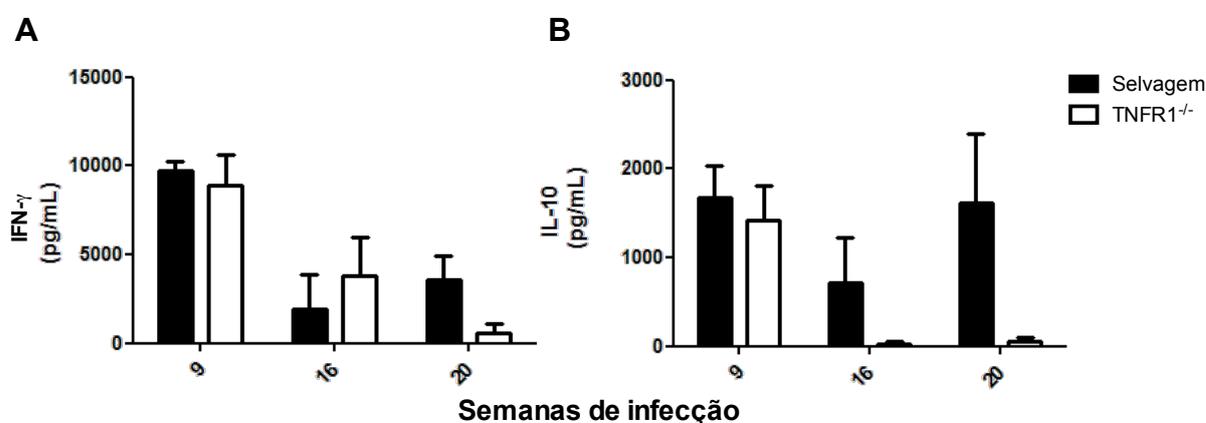


Figura 7. Avaliação das concentrações de IFN- γ e IL-10 por células dos linfonodos drenantes de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados via subcutânea com *L. amazonensis*. Camundongos (cinco por grupo) foram infectados subcutaneamente na pata com 1×10^4 formas promastigotas de *L. amazonensis* e, nos tempos indicados, os linfonodos poplíteos foram coletados e os níveis das citocinas mencionadas foram determinados por ELISA. As células foram estimuladas com antígeno homólogo. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são a média de dois experimentos independentes. NI – Não infectado.

4.06 — Avaliação do perfil de células mielóides nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis*.

O primeiro evento advindo com a inflamação é o recrutamento de células circulantes capazes de combater ou controlar o dano, bem como, caso necessário, desencadear a resposta imunológica adaptativa. Dentre as primeiras células recrutadas, encontram-se os neutrófilos e monócitos, ambos de linhagem mielóide que se ligam às moléculas de adesão intercelular (ICAM) através do CD11b. O CD11b é uma proteína da família das integrinas, cujas funções estão relacionadas à adesão das células mielóides às células endoteliais, permitindo o extravasamento destas células para os sítios inflamatórios (DIAMOND et al., 1990; SANCHEZ-MADRID et al., 1983). O ambiente inflamatório influencia a ativação destas células, bem como o patógeno ou dano em questão. Dada a importância imunológica das células mielóides, realizou-se a técnica de citometria de fluxo a fim de verificar sua presença ao longo da infecção.

Dentre as células CD11b⁺ destacam-se três subpopulações, os neutrófilos (Ly6G⁺); as células Ly6C⁻ (Ly6C^{-/low}), compostas por monócitos Ly6C⁻ (Ly6C^{-/low}) que produzem IL-10 ao fagocitar patógenos ou célula mortas e estão envolvidos no processo de reparo tecidual (Monócitos não inflamatórios), as células dendríticas (Ly6C^{-/low} MHC II⁺ CD11c⁺) e os macrófagos (Ly6C^{-/low} MHC II⁺ F4/80⁺) ambos já diferenciados; e, por fim, os monócitos Ly6C⁺ (Ly6C^{int/high}) (inflamatórios) que apresentam atividades microbicida, secretam citocinas pró-inflamatórias e são estes os principais monócitos recrutados para o local de infecção. Ainda, a população de monócitos Ly6C⁺ pode ser subdividida em monócitos não comprometidos com a diferenciação celular, aqueles CD11c⁻ e MHC II⁻, monócitos CD11c⁺ e MHC II⁺, que se diferenciariam em células dendríticas (Mon-DC) e monócitos CD11c⁻ e MHC II⁺, os quais se diferenciariam em macrófagos (Mon-Mφ) (Figura 8) (INGERSOLL et al., 2011; YANG et al., 2014).

Observou-se aumento gradativo no número de células CD11b⁺ em ambos os grupos ao longo da infecção, com maior o número de células nos camundongos selvagens ao tempo de três semanas, menor na quinta semana e iguais na sétima semana após a infecção (Figura 9A).

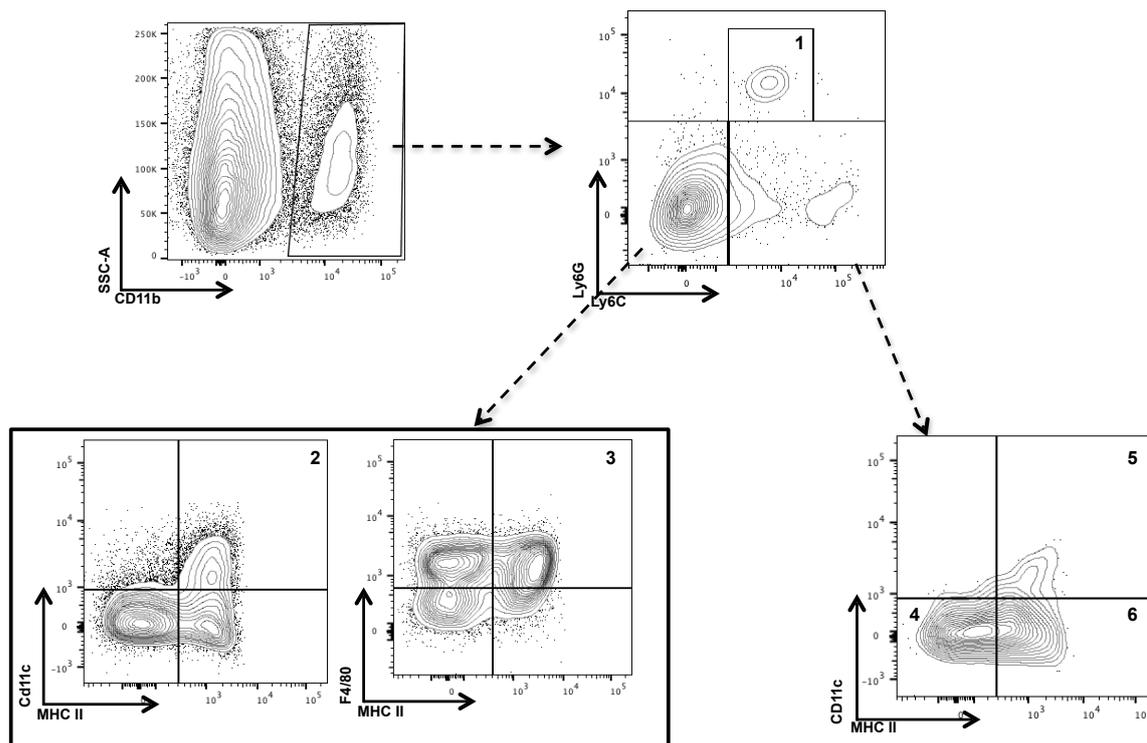


Figura 8. Dot plots com as estratégias de gates das células CD11b⁺ das orelhas dos camundongos. As subpopulações de células CD11b⁺ das orelhas dos camundongos foram analisadas. (1) Neutrófilos são as células CD11b⁺ Ly6G⁺. Dentro da população celular Ly6C⁻, observaram-se as células dendríticas (2), aquelas CD11c⁺ MHC II⁺ e os macrófagos (3), células CD11c⁻ MHC II⁺. Dentro da população Ly6C⁺, observaram-se as subpopulações de monócitos não comprometidos com a diferenciação (4), monócitos CD11c⁻ MHC II⁻, monócitos se diferenciando em células dendríticas (5), CD11c⁺ MHC II⁺, e monócitos se diferenciando em macrófagos (6), CD11c⁻ MHC II⁺.

Com a análise das subpopulações de células CD11b⁺ observou-se um aumento na frequência de monócitos Ly6C⁺ ao longo da infecção, alcançado o pico nas semanas três e cinco após o inóculo parasitário, sem diferenças entre os grupos experimentais (Figura 9C). A proporção de células Ly6C⁻, ao contrário da anterior, decresce com o decorrer da infecção a partir da terceira semana (Figura 9E). A frequência de neutrófilos foi observada em curva ascendente ao longo da infecção, sendo maior nos camundongos selvagens somente na terceira semana em relação aos TNFR1^{-/-} (Figura 9G).

Quanto ao perfil de células CD11b⁺ infectadas observou-se, nos animais selvagens, maior taxa de infecção na primeira e terceira semana de experimento do que estas mesmas células nos animais deficientes para TNFR1, diferença não observada nos dois últimos tempos (Figura 9B). Também, os resultados indicaram maior frequência de monócitos Ly6C⁺ infectados em camundongos selvagens na primeira semana experimental que em camundongos TNFR1^{-/-}, com posterior decréscimo nas demais semanas (Figura 9D). A proporção de células Ly6C⁻ infectadas aumentou nos dois últimos tempos de infecção, não

sendo observada diferenças entre os grupos (Figura 9F). Os neutrófilos se mostraram infectados em maior proporção nos animais selvagens na primeira semana experimental, contudo foram infectados igualmente em ambos os animais nos demais tempos (Figura 9H).

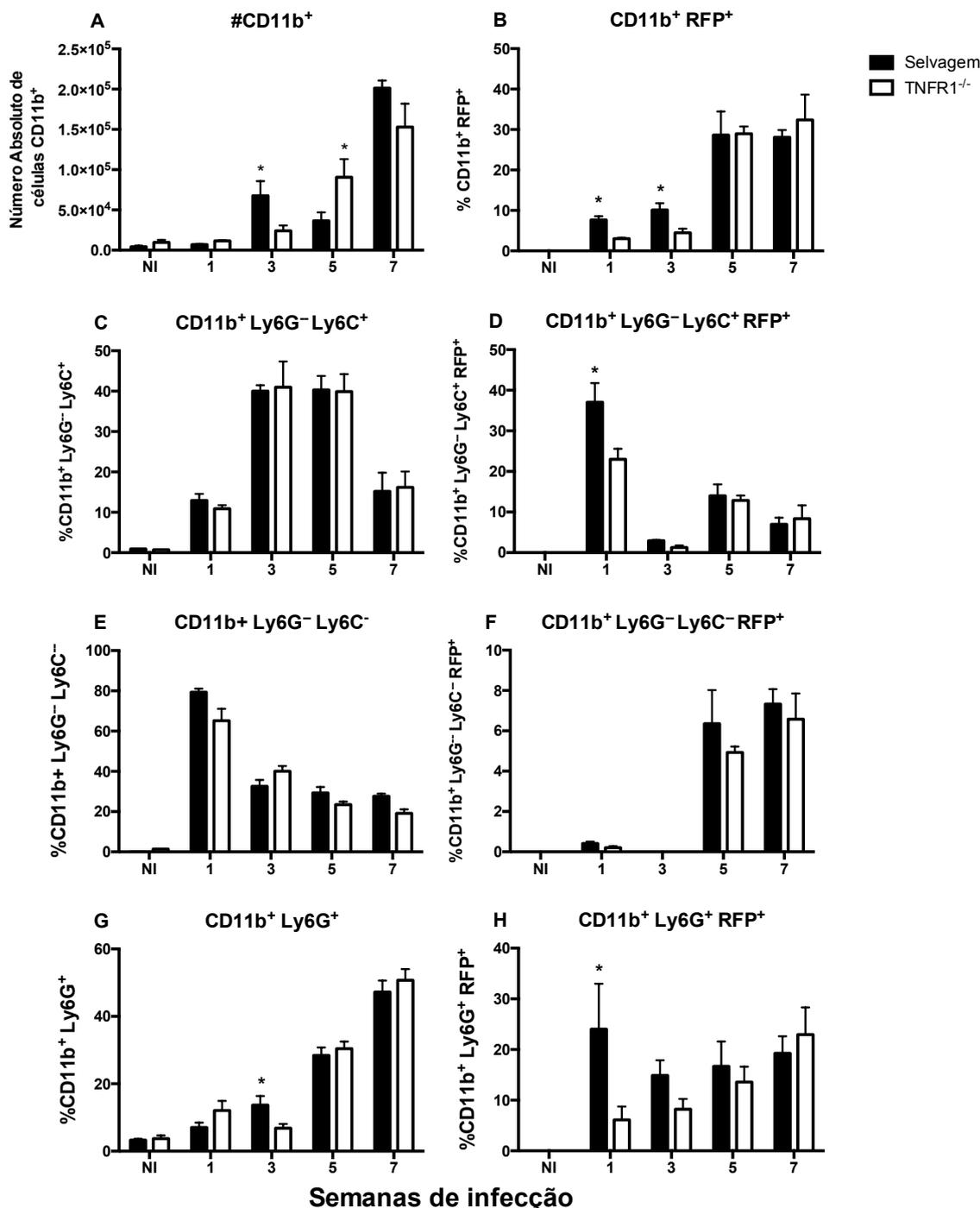


Figura 9. Avaliação do perfil de células da imunidade inata nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis*. Camundongos (cinco por grupo) foram infectados na orelha com 1x10⁴ formas promastigotas de *L. amazonensis* e, nos tempos indicados, as lesões foram coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. (A) Número absoluto de células CD11b⁺. Dentro do grupo de células CD11b⁺, avaliaram-se as porcentagens destas células infectadas (B), de monócitos Ly6C^{int/high} totais (C), de células Ly6C^{-/low} totais (E) e de neutrófilos (Ly6G⁺) totais (G). Também verificou-se a porcentagem de monócitos Ly6C^{int/high} infectados (D), de células Ly6C^{-/low} infectados (F) e de neutrófilos infectados (H) dentro das células CD11b⁺ totais. (* p<0,05). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são a média de três experimentos independentes. NI – Não infectado.

Os monócitos se diferenciam em células dendríticas ou macrófagos. As primeiras são as principais células apresentadoras de antígeno, importantes para o desenvolvimento da resposta imune adquirida. As segundas são as principais células fagocíticas, responsáveis pela eliminação de parasitos. Para melhor elucidar a diferenciação monocítica na infecção por *L. amazonensis*, esta população Ly6C⁺ foi marcada para MHC II, presentes em células dendríticas e macrófagos, e CD11c, presente apenas em células dendríticas, assim observou-se o comprometimento celular dos monócitos durante esta infecção.

Observou-se aumento da população de monócitos Ly6C⁺ com a infecção, sendo maior na quinta semana nos animais TNFR1^{-/-} em comparação aos selvagens e iguais nos demais tempos (Figura 10A). Ao longo do experimento não se observou diferença em relação à diferenciação destes monócitos entre os dois grupos murinos. Conforme o esperado, a inflamação oriunda da infecção por *L. amazonensis* aumenta a porcentagem de monócitos que estão se diferenciando em macrófagos (Figura 10C) e em células dendríticas (Figura 10E). A porcentagem de monócitos ainda não comprometidos com a diferenciação também foi analisada. Esta se mostrou em curva descendente, tanto nos camundongos selvagens quanto nos animais TNFR1^{-/-}, sem diferenças entre ambos (Figura 10G).

Quando analisadas a porcentagem de monócitos Ly6C⁺ infectados, observou-se uma maior frequência destas células na primeira semana experimental nos animais selvagens, contudo, nas demais semanas, as frequências foram similares; menores do que na semana inicial (Figura 10B). A diferença na semana inicial da infecção foi devida principalmente à taxa de infecção de monócitos Ly6C⁺ não comprometidos com a diferenciação celular que, tanto na primeira semana quanto na terceira semana de infecção, foi vista em maior frequência nos camundongos selvagens (Figura 10H). As taxas de monócitos infectados que se diferenciariam tanto em macrófagos quanto em células dendríticas aumentou progressivamente ao longo da infecção (Figuras 10D e 10F), porém não foi observada diferença entre as linhagens murinas em nenhum dos tempos estudado.

Concomitantemente, observou-se que a população de monócitos Ly6C⁻ aumenta gradativamente no órgão lesado ao longo da infecção (Figura 11A). Estas células apresentam frequências maiores de infecção nos dois últimos tempos experimentais (Figura 10B). Além de monócitos, a população celular Ly6C⁻ engloba as células dendríticas e macrófagos ambos já diferenciados, cujas frequências foram analisadas.

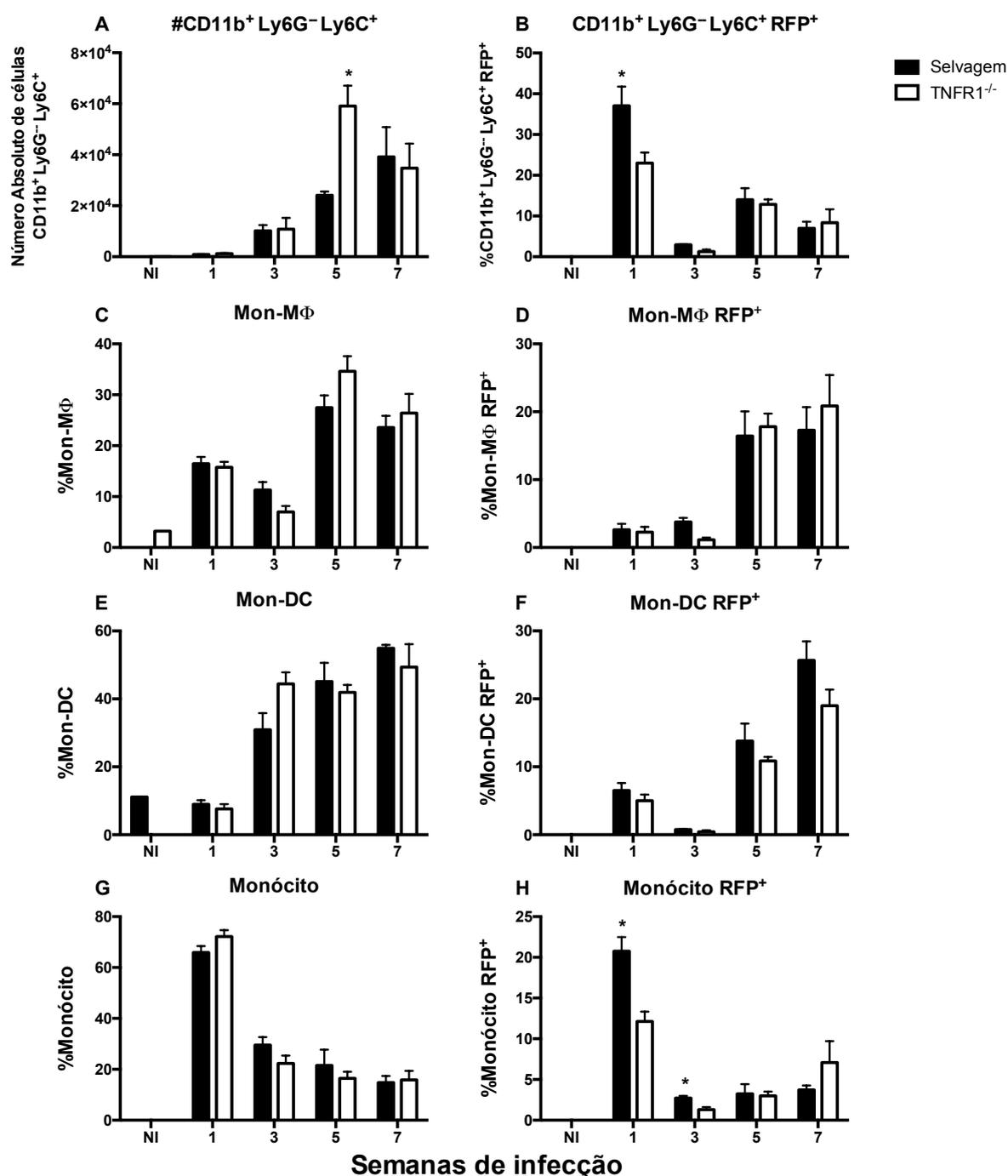


Figura 10. Avaliação do perfil da subpopulação de monócitos Ly6C⁺ nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis*. Camundongos (cinco por grupo) foram infectados na orelha com 1x10⁴ formas promastigotas de *L. amazonensis* e, nos tempos indicados, as lesões foram coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. (A) Número absoluto de monócitos Ly6C^{int/high}. Dentro do grupo de monócitos Ly6C^{int/high}, avaliaram-se as porcentagens destas células infectadas (B), monócitos Ly6C^{int/high} se diferenciando em macrófagos totais (C), e infectados (D) monócitos Ly6C^{int/high} se diferenciando em células dendríticas totais (E) e infectados (F). Também verificou-se a porcentagem de monócitos Ly6C^{int/high} totais ainda não comprometidos com diferenciação (G), e infectados (H). (* p<0,05). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são a média de três experimentos independentes. NI – Não infectado.

O número absoluto de macrófagos aumentou com o decorrer da infecção, sendo maior ao tempo de três semanas de experimento nos camundongos selvagens do que nos deficientes para TNFR1. Entretanto, na quinta semana experimental, camundongos TNFR1^{-/-} apresentaram quantidade maior de macrófagos que os selvagens, invertendo-se novamente a proporção na última semana de infecção (Figura 11C). Apesar da diferença no número de macrófagos, as frequências destas células foram similares entre os grupos em taxas relativamente constantes (Figura 11E). Os macrófagos se apresentaram em grande proporção infectados, principalmente nos dois últimos tempos de infecção, sendo que na quinta semana, camundongos TNFR1^{-/-} apresentaram maior índice de infecção que os selvagens (Figura 11F). A taxa de células dendríticas teve em aumento progressivo até a quinta semana após o inóculo (Figura 11D).

Estes dados sugerem que a infecção por *L. amazonensis* desencadeia o recrutamento de células mielóides para o sítio de infecção, tanto monócitos quanto neutrófilos, seja para o combate ao patógeno, seja para repovoamento de células dendríticas e macrófagos residentes do tecido. No tempo inicial, as principais células encontradas na lesão são Ly6C⁻ residentes. Na terceira semana de infecção a diferença encontrada no número absoluto de células mielóides advém da população de neutrófilos, uma vez que, entre as populações celulares CD11b⁺ estudadas, foram os únicos que se apresentaram em maior porcentagem nos camundongos selvagens em relação aos TNFR1^{-/-}. Quanto a diferença no número absoluto de células CD11b⁺ observada no tempo de cinco semanas de infecção, nenhuma diferença foi observada entre suas subpopulações, contudo o número de células mielóides recrutadas para o sítio de infecção foi maior nos camundongos TNFR1^{-/-} que nos animais selvagens.

Ainda, nos tempo intermediários, as células Ly6C⁻ tiveram a frequência diminuída, enquanto aumentou a porcentagem de monócitos Ly6C⁺. Na terceira semana de infecção, observou-se que os monócitos Ly6C⁺ que se diferenciariam em células dendríticas estavam em maior proporção do que os demais monócitos Ly6C⁺, mas, na quinta semana, as porcentagens dos monócitos precursores de macrófagos e de células dendríticas se igualaram. Entretanto, no tempo final, a células presente em maior frequência são os neutrófilos, mostrando assim, a alternância do perfil celular ao longo da infecção.

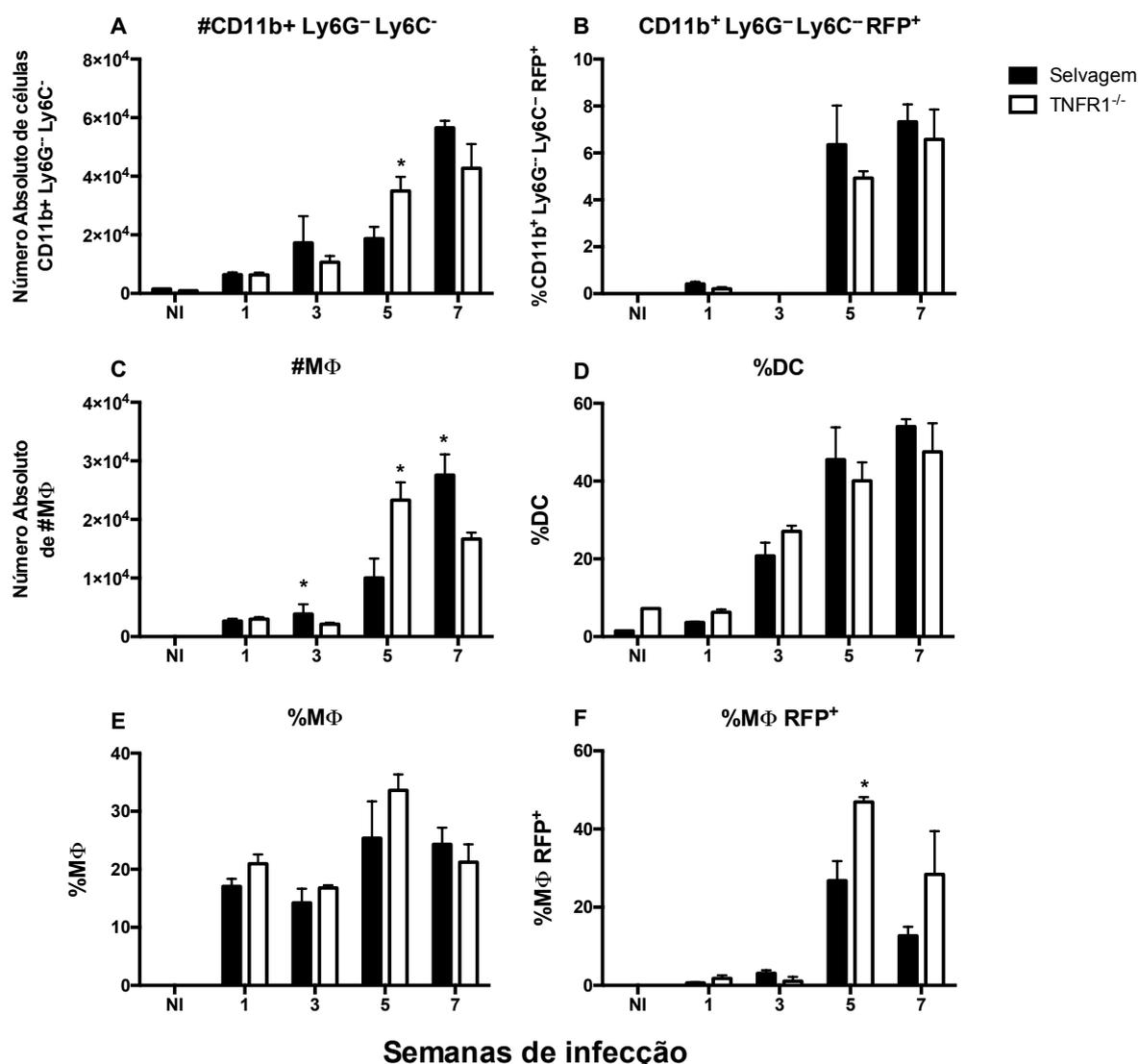


Figura 11. Avaliação do perfil da subpopulação de células Ly6C^{-low} nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis*. Camundongos (cinco por grupo) foram infectados na orelha com 1×10^4 formas promastigotas de *L. amazonensis* e, nos tempos indicados, as lesões foram coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. (A) Número absoluto de células Ly6C^{-low}. Dentro do grupo de células Ly6C^{-low}, avaliou-se as porcentagens destas células infectadas (B), número total de macrófagos (C); e porcentagem de células dendríticas (D) e macrófagos já diferenciados (E), além da porcentagem de macrófagos infectados (F). (* $p < 0,05$). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são a média de três experimentos independentes. NI – Não infectado.

O perfil das células mielóides infectadas também se altera com a infecção, entretanto diferentemente das células CD11b⁺ totais. Durante as duas primeiras semanas de infecção, a taxa de células CD11b⁺ de camundongos selvagens foi maior que dos camundongos deficientes de TNFR1. Na primeira semana, essa diferença deveu-se majoritariamente a população Ly6C⁺, sobretudo aos monócitos ainda não comprometidos com a diferenciação celular. Embora o número de monócitos ainda não comprometidos seja alto nos dois grupos, foi maior entre os camundongos selvagens. Já a diferença no número de células mielóides encontradas na quinta semana não foi explicada pelas subpopulações de monócitos. Embora

possa haver maior frequência de monócitos infectados ainda não comprometidos com a diferenciação celular entre os camundongos selvagens, a frequência de monócitos Ly6C⁺, células Ly6C⁻ e neutrófilos foram similares entre os grupos experimentais.

Assim, nos tempos iniciais examinados por nós, as células mielóides infectadas pela *L. amazonensis* são os monócitos, sobretudo aqueles ainda não comprometidos com a diferenciação celular, e os neutrófilos, mas, nos tempos finais da infecção, as principais células infectadas são os macrófagos, acompanhados pelos neutrófilos. Ainda, os animais selvagens recrutam células mielóides em maior número do que os animais TNFR1^{-/-} nas primeiras semanas, fato que pode explicar a lesão maior nestes animais na terceira semana. O mesmo não ocorre na quinta semana, quando o número de células mielóides é maior nos camundongos TNFR1^{-/-}, mas a lesão é igual entre os grupos.

4.07 — Análise da sinalização de morte celular entre as células mielóides na orelha de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados com *L. amazonensis*.

Um dos fatores consideráveis para o controle do processo inflamatório é a apoptose; a morte celular programada. Este processo é fisiológico e crucial para o próprio desenvolvimento e funcionamento do sistema imune. Em particular, ao término das respostas imunes, através da apoptose, ocorre a eliminação de células não mais necessárias após a resolução de uma infecção, ocasionando supressão da inflamação. Contudo, quando células em apoptose não são fagocitadas, elas se tornam células em necrose pós-apoptótica, um tipo de necrose secundária ou apoptose tardia, cuja capacidade inflamatória é reduzida em comparação àquelas em necrose primária (MAGNER; TOMASI, 2005; SCAFFIDI; MISTELI; BIANCHI, 2002). Como um dos domínios do TNFR1 é um domínio de morte, o qual pode direcionar a sinalização intracelular à apoptose, observou-se o tipo de sinalização de morte celular desencadeada pela infecção por *L. amazonensis* na população de células mielóides.

A porcentagem de células CD11b⁺Anexina⁻7AAD⁻, ou seja, sem marcadores de sinalização para morte celular, diminui com a infecção até a quinta semana experimental em ambos os grupos murinos. Importa ressaltar, os animais TNFR1^{-/-} não infectados e na primeira semana a taxa destas células é maior do que os animais selvagens, diferença que não persiste ao longo dos demais tempos (Figura 12A). Já a porcentagem de células CD11b⁺ sem marcadores de morte celular infectadas com *L. amazonensis* é maior em ambos os grupos ao tempo de sete semanas (Figura 12B). Assim, embora a infecção por parasito aumente a sinalização de morte celular na população CD11b⁺, a subpopulação destas células não marcada para morte celular tende a ser mais infectada por *L. amazonensis* nos tempos mais tardios da infecção.

Verificou-se também a cinética de células mielóides marcadas para necrose (CD11b⁺Anexina⁻7AAD⁺). Tanto os animais selvagens não infectados quanto os infectados aos tempos de três e sete semanas apresentaram maior taxa de células em necrose do que aqueles deficientes para o receptor 1 do TNF. Apenas na quinta semana o contrário foi observado, com a frequência de células necróticas menor nos animais selvagens (Figura 12C). Embora a frequência geral de células CD11b⁺ necróticas aumente, estas mesmas células

marcadas para o parasito têm a frequência diminuída, ou seja, a indução de necrose ocorre em maior grau nas células mielóides não infectadas por *L. amazonensis* (Figura 12D).

As células mielóides marcadas para apoptose ($CD11b^+Anexina^+7AAD^-$) também foram observadas. A porcentagem destas células entre os animais não infectados é maior nos camundongos selvagens. Entretanto, nos tempos de três e sete semanas é maior nos animais $TNFR1^{-/-}$. Enfim, de modo geral ocorre o aumento da frequência de células apoptóticas entre os animais $TNFR1^{-/-}$ ao longo da infecção, enquanto nos animais selvagens a proporção se mantém em níveis similares (Figura 12E). Células mielóides infectadas apoptóticas aumentam em proporção com o transcorrer da infecção, em ambos os grupos (Figura 12F). Desta maneira, estes dados sugerem que a infecção aumenta, a partir da quinta semana, a apoptose nos animais deficientes para o $TNFR1$ justamente nas células mielóides que interiorizam o parasito, mas não nos tempos anteriores. Embora nos camundongos selvagens a taxa de apoptose aumente nos tempos finais entre as células mielóides infectadas, de modo geral, permanece constante ao longo de todo o experimento entre as células mielóides.

Outro evento considerável durante a inflamação é a apoptose tardia, caracterizada pela presença de marcadores tanto para apoptose quanto para necrose ($CD11b^+Anexina^+7AAD^+$). Estas células não suprimem a infecção, ao contrário, a mantêm, mesmo que em potencial menor do que aquelas marcadas exclusivamente para necrose. Observou-se que a frequência desta população celular aumenta progressivamente ao longo da infecção até o tempo de cinco semanas, contudo retrocede ligeiramente no tempo final do experimento. Nos animais selvagens a frequência destas células é maior que nos animais $TNFR1^{-/-}$ no grupo não infectado e nos tempos de uma e cinco semanas de infecção, nos demais tempos não se observou diferenças (Figura 12G). Já a população destas células marcadas para *L. amazonensis* mostrou um perfil de variação diferente. Exceto no tempo de três semanas, em que foi menor que os demais, esta população se apresentou em níveis similares no decurso da infecção nos camundongos deficientes de $TNFR1$. Para os animais selvagens, esta população atinge a maior frequência ao tempo experimental de cinco semanas, maior inclusive que dos animais do outro grupo. Contudo, nos demais tempo os valores são mais baixos e iguais entre os grupos (Figura 12H).

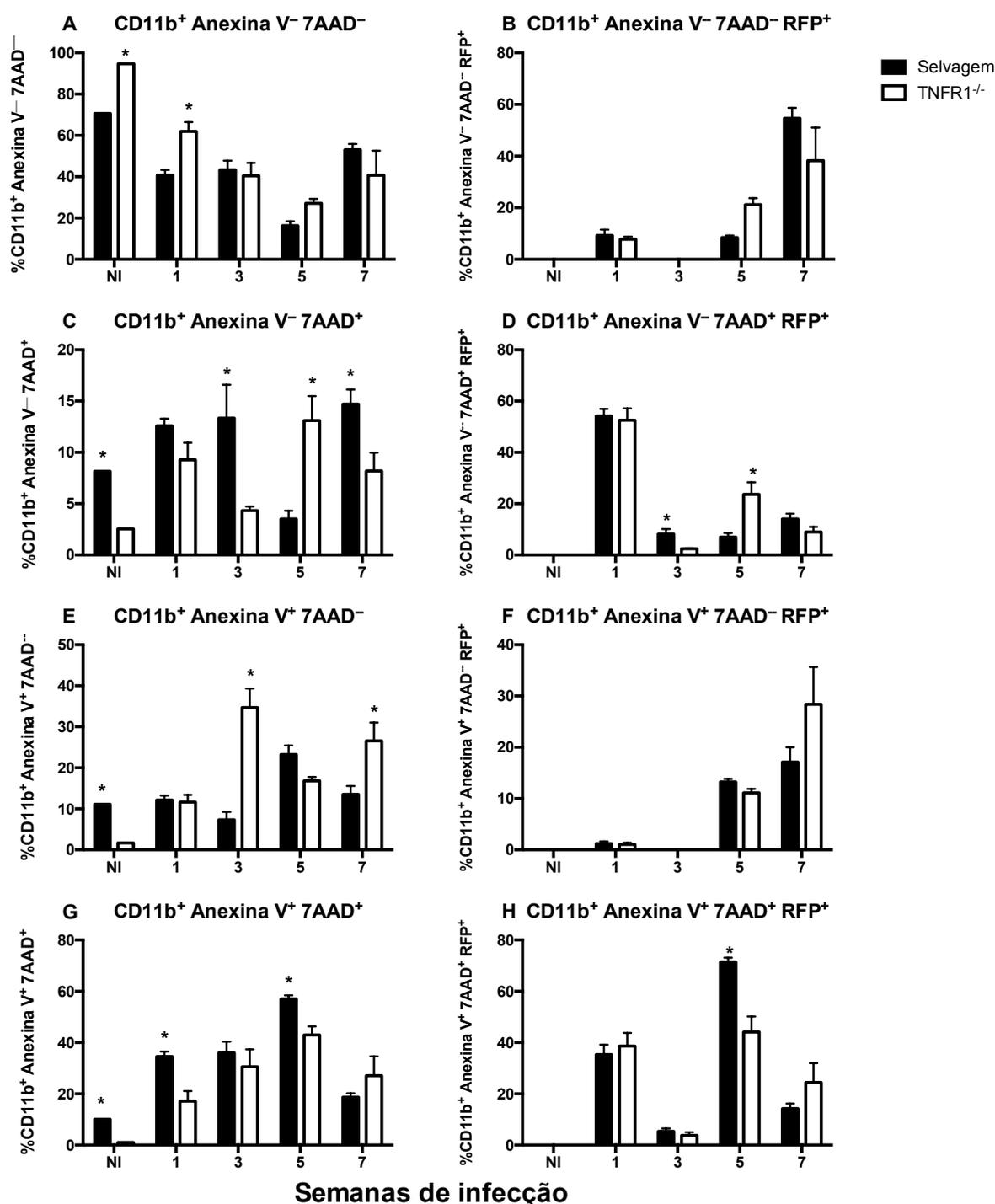


Figura 12. Avaliação da sinalização de morte celular entre as células CD11b⁺ nas orelhas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis*. Camundongos (cinco por grupo) foram infectados na orelha com 1x10⁴ formas promastigotas de *L. amazonensis* e, nos tempos indicados, as lesões foram coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. (A) Porcentagem de células CD11b⁺ vivas totais e (B) infectadas. Avaliaram-se as porcentagens de células CD11b⁺ necróticas (C), porcentagens de células CD11b⁺ apoptóticas (E), e porcentagens de células CD11b⁺ duplo positivas (G). Avaliou-se também a sinalização de morte entre as células CD11b⁺ infectadas. Porcentagem de células CD11b⁺ infectadas vivas (B), porcentagem de células CD11b⁺ infectadas em necrose (D), em apoptose (F) e duplo positivas (H). (* p<0,05). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são a média de três experimentos independentes. NI – Não infectado.

Dessarte, estes dados sugerem que a infecção por *L. amazonensis* influencia na sinalização de morte celular, não exclusivamente nas células infectadas, mas nas células mielóides em geral. Há uma tendência de células não marcadas para sinalização de morte celular diminuir ao longo da infecção. Ainda, as células marcadas para necrose foram observadas em maior frequência nos camundongos selvagens ao tempo de três semanas, diminuindo na semana seguinte e, de maneira contrária, aumentando nos animais TNFR1^{-/-}, fato que pode estar associado à perda de tecido ocorrer anteriormente neste grupo. Além do mais, pode-se inferir que esta infecção inibe a apoptose via TNFR1 e promove a ativação de outra via de morte celular programada, pois as taxas de apoptose nos camundongos selvagens diminuem na terceira semana, enquanto aumentam nos animais TNFR1^{-/-}. Ao tempo de cinco semanas, elas se igualam, ou seja, aumentam nos camundongos selvagens e diminuem nos deficientes de TNFR1, Porém a taxa de células em apoptose volta a diminuir nos animais selvagens e a aumentar nos TNFR1^{-/-}. Interessantemente, durante a infecção, as células em apoptose tardia são as mais frequentes, excetuando o tempo de sete semanas. Isto indica que aquelas células que entraram em apoptose também não foram eliminadas, permanecendo no local e contribuindo com a inflamação.

Coevolutivamente, parasitos do gênero *Leishmania* se adaptaram a invadir silenciosamente diferentes tipos celulares para, assim, evadir o sistema imunológico do hospedeiro. Predominantemente células mielóides, tais como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, abrigam a forma intracelular obrigatória destes parasitos. Entretanto, os parasitos interagem diferentemente com estas células (BOGDAN; DONHAUSER; DÖRING, 2000). Formas promastigotas de *Leishmania* aderem aos fagócitos mononucleares através de interação via receptores do sistema do complemento e são capturadas pelo mecanismo de fagocitose. Uma vez interiorizada, o fagossoma se funde com o lisossoma para formar o fagolisossoma, organela dentro da qual as promastigotas sofrem alterações bioquímicas e metabólicas, resultando na forma parasitária intracelular obrigatória — amastigota. As formas amastigotas evadem dos macrófagos e são capturadas por células dendríticas e fibroblastos, bem como macrófagos (HANDMAN; BULLEN, 2002). Outra célula importante na captura e eliminação de patógenos são os neutrófilos, principais células de defesa no início de infecções. Neutrófilos são capazes de fagocitar e eliminar uma diversidade de patógenos quando opsonizados, contudo, em casos de fagocitose de organismos invasores não

opsonizados, ou quando estas células tem seus mecanismos efetores silenciados, os neutrófilos favorecem a infecção (VAN ZANDBERGEN et al., 2006). Assim, a fim de verificar a indução de morte celular durante a interação entre o parasito e as principais células envolvidas na infecção, na ausência ou presença do receptor 1 de TNF, observou-se o tipo de sinalização de morte celular desencadeada durante a infecção intradérmica por *L. amazonensis* na população de macrófagos (Figura 13) e neutrófilos (Figura 14).

A porcentagem de macrófagos totais sem marcadores de morte celular diminuiu ao longo da infecção tanto nos camundongos selvagens quanto nos TNFR1^{-/-}, sendo mais tardia a queda nestes últimos camundongos. Inclusive, maior frequência destas células sem marcação para morte celular foi observada no tempo de cinco semanas nos camundongos deficientes de TNFR1 em relação aos selvagens (Figura 13A). Macrófagos necróticos ocorreram em maior frequência nos camundongos TNFR1^{-/-} no tempo de cinco semanas do que nos camundongos selvagens. A porcentagem de macrófagos em necrose manteve-se relativamente em níveis baixos, aumentando somente no último tempo experimental (Figura 13C). Já os macrófagos marcados para apoptose apresentaram a frequência constante, excetuando-se o tempo de três semanas, quando os camundongos deficientes de TNFR1 apresentaram alta taxa de macrófagos apoptóticos (Figura 13E). Durante todo o tempo experimental, houve predominância de macrófagos em apoptose tardia, ocorrendo em níveis similares nos dois grupos. Exceto na quinta semana, quando os camundongos TNFR1^{-/-} tiveram a porcentagem de macrófagos em apoptose tardia menor que os selvagens (Figura 13G).

Em relação aos macrófagos infectados, a cinética destas células quanto à marcação para morte celular mostrou-se diferente daquela dos macrófagos totais. A taxa de macrófagos infectados sem nenhum marcador para morte celular aumenta nos tempos finais de infecção, sendo que na quinta semana é maior nos camundongos TNFR1^{-/-} do que nos selvagens, não persistindo essa diferença no tempo final (Figura 13B). Já a porcentagem de macrófagos infectados em necrose tende a diminuir ao longo da infecção em ambos os grupo. Durante a terceira semana de experimento, essa população celular foi observada maior nos animais selvagens, invertendo na quinta semana (Figura 13D). Os macrófagos infectados em apoptose foram observados a partir da quinta semana, sendo mais frequentes na sétima semana de experimento, sem diferenças entre os grupos (Figura 13F). Quanto aos macrófagos infectados em apoptose tardia, observou-se, nos camundongos selvagens, uma leve curva ascendente na

frequência destas células, contudo com uma queda acentuada no último período experimental. Já entre os camundongos deficientes de TNFR1, essa tendência acompanha, porém com alterações menos bruscas, sendo observada em maior frequência nos camundongos selvagens, ao tempo de cinco semanas de infecção, em relação os TNFR1^{-/-} (Figura 13H).

Os neutrófilos também foram analisados quanto à sinalização de morte celular ao longo da infecção por *L. amazonensis*. A frequência de neutrófilos não marcados tanto para apoptose quanto para necrose foi observada em taxa decrescente até a quinta semana, recrudescendo na sétima semana de infecção para ambos grupos (Figura 14A). Já os neutrófilos necróticos foram observados em níveis similares no decorso da infecção nos dois grupos experimentais, sem diferenças entre eles (Figura 14C). A população de neutrófilos em apoptose observada mostrou uma taxa ascendente até a quinta semana de infecção, diminuindo na sétima semana entre os camundongos selvagens e se mantendo estável nos TNFR1^{-/-} (Figura 14E). Semelhante aos neutrófilos apoptóticos, a taxa de neutrófilos em apoptose tardia observada mostrou um aumento ao longo do experimento até a quinta semana de infecção, contudo na última semana essas taxas foram diminuídas em ambos os grupos (Figura 14G).

Em relação à população de neutrófilos infectados, observou-se que a taxa destas células não marcada para morte celular aumenta igualmente entre o dois grupos de camundongos no decorrer da infecção (Figura 14B). Contudo, os neutrófilos infectados em necrose decaem percentualmente ao longo da infecção (Figura 14D). Os neutrófilos infectados em apoptose se apresentam em taxas maiores nos dois últimos tempos experimentais, sem diferenças entre as linhagens murinas estudadas (Figura 14F). Já os neutrófilos infectados em apoptose tardia foram observados em altas taxas nas semanas um e cinco e em menor frequência nas semanas três e sete, contudo sem diferenças entre os dois grupos de camundongos (Figura 14H).

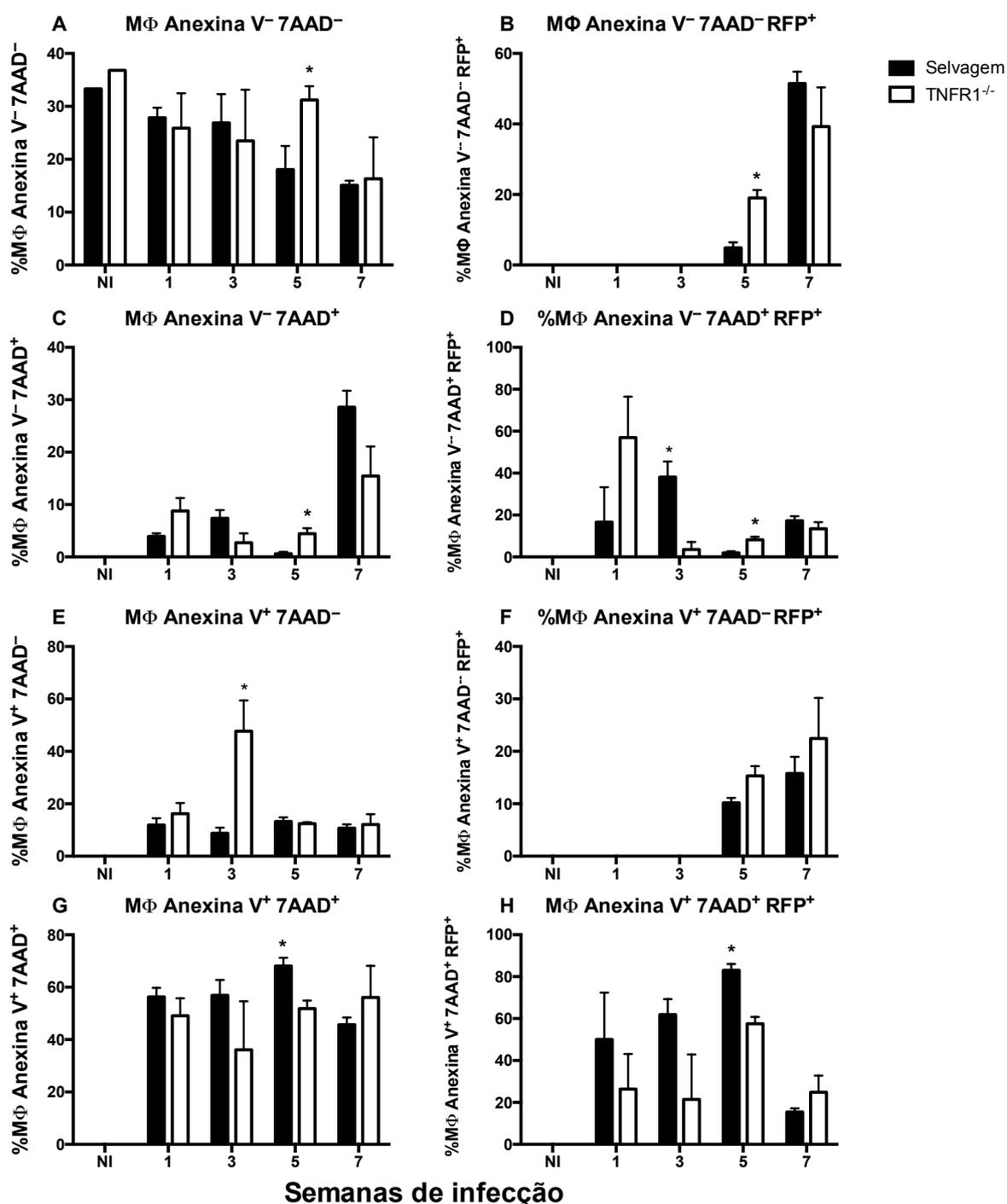


Figura 13. Avaliação da sinalização de morte celular em macrófagos das orelhas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis*. Camundongos (cinco por grupo) foram infectados na orelha com 1x10⁴ formas promastigotas de *L. amazonensis* e, nos tempos indicados, as lesões foram coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. (A) Porcentagem de macrófagos totais vivos e (B) infectados; (C) macrófagos totais em necrose e (D) infectados; (E) macrófagos totais apoptóticos e (F) infectados; (G) macrófagos totais duplos positivos e (H) infectados. (* p<0,05). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são a média de três experimentos independentes. NI – Não infectado.

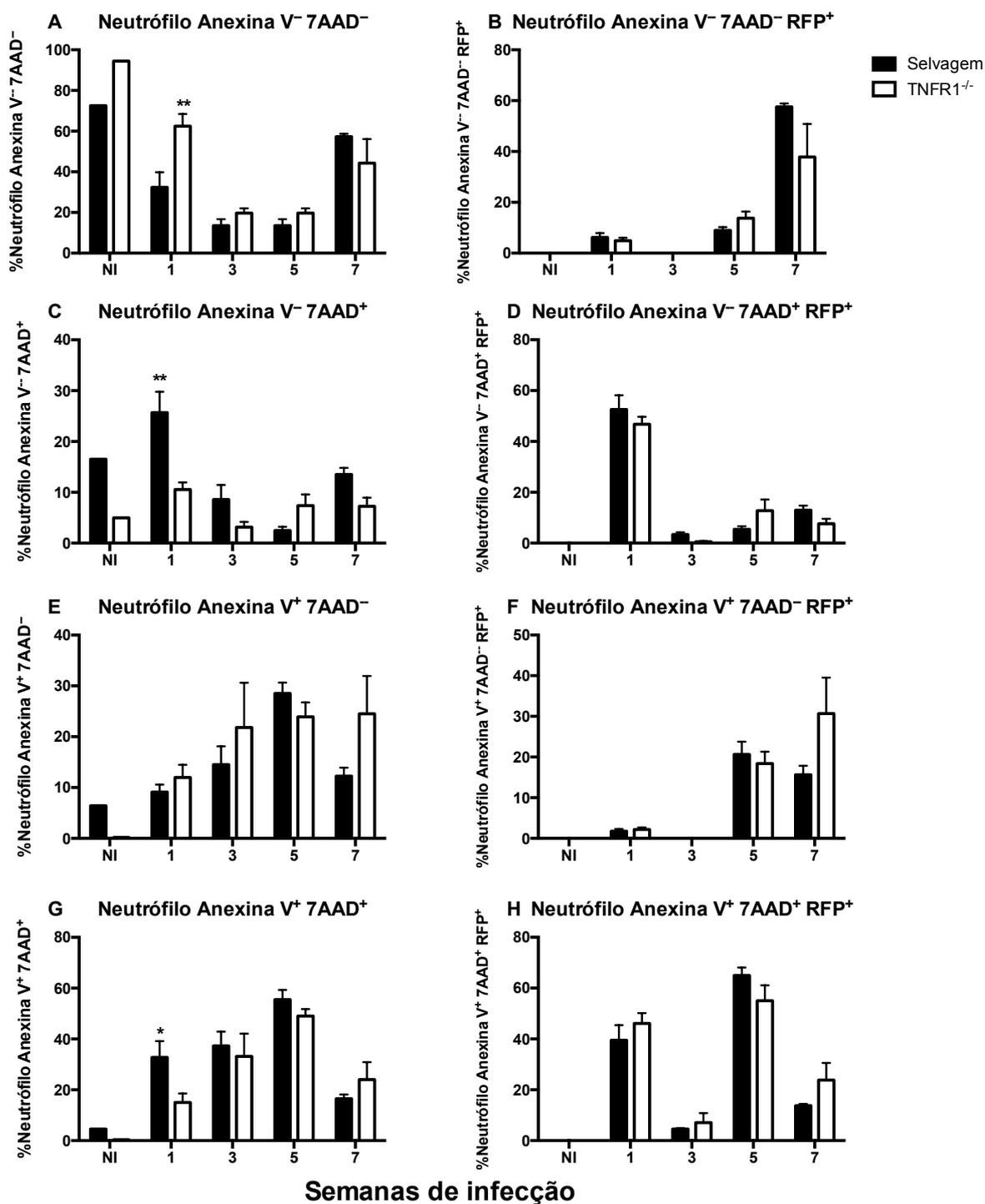


Figura 14. Avaliação da sinalização de morte celular em neutrófilos das orelhas de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis*. Camundongos (cinco por grupo) foram infectados na orelha com 1×10^4 formas promastigotas de *L. amazonensis* e, nos tempos indicados, as lesões foram coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. Porcentagem de neutrófilos totais vivos e (A) infectados (B); neutrófilos totais em necrose (C) e infectados (D); neutrófilos totais apoptóticos (E) e infectados (F); neutrófilos totais duplos positivos (G) e infectados (H). (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são a média de três experimentos independentes. NI – Não infectado.

Estes dados sugerem, coletivamente, que o percentual de células mielóides sem marcadores para morte celular diminui até a quinta semana de infecção e, na sétima semana, aumenta novamente tanto nos camundongos selvagens quanto nos TNFR1^{-/-}. Este aumento na taxa destas células no tempo final do experimento é devido principalmente à população de neutrófilos, uma vez que o recrutamento das células não marcadas para morte celular foi observado apenas neste tipo celular. A taxa de células mielóides sem marcadores para morte celular na primeira semana de infecção foi maior entre os camundongos deficientes de TNFR1, fato que pode ser associado aos neutrófilos também, embora não se tenha observado diferenças na taxa destas células entre os grupos neste tempo, o número absoluto de neutrófilos é maior que o de macrófagos. Então, quando se comparam as células mielóides totais, a diferença é evidenciada entre os grupos, pois o grande número de neutrófilos é o que sustenta essa diferença já que a taxa de macrófagos sem marcadores de morte celular é igual entre as linhagens neste tempo.

Na quinta semana, a taxa menor de necrose nas células mielóides de camundongos selvagens parece estar associada aos macrófagos. Neste tempo, ainda, as taxas destas células em apoptose são similares, tanto de macrófagos quanto em neutrófilos, enquanto as células mielóides dos camundongos selvagens apresentam maior taxa de apoptose tardia, principalmente os macrófagos. Estes fatos que evidenciam melhor regulação da inflamação pelos camundongos selvagens, logo na semana experimental em que as lesões apresentaram mesmo tamanho. Em relação à sétima semana, os camundongos TNFR1^{-/-} já apresentam grande perda do tecido da orelha, embora apresentem maior taxa de células apoptóticas do que os selvagens, provavelmente relacionada aos neutrófilos. Além disso, as taxas de necrose entre as células mielóides dos camundongos selvagens recrudescem, sendo observada massiva perda de tecido também entre esses camundongos, nas semanas posteriores. Apesar das taxas de células mielóides necróticas já haverem sido tão altas tanto na terceira quanto na sétima semanas de infecção, o aporte celular no tempo final é maior, sugerindo que os camundongos selvagens não consigam controlar tão elevado número de células em necrose na orelha.

Já a presença do parasito no interior das células mielóides altera igualmente o perfil de macrófagos e neutrófilos quanto aos marcadores de morte celular, tanto entre os camundongos selvagens quanto entre os TNFR1^{-/-}. Em ambos os grupos observou-se aumento da taxa de células infectadas não marcadas para morte celular ao longo da infecção. Observou-se

também uma diminuição da taxa de células mielóides infectadas em necrose, enquanto aumenta-se a taxa de células em apoptose nos tempo finais nas duas linhagens murinas. Já a flutuação da população de células mielóide infectadas em apoptose tardia é diferente entre neutrófilos e macrófagos. Os neutrófilos infectados apresentaram alta taxa de apoptose tardia nos tempo de uma e três semanas, já os macrófagos aumentam a taxa continuamente até a quinta semana, decaindo na sétima semana de infecção, isto tanto para a linhagem murina selvagem quanto para linhagem deficiente de TNFR1.

4.08 — Análise da da população linfocítica na orelha de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados com *L. amazonensis*.

Linfócitos são outras células que migram para o sítio de infecção, cuja importância deve-se considerar. Linfócitos T auxiliares, tanto os CD4⁺ quanto os CD8⁺, e linfócitos B são considerados fatores de patogênese (SOONG et al., 1997; WANASEN; XIN; SOONG, 2008). Não obstante, dentre as funções do TNF destaca-se a indução de diferenciação de monócitos em células dendríticas, principais células ativadoras de linfócitos, culminado no recrutamento destas células para o local de infecção (CHOMARAT et al., 2003). Assim, faz-se mister avaliar o perfil de linfócitos ao longo do curso de infecção.

Nas infecções por *L. amazonensis* na orelha, a população de linfócitos aumentou apenas na última semana de experimento (Figura 15A), contudo, diferenças entre o perfil linfocítico dos camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} foram observados. Os linfócitos B (CD19⁺) decaíram ao longo do experimento em ambos os grupos, entretanto, ao tempo de cinco semanas de infecção, os camundongos selvagens apresentaram maior número destas células (Figura 15B). Os linfócitos T (CD3⁺) também apresentaram viés de queda ao longo da infecção, sendo que os animais deficientes de TNFR1 apresentaram maior número destes quando não infectados e ao tempo de cinco semanas de experimento (Figura 15C). Os linfócitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) também foram observados em maior número na quinta semana de infecção entre os animais TNFR1^{-/-} (Figura 15D), bem como os linfócitos T auxiliares (CD3⁺CD4⁺) (Figura 15E). A proporção de linfócitos T auxiliares também foi avaliada, interessante ela aumentou primeiramente nos camundongos selvagens, já na terceira semana experimental, enquanto permaneceu alta neste grupo, aumentando na quinta semana nos camundongos TNFR1^{-/-}, diminuindo igualmente nos dois grupos na sétima semana de infecção (Figura 15F). As células T regulatórias (CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺), responsáveis pela regulação e controle da inflamação, também foram avaliadas. Na terceira semana tanto o número absoluto de células T regulatórias quanto a sua respectiva proporção foram maior nos camundongos deficientes de TNFR1 e, na quinta semana apenas o número absoluto se manteve maior. Embora observe-se a frequência aumentada das células T regulatórias ao tempo de sete semanas de infecção, vemos que neste mesmo tempo experimental, o número das células T regulatórias é reduzido, sendo que foram induzidas

apenas nos camundongos $TNFR1^{-/-}$, somente nos tempos de três e cinco semanas de infecção (Figuras 15G e 15H).

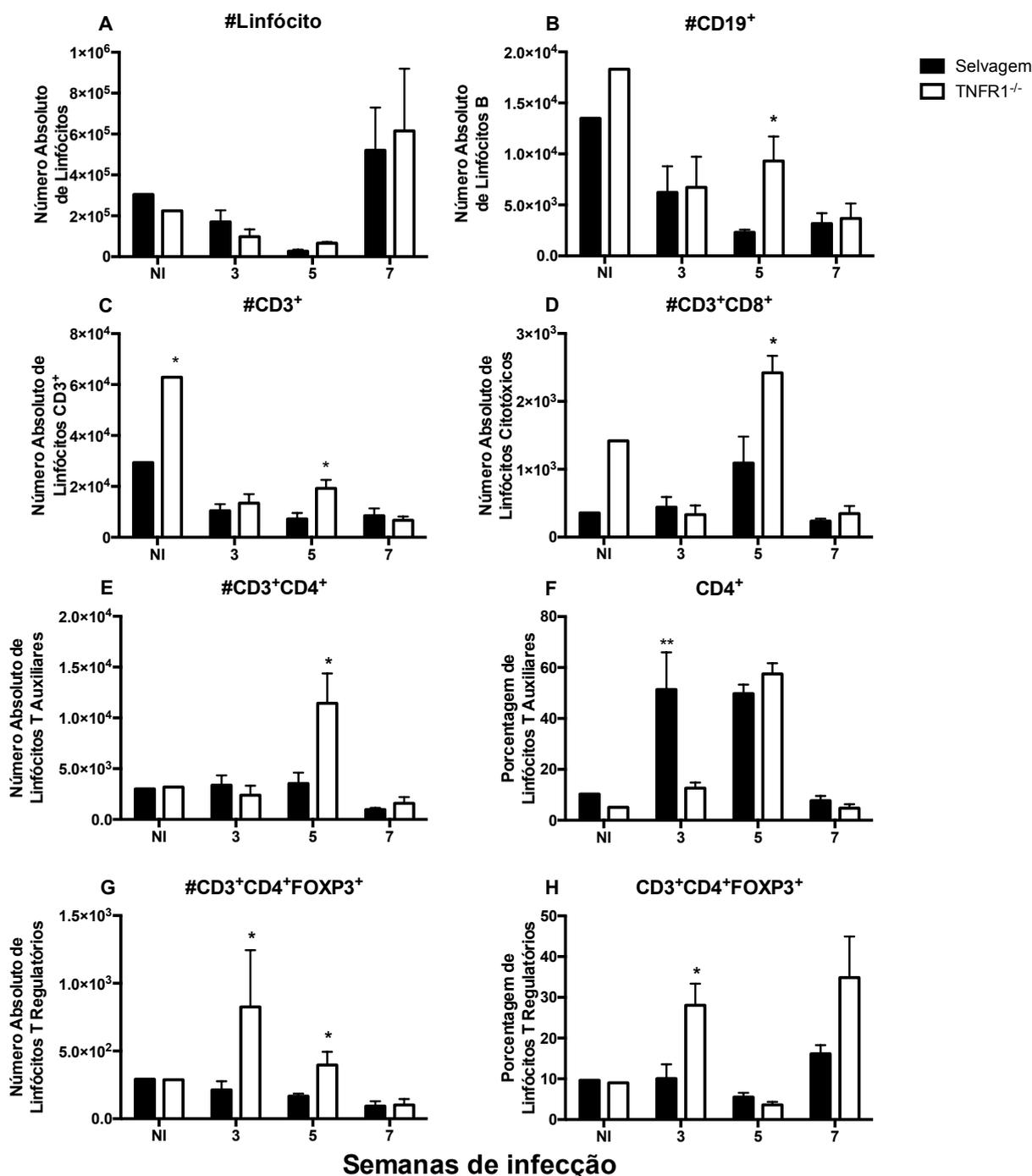


Figura 15. Avaliação da população linfocítica das orelhas de camundongos selvagens e $TNFR1^{-/-}$ infectados por *L. amazonensis*. Camundongos (cinco por grupo) foram infectados na orelha com 1×10^4 formas promastigotas de *L. amazonensis* e, nos tempos indicados, as lesões foram coletadas para a análise do perfil celular por citometria de fluxo. Foram avaliados o número absoluto de linfócitos totais (A), bem como de linfócitos B (B), linfócitos CD3⁺ totais (C), linfócitos CD3⁺CD8⁺ (D), linfócitos CD3⁺CD4⁺ e suas frequências (E), além dos linfócitos T regulatórios (CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺) e também suas frequências. (F). (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são a média de três experimentos independentes. NI – Não infectado.

Coletivamente, estes dados sugerem que na ausência do TNFR1 observaremos maior número de linfócitos B, T citotóxico e auxiliares, bem como T regulatórios ao tempo de cinco semanas de infecção. Estas células, excetuando-se os linfócitos T regulatórios, foram observadas como fatores de patogênese ao longo da infecção por parasitos do gênero *Leishmania*. Então, estas diferenças encontradas ao tempo de cinco semanas podem estar relacionadas com a perda massiva de tecido ocorrer anteriormente nos camundongos TNFR1^{-/-}. Quanto às diferenças observadas em relação às células T regulatórias, o maior número absoluto e frequência destas células no tempo de três semanas parece de acordo com o fato da lesão dos camundongos selvagens ser maior neste tempo do que a de camundongos TNFR1^{-/-}. Entretanto, mesmo sendo maior o número absoluto dos linfócitos regulatórios entre os camundongos deficientes de TNFR1 na quinta semana, a frequência não o é. Ainda, o número de linfócitos T e B também são maiores nestes grupo experimental na quinta semana de infecção, cuja ativação e regulação da inflamação, hipoteticamente, podem estar menos balanceada com a infecção por *L. amazonensis* nos camundongos TNFR1^{-/-}.

4.09 — Análise do perfil celular na lesão de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis* na pata.

O modelo de infecção subcutânea, obtido com a infecção na pata de camundongos mostrou relevantes diferenças entre o modelo intradérmico, ou seja, com a infecção realizada na orelha de camundongos. Ao tempo de oito semanas de infecção na pata, quando as lesões apresentaram tamanhos iguais nos dois grupos, não foram observadas diferenças no número de células dendríticas (Figura 16A), neutrófilos (Figura 16D), linfócitos B (Figura 16C), linfócitos citotóxicos (Figura 16B) e auxiliares (Figura 16G).

Entretanto, ao tempo de doze semanas de infecção, quando as lesões dos camundongos TNFR1^{-/-} estavam maiores que dos camundongos selvagens, foi observado que, na ausência de TNFR1, aumenta-se o número de células dendríticas (Figura 16A), neutrófilos (Figura 16D), linfócitos B (Figura 16C), linfócitos citotóxicos (Figura 16B) e auxiliares (Figura 15G), exceto o subgrupo de linfócitos T regulatórios. Este subgrupo, aliás, foi observado em menor número e frequência nos camundongos deficientes de TNFR1 (Figuras 16I e 16J). A frequência de neutrófilos e células T auxiliares foram observadas maiores nos camundongos TNFR1^{-/-} (Figuras 16E e 16H).

Estes dados corroboram a ideia de a resolução da infecção variar quanto ao local do inóculo, pois além destas diferenças apresentadas acima, camundongos C57BL/6 controlam e reparam a lesão nas patas, diferentemente dos camundongos TNFR1^{-/-} e selvagens infectados na orelha, os quais exacerbam a lesão, apresentando massiva perda de tecido no órgão acometido. Ainda, ressalta-se a patogenicidade de neutrófilos e linfócitos T e B no sítio de infecção, bem como ausência de controle de regulação da regulação da inflamação na ausência do TNFR1, fatos que, em conjunto, levam à suscetibilidade da infecção por *L. amazonensis*.

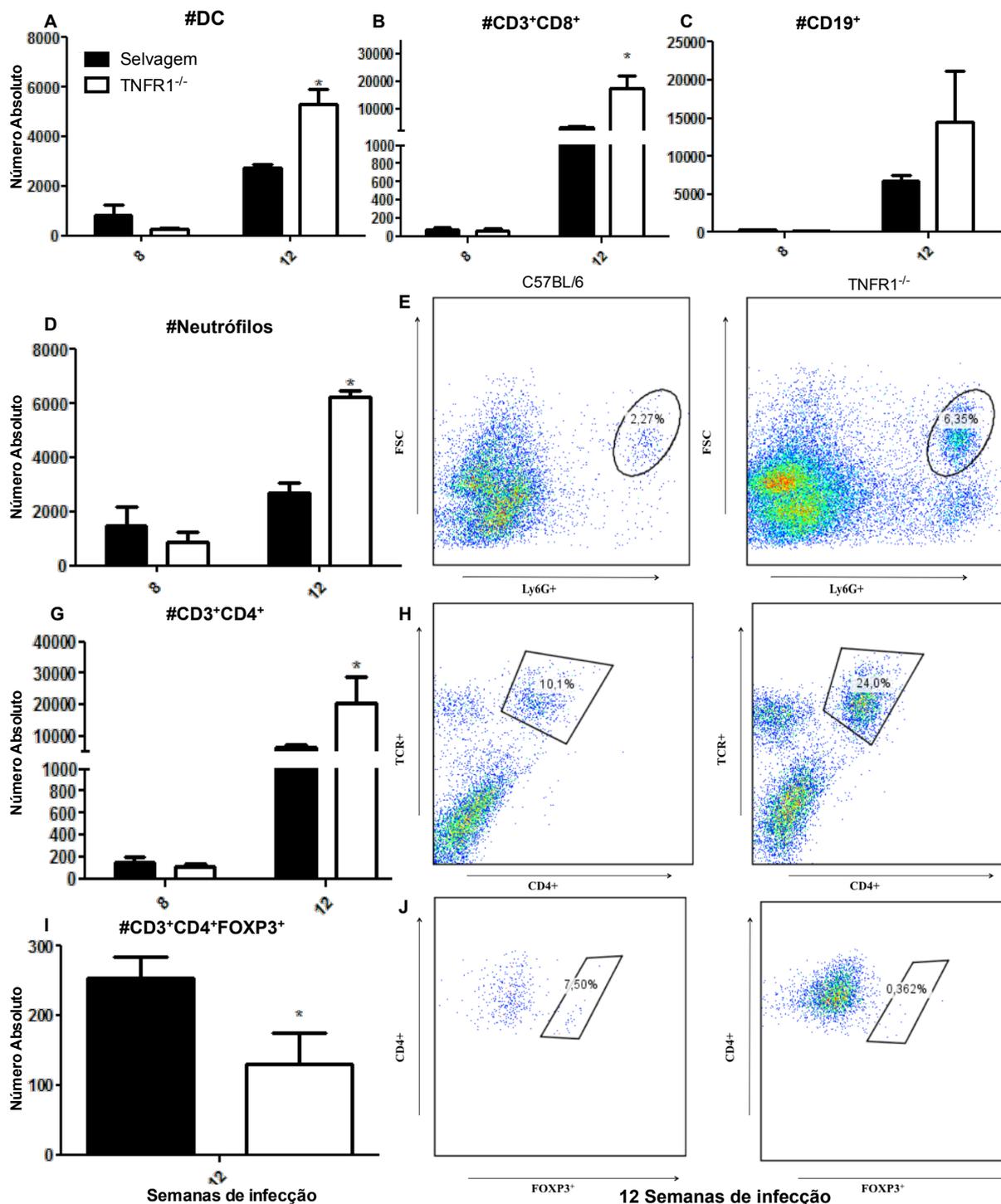


Figura 16. Avaliação do perfil celular na lesão de camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} infectados por *L. amazonensis* na pata. Camundongos (cinco por grupo) foram infectados na orelha com 1×10^4 formas promastigotas de *L. amazonensis* e, nos tempos indicados, as lesões foram coletadas para a análise do perfil celular por citometria de fluxo. O número absoluto de células dendríticas (A), o número absoluto de linfócitos CD3⁺CD8⁺ (B) e linfócitos B (C). O número absoluto de neutrófilos (D) e sua freqüência (E). Número absoluto de linfócitos CD3⁺CD4⁺ (G) e sua freqüência (H), bem como o número absoluto de células Treg (CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺) (I) e freqüência das mesmas (J). (* p<0,05). Teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados mostrados nas letras A, B, C, D, G e I são a média de dois experimentos independentes, já os mostrados em E, H e J são representativos de dois experimentos. NI – Não infectado.

5. DISCUSSÃO

A pleiotropia do TNF é patenteada nos estudos acerca de doenças parasitárias. O comprometimento da sinalização de TNF, mais propriamente o de sua sinalização através do receptor 1 do TNF, resulta na suscetibilidade à *Citrobacter rodentium*, à colite experimental, à *Mycobacterium tuberculosis* e à *L. major* associada à falta de remodelamento tecidual nos tempos tardios da infecção. Ainda, o TNF é tido como uma importante citocina na promoção da inflamação (HAYDEN; GHOSH, 2014). Muitos modelos de camundongos são naturalmente resistentes à *L. major*, entretanto na ausência ou comprometimento da sinalização do TNF se tornam suscetíveis, como os camundongos C57BL/6 (VIEIRA et al., 1996; WILHELM et al., 2001). Na ausência do TNFR1, camundongos controlam a carga parasitária, mas não controlam a lesão (VIEIRA et al., 1996; WILHELM et al., 2001, OLIVEIRA et al., 2012). A baixa taxa de apoptose na fase crônica observada nos camundongos TNFR1^{-/-} infectados com *L. major* foi associada à falta de controle da inflamação e, conseqüentemente, à suscetibilidade (KANALY et al., 1999; NAUDÉ et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012). Diante de tão amplo espectro de atuação, a fim de elucidar melhor a papel imunobiológico do TNFR1, questionou-se a participação deste receptor na infecção por *L. amazonensis*. Sabe-se que, na infecção por *L. amazonensis*, camundongos TNFR1^{-/-} com fundo genético C57BL/6 apresentam falta de controle das lesões nas patas nos tempos finais de infecção, com uma inflamação grave persistente (CARGNELUTTI et al. 2014).

Durante as infecções intradérmicas, observou-se que as orelhas dos camundongos selvagens apresentaram lesão maior nos tempos iniciais, contudo estas lesões se igualam e são, posteriormente, superadas em tamanho, no decorrer do experimento pelos camundongos TNFR1^{-/-}. Contudo, em ambas as linhagens murinas, a infecção resulta em massiva perda da orelha infectada, iniciada mais tardiamente nos camundongos selvagens. Assim, em consonância com a literatura, a sinalização do TNF via TNFR1 parece estar envolvida com a promoção da inflamação na infecção por *L. amazonensis*. Porém, não parece estar relacionada com o reparo tecidual na orelha, uma vez que as lesões de ambos os camundongos evoluem para perda massiva de tecido deste órgão. Diferente e interessantemente, nas infecções subcutâneas por *L. amazonensis*, embora tenha sido observada a tendência de lesão maior

inicialmente nos camundongos selvagens com posterior controle e exacerbação da lesão nos camundongos TNFR1^{-/-} na fase crônica, somente os animais selvagens apresentam diminuição da lesão sem perda massiva de tecido. Neste modelo de infecção, o TNF via TNFR1 parece estimular a inflamação, bem como controlá-la, e, ainda auxiliar no reparo tecidual, conforme já descrito.

De maneira igual à descrita em infecções por *L. major*, independente tanto da via de inoculação quanto da presença ou ausência do TNFR1, a carga parasitária é controlada similarmente, não apresentando diferenças na atividade de arginase mensurada. Portanto, o TNFR1 não parece atuar no controle parasitário em infecções por *L. amazonensis* tal qual o observado para *L. major* (VIEIRA et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2012).

Em infecções por *L. amazonensis* é sabido que não ocorre uma polarização da resposta imunológica para qualquer perfil citocinas, afinal são observados baixos níveis de produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6, IL-10, IL-12, entre outras (CÔRTEZ et al., 2000; COURRET et al., 2003; JI et al., 2002; JI; SUN; SOONG, 1993; VIEIRA et al., 1996; JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000; XIN; LI; SOONG, 2007; XIN; LI; SOONG, 2008). No modelo intradérmico, a infecção por *L. amazonensis* foi observada como fraca estimuladora da produção de IFN- γ , TNF, IL-12p70, IL-1 β , IL-10 e IL-6. A indução principalmente das citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ , TNF, IL-12p70, IL-1 β , e IL-6 foi observada apenas nos tempos finais, podendo ser mais devida ao resultado da inflamação que propriamente da infecção. Mesmo que a produção de IL-10 nas orelhas infectadas dos camundongos seja estimulada já na terceira semana de infecção, isto não é suficiente para regular a inflamação, pois a lesão nas orelhas dos camundongos dos dois grupos evolui para perda massiva de tecido. Nos linfonodos retromaxilares, ou seja, os linfonodos drenantes na infecção intradérmica, a produção de IL-12p70 foi estimulada já nas primeiras semanas experimentais nos camundongos TNFR1^{-/-}, e os índices de TNF na semana final foram maior entre os selvagens. Embora estas diferenças ocorram, não é o suficiente para levar a uma resolução diferente neste modelo de infecção. Durante a infecção intradérmica, a produção de IL-10 nas orelhas infectadas é estimulada apenas na terceira semana de infecção entre os camundongos C57BL/6, enquanto nos TNFR1^{-/-} foi estimulada apenas na última semana experimental, bem como nos linfonodos retromaxilares de ambas as linhagens murinas. Acrescido a isso, o fato da produção de IL-10 ter sido observada por células do linfonodo poplíteo nos dois grupos

murinos durante a infecção subcutânea, porém persistida esta produção apenas nos camundongos selvagens. Assim, conjecturou-se que a produção de IL-10 para ser efetiva no controle da inflamação deve ser ocorrer ao longo de todo o período de infecção.

A análise histológica permitiu observar que, durante a infecção intradérmica por *L. amazonensis*, a média de células totais encontradas por campo aumenta gradativamente, sendo que na quinta semana o número de células totais encontrada nos camundongos selvagens é maior, sendo igualadas no tempo final. Contudo, o recrutamento de células mielóides se desenvolve de modo diferente. Há um aumento de células mielóides no sítio inflamatório gradativo, porém, na terceira semana, o número de células mielóides é maior nos camundongos C57BL/6 e, na quinta semana de infecção, é maior nos camundongos TNFR1^{-/-}. As células mielóides podem contribuir com a lesão aumentada nos camundongos selvagens no tempo de três semanas experimental. Já na quinta semana, a despeito da diferença no número de células mielóides, a análise histológica revela maior número de células totais entre os camundongos selvagens, fato que pode equilibrar o tamanho da lesão entre os grupos neste período. As células mielóides advêm da medula óssea, recrutadas em resposta a danos ou infecções, porém grande é a gama de células mielóides, assim, a fim de verificar o perfil destas células ao longo da infecção se fez necessário.

As primeiras células a migrarem para o local da infecção por via intradérmica são os neutrófilos. Após a primeira semana de infecção, as células mielóides predominantes na infecção intradérmica por *L. amazonensis* são as células Ly6C⁻; monócitos envolvidos, principalmente, com o reparo tecidual, além de macrófagos e células dendríticas já diferenciadas para residirem no tecido (CARNEIRO, 2014). Com o decorrer da infecção, o principal tipo celular encontrado passa a ser os monócitos Ly6C⁺; monócitos precursores de macrófagos e células dendríticas com atividades microbicida e secretoras de citocinas pró-inflamatórias. Inicialmente, os principais monócitos Ly6C⁺ observados na infecção intradérmica são aqueles não comprometidos com a diferenciação celular. Contudo, aqueles monócitos comprometidos com a diferenciação em células dendríticas passam a ser os principais monócitos Ly6C⁺ e, no tempo final, são aqueles que se diferenciariam em macrófagos. A população de neutrófilos também é observada em curva ascendente, sendo no tempo final a principal célula mielóide na orelha dos camundongos infectados. A diferença entre o número total de células mielóides na terceira semana de infecção é explicada pela

diferença de neutrófilos, maior no grupo selvagem a esse tempo. Já a diferença observada, também no número de células mielóides, na quinta semana não se explica pela frequência de nenhuma subpopulação, pois foram observados em mesma proporção nos dois grupos. Assim, mesmo que o número de macrófagos presente na orelha infectada de camundongos TNFR1^{-/-} seja maior, as demais células CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁻ aumentaram em proporções similares, assim como os subtipos de monócitos Ly6C⁺. Então, inferiu-se que na presença do TNFR1, a infecção intradérmica por *L. amazonensis* recruta inicialmente mais neutrófilos, um dos responsáveis pela diferença no tamanho da lesão a esse tempo. Este raciocínio, entretanto, não se aplica à quinta semana de infecção, quando as lesões se equivalem, pois, neste tempo experimental, a ausência do TNFR1 foi relacionada com menor recrutamento de células mielóides, mais precisamente aquelas células CD11b⁺Ly6C⁻, para o sítio inflamatório, mas não células totais. Não houve qualquer diferença na proporção de subpopulações das células mielóides ao final do experimento.

O número de células mielóides infectadas, assim como as células mielóides totais, aumenta com o decorrer do experimento e é maior nos camundongos selvagens nas duas primeiras semanas experimentais. A diferença na primeira semana foi atribuída aos neutrófilos e monócitos Ly6C⁺, majoritariamente aqueles ainda não comprometidos com a diferenciação celular. Na terceira semana de infecção, embora haja maior taxa de células mielóides infectadas nos animais C57BL/6, nenhum subtipo destas células foi visto infectado em maior proporção que nos camundongos deficientes de TNFR1. De maneira geral, a principal célula infectada neste tempo foram os neutrófilos. Já nos tempos finais, observou-se que o número de monócitos Ly6C⁺ comprometidos com a diferenciação tanto em células dendríticas quanto em macrófagos aumenta, bem como a população de macrófagos infectados já diferenciados, enquanto os neutrófilos infectados permanecem praticamente constantes ao longo do tempo. Assim, a infecção intradérmica por *L. amazonensis* favorece a diferenciação celular de monócitos Ly6C⁺, atuando no recrutamento de células dendríticas e macrófagos para o sítio de infecção. Ainda, evidenciou-se, novamente, que o TNFR1 participa na promoção inicial de inflamação, favorecendo a fagocitose do parasito pelas células mielóides.

Quanto à infecção pela via subcutânea por *L. amazonensis*, dentre as células mielóides observadas destacam-se as células dendríticas e neutrófilos, sendo que ambas estas células se apresentaram em números iguais quando as lesões eram iguais entre os grupos. , Contudo,

foram vistas em maior número nos animais deficientes de TNFR1 nos tempos finais do experimento, justamente quando os camundongos selvagens controlam a lesão. Ainda, a frequência de neutrófilos foi também maior no tempo de doze semanas de infecção nos camundongos TNFR1^{-/-}. Logo, infere-se que é prejudicial para o controle da inflamação ao final da infecção subcutânea por *L. amazonensis* a presença em grande número tanto de células dendríticas quanto de neutrófilos, sobretudo quando os neutrófilos se encontram com a frequência aumentada, fato decorrente da ausência de TNFR1. Assim, sugere-se que o TNFR1 participe no recrutamento celular no início da infecção, bem como no controle da inflamação apenas na infecção via subcutânea por *L. amazonensis*.

A análise da população de células mielóides revelou que a infecção intradérmica por *L. amazonensis* induz a sinalização de morte celular, uma vez que a taxa de células mielóides não marcadas para morte celular diminui ao longo da infecção. No tempo de uma semana de infecção, observou-se que os neutrófilos dos camundongos selvagens estavam apresentando necrose e apoptose tardia em maior taxa do que os camundongos TNFR1^{-/-}, possivelmente mantendo o sítio de infecção mais inflamatório. Já na terceira semana de infecção, observou-se nas orelhas infectadas maior taxa de células mielóides em necrose e apoptose tardia no grupo C57BL/6, enquanto nos camundongos deficientes de TNFR1 os macrófagos apresentaram apoptose em taxa maior. Mais uma vez, evidenciou-se o microambiente mais inflamatório justamente quando o número de células mielóides é maior, consonante a maior lesão nos camundongos selvagens neste tempo experimental. Na quinta semana de infecção, as células mielóides dos camundongos TNFR1^{-/-} foram observadas necróticas em maior taxa, enquanto nos camundongos C57BL/6 estas células apresentaram maior taxa de apoptose tardia, ambas as diferenças estavam associadas aos macrófagos das duas linhagens. Assim, neste tempo, o ambiente era inflamatório nos camundongos deficientes de TNFR1, fato que pode levar a aumento da lesão nos tempos finais. Enfim, no tempo de sete semanas de infecção havia maior frequência de células mielóides em necrose nos camundongos C57BL/6 e mais células mielóides apoptóticas nos TNFR1^{-/-}, muito embora ambos falhem em controlar e reparar a lesão.

Através da análise histológica, também observou-se inicialmente um decréscimo na média de células apoptóticas após a infecção intradérmica apenas nos camundongos selvagens, com posterior aumento nos dois grupos, levando a inferir que a infecção por *L.*

amazonensis inibe a apoptose via TNFR1 nos tempos iniciais e favorece uma outra via de morte celular programada nos tempos finais da infecção. Contudo, de modo geral, a taxa de células em apoptose decai com a infecção intradérmica por *L. amazonensis*. Interessantemente, através da técnica de citometria de fluxo não foram observadas diferenças quanto à apoptose entre os grupos no tempo de uma semana de infecção, contudo foi observada maior taxa de células mielóides em apoptose tardia. Estas duas populações apresentam características morfológicas de apoptose, diferenciado entre si por marcadores moleculares. Assim, estes dados corroboram os obtido com a análise histológica, onde foram observadas em maior taxa células apoptóticas nos animais selvagens não infectados e na primeira semana do experimento. Ainda, por citometria de fluxo, observou-se maior porcentagem de células mielóides em apoptose no tempo de três semanas de infecção nos camundongos TNFR1^{-/-}, atribuída aos macrófagos destes animais. Já na sétima semana, inferiu-se que a maior taxa de apoptose nos camundongos deficientes de TNFR1 seja mais relacionada aos neutrófilos. Estes dados fortalecem a ideia de que a infecção intradérmica inibe a apoptose via TNFR1, mas promova a ativação de outra via de apoptose.

Quanto à sinalização de morte celular entre as células mielóides infectadas, observou-se em ambos os grupos, na primeira semana, que as células (principalmente os neutrófilos) com o parasito se apresentavam mais frequentemente em necrose, um número menor em apoptose tardia. Em escala menor, na terceira semana de infecção, camundongos selvagens apresentaram maior proporção de macrófagos e neutrófilos necróticos do que os TNFR1^{-/-}. Já na quinta semana enquanto os macrófagos infectados dos camundongos deficientes de TNFR1 apresentaram maior taxa de necrose, os macrófagos infectados dos camundongos C57BL/6 apresentavam maior taxa de apoptose tardia, sendo esta a principal sinalização de morte celular neste tempo entre as células mielóides das duas linhagens. Por fim, no tempo final de infecção, destacam-se as células mielóides infectadas sem marcadores para morte celular como principais células mielóides infectadas, seguidas pelas células mielóides infectadas em apoptose. Assim, na fase crônica da infecção intradérmica, aparentemente a perda do controle da lesão e de seu reparo não é atribuída à apoptose ou outros tipos de morte celular, contudo ressalta-se que a taxa de apoptose é semelhante entre os camundongos deficientes e suficientes de TNFR1, podendo-se inferir que a infecção por *L. amazonensis* afeta justamente a apoptose via TNFR1. Estas observações diferem do modelo de infecção por *L. major*, no

qual os TNFR1^{-/-} apresentam taxas de apoptose mais baixas que os camundongos C57BL/6 na fase crônica (KANALY et al., 1999; NAUDÉ et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012)

A população linfocítica também foi avaliada ao longo da infecção por *L. amazonensis*. Quando infectados pela via intradérmica, não se observaram no sítio inflamatório diferenças quanto ao número de linfócitos totais em quaisquer dos tempos estudados, contudo as populações de linfócitos B e T foram maiores ao tempo de cinco semanas de infecção. Dentro das subpopulações de células T, tanto as auxiliares quanto as citotóxicas foram observadas em maior número nos camundongos deficientes de TNFR1 na quinta semana de infecção intradérmica. Embora as lesões dos camundongos estudados sejam iguais a esse tempo, a perda de tecido da orelha dos animais TNFR1^{-/-} começa mais cedo, podendo estar relacionada com esse robusto número de linfócitos B e T, similares no tempo último do estudo neste modelo. Esta observação é corroborada pelos dados da infecção subcutânea: no tempo de oito semanas de infecção, quando as lesões se equivalem, não foram vistas diferenças entre as populações de linfócito B. Entretanto, na décima segunda semana, quando a lesão era controlada pelos camundongos selvagens e exacerbada nos TNFR1^{-/-}, os linfócitos T citotóxicos e auxiliares foram observados em maior número nos camundongos deficientes de TNFR1. Além do número absoluto maior, a frequência de linfócitos T auxiliares também foi observada maior durante a semana doze após a infecção subcutânea.

Voltando ao modelo de infecção intradérmica, nos camundongos TNFR1^{-/-}, a população de células T regulatórias estava em maior número no tempo de três e cinco semanas, com a frequência aumentada apenas na terceira semana neste grupo experimental. Na terceira semana, a lesão é menor nestes camundongos, devido à regulação da inflamação, pois apresenta maior proporção de células T regulatórias e menor número de células mielóides. Contudo, a população aumentada de células T regulatórias nos camundongos TNFR1^{-/-} não lhes confere maior frequência destas células, não sendo suficiente para levar a supressão da inflamação, tampouco no reparo tecidual. Por outro lado, na infecção subcutânea por *L. amazonensis*, não só o número de células T regulatórias, mas também sua frequência foi maior nos camundongos C57B/6 na décima segunda semana, direcionando para a supressão da inflamação e do reparo tecidual nestes animais. Assim, infere-se que o TNFR1 regule, durante a infecção por *L. amazonensis*, o recrutamento de linfócitos B e T, não minimizando os efeitos patogênicos associados a estes tipos celulares (SOONG et al., 1997;

WANASEN; XIN; SOONG, 2008). Contudo, na infecção intradérmica, aos tempos finais de infecção, quando é preciso regular a inflamação e reparar o tecido lesado, observou-se a falta da capacidade do TNFR1 de exercer esta função, levando a perda massiva da orelha em ambos os grupos murinos. Contrariamente, na infecção subcutânea, a capacidade de regulação via TNFR1 persiste, levando ao reparo tecidual na pata infectada dos camundongos suficientes de TNFR1.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que o TNFR1 exerce papel no controle do tamanho da lesão, mas não no controle parasitário. O controle do tamanho lesão nos tempos iniciais da infecção é devido ao envolvimento do TNFR1 no recrutamento celular, aumentando a lesão nos primeiros tempos. Já o melhor controle do tamanho da lesão na fase crônica se deve ao TNFR1 estar envolvido no controle do recrutamento de linfócitos B, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T auxiliares e T regulatórios para o sítio da infecção. No modelo de infecção subcutâneo, na fase crônica, o TNFR1 se mostrou mais apto a controlar a migração de células inflamatórias para o sítio de infecção, concomitante à resolução da lesão, fato não observado durante a infecção intradérmica.

A *L. amazonensis* não é uma forte indutora de citocinas de quaisquer perfis imunológicos, contudo, o TNFR1 foi importante na manutenção da produção de IL-10 pelos linfonodos drenantes durante infecções subcutâneas exclusivamente, resultando num controle da lesão nas patas de camundongos C57BL/6. Desta maneira, o TNFR1 seria um fator importante de promoção da inflamação durante a fase aguda da infecção e importante na regulação da resposta imune na fase crônica, quando também está envolvido no reparo tecidual.

A sinalização via TNFR1, na infecção intradérmica por *L. amazonensis*, favorece a morte celular por necrose, bem como diminui a capacidade de eliminação das células em apoptose, promovendo a ocorrência da apoptose tardia. Talvez seja pelo fato da sinalização do TNFR1 pender para a via de ativação do NF- κ B, culminando na expressão de moléculas celulares que inibam a apoptose, tais como a cIAP e a cFLIP.

Nossas observações acerca do papel do TNFR1 na infecção por *L. amazonensis* abrem campos novos de estudos, como o porquê da diferença de eficácia no controle da inflamação encontrado entre as diferentes vias, a fim de melhor entender a imunobiologia do TNFR1, otimizando esta função nas patologias através do desenvolvimento de recursos terapêuticos

7. BIBLIOGRAFIA

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Rev. Immunol.*, v. 3, n. 9, p. 745–756, 2003.

AGGARWAL, B. B.; KOHR, W. J.; HASS, P. E.; MOFFAT, B.; SPENCER, S. A.; HENZEL, W. J.; BRINGMAN, T. S.; NEDWIN, G. E.; GOEDEL, D. V.; HARKINS, R. N. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.*, v. 260, n. 4, p. 2345–2354, 1985.

AGGARWAL, B. B.; MOFFAT, B.; HARKINS, R. N. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J. Biol. Chem.*, v. 259, n. 1, p. 686–691, 1984.

AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.*, v. 61, n. 7, p. 2952–2959, 1993.

AKDIS, M.; BURGLER, S.; CRAMERI, R.; EIWEGGER, T.; FUJITA, H.; GOMEZ, E.; KLUNKER, S.; MEYER, N.; O'MAHONY, L.; PALOMAREA, O.; RHYNER, C.; QUAKED, N.; SCHAFFARTIZIK, A.; VAN DE VEEN, W.; ZELLER, S.; ZIMMERMANN, M.; AKDIS, A. C. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 127, n. 3, p. 701–21.e1–70, 2011.

ALLENBACH, C.; LAUNOIS, P.; MUELLER, C.; TACCHINI-COTTIER, F. An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania major* infection. *Eur. J. Immunol.*, v. 38, n. 3, p. 720–731, 2008.

ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Frontiers in immunology*, v. 3, n. 80, p. 1–13, 2012.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN, Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLOS ONE*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ANDERSON, C. F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J. Immunol.*, v. 174, n. 5, p. 2934–2941, 2005

ANDERSON, C. F.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. J.; SACKS, D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.*, v. 204, n. 2, p. 285–297, 2007

ARANHA, F. C.; RIBEIRO, U., Jr.; BASSE, P.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D. Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of *Leishmania*

(*Leishmania*) *amazonensis* promastigote and macrophage infection. *Scand.J.Immunol.*, v. 62, n. 4, p. 334-341, 2005.

ASSREUY, J.; CUNHA, F. Q.; EPPERLEIN, M.; NORONHA-DUTRA, A.; O'DONNELL, C. A.; LIEW, F. Y.; MONCADA, S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur.J.Immunol.*, v. 24, n. 3, p. 672-676, 1994.

BALESTIERI, F. M.; QUEIROZ, A. R.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M.; BARRAL-NETTO, M.; ABRAHAMSOHN, Ide A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes.Infect.*, v. 4, n. 1, p. 23-29, 2002.

BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A. L.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int. J. Derm.*, v. 34, n. 7, p. 474-479, 1995.

BATES, P. A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp. Parasitol.*, v. 79, n. 2, p. 215-218, 1994.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.*, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BATES, P.; ROGERS, M. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, v. 420, n. 6915, p. 502-507, 2002.

BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D. S.; VAN DER MEIDE, P. H.; SLAYTER, M. V.; NACY, C. A. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J.Immunol.*, v. 143, n. 1, p. 266-274, 1989.

BERG, L.; LAMPA, J.; ROGBERG, S.; VAN VOLLENHOVEN, R.; KLARESKOG, L. Increased peripheral T cell reactivity to microbial antigens and collagen type II in rheumatoid arthritis after treatment with soluble TNFalpha receptors. *Ann.Rheum.Dis.*, v. 60, n. 2, p. 133-139, 2001.

BEUTLER, B.; GREENWALD, D.; HULMES, J. D.; CHANG, M.; PAN, Y.-C. E.; MATHSON, J.; ULEVITCH, R.; CERAMI, A. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*, v. 316, n. 6028, p. 552-554, 1985a.

BEUTLER, B.; MAHONEY, J.; LE TRANG, N.; PEKALA, P.; CERAMI, A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J.Exp.Med.*, v. 161, n. 5, p. 984-995, 1985b.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature Immunol.*, v. 8, n. 4, p. 345–350, 2007.

BIEDERMANN, T.; ZIMMERMANN, S.; HIMMELRICH, H.; GUMY, A.; EGETER, O.; SAKRAUSKI, A. K.; SEEGMULLER, I.; VOIGT, H.; LAUNOIS, P.; LEVINE, A. D.; WAGNER, H.; HEEG, K.; LOUIS, J. A.; ROCKEN, M. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat.Immunol.*, v. 2, n. 11, p. 1054-1060, 2001.

BLUM, J. J. Introductory Remarks: Symposium on Differentiation of Trypanosomatids. *J. Euk, Microbiol*, v. 40, n. 2, p. 196–196, 1993.

BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DÖRING, R.; RÖLLINGHOFF, D.; DIEFENBACH, A.; RITTIG, M. G. Fibroblasts as Host Cells in Latent Leishmaniosis. *J.Exp.Med.*, v. 191, n. 12, p. 2121–2130, 2000.

BRONS, P. P. T.; VAN ERP, P. E. J.; PENNING, A. H. M.; Simultaneous DNA content and cell-surface immunofluorescence analysis. *Methods Cell Biol.* 1994;41:95–102.

BUXBAUM, L. U. Type I IFNs promote the early IFN- γ response and the IL-10 response in *Leishmania mexicana* infection. *Parasite Immunol.*, v. 32, n. 2, p. 153-160, 2010.

CARDIFF, R. D.; MILLER, C. H.; MUNN, R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb. Protoc.*, v. 2014, n. 6, p. 655–658, 2014.

CARNEIRO, M. B. H. *Recrutamento de células inflamatórias dependente de IFN- γ contribui para a patogênese na infecção por Leishmania amazonensis*. Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia; área de concentração: Imunologia de doenças infecciosas. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

CARNEIRO, M. B. H.; LOPES, M. E. DE M.; VAZ, L. G.; SOUSA, L. M.; DOS SANTOS, L. M.; DE SOUZA, C. C.; CAMPOS, A. C. A.; GOMES, D. A.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W.; VIEIRA, L. Q. IFN- γ -Dependent Recruitment of CD4(+) T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. *J.Interf.Cytok.Res.*, v. 35, n. 12, p. 935–947, 2015.

CARGNELUTTI, D. E.; SALOMÓN, M. C.; CELEDON, V.; CUELLO-CARRIÓN, F. D.; GEA, S.; Di GENARO, M. S.; SCODELLER, E. A. Impact of tumor necrosis factor receptor p55 deficiency in susceptibility of C57BL/6 mice to infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J.Microbiol.Immunol.Infect.*, 2014.

CARLSEN, E. D.; HAY, C.; HENARD, C. A.; POPOV, V.; GARG, N. J.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infect.Immun.*, v. 81, n. 11, p. 3966-3974, 2013.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, v. 72, n. 9, p. 5397-5401, 1975.

CHATELAIN, R.; MAUZE, S.; VARKILA, K.; COFFMAN, R. L. Leishmania major infection in interleukin-4 and interferon-gamma depleted mice. *Parasite Immunol.*, v. 21, n. 8, p. 423-431, 1999.

CHAN, F. K.; CHUN, H. J.; ZHENG, L.; SIEGEL, R. M.; BUI, K. L.; LENARDO, M. J. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, v. 288, n. 5475, p. 2351–2354, 2000.

CHOMARAT, P.; DANTIN, C.; BENNETT, L.; BANCHEREAU, J.; PALUCKA, A. K. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J. Immunol.*, v. 171, n. 5, p. 2262–2269, 2003.

COLLART, M. A.; BAEUERLE, P.; VASSALLI, P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol.CellBiol.*, v. 10, n. 4, p. 1498-1506, 1990.

COLMENARES, M.; KIMA, P. E.; SAMOFF, E.; SOONG, L.; MCMAHON- PRATT, D. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against Leishmania amazonensis infection. *Infect.Immun.*, v. 71, n. 6, p. 3172-3182, 2003.

COPE, A. P.; LONDEI, M.; CHU, N. R.; COHEN, S. B.; ELLIOTT, M. J.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M. Chronic exposure to tumor necrosis factor (TNF) in vitro impairs the activation of T cells through the T cell receptor/CD3 complex; reversal in vivo by anti-TNF antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *J.Clin.Invest.*, v. 94, n. 2, p. 749–760, 1994.

CORRALIZA, I. M.; CAMPO, M. L.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J.Immunol.Methods*, v. 174, n. 1-2, p. 231–235, 1994.

CORRALIZA, I. M.; SOLER, G.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 206, n. 2, p. 667-673, 1995.

CÔRTEZ, D. F.; CARNEIRO, M. B. H.; SANTOS, L. M.; SOUZA, T. C. O.; MAIOLI, T. U.; DUZ, A. L. C.; RAMOS-JORGES, M. L.; AFONSO, L. C. C.; CARNEIRO, C.; VIEIRA, L. Q. Low and high-dose intradermal infection with Leishmania major and Leishmania amazonensis in C57BL/6 mice. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 6, p. 736–745, 2010.

COURRET, N.; LANG, T.; MILON, G.; ANTOINE, J. C. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce

different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int.J.Parasitol.*, v. 33, n. 12, p. 1373-1383, 2003.

CROAN, D. G.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1997.

CROTTY, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu.Rev.Immunol.*, v. 29, p. 621–663, 2011.

DE SOUZA, V. L.; SOUZA, J. A.; SILVA, T. M. C.; VERAS, P. S. C.; DE-FREITAS, L. A. R. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes.Infect*, v. 2, n. 15, p. 1807–1815, 2000.

DECLERCQ, W.; DENECKER, G.; FIERS, W.; VANDENABEELE, P. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J.Immunol.*, v. 161, n. 1, p. 390–399, 1998.

DECOSTER, E.; VANHAESEBROECK, B.; VANDENABEELE, P.; GROOTEN, J.; FIERS, W. Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J.Biol.Chem.*, v. 270, n. 31, p. 18473–18478, 1995.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.*, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DIAMOND, M. S.; STAUNTON, D. E.; de FOURGEROLLES, A. R.; STACKER, S. A.; GARCIA-AGUILAR, J.; MARGARET, L. H.; SPRINGER, T. A. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J.Cell.Biol.*, v. 111, n. 6, p. 3129–3139, 1990.

EISSNER, G.; KOLCH, W.; SCHEURICH, P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytok.Growth Factor Rev.*, v. 15, n. 5, p. 353–366, 2004.

FAVALI, C.; TAVARES, N.; CLARENCIO, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *J.Leukoc.Biol.*, v. 82, n. 6, p. 1401-1406, 2007.

FELDMANN, M.; STEINMAN, L. Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nat.Cell Biol.*, v. 435, n. 7042, p. 612–619, 2005.

FIGGETT, W. A.; VINCENT, F. B.; SAULEP-EASTON, D.; MACKAY, F. Roles of ligands from the TNF superfamily in B cell development, function, and regulation. *Sem.Immunol*, v. 26, n. 3, p. 191–202, 2014.

FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; CHAN, J.; et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity*, v. 2, n. 6, p. 561–572, 1995.

FÖRSTER, R.; DAVALOS-MISSLITZ, A. C.; ROT, A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 5, p. 362–371, 2008.

GIBSON-CORLEY, K. N.; BOGGIATTO, P. M.; MUKBEL, R. M.; PETERSEN, C. A.; JONES, D. E. A deficiency in the B cell response of C57BL/6 mice correlates with loss of macrophage-mediated killing of *Leishmania amazonensis*. *Int.J.Parasitol.*, v. 40, n. 2, p. 157-161, 2010

GODING, J. W.; HOWARD, M. C. Ecto-enzymes of lymphoid cells. *Immunol.Rev.*, v. 161, n. 1, p. 5–10, 1998.

GONÇALVES, N. S.; GHAEM-MAGHAMI, M.; MONTELEONE, G.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; LEWIS, D J. M.; SIMMONS, C. P.; MACDONALD, T. T. Critical role for tumor necrosis factor alpha in controlling the number of luminal pathogenic bacteria and immunopathology in infectious colitis. *Infect.Immunity*, v. 69, n. 11, p. 6651–6659, 2001.

GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.*, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, 1990a.

GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B., Jr.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J.Immunol.*, v. 144, n. 1, p. 278-283, 1990b.

GRELL, M.; WAJANT, H.; ZIMMERMANN, G.; SCHEURICH, P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, v. 95, n. 2, p. 570–575, 1998.

GUIMARAES-COSTA, A. B.; DESOUZA-VIEIRA, T. S.; PALETTA-SILVA, R.; FREITAS-MESQUITA, A. L.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SARAIVA, E. M. 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. *Infect.Immun.*, v. 82, n. 4, p. 1732-1740, 2014.

HAN, J.; BROWN, T.; BEUTLER, B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *J.Exp.Med.*, v. 171, n. 2, p. 465–475, 1990.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Tren.Parasitol.*, v. 18, n. 8, p. 332–334, 2002.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Sem.Immunol.*, v. 26, n. 3, p. 253–266, 2014

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J.Exp.Med.*, v. 169, n. 1, p. 59-72, 1989.

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J.Exp.Med.*, v. 177, n. 5, p. 1505-1509, 1993.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunol.*, v. 115, n. 1, p. 1–20, 2005.

HIGUCHI, M.; AGGARWAL, B. TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor. *J Immunol* 152, 3550–3558, 1994.

HU, X.; LI, B.; LI, X.; ZHAO, Z.; WAN, L.; LIN, G.; YU, M.; WANG, J.; JIANG, X.; FENG, W.; QIN, Z.; YIN, B.; LI, Z. Transmembrane TNF- α promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J.Immunol.*, v. 192, n. 3, p. 1320–1331, 2014.

INGERSOLL, M. A.; PLATT, A. M.; POTTEAUX, S.; RANDOLPH, G. J. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Tren.Immunol.*, v. 32, n. 10, p. 470–477, 2011.

ISOMAKI, P.; PANESAR, M.; ANNENKOV, A.; CLARK, J. M.; FOXWELL, B. M. J.; CHERNAJOVSKY, Y.; COP, A. P. Prolonged Exposure of T Cells to TNF Down-Regulates TCR and Expression of the TCR/CD3 Complex at the Cell Surface. *The J.Immunol.*, v. 166, n. 9, p. 5495–5507, 2001.

JÄGER, A.; KUCHROO, V. K. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand.J.Immunol*, v. 72, n. 3, p. 173–184, 2010.

JI, J.; MASTERSON, J.; SUN, J.; SOONG, L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J.Immunol.*, v. 174, n. 11, p. 7147-7153, 2005.

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect.Immun.*, v. 71, n. 8, p. 4278-4288, 2003.

JI, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 66, n. 4, p. 338–345, 2002.

JONES, D. E.; ACKERMANN, M. R.; WILLE, U.; HUNTER, C. A.; SCOTT, P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect.Immun.*, v. 70, n. 4, p. 2151-2158, 2002.

JONES, D. E.; BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J.Immunol.*, v. 165, n. 1, p. 364-372, 2000.

KANALY, S. T.; NASHLEANAS, M.; HONDOWICZ, B., SCOTT, P. TNF receptor p55 is required for elimination of inflammatory cells following control of intracellular pathogens: *J.Immunol.*, v. 163, no. 7, p. 3883-3889, 1999.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, 2001.

KIM, E. Y.; TEH, H. S. Critical Role of TNF Receptor Type-2 (p75) as a Costimulator for IL-2 Induction and T Cell Survival: A Functional Link to CD28. *J.Immunol.*, v. 173, n. 7, p. 4500-4509, 2004.

KOLB, W. P.; GRANGER, G. A. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, v. 61, n. 4, p. 1250-1255, 1968.

KOLLIAS, G.; KONTOYIANNIS, D.; DOUNI, E.; KASSIOTIS, G. The Role of TNF/TNFR in Organ-Specific and Systemic Autoimmunity: Implications for the Design of Optimized 'Anti-TNF Therapies. *Curr.Dir.Autoimmun.*, v. 5, p.30-50, 2001.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu.Rev.Immunol.*, v. 27, n. 1, p. 485-517, 2009.

KROPF, P.; FUENTES, J. M.; FÄHNRIK, E.; ARPA, L.; HERATH, S.; WEBER, V.; SOLER, G.; CELADA, A.; MODOLELL, M.; MULLER, I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J.*, v. 19, n. 8, p. 1000-1002, 2005.

LANGERMANS, J. A.; VAN DER HULST, M. E.; NIBBERING, P. H.; HIEMSTRA, P. S.; FRANSEN, L.; VAN, Furth R. IFN-gamma-induced L- arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.*, v. 148, n. 2, p. 568-574, 1992.

LEE, B. O.; HAYNES, L.; EATON, S. M.; SWAIN, S. L.; RANDALL, T. D. The Biological Outcome of CD40 Signaling Is Dependent on the Duration of CD40 Ligand Expression. *J.Exp.Med.*, v. 196, n. 5, p. 693-704, 2002.

LEE, Y. K.; MUKASA, R.; HATTON, R. D.; WEAVER, C. T. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr.Opin.Immunol.*, v. 21, n. 3, p. 274-280, 2009.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J.Immunol.*, v. 145, n. 12, p. 4306–4310, 1990.

LIEW, F. Y.; YAN, D. M.; SEVERN, A.; COX, F. E. G. TNF-alpha reverses the disease-exacerbating effect of subcutaneous immunization against murine cutaneous leishmaniasis. *Immunol.*, v. 74, n. 2, p. 304, 1991.

LISTING, J.; STRANGFELD, A.; KARY, S.; RAU, R. Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. *Arthritis Rheum.*, 52, 3403–3412, 2005.

MAGNER, W. J.; TOMASI, T. B. Apoptotic and necrotic cells induced by different agents vary in their expression of MHC and costimulatory genes. *Mol.Immunol.*, v. 42, n. 9, p. 1033–1042, 2005.

MAIOLI, T. U.; TAKANE, E.; ARANTES, R. M. E.; FIETTO, J. L. R.; AFONSO, L. C. C. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol.Res.*, v. 94, n. 3, p. 207–212, 2004.

MANES, T. D.; POBER, J. S.; KLUGER, M. S. Endothelial cell-T lymphocyte interactions: IP[corrected]-10 stimulates rapid transendothelial migration of human effector but not central memory CD4⁺ T cells. Requirements for shear stress and adhesion molecules. *Transplantation*, v. 82, n. 1 Suppl, p. S9–14, 2006.

MATTHEWS, D. J.; EMSON, C. L.; MCKENZIE, G. J.; JOLIN, H. E.; BLACKWELL, J. M.; MCKENZIE, A. N. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J.Immunol.*, v. 164, n. 3, p. 1458-1462, 2000.

MATTNER, J.; SCHINDLER, H.; DIEFENBACH, A.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSER, I.; BOGDAN, C. Regulation of type 2 nitric oxide synthase by type 1 interferons in macrophages infected with *Leishmania major*. *Eur.J.Immunol.*, v. 30, n. 8, p. 2257-2267, 2000.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J.; HILL, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.*, v. 164, n. 12, p. 6166–6173, 2000.

MODOLELL, M.; CHOI, B. S.; RYAN, R. O.; HANCOCK, M.; TITUS, R. G.; ABEBE, T.; HAILU, A.; MULLER, I.; ROGERS, M. E.; BANGHAM, C. R.; MUNDER, M.; KROPF, P. Local suppression of T cell responses by arginase- induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 3, n. 7, p. e480, 2009.

MODOLELL, M.; CORRALIZA, I. M.; LINK, F.; SOLER, G.; EICHMANN, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur.J.Immunol.*, v. 25, n. 4, p. 1101-1104, 1995

MORAES, M. A.; SILVEIRA, F. T. [Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*]. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo*, v. 36, n. 5, p. 459-463, 1994.

MORO, L.; VASCONCELOS, A. C.; SANTOS, F. G. A.; ALVES, C. M.; NUNES, J. E. S.; SAMPAIO, I. B. M. Determination of the minimal representative number of microscopic fields to quantify apoptosis in canine lymph nodes. *Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.*, v. 56, n. 3, p. 408-410, 2004.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.*, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MORAN, J. M.; CENTENO, F.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J.Immunol.*, v. 163, n. 7, p. 3771-3777, 1999.

MUPPIDI, J. R.; TSCHOPP, J.; SIEGEL, R. M. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity*, v. 21, n. 4, p. 461-465, 2004.

MURRAY, P. J.; ALLEN, J. E.; BISWAS, S. K.; FISHER, E. A.; GILROY, D. W.;⁵ Sergij GOERDT, S.; GORDON, S.; HAMILTON, J. A.; IVASHKIV, L. B.; LAWRENCE, T.; LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; MARTINEZ, F. O.; MEGE, J.; MOSSER, D. M.; NATOLI, G.; SAEIJ, J. P.; SCHULTZE, J. L.; SHIREY, K. A.; SICA, A.; SUTTLES, J.; UDALOVA, I.;

NAUDÉ, P. J. W.; BOER, DEN, J. A.; LUITEN, P. G. M.; EISEL, U. L. M. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J.*, v. 278, n. 6, p. 888-898, 2011.

NOBEN-TRAUTH, N.; KROPF, P.; MULLER, I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science*, v. 271, n. 5251, p. 987- 990, 1996.

NOBEN-TRAUTH, N.; LIRA, R.; NAGASE, H.; PAUL, W. E.; SACKS, D. L. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J.Immunol.*, v. 170, n. 10, p. 5152-5158, 2003.

NOVAIS, F. O.; CARVALHO, L. P.; GRAFF, J. W.; BEITING, D. P.; RUTHEL, G.; ROOS, D. S.; BETTS, M. R.; GOLDSCHMIDT, M. H.; WILSON, M. E.; OLIVEIRA, C. I.; SCOTT, P. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLOS PATHOGENS*, v. 9, n. 7, p. e1003504, 2013.

NOYES, H.; PRATLONG, F.; CHANCE, M.; ELLIS, J.; LANOTTE, G.; DEDET, J.P. A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* ss. *Parasitology*, v. 124, n. 01, p. 17-24, 2002.

OLIVEIRA, C. F.; MANZONI-DE-ALMEIDA, D.; MELLO, P. S.; NATALE, C. C.; SANTIAGO, H. C.; MIRANDA, L. S.; FERRAZ, F. O.; DOS SANTOS, L. M.; TEIXEIRA, M. M.; ARANTES, R. M.; VIEIRA, L. Q. Characterization of Chronic Cutaneous Lesions from TNF-Receptor-1-Deficient Mice Infected by *Leishmania major*. *Clin.Dev.Immunol.*, v. 2012, p. 1–12, 2012.

O'SHEA, J. J.; PAUL, W. E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells. *Science*, v. 327, n. 5969, p. 1098–1102, 2010.

PARK, H. H.; LO, Y.-C.; LIN, S.-C.; et al. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu.Rev.Immunol.*, v. 25, p. 561–586, 2007.

PINHEIRO, R. O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 1, p. 79-82, 2007.

PIRES, A. C. A. M. *Estudo da susceptibilidade de Lutzomyia (L.) longipalpis com diferentes espécies de Leishmania*. Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect.Immun.*, v. 72, n. 2, p. 988-995, 2004.

RAMER, A. E.; VANLOUBBEECK, Y. F.; JONES, D. E. Antigen-responsive CD4⁺ T cells from C3H mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* are impaired in the transition to an effector phenotype. *Infect.Immun.*, v. 74, n. 3, p. 1547-1554, 2006.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; ROMA, E. H.; CARNEIRO, M. B. H.; DORIA, N. A.; SACKS, D. L.; PETERS, N. C. Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania major*. *Infect.Immun.*, v. 82, n. 7, p. 2713–2727, 2014.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol.*, v. 25, n. 11, p. 505–510, 2009.

RITTER, U.; LECHNER, A.; SCHARL, K.; KIAFARD, Z.; ZWIRNER, J.; KÖRNER, H. TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of *Leishmania major* infection. *Med.Microbiol.Immunol.*, v. 197, n. 1, p. 29–37, 2008.

RITTER, U.; MATTNER, J.; ROCHA, J. S.; BOGDAN, C.; KÖRNER, H. The control of *Leishmania (Leishmania) major* by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. *Microbes Infect.*, v. 6, n. 6, p. 559–565, 2004.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*–Host-cell Interaction: Complexities and Alternative Views. *Parasitol. Today*, v. 16, n. 7, p. 292–297, 2000.

ROUX-LOMBARD, P.; PUNZI, L.; HASLER, F.; BAS, S.; TODESCO, S.; GALLATI, H.; GUERNE, P. A.; DAYER, J. M. Soluble tumor necrosis factor receptors in human inflammatory synovial fluids. *Arthritis Rheum*, v. 36, n. 4, p. 485–489, 1993.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis 1. *Annu.Rev.Microbiol.*, v. 55, n. 1, p. 453–483, 2001.

SADICK, M. D.; HEINZEL, F. P.; HOLADAY, B. J.; PU, R. T.; DAWKINS, R. S.; LOCKSLEY, R. M. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma- independent mechanism. *J.Exp.Med.*, v. 171, n. 1, p. 115-127, 1990.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.*, v. 155, n. 3, p. 1151-1164, 1995.

SANABRIA, M. X.; VARGAS-INC; XIN, L.; SOONG, L. Role of natural killer cells in modulating dendritic cell responses to *Leishmania amazonensis* infection. *Infect.Immun.*, v. 76, n. 11, p. 5100-5109, 2008.

SANCHEZ-MADRID, F.; NAGY, J. A.; ROBBINS, E.; SIMON, P.; SPRINGER, T. A. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J.Exp.Med.*, v. 158, n. 6, p. 1785–1803, 1983.

SCAFFIDI, P.; MISTELI, T.; BIANCHI, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, v. 418, n. 6894, p. 191–195, 2002.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J.Exp.Med.*, v. 178, n. 2, p. 567-577, 1993.

SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L. C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol.*, v. 154, n. 10, p. 5320–5330, 1995.

SCHLÜTER, D.; DECKERT, M. The divergent role of tumor necrosis factor receptors in infectious diseases. *Micro.Infect.*, v. 2, n. 10, p. 1285–1292, 2000.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J.Exp.Med.*, v. 168, n. 5, p. 1675-1684, 1988.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SOONG, L.; CHANG, C. H.; SUN, J.; LONGLEY, B. J., Jr.; RUDDLE, N. H.; FLAVELL, R. A.; MCMAHON-PRATT, D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J.Immunol.*, v. 158, n. 11, p. 5374-5383, 1997.

SOUSA, L. M.; CARNEIRO, M. B.; RESENDE, M. E.; MARTINS, L. S.; DOS SANTOS, L. M.; VAZ, L. G.; MELLO, P. S.; MOSSER, D. M.; OLIVEIRA, M. A.; VIEIRA, L. Q. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite Immunol.*, v. 36, n. 1, p. 13-31, 2014.

SILVA, S. O.; WU, A. A.; EVANS, D. A.; VIEIRA, L. Q.; MELO, M. N. *Leishmania* sp. isolated from human cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil characterized as *Leishmania major*-like. *Acta Trop.*, v. 112, n. 3, p. 239-248, 2009.

SPÄTH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp.Parasitol.*, v. 99, n. 2, p. 97–103, 2001.

SYPEK, J. P.; CHUNG, C. L.; MAYOR, S. E.; SUBRAMANYAM, J. M.; GOLDMAN, S. J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S. F.; SCHAUB, R. G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J.Exp.Med.*, v. 177, n. 6, p. 1797-1802, 1993.

TARTAGLIA, L. A.; WEBER, R. F.; FIGARI, I. S.; REYNOLDS, C.; PALLADINO, JR. M. A.; GOEDDEL, D. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, v. 88, n. 20, p. 9292, 1991.

TARTAGLIA, L.A., GOEDDEL, D.V., 1992. Two TNF receptors. *Immunol. Today* 13, 151–153.

TAUB, D. D.; COX, G. W. Murine Th1 and Th2 cell clones differentially regulate macrophage nitric oxide production. *J.Leukoc.Biol.*, v. 58, n. 1, p. 80-89, 1995.

THEODOS, C. M.; POVINELLI, L.; MOLINA, R.; SHERRY, B.; TITUS, R. G. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. *Infect. Immunity*, v. 59, n. 8, p. 2839–2842, 1991.

TITUS, R. G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J.Exp.Med.*, v. 170, n. 6, p. 2097–2104, 1989.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol.Therap.*, v. 117, n. 2, p. 244–279, 2008.

TRACEY, K. J. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J.Exp.Med.*, v. 167, n. 3, p. 1211–1227, 1988a.

TRACEY, K. J.; LOWRY, S. F.; CERAMI, A. The pathophysiologic role of cachectin/TNF in septic shock and cachexia. *Annales de l'Institut Pasteur/Immunologie*, v. 139, n. 3, p. 311–317, 1988b.

VAN GINDERACHTER, J. A.; VOGEL, S. N.; WYNN, T. A. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.

VAN LIESHOUT, A. W. T.; BARRERA, P.; SMEETS, R. L.; PESMAN, G. J.; VAN RIEL, P. L. C. M.; VAN DEN BERG, W. B.; RADSTAKE, T. R. D. J. Inhibition of TNF alpha during maturation of dendritic cells results in the development of semi-mature cells: a potential mechanism for the beneficial effects of TNF alpha blockade in rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.*, v. 64, n. 3, p. 408–414, 2005.

VAN ZANDBERGEN, G.; BOLLINGER, A.; WENZEL, A.; KAMHAWI, S.; VOLL, R.; KLINGER, M.; MÜLLER, A.; HÖLSCHER, C.; HERRMANN, M.; SACKS, D.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. v. 103, n. 44, p. 13837-13842. 2006.

VANDENABEELE, P.; GALLUZZI, L.; VANDEN BERGHE, T.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat.Rev.Mol.CellBiol.*, v. 11, n. 10, p. 700–714, 2010.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J.Immunol.Methods*, v. 243, n. 1-2, p. 167–190, set. 2000.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect.Immun.*, v. 62, n. 11, p. 5177-5182, 1994.

VIEIRA, L. Q.; GOLDSCHMIDT, M.; NASHLEANAS, M.; PFEFFER, K.; MAK, T.; SCOTT, P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J.Immunol.*, v. 157, n. 2, p. 827–835, 1996.

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol.Immunol.*, v. 45, n. 12, p. 3371- 3382, 2008.

XIN, L.; LI, Y.; SOONG, L. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD45RB- dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4+ T cells in vitro and in vivo. *Infect.Immun.*, v. 75, n. 10, p. 5018-5026, 2007.

YANG, J.; ZHANG, L.; YU, C.; YANG, X.-F.; WANG, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biom.Res.*, v. 2, n. 1, p. 1, 2014.

YAMEY, G.; HOTEZ, P. Neglected tropical diseases. *BMJ*, v. 335, n. 7614, p. 269–270, 2007.

WALLACH, D. The TNF family: only the surface has been scratched. *Sem.Immunol.*, v. 26, n. 3, p. 181–182, 2014.

WANASEN, N.; MACLEOD, C. L.; ELLIES, L. G.; SOONG, L. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *Infect.Immun.*, v. 75, n. 6, p. 2802- 2810, 2007.

WANASEN, N.; XIN, L.; SOONG, L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int.J.Parasitol.*, v. 38, n. 3-4, p. 417- 429, 2008

WARE, C. F. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu.Rev.Immunol.*, v. 23, p. 787–819, 2005.

WIENS, G. D.; GLENNEY, G. W. Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies. *DevelopCompImmunity.*, v. 35, n. 12, p. 1324–1335, 2011.

WILHELM, P.; RITTER, U.; LABBOW, S.; DONHAUSER, N. ; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C.; KÖRNER, H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J.Immunol.*, v. 166, n. 6, p. 4012–4019, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health Section of the Secretariat of the League of Nations. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Weekly epidemiological record*, v. 91, n. 22, p. 287–296, 2016.

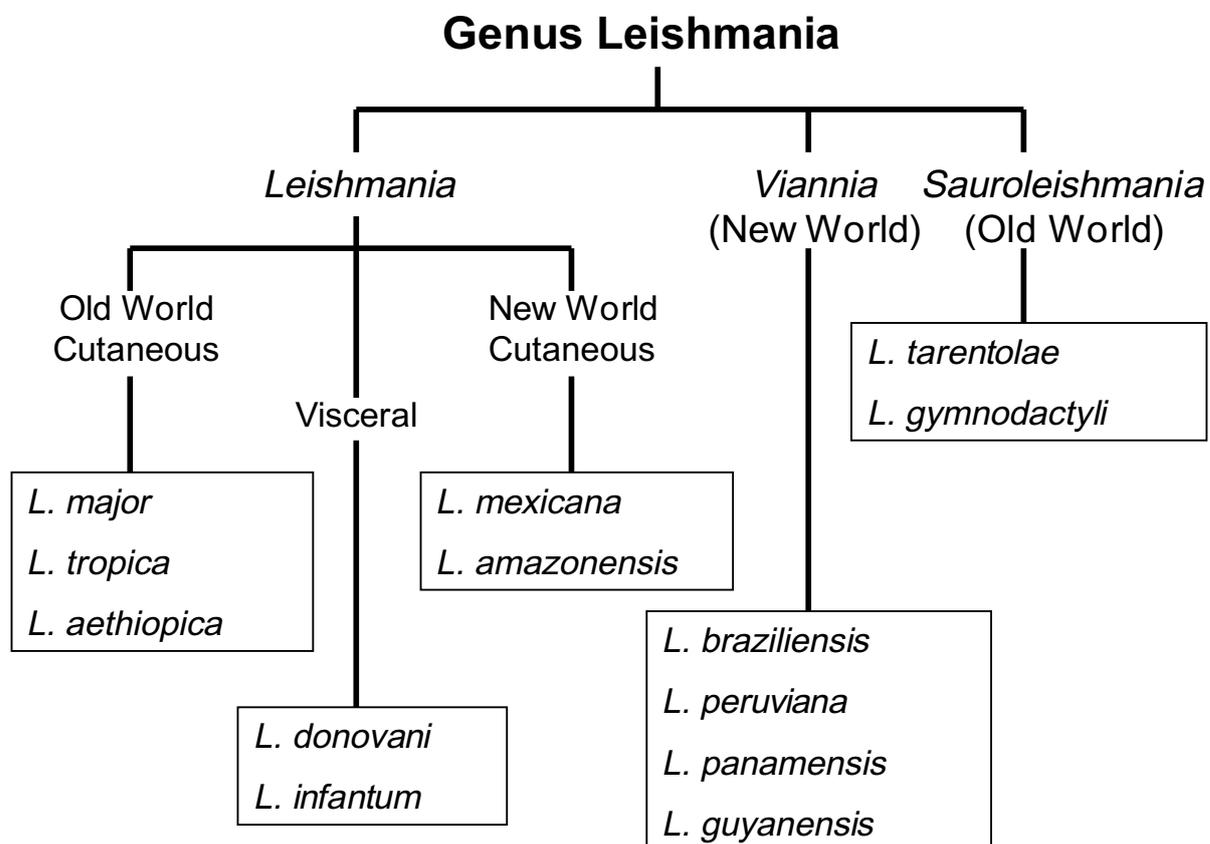
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Control of Neglected Tropical Diseases. *Neglected tropical diseases. Disponível em:* <http://www.who.int/neglected_diseases/zoonoses/en/>. Acesso em: 01 de ago. de 2016.

ZHOU, X.; BAILEY-BUCKTROUT, S.; JEKER, L. T.; BLUESTONE, J. A. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr.Opin.Immunol.*, v. 21, n. 3, p. 281–285, 2009.

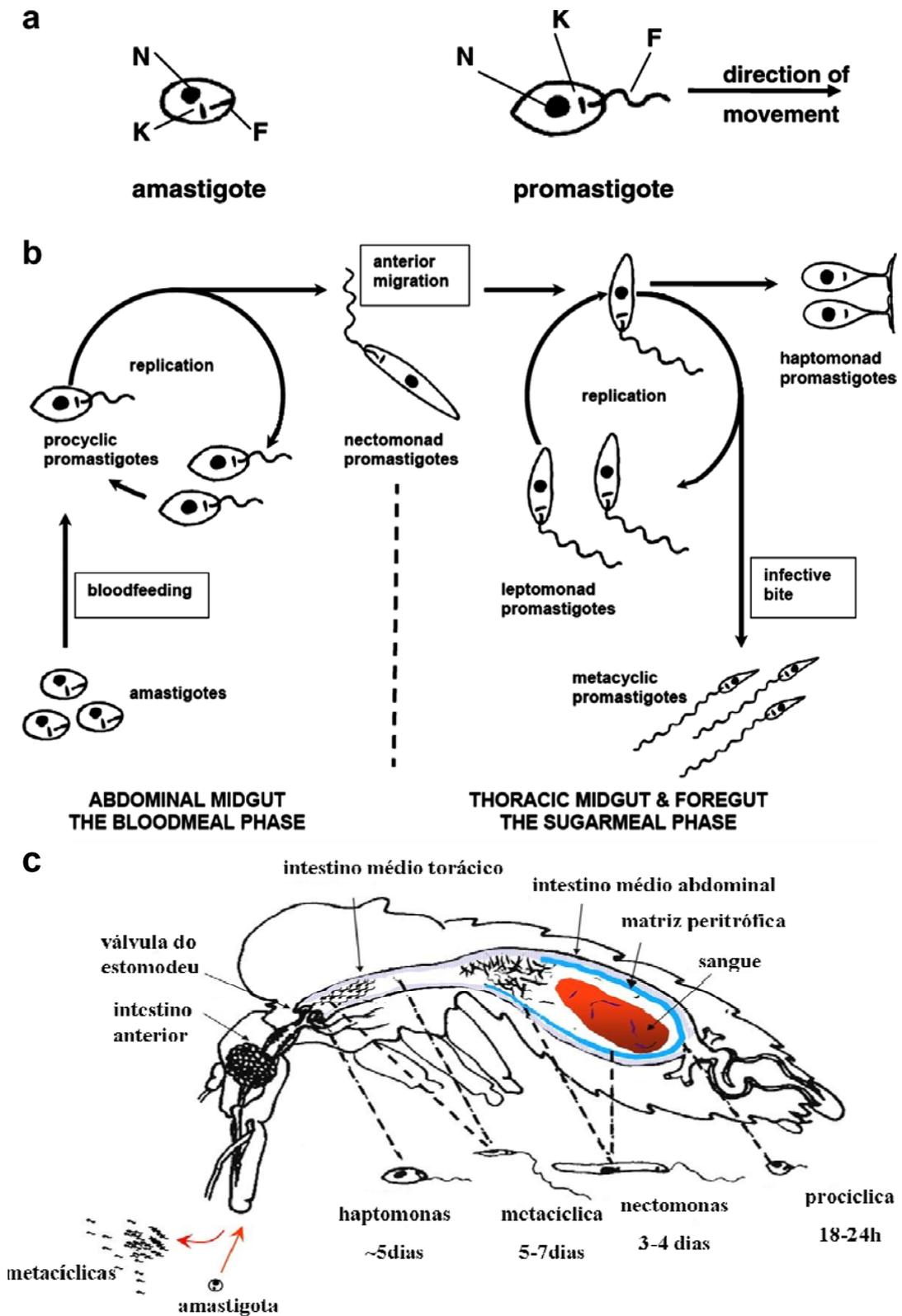
ZHOU, L.; CHONG, M. M. W.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*, v. 30, n. 5, p. 646–655, 2009.

ANEXOS

ANEXO A

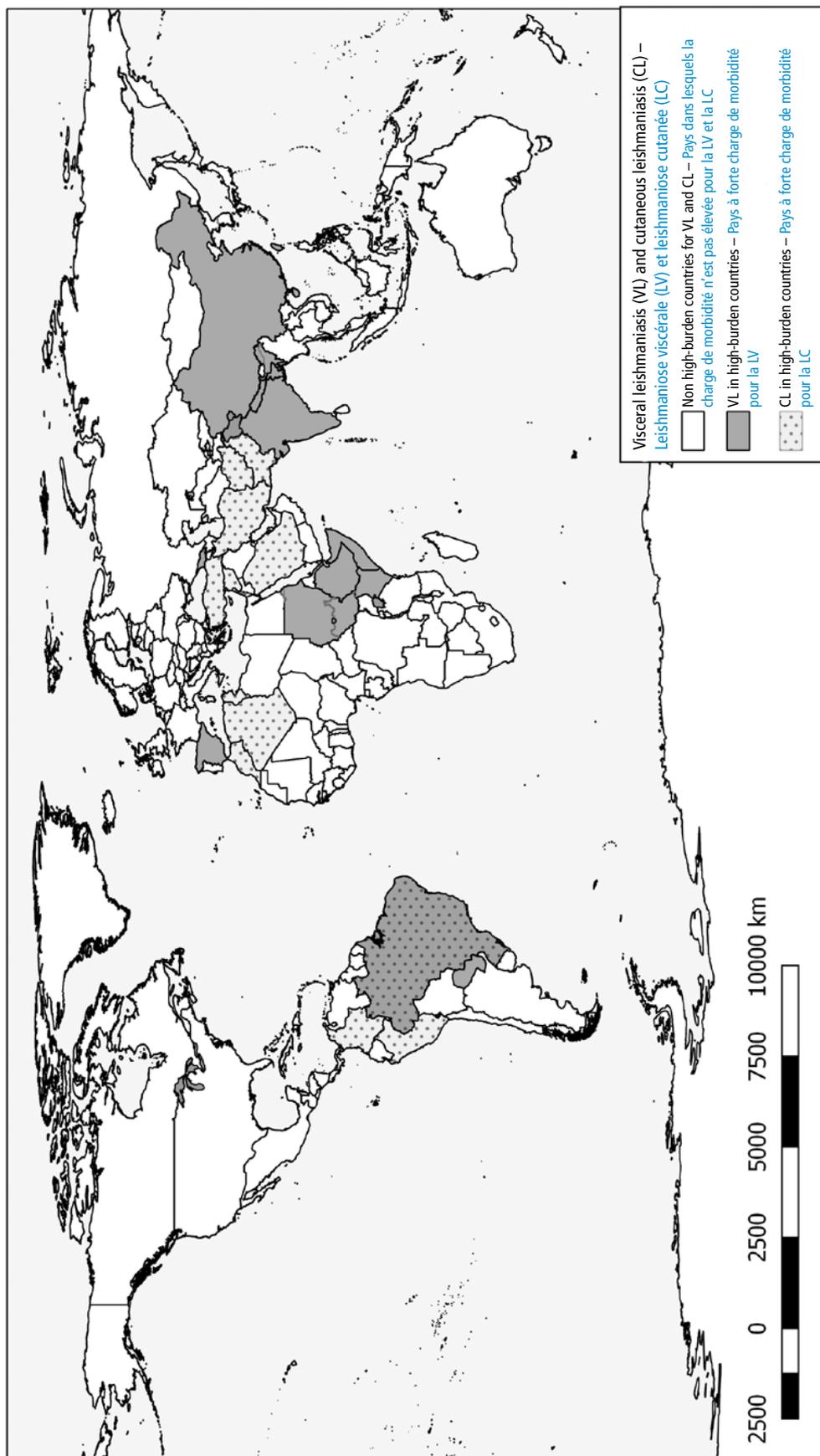
ANEXO A: Filogenia do gênero *Leishmania* (BATES, 2007, p 1099).

ANEXO B



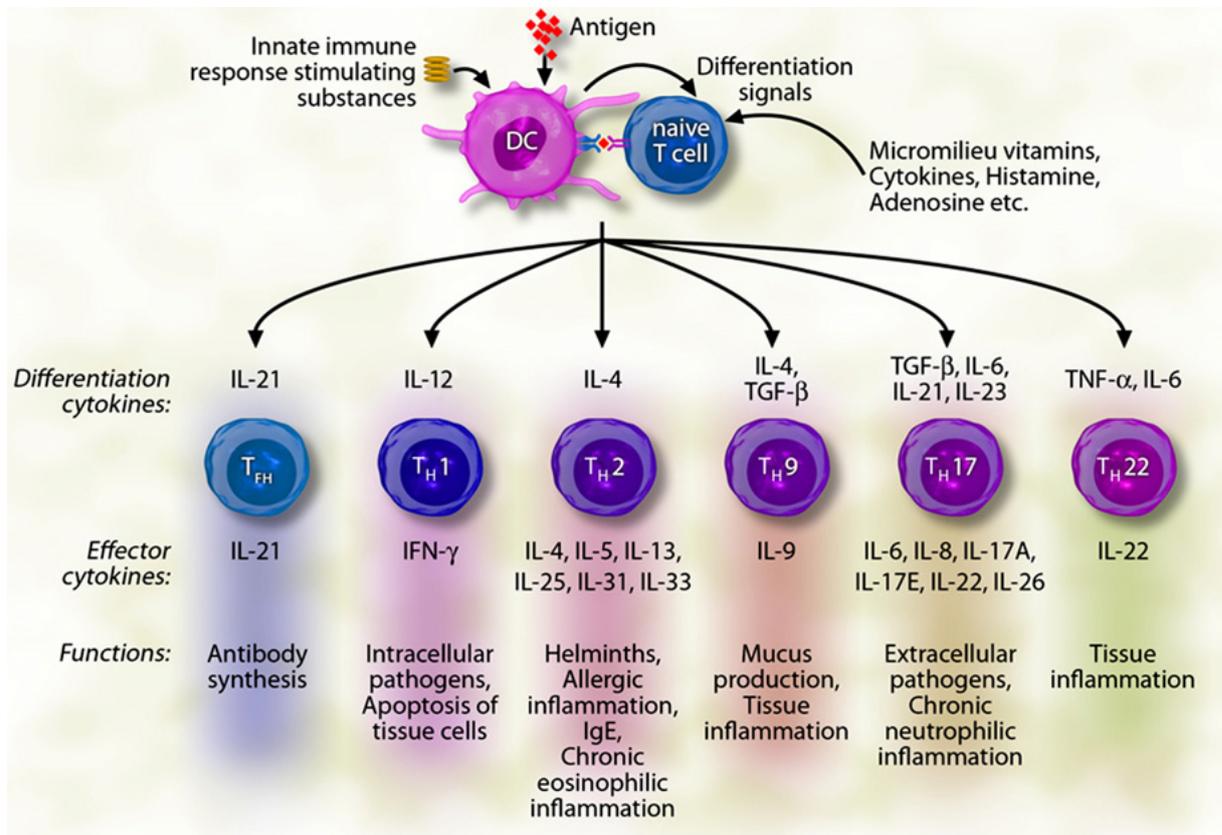
ANEXO B: Formas evolutivas de *Leishmania*. Amastigota e promastigota (A). Metaciclo gênese esquematizada (B) (BATES, 2007, p 1100). Desenho esquemático do desenvolvimento do parasito *Leishmania* dentro do vetor (C) (PIRES 2014, p. 22).

ANEXO C



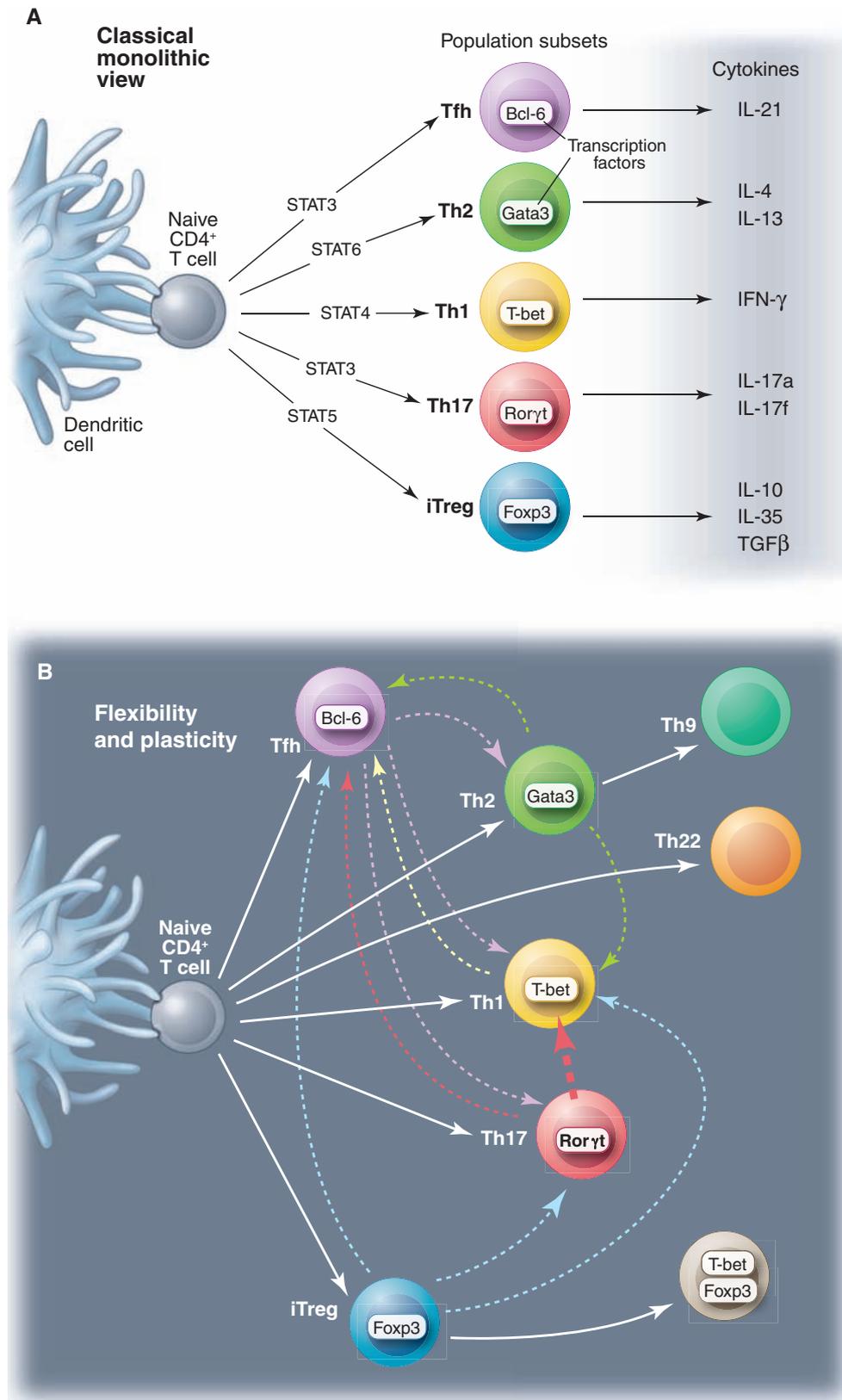
ANEXO C: Mapa epidemiológico de países com alta incidência de leishmaniose. (WHO, 2014, p 290).

ANEXO D



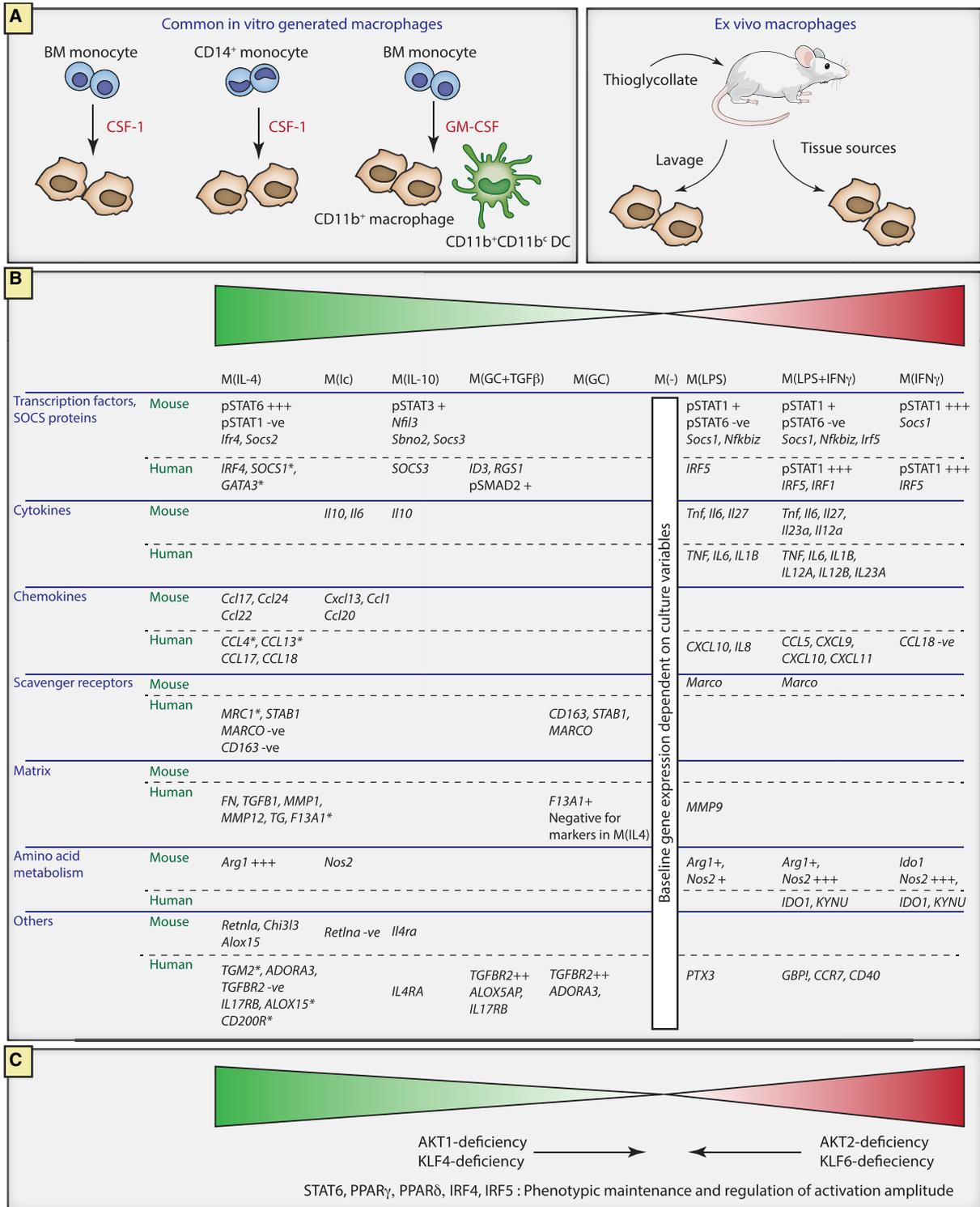
ANEXO D: Apresentação de antígeno a células T *naïve* por células dendríticas e outros fatores indutores de interleucinas na diferenciação de células T auxiliares em subpopulações (AKDIS et al., 2011, P. 703).

ANEXO E



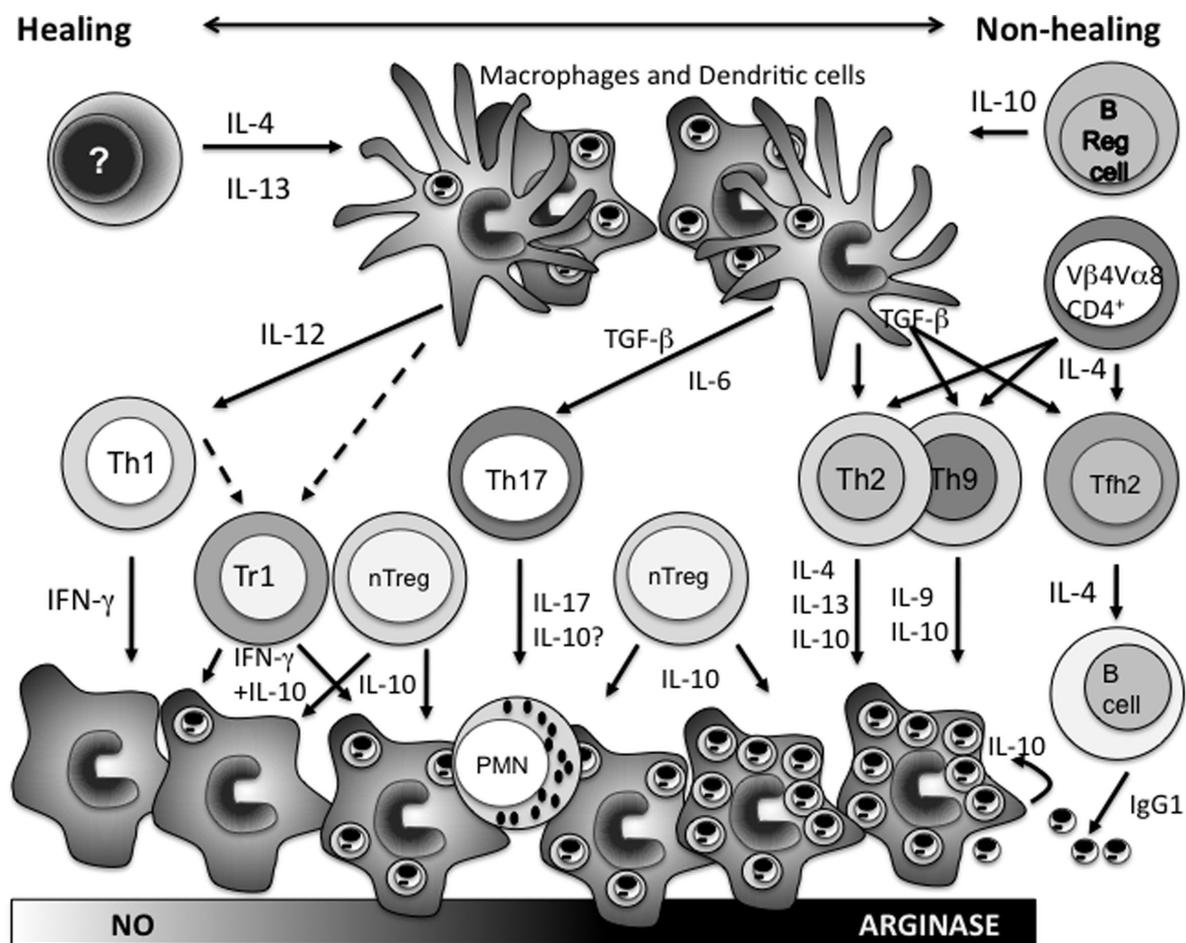
ANEXO E: Diferenciação de células T. A visão monolítica clássica: ideia de que estas subpopulações se comportam como linhagens, com fenótipo inflexível. Por conseguinte, estas subpopulações expressam fatores de transcrição que selecionam as citocinas a serem produzidas (A). Flexibilidade e plasticidade das células T auxiliares. Estudos recentes tem revelado o caráter transitente da ativação celular, alterando as citocinas produzidas, devido a apresentarem os fatores de transcrição de modo temporário, algumas vezes até mais de um destes fatores (B) (O'SHEA; PAUL, 2010, p 1099).

ANEXO F



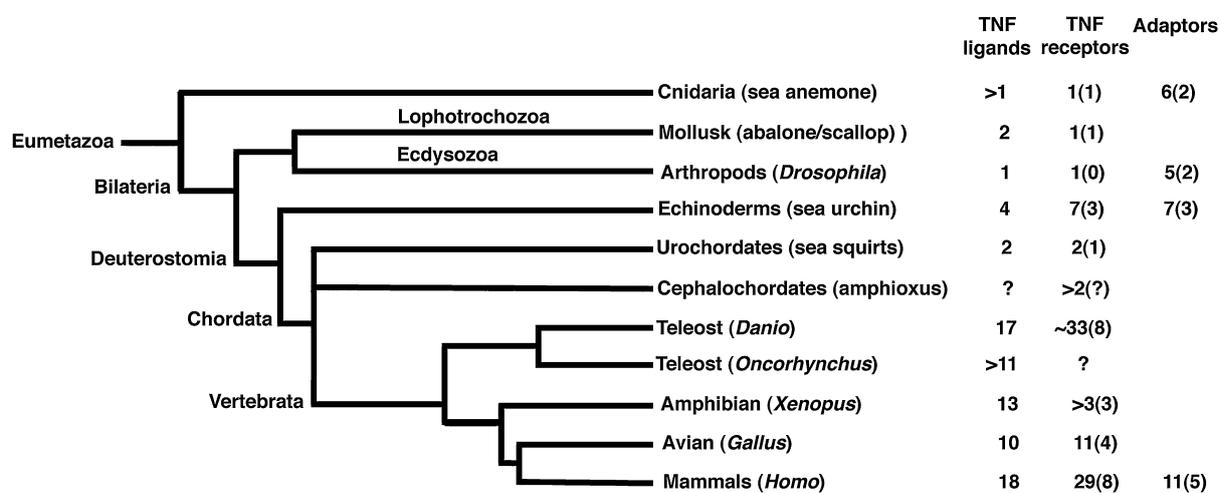
ANEXO F: Espectro de ativação de macrófago (MURRAY, et al., 2014, p. 340).

ANEXO G



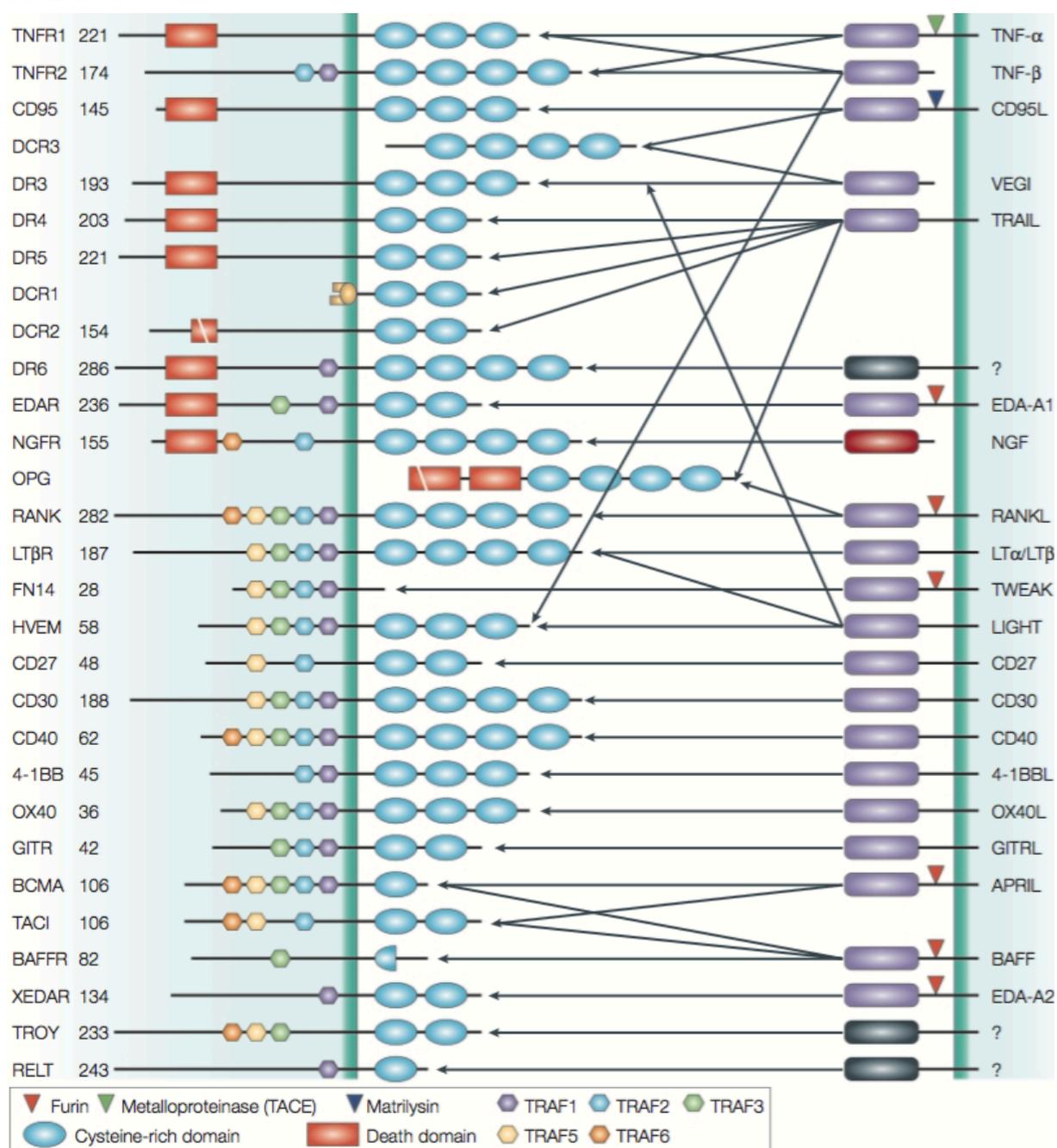
ANEXO G: Mecanismo que influenciam na expansão de células T auxiliares, bem como a resposta imune adaptativa subsequente a infecção por *Leishmania major*, função e determinação da resolução da doença (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012, p. 2).

ANEXO H



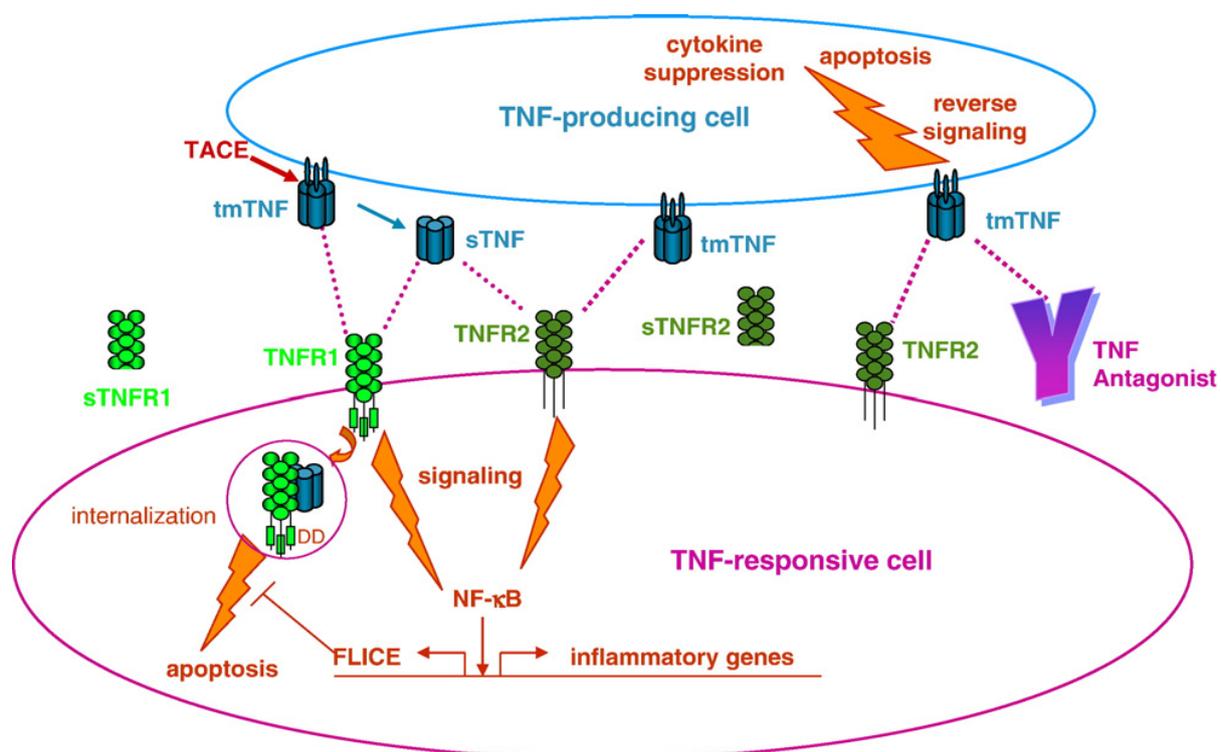
ANEXO H: Filogenia baseada em ligantes, receptores e moléculas adaptadoras da Superfamília de TNF. Os números em parênteses indicam o número de receptores ou adaptadores com domínios de morte (WIENS; GLENNEY, 2011, p. 1328).

ANEXO I



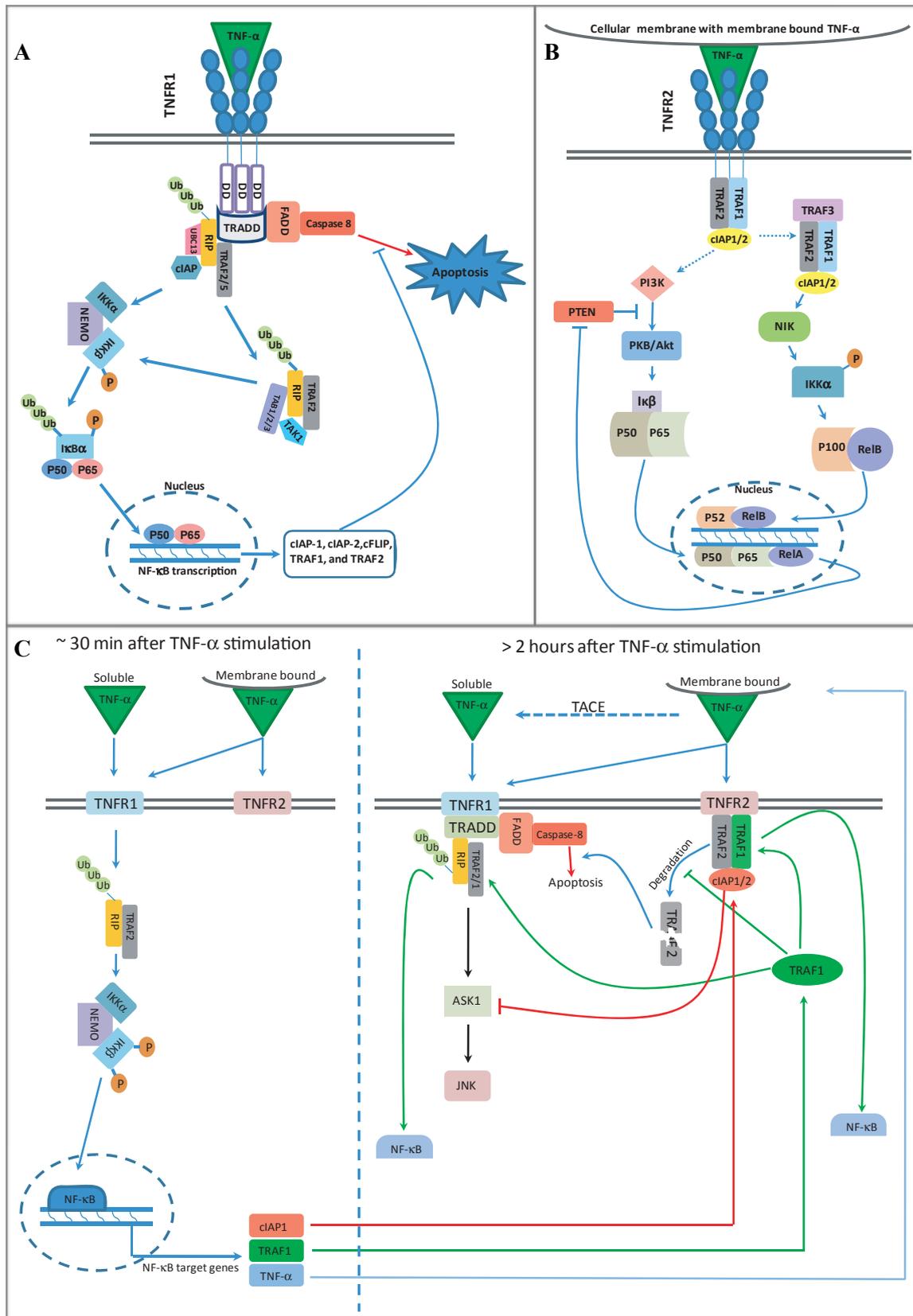
ANEXO I: Diagrama representativo dos ligantes e receptores da Superfamília do TNF em mamíferos (AGGARWAL, 2003, p. 747).

ANEXO J



ANEXO J: Diagrama simplificado representando a sinalização do TNF vias seus receptores (TRACEY, 2008, p. 249).

ANEXO K



ANEXO K: Sinalização do TNF via seus receptores. (A) Sinalização via TNFR1. (B) Sinalização via TNFR2. (C) Sinalização celular cruzada entre TNFR1 e TNFR2 (NAUDÉ et al., 2011).