

PAULA SEIXAS MELLO

**LESÕES CRÔNICAS EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES NO RECEPTOR 1 DO
TNF INFECTADOS COM *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*: DESENVOLVIMENTO
DE UM MODELO PARA ESTUDO DA LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA**

**Belo Horizonte – MG
2014**

PAULA SEIXAS MELLO

**LESÕES CRÔNICAS EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES NO RECEPTOR 1 DO
TNF INFECTADOS COM *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*: DESENVOLVIMENTO
DE UM MODELO PARA ESTUDO DA LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA**

Dissertação de mestrado 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

Profa. Dra. Leda Quercia Vieira (Orientadora)

Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia – Depto de Bioquímica e Imunologia
Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Daniel Manzoni de Almeida (Co-Orientador)

Departamento de Metodologia do Ensino e Educação Comparada - Faculdade de Educação
Universidade de São Paulo

Belo Horizonte – MG

2014

DEDICATÓRIA

Para Mestre Hugo (*in memoriam*) e D. Neusa:

*Avós que sempre foram pais;
Educadores nos quais eu me espelho.*

Para Luziane, Paulo e Hugo:

Minha fortaleza.

AGRADECIMENTOS

Obrigada Leda pela sua orientação, dedicação, paciência e ensinamentos. Pelo carinho, que faz do laboratório um ambiente extremamente acolhedor e, principalmente, pela generosidade em permitir que eu trilhe o meu caminho dentro e fora do laboratório.

Meu profundo agradecimento ao amigo e coorientador Daniel Manzoni, que em todo o momento contribuiu para a construção desse trabalho e também para minha formação profissional, acadêmica e pessoal. Jamais me esquecerei das enrascadas em que nos metíamos no ICB quando a centrífuga estragava, dos assuntos confidenciais “em off”, das inúmeras gargalhadas durante os experimentos, das vezes que saía em minha defesa, mesmo quando eu estava errada. Amo você!

Ao Caio, pela amizade de todas as horas. Por participar de todas as minhas atividades no LAGI. Por me ensinar que há outro mundo além do que convencionam pra gente.

Ao professor Luís Carlos, meu primeiro orientador e principal responsável por minha inserção no meio acadêmico. Obrigada por me abrir as portas do seu laboratório e me permitir conviver e aprender com todos do LIP.

A Carol e ao professor Ricardo Gonçalves pelas discussões proveitosas e pela ajuda indispensável nas histologias.

Ao Matheus, pela ajuda imensurável durante todos os experimentos e pela amizade.

A Lili, ao Diego e ao Waldionê e a Grazi por estarem sempre presentes.

Aos demais amigos do LAGI: Mateus Jr., Peter, Leo, Clarinha, Layara, João, Débora, pela ajuda de sempre, pela amizade e pelos momentos felizes que sempre compartilhamos.

Aos “ex-lagianos” Louisa, Magda, Juan e Eric, pela ajuda e pela amizade que permanece.

A Ouro Preto e a República Hangar, que me ensinaram ser possível encontrar verdadeiros amigos fora de casa.

Aos amigos do LIP pela paciência e ensinamentos durante o começo da minha iniciação científica.

A vovó Nair, pelo amor e as comidinhas deliciosas.

Aos tios e primos (de sangue e de coração), pelos momentos alegres, em especial a Dú e Fija pelo carinho e as oportunidades de uma vida.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado e pela valorização do meu trabalho de iniciação científica.

A Naná pela oportunidade e pelo acolhimento sem medida.

Aos meus alunos, por me ensinarem.

Ao meu irmão, Hugo, por seu meu melhor amigo. Ao meu pai, Paulo, por seu meu protetor. A minha mãe, Luziane, meu exemplo, minha força, minha luz.

A ciência pode classificar e nomear os órgãos de um
sabiá
mas não pode medir seus encantos.

A ciência não pode calcular quantos cavalos de força
existem
nos encantos de um sabiá.

Quem acumula muita informação perde o condão de
adivinhar: *divinare*.

Os sabiás divinam.

(Manoel de Barros)

Resumo

Leishmaniose é a denominação dada para doenças provocadas pela infecção por protozoários do gênero *Leishmania* que, dependendo da espécie, podem produzir vários tipos de manifestações clínicas (locais e sistêmicas), sendo um problema importante de saúde pública mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, como por exemplo, o Brasil. A forma mucocutânea da leishmaniose é caracterizada pelo surgimento de lesões crônicas e disseminadas para a mucosa oral e nasal do paciente, porém com baixos níveis de parasitas. Para estudo da leishmaniose mucocutânea ainda não há modelo murino específico que desenvolva todas as características imunopatológicas descritas em humanos. Porém, nosso grupo vem mostrando que a infecção do camundongo TNFR1 KO com *L. major* provoca lesões cutâneas crônicas com algumas características que correlacionam às achadas em humanos, porém com a patologia restrita ao local de lesão. O objetivo desse trabalho foi avaliar a infecção de camundongos TNFR1 KO por *L. braziliensis*, como proposta de desenvolvimento de um modelo experimental para a leishmaniose mucocutânea. Nossas observações indicaram similaridade entre as lesões crônicas humana e nesses camundongos, compostas por um infiltrado inflamatório rico em linfócitos T CD8⁺ e neutrófilos, que permanecem mesmo após o controle do parasitismo e promovem intensa liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IFN- γ . Os níveis similares de IL-10 entre os camundongos C57BL/6 (selvagem) e TNFR1 KO sugerem que ausência de regulação da inflamação nesses animais pode ser um dos fatores que favorece a disseminação de parasitas e a permanência de células inflamatórias nos linfonodos e baço, durante as fases avançadas da doença. Porém, não detectamos a presença de lesões nas mucosas desse camundongo, o que sugere que a manifestação da doença é o resultado da interação de múltiplos fatores inerentes não só ao parasita, mas também ao hospedeiro.

Palavras-chaves: leishmaniose; TNFR1; *Leishmania braziliensis*; leishmaniose muco-cutânea

Abstract

Leishmaniasis is the name given to the disease caused by protozoa parasites of the genus *Leishmania*. Depending on the species a broad spectrum of clinical manifestations can be observed both locally and systemically during the infection. Leishmaniasis constitute an important public health problem worldwide, especially in developing countries, for example, Brazil. Mucocutaneous leishmaniasis is characterized by the development of chronic lesions disseminated to the oral and the nasal mucosa of patients, but with low parasite load. There is no specific murine model that mimics all the immunopathological characteristics described in humans. However, our group has recently shown that TNFR1 KO mouse infected with *L. major* can present some features that correlate with symptoms described in humans. The aim of this study was to evaluate the infection of TNFR1 KO mice by *L. braziliensis* attempting to develop an experimental model for mucocutaneous leishmaniasis. Our observations indicate similarities in the inflammatory infiltrate between human and TNFR1 KO mice lesions. There was an increase in TCD8+ lymphocytes and neutrophils in the site of infection that remain even after controlling the parasitism. Infiltration of these cells promote intense release of pro-inflammatory cytokines such as TNF and IFN- γ . Similar levels of IL-10 from C57BL/6 (wild-type) and TNFR1 KO mice suggest that the lack of regulation of the inflammatory process in these animals can be one of the factors that promote the spreading of parasites and maintenance of inflammatory cells in the lymph nodes and spleen during the advanced stages of the disease. Nevertheless, we did not detect the presence of mucosal lesions in those mice, suggesting that the manifestation of the disease is the result of the interaction of multiple factors inherent not only to the parasite, but also the host.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Infecção dos camundongos selvagens e TNFR1 KO por dois diferentes isolados de <i>Leishmania braziliensis</i>.	26
Figura 2. Infecção dos camundongos selvagens e TNFR1 KO pelo isolado PPS6 de <i>Leishmania braziliensis</i>.	29
Figura 3. Análises histológicas das lesões cutâneas crônicas dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por <i>L. braziliensis</i>.	32
Figura 4. Análises histológicas e da celularidade dos órgãos linfóides dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por <i>L. braziliensis</i>.	34
Figura 5. Análise do perfil do infiltrado de linfócitos nas lesões crônicas nos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por <i>L. braziliensis</i>.	36
Figura 6. Análise do perfil do infiltrado de células da imunidade inata nas lesões crônicas nos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por <i>L. braziliensis</i>.	37
Figura 7. Análise das concentrações de citocinas no local de lesão dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por <i>L. braziliensis</i>.	40
Figura 8. Análise das razões das produções de citocinas pro e antiinflamatórias no local de lesão dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por <i>L. braziliensis</i>. Erro! Indicador não definido.	
Figura 9. Análise da produção de citocinas por células de linfonodos drenantes dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por <i>L. braziliensis</i>.	42
Figura 10. Análise da produção de citocinas por células de baços dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por <i>L. braziliensis</i>.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características comuns descritas entre as lesões de pacientes com leishmaniose mucocutânea e as lesões crônicas desenvolvidas nos camundongos TNFR1 KO infectados por <i>L. major</i> e <i>L. braziliensis</i>	58
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP - Adenosina trifosfato
BSA: Soro albumina bovina
C: Graus Celsius
CD: Grupo de diferenciação
cDNA: DNA complementar
DEPC: Dietilpirocarbonato
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO: Dimetilsulfóxido
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ácido etileno-diamino-tetra-acético
ELISA: Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
g: Gravidade
g: Grama
HPRT: Hipoxantina fosforibosil transferase
IFN γ : Interferon gama
Ig: Imunoglobulina
IL-#: Interleucina
iNOS: Óxido nítrico sintase indutível
L: Litro
LCL: Leishmaniose cutânea localizada
LCD: Leishmaniose cutânea difusa
LM: Leishmaniose mucocutânea
LV: Leishmaniose visceral
M: Molar
MHC: Complexo de histocompatibilidade principal
MMP: Metaloproteinase da matriz extracelular
mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro
NAG: N-acetilglicosaminidase
NI: Não infectado
NK: Células exterminadoras naturais
OD: Densidade óptica
OPD: *o*-fenileno-diamina
PBMC: Célula mononuclear do sangue periférico
PBS: Salina tamponada com fosfato 0,1 M, pH 7,3 (*Phosphate Buffered Saline*)
PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)
ROS: Espécies reativas de oxigênio
SFB: Soro bovino fetal
SSA: Solução saturada de sulfato de amônia
TGF: Fator de crescimento transformante
Th#: Células T auxiliares do tipo #
TMB: Tetrametilbenzina
TNF: Fator de necrose tumoral
TNFR: receptor do TNF- α
U: Unidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. As leishmanioses: características gerais	1
1.2. A Leishmaniose mucocutânea	5
1.3. Os modelos experimentais para estudo das <i>Leishmanioses</i>	7
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Animais	15
3.2. Parasitos e antígeno	15
3.3. Infecção por <i>L. braziliensis</i>	16
3.4. Quantificação de parasitos no local de lesão, linfonodo drenante e baço	17
3.5. Cultura de células dos órgãos linfoides	18
3.6. Extração de tecido para dosagem de citocinas na lesão	19
3.7. Determinação de citocinas por ELISA (enzime linked imunosorbent assay)	19
3.8. Análises histopatológicas	20
3.8.1. Microscopia de luz	20
3.8.2. Imunohistoquímica	21
3.9. Citometria de fluxo	22
3.10. Análises estatísticas	22
4. RESULTADOS	25
4.1. Análise do curso da infecção, nas patas, de camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por duas cepas <i>Leishmania braziliensis</i>	25
4.2. Análise da infecção cutânea em camundongos selvagens e TNFR1KO pela cepa PPS6	27
4.3. Análises histopatológicas das lesões cutâneas de camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados com <i>L. braziliensis</i>	30
4.4 Análises histopatológicas dos órgãos linfoides secundários dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados com <i>Leishmania braziliensis</i>	33
4.5. Avaliação do perfil de leucócitos presentes nas lesões de camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados com <i>Leishmania braziliensis</i>	35
4.6. Avaliação da produção de citocinas pró e anti inflamatórias nas lesões e nos órgãos linfoides dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados com <i>L. braziliensis</i>	38
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. As leishmanioses: características gerais

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais provocadas por protozoários digenéticos unicelulares do gênero *Leishmania*, da família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida (Cruz et al., 2002). De acordo com dados recentes, as leishmanioses são endêmicas em 98 países pertencentes a 5 continentes, onde o Brasil se destaca em relação a alta incidência (Alvar et al., 2012; Salam et al., 2014). A Organização Mundial da saúde estima cerca de um milhão e trezentos mil novos casos diagnosticados a cada ano e um total de doze milhões de indivíduos acometidos no mundo (Alvar et al., 2012; Salam et al., 2014), os quais compõem, em sua maioria, a parcela mais pobre da população mundial (Alvar et al., 2006). A desnutrição e os casos de coinfeção com outras doenças contribuem para aumentar a severidade das manifestações, o que, aliado a falta de acesso às políticas de saúde pública, promovem um alto índice de mortalidade, em torno de 40 mil pessoas por ano (Alvar et al., 2012; Salam et al., 2014).

O ciclo de vida desse parasita exige a presença do hospedeiro vertebrado, representado por diversas espécies de mamíferos silvestres e domésticos, onde se inclui a humana (Desjeux, 1996). Mudanças climáticas e ecológicas têm sido intimamente relacionadas ao surgimento/aumento de casos no perímetro urbano e nas regiões temperadas, os quais tem se tornado ambiente propício ao estabelecimento do vetor (Maroli et al., 2013). São mais de 20 espécies capazes de infectar humanos (Alvar et al., 2012), divididas em dois subgêneros, de acordo com o seu desenvolvimento no intestino do vetor. No subgênero *Leishmania* estão classificadas espécies do Velho e do Novo Mundo, que se desenvolvem no intestino anterior e médio do vetor e no subgênero

Viannia estão inseridas espécies exclusivas do Novo Mundo, cujo desenvolvimento se dá no intestino posterior do inseto (Cupolillo et al., 2000).

O vetor é o hospedeiro invertebrado da *Leishmania* e é constituído por fêmeas de insetos comumente chamados de flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Phlebotomous* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Desjeux, 1996;Cruz et al., 2002;Maroli et al., 2013;Salam et al., 2014). Diferente dos machos, as fêmeas são hematófagas devido à necessidade de maior aporte energético para completar o desenvolvimento dos ovos (Maroli et al., 2013). Durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos ingerem fagócitos repletos de parasitas em seu fagossoma (vacúolo parasitóforo), os quais se encontram nas formas ovoides aflagelares, denominadas amastigotas (Schaible et al., 1999;Bajenoff et al., 2006). Dentro do intestino médio ou posterior do vetor, as amastigotas são liberadas após o rompimento dos macrófagos ingeridos e se diferenciam progressivamente, até a conversão nas formas promastigotas metacíclicas, móveis e alongadas, no intestino anterior do inseto. Nesse local, durante a picada no hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas são regurgitadas em baixa quantidade – entre 10 e 1000 - juntamente com a saliva do inseto, a qual possui potentes fatores imunomodulatórios que facilitarão a invasão em fagócitos (Sacks, 1989;Belkaid et al., 1998;Belkaid et al., 2000). Além disso, e uma vez estabelecido no interior da pele, o parasita aproveita-se dos componentes do sistema de complemento do hospedeiro e, por meio da opsonofagocitose, garante a entrada silenciosa nos fagócitos – tipicamente neutrófilos, células dendríticas e macrófagos (Mosser and Brittingham, 1997;Schaible et al., 1999;Dominguez et al., 2003) - que foram atraídos para o local em resposta a chegada do parasita (Dominguez et al., 2003).

As manifestações clínicas e sintomas são variados e parecem depender de fatores associados ao parasita, como a diversidade genética e os fatores de virulência de cada

espécie (Mosser and Brittingham, 1997;Yoneyama et al., 2007;Vendrame et al., 2010;Dantas et al., 2014). Baseado nesse critério, as manifestações clínicas das leishmanioses são divididas em dois grandes grupos: a leishmaniose tegumentar (ou leishmaniose cutânea) e a leishmaniose visceral.

Parasitas das espécies *L.(L.) donovani* e *L.(L.) infantum* são os causadores da forma visceral da leishmaniose no Velho e no Novo Mundo, respectivamente (Shakya et al., 2011;Kumar et al., 2014), a manifestação mais grave da doença. O acometimento de órgãos internos, tipicamente o baço e o fígado, provoca perda da função e consequente aumento em seu volume, caquexia, febre e mortalidade (Pereira et al., 2009;Shakya et al., 2011). Mais de 90% dos casos mundiais de leishmaniose visceral estão concentrados em 5 países: Índia, Bangladesh, sul do Sudão, Brasil e Etiópia (Alvar et al., 2012).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é caracterizada pelo surgimento de nódulos localizados na derme dos pacientes, os quais são macroscopicamente constituídos de áreas de necrose delimitadas por uma borda característica, porém, em geral, indolores (Mitropoulos et al., 2010). Microscopicamente, as úlceras são povoadas por células mononucleares, as quais estão repletas de formas amastigotas imóveis e aflageladas de *Leishmania*, que se desenvolveram entre algumas semanas ou meses após a picada do flebotomíneo (Silveira et al., 2004). Em alguns casos, observa-se cura espontânea da doença em indivíduos imunocompetentes (Reithinger et al., 2007), entretanto, não há consenso quanto à eliminação completa do parasita nos casos de proteção duradoura e de recidivas (Belkaid et al., 2001;Dantas et al., 2014), mesmo após o tratamento com fármacos leishmanicidas (Mitropoulos et al., 2010). A leishmaniose cutânea localizada pode ser causada pela infecção de, entre outras espécies de parasitas: *L.(L.) major* e *L.(L.) tropica* descritas em casos no Velho Mundo; e *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) panamensis*, *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) mexicana* nos casos do

Novo Mundo (Goto and Lindoso, 2010; Salam et al., 2014). Enquanto as espécies do velho mundo estão em geral associadas a manifestações benignas, as espécies do novo mundo causam um espectro de doenças relacionadas às formas mais severas. Dentre elas, a leishmaniose cutânea difusa (LCD), que é caracterizada pela ausência de uma resposta celular eficiente - referida como anergia - à presença de *Leishmania amazonensis*. As lesões múltiplas na pele dos pacientes com essa forma da doença podem ou não ulcerar, não são resolvidas espontaneamente (Alborzi et al., 2008) e são atribuídas a altos níveis de TNF (nova nomenclatura para TNF- α (Tracey et al., 2008) secretado (Mosser and Brittingham, 1997), um potente mediador relacionado ao dano tecidual (Da-Cruz et al., 1996). Dentre as manifestações tegumentares, a leishmaniose mucocutânea (LM) tem sido relatada como a mais grave (Herwaldt, 1999). É provocada por *L. braziliensis* e é caracterizada por lesões intensamente destrutivas, devido a resposta celular exacerbada (Mosser and Brittingham, 1997), as quais disseminam para as regiões de mucosas dos pacientes anos após a manifestação inicial, mesmo após a aparente resolução (Goto and Lindoso, 2010). Dez países, incluindo Afeganistão, Argélia, Colômbia, Iran, Síria, Etiópia, norte do Sudão, Costa Rica, Peru e Brasil, respondem por cerca de 75% da incidência dos casos de leishmaniose tegumentar, cuja manifestação multifacetada atinge e provoca lesões na pele.

Enquanto a espécie direciona qual das duas formas de leishmaniose será determinada, diversos outros fatores, incluindo componentes da saliva do vetor, polimorfismos dentro da própria espécie de *Leishmania* e no hospedeiro, imunossupressão, estado nutricional e idade influenciam fortemente desde o estabelecimento, progressão, até a severidade da doença (Reithinger et al., 2007; Ives et al., 2011; Novais et al., 2013).

1.2. A Leishmaniose mucocutânea

A leishmaniose mucocutânea, também conhecida como “espúndia” (Marsden, 1986;Goto and Lindoso, 2010) é uma manifestação endêmica em diversas partes da América latina, especialmente Brasil, Peru, Bolívia, Venezuela e Guatemala, onde é considerada uma das formas mais graves da leishmaniose tegumentar e um dos maiores problemas de saúde pública (Amato et al., 2008;Ronet et al., 2011;Gomes et al., 2014b).

É caracterizada por ulcerações crônicas nas áreas orais e nasofaringeais do paciente, com progressiva destruição do palato, de cartilagens, de massa óssea e dos tecidos moles adjacentes. Essas alterações destrutivas culminam na perfuração do septo e provocam severa desfiguração facial, acarretando distúrbios respiratórios e alimentares nos indivíduos acometidos (Amato et al., 1998;Alvar et al., 2006;Amato et al., 2008;Boaventura et al., 2010;de Camargo et al., 2014). Há também o relato de diversos pacientes sobre distúrbios psicossociais originados das dificuldades de reinserção no meio social e profissional, graças ao preconceito causado pelas deformações em todo o corpo (Costa et al., 1987).

Estudos indicam que as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo como *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. amazonensis* estão relacionadas com manifestações disseminadas da leishmaniose tegumentar (de Camargo et al., 2014), porém *L. braziliensis* é a espécie mais associada aos casos de leishmaniose mucocutânea, além de ser o agente mais comum no Brasil (Barral-Netto et al., 1995;Boaventura et al., 2006;Boaventura et al., 2010;Oliveira et al., 2011).

Não há certeza se existe uma relação causal entre a presença de infecções primárias por *Leishmania braziliensis* e o surgimento de lesões destrutivas na mucosa. Na maioria dos casos, as ulcerações podem ocorrer após algum tempo do aparecimento das lesões cutâneas iniciais, mas também podem surgir concomitantemente a elas, o que

caracteriza cronicidade e latência à doença (Saravia et al., 1990; Barral et al., 1995; Amato et al., 2003; Oliveira et al., 2013). Ainda que a carga parasitária nas lesões seja muito baixa (Da-Cruz et al., 1996; Amato et al., 2003; Boaventura et al., 2010; de Camargo et al., 2014), é comum encontrar parasitas na forma de amastigotas dentro de macrófagos em biópsias desses pacientes (Gul et al., 2013), o que permite comparar características genéticas entre as cepas obtidas nas mucosas e nas lesões iniciais (Saravia et al., 1990). A equivalência encontrada entre esses isolados permite propor que existe reativação das lesões (Saravia et al., 1990), a partir do carreamento de *L. braziliensis* pelo sangue (Martinez et al., 1992), mas é mais provável que isso aconteça a partir dos tecidos linfáticos (Barral et al., 1995).

Os mecanismos que permitem o escape da defesa e a consequente sobrevivência do parasita ainda não estão bem elucidados, mas casos relatados de resistência aos fármacos antimoniais nas lesões de mucosa (Arevalo et al., 2007), assim como ao estresse oxidativo dentro dos fagócitos (Souza et al., 2010), ou aqueles em que o tratamento nas lesões cutâneas primárias foi interrompido (Amato et al., 2008), direcionam alguns fatores que possam estar relacionados ao acometimento de mucosas. Até mesmo o estresse mecânico das áreas onde a lesão já fora aparentemente resolvida também tem sido envolvidos na geração de recidivas (Amato et al., 2008). Sabe-se, ainda, que existe prevalência de certos fatores do hospedeiro, como em indivíduos de meia-idade do sexo masculino, em casos de coinfeção e imunossupressão (em especial na infecção de indivíduos pelo vírus HIV), no uso crônico de certos fármacos, como corticosteroides (Marsden, 1994; Amato et al., 2008) e em casos de subnutrição (Alvar et al., 2006).

Embora a carga parasitária nas lesões seja baixa, observa-se uma forte resposta celular inflamatória que gera, como consequência, extensiva destruição tecidual (Gaze

et al., 2006;Boaventura et al., 2010) nos pacientes com a forma mucocutânea. Esse, inclusive é um dos fatores que diferencia as manifestações crônicas causados por *L. braziliensis* da leishmaniose visceral e da leishmaniose difusa – outras duas manifestações crônicas- em que a alta susceptibilidade dos pacientes parece estar relacionada à indução de uma resposta celular deficiente (Gaze et al., 2006;Dantas et al., 2014). A patologia nas mucosas humanas é fortemente relacionada a uma hiperatividade dos linfócitos T – em especial a atividade citotóxica (Ruiz and Becker, 2007;Novais et al., 2013;Santos et al., 2013;Dantas et al., 2013), a altos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como TNF, IFN- γ , CCL2, CCL5, CXCL10, paralelamente a liberação de citocinas anti- inflamatórias, como IL-4 (Gaze et al., 2006) e uma consequente resposta reguladora de IL-10 e TGF- β deficiente (Faria et al., 2005;Gaze et al., 2006). Essas características reforçam as hipóteses sobre a ausência de regulação negativa dos fenômenos inflamatórios como importante fator relacionado ao acometimento de mucosa desses pacientes (Ronet et al., 2011).

1.3. Os modelos experimentais para estudo das *Leishmanioses*

Os modelos experimentais em camundongos têm contribuído imensamente para a geração de conhecimento acerca dos mecanismos que envolvem a resposta imune em *Leishmaniose*. A maior parte desse conhecimento vem de experimentos que utilizam camundongos isogênicos infectados por *Leishmania major*.

A resistência a esse parasita em camundongos C57BL/6, verificada a partir de uma lesão pequena e auto limitante, é desencadeada pelo estímulo inicial de IL-12 pelas células dendríticas. A IL-12 é capaz de ativar células *natural killers* (NK) e linfócitos T CD8⁺ a promover a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺, via IFN- γ , em um fenótipo denominado Th1. Esses linfócitos ativados habilitam macrófagos - as principais

hospedeiras das amastigotas - por meio da liberação de TNF-, a eliminar o parasita (Sacks and Noben-Trauth, 2002; Mosmann et al., 2005) a partir de diversos mecanismos microbicidas. Apesar disso, acredita-se que a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio, em especial o óxido nítrico (NO) a partir da oxidação do grupo guanidino da L-arginina pela enzima iNOS, parecem ser as espécies responsáveis pela eliminação do parasita dentro do fagossoma (Nathan et al., 1984). Além disso, é sabido que uma resposta do tipo Th1 é capaz de gerar linfócitos T de memória, que promovem proteção prolongada ao parasita (Stobie et al., 2000).

Já a susceptibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. major* está relacionada à ausência de IL-12 ou à inibição dos seus receptores via IL-4 (Launois et al., 2002). Nesse modelo, a liberação de IL-4 pelas células dendríticas logo após a fagocitose do parasita provoca a ausência de produção de IFN- γ e TNF, inibindo os mecanismos de controle da infecção. Além disso, observa-se a produção de IL-5, IL-10, IL-13, IgG1 e arginase, o que torna o macrófago permissivo à replicação do parasita (Sacks and Noben-Trauth, 2002; Mosmann et al., 2005). A IL-10 medeia a ativação alternativa de macrófagos e tem, portanto, um papel anti-inflamatório – a ausência dessa citocina em camundongos nocautes possibilita o controle da carga parasitária e do tamanho da lesão (Mosser and Brittingham, 1997) - e promove a replicação do parasita dentro do fagossoma. Por isso, tem papel relevante durante a regulação da inflamação cutânea nas fases tardias da infecção (Sacks and Noben-Trauth, 2002).

Estudos têm mostrado, porém, que os fenômenos de resistência e susceptibilidade nos modelos experimentais sofrem influência de diversos componentes, como por exemplo, as vias de inóculo. É sabido que as primeiras populações celulares a estabelecer contato com o parasita inoculado por via subcutânea e intradérmica são diferentes, o que influencia no seu estabelecimento e, conseqüentemente, no resultado

da resposta imune induzida por ele (Ribeiro-Gomes et al., 2014). Além disso, têm sido observadas variações nas respostas do hospedeiro a diferentes doses e a diferentes cepas de *Leishmania* (Cortes et al., 2010). Esses achados são reforçados a partir das observações do modelo de infecção natural, em que os componentes da saliva do vetor têm papel importante em ampliar a severidade das lesões. Detectou-se ainda, nesse mesmo modelo experimental, uma possível manutenção de parasitas residuais mediadas pela IL-10, que poderia contribuir para a reativação das lesões por *L. major* (Belkaid et al., 1998;Belkaid et al., 2000;Belkaid et al., 2001;Peters et al., 2008a).

Além disso, estudos com outras espécies de *Leishmania* têm mostrado a relevância dos fatores de virulência do parasita na determinação do perfil de resposta do camundongo contra a infecção. Camundongos C3H, C57BL/10 e C57BL/6, capazes de resolver a infecção por *L. major*, desenvolvem doença crônica após o inóculo de *L. amazonensis* (Afonso and Scott, 1993;Loria-Cervera and Andrade-Narvaez, 2014). Essa patologia é caracterizada, nessas duas últimas linhagens de animais, pela ausência de IFN- γ e baixos níveis de IL-4. A partir disso, esse fenótipo não é atribuído à indução de uma resposta Th2, sugerindo que ausência de um perfil Th1 é responsável pela indução da susceptibilidade (Afonso and Scott, 1993), por meio do comprometimento da maturação das células dendríticas e da produção de IL-12 (Soong et al., 1997). Já em camundongos BALB/c a alta produção de IL-4 parece ser determinante para a indução de um perfil de susceptibilidade, visto que o bloqueio do IL-4 provoca redução da lesão e da carga parasitária (Afonso and Scott, 1993;Cortes et al., 2010).

Nessa mesma perspectiva, camundongos BALB/c são susceptíveis a *L. major* e *L. amazonensis*, mas são capazes de controlar a infecção por *L. donovani* e *L. infantum* partir de uma rápida resposta do tipo Th1 e formação de granulomas após a visceralização (Murray et al., 1982). Devido à alta variabilidade entre os isolados de *L.*

braziliensis, camundongos BALB/c são considerados parcialmente resistentes, podendo apresentar visceralização (Pereira et al., 2009) e controlando a infecção com uma resposta imune mista (Murray et al., 1982).

Ainda não há um modelo que atenda todas as características patológicas observadas nos casos de leishmaniose mucocutânea. Porém, alguns modelos apresentam características imunopatológicas que se aproximam das descritas em humanos. A primeira tentativa para desenvolvimento de um modelo experimental para a leishmaniose mucocutânea originou-se a partir do inóculo de *L. major* em camundongos de uma linhagem híbrida, a partir do cruzamento entre C57BL/6 e BALB/c (Barral et al., 1983). Observou-se, nesse camundongo, a capacidade de visceralização e o desenvolvimento de lesões nas regiões nasais, porém a grande quantidade de parasitas nesses locais, bem como a espécie de parasita utilizada, tornaram esse modelo pouco adequado. A partir daí, observa-se na literatura que diversos tipos de camundongos experimentais são capazes de desenvolver inflamações crônicas em resposta à *L. braziliensis*. Um estudo a partir da infecção por esse parasita em camundongos Rag1 KO mostrou a presença de lesões mais graves quando esse animal era reconstituído com linfócitos T CD8⁺, em relação ao camundongo não reconstituído, reforçando as ideias de que as células T CD8⁺ têm um papel patogênico. Além disso, foi mostrado que os neutrófilos são majoritários dentre as células mieloides que compõem a lesão, as quais liberam altos níveis de IFN- γ e TNF. Também foi detectada a presença de disseminação da inflamação para a orelha contralateral, para a cauda e para o focinho dos animais reconstituídos. O mesmo não ocorreu com os animais Rag1 KO reconstituídos com células T CD4⁺ e T CD8⁺ ou com camundongos não reconstituídos, sugerindo que o desenvolvimento de lesões primárias e metastáticas nesse camundongo é dependente de

linfócitos T CD8⁺. Foi possível, porém, detectar níveis de parasitas similares aos dos camundongos onde não se observou metástase (Novais et al., 2013).

Existe um certo consenso entre os estudos em humanos e em camundongos do papel relevante de TNF nas infecções por *Leishmania*. O TNF é uma citocina pleiotrópica produzida por diversas células, como macrófagos ativados, linfócitos T, células *natural killers* e outros tipos celulares, podendo ser expresso em duas formas biológicas, a forma secretada e a forma transmembranar (Tracey et al., 2008;Hu et al., 2014). Ambas são capazes de se ligar aos dois receptores de TNF - TNFR1 (TNFRp55) e TNFR2 (TNFRp75) -, mas há evidências de que o TNF secretado sinergiza preferencialmente com o receptor p55 e o TNF transmembranar, com o receptor p 75. Além disso, ambos os receptores parecem induzir distintas vias de sinalização quando se ligam às respectivas citocinas (Hu et al., 2014). Nas infecções por *Leishmania* o TNF está envolvido em diferentes funções biológicas, dependendo do momento da infecção: primeiramente, promove o desencadeamento da inflamação - por meio da indução de fatores quimiotáticos - e a citotoxicidade, a partir da liberação por linfócitos T e macrófagos ativados na defesa inicial. Nos momentos finais, o TNF induz o remodelamento tecidual após a eliminação do parasita nos casos de resistência (Vieira et al., 1996;Cortes et al., 2010;Oliveira et al., 2012). Entretanto, nas manifestações crônicas em humanos, os altos títulos de TNF no soro e na lesão correlacionam essa citocina a uma função patológica, o que é corroborado pelos casos de leishmaniose crônica em camundongos (Vieira et al., 1996;Oliveira et al., 2012;Novais et al., 2013). Camundongos C57BL/6 deficientes para o receptor 1 de TNF (TNFR1 KO, TNFRp55^{-/-}) desenvolvem doenças crônicas quando infectados com outros patógenos, como *Citrobacter rodentium* em colite experimental e *Mycobacterium tuberculosis*, sugerindo

um importante papel desse receptor é no remodelamento tecidual (Flynn et al., 1995;Goncalves et al., 2001).

Vieira e colaboradores (1996), ao estudarem a infecção por *L. major* nos camundongos C57BL/6 TNFR1 KO, verificaram a presença de lesões crônicas aparentemente similares àquelas em pacientes com leishmaniose mucocutânea. Esses camundongos eram incapazes de resolver a patologia nas fases avançadas de infecção, ainda que o parasitismo estivesse em níveis controlados. Mais tarde, Oliveira e colaboradores (2012), ao caracterizarem o perfil imunopatológico dessas lesões experimentais, detectaram uma incapacidade desse animal em regular a inflamação, devida aos baixos níveis de apoptose em fases avançadas, o que fora atribuído a ausência do TNFR1, o qual já se encontra bem caracterizado por mediar a apoptose a partir da ativação do seu domínio de morte (Naude et al., 2011) em *Leishmania* e outros parasitas intracelulares (Kanaly et al., 1999). Assim, as lesões crônicas nos camundongos TNFR1 KO infectados por *L. major* são povoadas por um vasto infiltrado inflamatório - rico em células T CD8⁺ e células Ly6G⁺ – e pela liberação contínua mediadores da inflamação, como IFN- γ , TNF e IL-17. A carga parasitária é baixa e similar à dos camundongos selvagens (C57BL/6), os quais já resolveram a patologia nas fases avançadas. Uma menor tendência à expressão de IL-10 é observada em relação aos camundongos selvagens, o que reforça os dados de apoptose e sugerem uma ausência de regulação da inflamação.

Entretanto, alguns problemas com relação a esse modelo poderiam inviabilizar a sua utilização como modelo para estudo da leishmaniose mucocutânea. Primeiro porque a espécie de parasita utilizada foi a *Leishmania major*, da qual não se tem registros concretos de leishmaniose mucocutânea. Depois, porque o inóculo nas patas dos camundongos TNFR1 KO foi realizado por via subcutânea e mobiliza a resposta imune

em tecidos diferentes dos da via intradérmica, o que poderia impedir a disseminação dos parasitas para tecidos de mucosas (Vieira et al., 1996;Oliveira et al., 2012). Assim, para o presente trabalho, nos perguntamos: a infecção do camundongo TNFR1 KO com *Leishmania braziliensis*, a espécie encontrada nas lesões dos pacientes com a forma mucocutânea, poderia induzir a imunopatologia característica da leishmaniose mucocutânea e um conseqüente desenvolvimento de lesões crônicas na mucosa?

2. OBJETIVOS

Objetivo geral: Caracterização do infiltrado celular nas lesões de camundongos TNFR1 KO infectados com *L. braziliensis*, como proposta de um modelo experimental para estudo de leishmaniose mucocutânea.

Objetivos específicos:

- Analisar o desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos TNFR1 KO infectados com *L. braziliensis*;
- Analisar o parasitismo nas lesões cutâneas dos camundongos TNFR1 KO infectados com *L. braziliensis*;
- Analisar a expressão de citocinas IFN- γ , TNF, IL-10 e IL-17 nas lesões cutâneas e produção de IFN- γ , TNF e IL-10 dos linfonodos drenantes e baço dos camundongos TNFR1 KO infectados com *L. braziliensis*;
- Avaliar o infiltrado de células T (CD4⁺, CD8⁺), macrófagos, células dendríticas e neutrófilos das lesões cutâneas de camundongos TNFR1 KO infectados com *L. braziliensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos C57BL/6 foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO). Camundongos *knockout* para o receptor 1 (p55) de TNF (TNFRp55^{-/-}, TNFR1KO) 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 transferidos ao biotério experimental do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia estavam expostos a condições de temperatura e fotoperíodo controlados, alimentando-se de 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 nos experimentos. Todos os procedimentos foram executados de acordo com os protocolos institucionais e internacionais que regulam a experimentação em animais (protocolo CEUA 48/2013).

3.2. Parasitos e antígeno

Foram utilizadas neste estudo as cepas HPV6 (MHOM/BR/2006/HPV) e PPS6 de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/2006/PPS) obtidas do Banco Imunobiológico de Leishmanioses da região Centro-Oeste (Leishbank) no Instituto de Patologia e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (UFG). Formas promastigotas foram cultivadas em estufa a 25°C, em meio de Grace (GIBCOBRL- Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) diluídos em água milli-Q, acrescido de 20%

soro fetal bovino (Cripion Biotecnologia - Andradina, SP, BR), mais 100 unidades/mL penicilina G (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 100 µg/mL streptomicina (Sigma-Aldrich) e 2 mM L-glutamina (GIBCO BRL- Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) com pH 6,5.

Para a obtenção do antígeno particulado de *Leishmania*, após lavagem em salina de fosfatada em pH 7,4 (PBS), as culturas em fase estacionária foram submetidas a centrifugação (2000 x g por 15 min.) seguida de sete ciclos de congelamento em N₂ líquido e aquecimento em banho-maria a 37°C. As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) e em seguida, os extratos foram preparados na concentração de 1mg/mL e estocados a -20°C para serem utilizados como estímulo em cultura de células de baço e linfonodos drenantes.

3.3. Infecção por *L. braziliensis*

Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* foram cultivadas durante cinco dias em meio Grace suplementado. As culturas de células foram lavadas em PBS estéril por duas vezes e centrifugadas a 2000 x g a 4°C por 15min e sobrenadante foi, então, desprezado. O sedimento foi suspenso em 1 mL de PBS e uma alíquota foi retirada e diluída em formol tamponado para a estimativa do número de parasitas por contagem em câmara de Neubauer.

Para a infecção subcutânea a concentração utilizada foi de 10⁶ parasitas em 40 µL de PBS nas duas patas traseiras dos camundongos C57BL/6 e TNFR1 KO (3-5 animais por grupo)

Já o inóculo intradérmico em camundongos C57BL/6 e TNFR1 KO foi feito com a concentração de 10⁶ promastigotas de *L. braziliensis* em 10 µL de PBS nas duas orelhas.

Durante 15 semanas foram realizadas medidas das lesões com auxílio de paquímetro digital (Starrett 727, Itu, SP, Brasil) e o resultado foi expresso, para a infecção subcutânea, fazendo-se a diferença entre a pata infectada e a pata do camundongo não infectado. Para a infecção intradérmica, mediu-se a espessura das orelhas infectadas.

3.4. Quantificação de parasitos no local de lesão, linfonodo drenante e baço

Para a infecção subcutânea, após 3, 6 e 15 semanas os animais foram sacrificados e as patas infectadas foram coletadas. Para a infecção intradérmica, os animais foram sacrificados após 6, 8 e 15 semanas de infecção, tempos em que as orelhas, os baços e os linfonodos drenantes foram retirados e submetidos a processamento para que se obtivesse uma suspensão de células contendo os parasitas. Após maceração manual, os homogenatos resultantes foram centrifugados a 250 x g por 4 minutos e os sobrenadantes recuperados foram submetidos a uma posterior centrifugação de 2.000 x g por 15 minutos. O sedimento obtido foi suspenso em 400 µL de meio Grace (GIBCO) suplementado e duzentos microlitros dessa suspensão foram colocados em duplicata nos primeiros poços de placas de fundo chato de 96 poços (Afonso and Scott, 1993). Posteriormente as soluções foram serialmente diluídas (método da diluição limitante), em que eram transferidos 100 µL da solução contendo as células aos poços seguintes que continham 100 µL de meio Grace suplementado (1:2). A cada transferência era descartado o conjunto de ponteiras utilizadas a fim de evitar um resultado falso-positivo provocado pelo arraste de parasitas através da ponteira. As placas foram incubadas a 25° C durante 15 dias para verificar-se o crescimento das promastigotas. A partir da observação do último poço que contivesse *Leishmania*, estimava-se o número de parasitos presentes nas lesões e órgãos linfoides secundários e, assim, os resultados foram expressados em forma de logaritmo negativo.

3.5. Cultura de células dos órgãos linfoides

Nos mesmos tempos utilizados para a quantificação de parasitas inoculados por via intradérmica, foram extraídos baço e linfonodos drenantes de animais infectados e não-infectados. A maceração dos órgãos foi feita em PBS e, posteriormente, foi feita a centrifugação do material.

Após maceração as células do baço foram submetidas durante 3 min a solução de lise de hemáceas (Tris base 17 mM e cloreto de amônio 144m M). Tanto para o baço quanto para o linfonodo foi feita contagem de células em azul de tripan, feita centrifugação e a concentração acertada para 5×10^6 células/mL em meio RPMI (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) acrescido de 1% de soro fetal bovino (Cripion Biotecnologia - Andradina, SP, BR), 100 unidades/mL penicilina G (Sigma - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA), 100 μ g/mL streptomicina (Sigma - Sigma Chemical, CO, St Louis, MO, USA), 2 mM l-glutamina (Sigma Aldrich), pH7.2.

Em placas de cultura de 24 poços foram adicionados 1000 μ L/poço da suspensão de células sem ou com estímulo de 50 μ g/mL de antígeno particulado de *L. braziliensis*. Após 24h de cultura o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70° C para dosagem de TNF e com 72h de cultura o sobrenadante foi coletado para dosagem de outra citocinas (armazenado a -20° C).

Os baços de ambas as linhagens de camundongos foram macerados isoladamente e as células colocadas em cultura em duplicata. Para os linfonodos de C57BL/6 fez-se *pool* de animais para se obter quantidade de células suficiente para cultura em duplicata. Os linfonodos de TNFR1 KO foram macerados isoladamente e a cultura foi feita em duplicata.

3.6. Extração de tecido para dosagem de citocinas na lesão

Nos tempos indicados, as orelhas dos camundongos 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 Corp., 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 $10.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi recolhido, e congelado a -70°C até a realização do ELISA para a determinação das citocinas produzidas no local de lesão.

3.7. Determinação de citocinas por ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Os sobrenadantes de cultura celular contendo citocinas resultantes da estimulação antigênica foram plaqueados. Os macerados do local de lesão foram distribuídos nas placas com as seguintes diluições: 1:2 e 1:4 e sua quantidade dosada por ELISA de captura com a utilização de kits da BD (BD Pharmingen, São Diego, CA, EUA) para as citocinas TNF e IL-10. Para IL-17, o kit utilizado foi da marca eBioscience (eBioscience, San Diego, CA, USA).

A dosagem de IFN- γ foi feita com utilização de anticorpos monoclonais produzidos no Laboratório de Imunoparasitologia (NUPEB, UFOP), gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Luís Carlos Crocco Afonso. As placas de ELISA (Nalgene NUNC, Rochester, NY, EUA) foram sensibilizadas com 100 μL a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do anticorpo de captura anti- IFN- γ murino (R4-6A2), e incubadas por 18 horas a 4°C . Em seguida foi feito o bloqueio da placa com PBS contendo 5% de soro fetal bovino

(Cripion) por 1h. Passado esse tempo, as placas foram lavadas cinco vezes com uma solução de Tween a 0,05% em PBS e as amostras foram aplicadas. A curva padrão foi feita pela adição do padrão a uma concentração de 1 ng/mL em duplicata e diluído (1:2) nos poços subsequentes para montagem da curva. Então, as placas foram incubadas por 2h a 25° C. Após nova lavagem adicionou-se anticorpos policlonais anti-IFN- γ feitos em coelho (também gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso). Incubou-se por 1h a 25° C. Depois de lavadas cinco vezes com Tween 0,05% em PBS, foi adicionado o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, seguido de incubação por 1h a 25° C. Após novo ciclo de lavagem, agora por 10 vezes, adicionou-se a solução substrato de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolino sulfônico) (Sigma Aldrich) 0,05% em tampão citrato-fosfato (0,1M, pH 4,0) acrescido de H₂O₂ a 0,005%. A reação foi parada com a utilização de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich) a 1%. As placas foram lidas em um comprimento de onda de 405 nm com um leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). O limite de detecção foi de 0,03 ng/mL.

Já nos ensaios para a dosagem de TNF e IL-10 o procedimento foi feito exatamente como recomenda o fabricante (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA). O limite de detecção foi de 32pg/mL para ambas as citocinas).

A dosagem de IL-17 também respeitou as especificações do fabricante (eBioscience, San Diego, CA, USA) e o limite de detecção foi de 4 pg/mL.

3.8. Análises histopatológicas

3.8.1. Microscopia de luz

Amostras de lesões, linfonodos drenantes e baço de camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados foram coletadas após 6 e 15 semanas de infecção e fixadas em

formol 10% tamponado com PBS pH 7,2. As lâminas foram inicialmente desparafinadas em xilol I e II por 15 min cada, hidratadas em soluções decrescentes de álcoois 3 min cada, e a seguir, lavadas em água corrente. Foram realizados cortes histológicos seriados de 5 µm de espessura em micrótomo de rotação SPENCER (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), os quais foram montados em lâminas e corados segundo as técnicas de Hematoxilina-Eosina (H&E). As análises histológicas foram desenvolvidas sob microscopia de luz usando de 100 a 400 vezes de aumento.

3.8.2. Imunohistoquímica

Para análise de imunohistoquímica, visando marcar a *Leishmania* nas lesões, as lâminas ficaram por uma hora na estufa a 57° C para que o excesso de parafina fosse removido antes do ensaio. 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. Em seguida foram realizados os três bloqueios da reação. O primeiro deles realizado em imersão, com solução de PBS 10% de peroxidase, por 30 minutos. Em seguida 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 enxugamos o excesso de solução ao redor dos cortes. Em seguida pingamos o soro de coelho previamente

infectado com *L. infantum*, na diluição de 1:800. As lâminas foram deixadas em câmara úmida escura por 12 horas a 4°C. No dia seguinte lavamos as lâminas por três vezes em PBS, cinco minutos cada lavagem, para a retirada do anticorpo não ligado. Em seguida pingamos sobre o corte os reagentes do kit DAKO (DAKO North America, Inc, Carpinteria, CA, EUA). Primeiro foi acrescentada a estreptoavidina-HRP, que permaneceu sobre o corte por 30 minutos, seguida de lavagem com PBS por três vezes, e por fim o anticorpo biotinilado, incubado por 30 minutos em câmara escura e úmida. Em seguida as lâminas passaram por outro processo de lavagem. Por fim, fizemos a revelação com PBS contendo 50 mg de DAB e 0,25% de H₂O₂. Após cinco minutos mergulhamos rapidamente as lâminas em solução de hematoxilina e lavamos em água corrente. Por fim, nova lavagem em PBS foi realizada para remoção de excesso de corante. Em seguida as lâminas foram desidratadas na sequência de álcool: 70, 80, 90%; e três banhos em álcool absoluto; por cinco minutos nos primeiros e 10 minutos em cada absoluto. Posteriormente, foram passadas em três banhos de xilol, por 10 minutos em cada. Por fim montamos as lâminas com entelan (Merck, Darmstadt, Hessen, ALE). A quantificação de células infectadas e do número de parasitas foi feita a partir de pelo menos 20 imagens obtidas de três animais por grupo para cada tempo analisado. As mesmas foram obtidas com objetiva de 40x através do microscópio Optical Olympus Research (Center Valley, PA, EUA) acoplado a um sistema de captura de imagem digital (MegaCybernetics, Center Valley, PA, EUA). As imagens foram analisadas com o software KS300 (Kontron Elektronik/Carl Zeiss, NY, EUA).

3.9. Citometria de fluxo

Após 15 semanas de infecção as orelhas dos camundongos C57BL/6 e TNFR1 KO foram extraídas retiradas e colocadas em álcool 70° por 5 minutos, logo

depois transferidas para PBS. Então, os lobos foram separados com o auxílio de uma pinça dente de rato e mergulhadas em 1 mL de meio de digestão composto de 500 µL de RPMI (GIBCO) sem soro fetal bovino, 50 µg de liberase (Roche Diagnostics Corp.) e 0,25 mg de desoxiribonuclease I (Sigma-Aldrich). A solução contendo as orelhas foi, então, incubada a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Logo depois, a placa foi transferida para o gelo e a digestão interrompida com EDTA 0.5 M diluído 1:100 e 1mL de RPMI acrescido de 3% de soro fetal bovino (Cripion). O tecido digerido, juntamente com o meio de cultura foram macerados manualmente e centrifugados a 400 x g por 10 minutos. 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, San Diego, CA, USA); 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) e anti-CD4 (clone GK1.5). Todos os anticorpos utilizados foram da BD (BD Biosciences Pharmingen, São Jose, CA, EUA). Em seguida adicionamos 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. Para tanto, utilizamos o FACSCanto™ II (BD Bioscience) e adquirimos toda a amostra. As análises foram realizadas no *software* FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

3.10. Análises estatísticas

Representamos os resultados como média ± 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. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, sendo consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Análise do curso da infecção, nas patas, de camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por duas cepas *Leishmania braziliensis*

Dados da literatura mostraram que diferentes isolados de *L. braziliensis* induzem lesões cutâneas distintas no modelo murino (de Araujo et al., 2014). Baseados nessas informações, optamos, inicialmente, por comparar o curso de lesão e o parasitismo nos camundongos infectados por duas cepas de *L. braziliensis*: a HPV6, proveniente de lesões cutâneas de paciente do estado da Bahia e a PPS6, obtida a partir de mucosa de paciente oriundos do estado do Tocantins (Gomes et al., 2014a). Ambas as cepas possuem alta atividade ectonucleotidásica, uma das medidas que está relacionada à infectividade do parasita, o que garante a presença de lesões e parasitismo detectáveis durante o curso de infecção (Leite et al., 2012).

Nossos resultados sobre as lesões cutâneas dos camundongos selvagens e TNFR1 KO mostraram que ambos os isolados provocaram lesões nas patas de ambas as linhagens de camundongos. Nos camundongos selvagens essas lesões são de pequeno tamanho (que atingem até 1 mm), não ulcerativas e que persistiram até a décima quinta semana. Para os camundongos TNFR1 KO observamos que ambas as cepas também induziram lesões não ulcerativas e persistentes até a décima quinta semana. Entretanto, quando comparadas às lesões desenvolvidas nos camundongos selvagens, observamos que as lesões dos camundongos TNFR1 KO foram significativamente maiores (com valores iguais ou superiores a 1 mm) (**Figuras 1 A e C**).

Sobre a análise do parasitismo nos locais de infecção nos camundongos selvagens e TNFR1 KO, nossos resultados mostraram que ambas as linhagens não conseguem eliminar o parasita completamente, em ambas cepas, no local na infecção.

Entretanto, camundongos selvagens, na fase crônica avançada de infecção (décima quinta semana), mostraram redução do número de parasitas da cepa HPV6 no local da lesão quando comparados aos camundongos TNFR1 KO. Não observamos esse fato para os camundongos, de ambas as linhagens, infectados pela cepa PPS6 da *L. braziliensis*. Para essa cepa, camundongos selvagens e TNFR1 KO não mostraram redução ou diferenças nos números dos parasitas no local de infecção (Figura 1C e Figuras 1D).

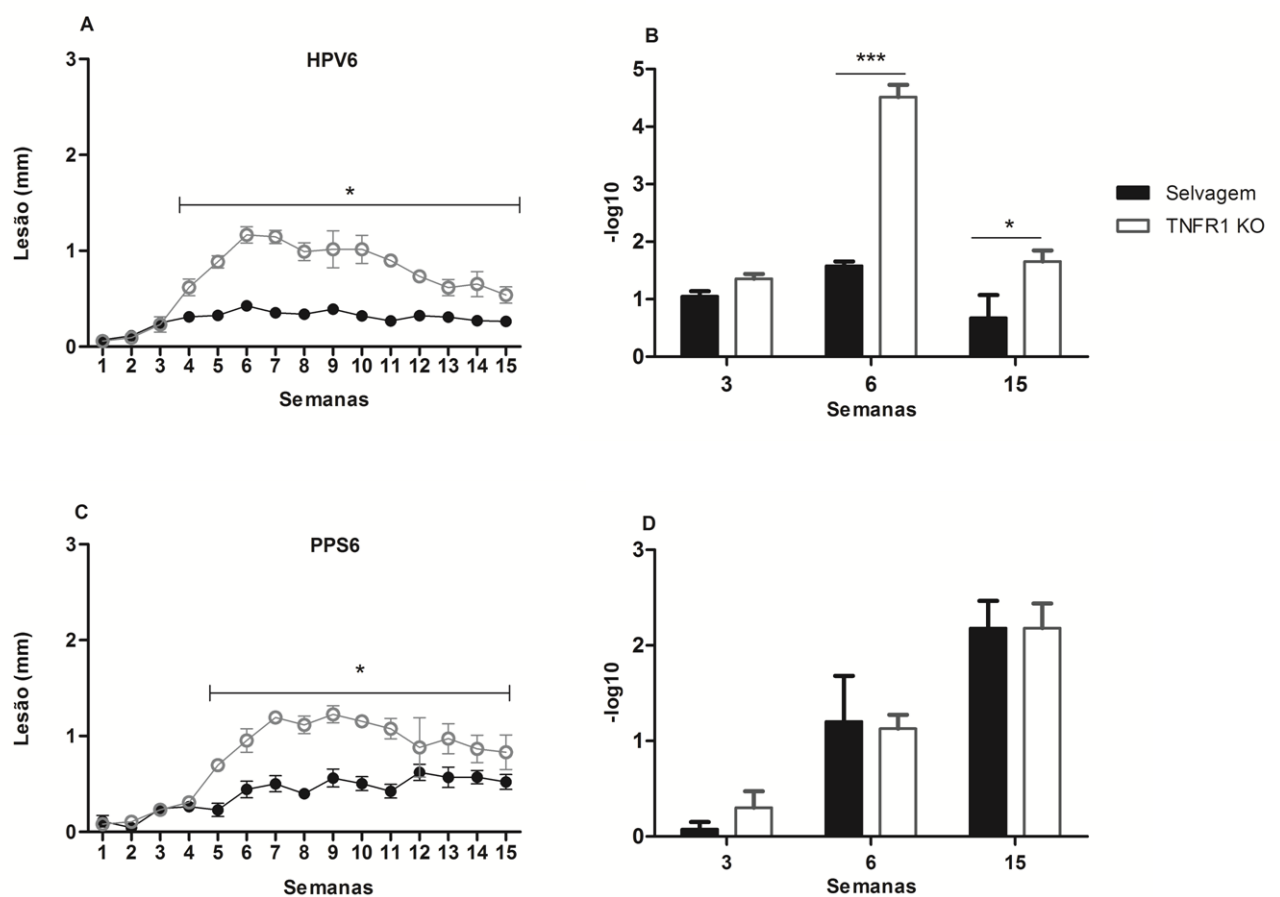


Figura 1. Infecção dos camundongos selvagens e TNFR1 KO por dois diferentes isolados de *Leishmania braziliensis*. Os camundongos foram infectados na pata com 1×10^6 formas promastigotas de *L. braziliensis* e as lesões foram medidas semanalmente. A média dos valores das patas de camundongos não infectados foi subtraída de cada pata infectada para estimativa das lesões provocadas. (A) representa os camundongos infectados pelo isolado HPV6 e (C) pelo isolado PPS6. Após seis e 15 semanas de infecção, os camundongos foram eutanasiados e as lesões foram removidas para determinação da carga parasitária por meio da técnica de diluição limitante. A carga dos parasitas nos animais infectados por (B) HPV6 e (D) PPS6 foi determinada individualmente e as médias das diluições máximas de cada grupo foram expressas pelo logaritmo negativo do título (última diluição positiva). Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (* = $p < 0,05$ e *** = $p < 0,001$). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

4.2. Análise da infecção cutânea em camundongos selvagens e TNFR1KO pela cepa PPS6

Um dos nossos objetivos é propor um modelo murino próximo do natural para o estudo da leishmaniose mucocutânea. Assim, optamos por dar prosseguimento aos experimentos com o isolado PPS6, que provocou lesões cutâneas similares às do isolado HPV6, porém com número de parasitas inferiores, e perfil similar do número parasitas nas lesões dos camundongos selvagens e TNFR1 KO durante o tempo de análise. O detalhe do número de parasitas é importante, pois a verificação do parasitismo em humanos com manifestação crônica de leishmaniose mostra baixos títulos de parasitas nas lesões de mucosa as quais, ainda assim, se encontram exageradamente inflamadas (Marra et al., 2014). Além disso, após esses resultados preliminares, decidimos trabalhar com a via intradérmica de infecção, devido à similaridade dessa com a via de infecção natural. Adicionalmente, dados da literatura têm exibido sistematicamente uma série de diferenças nos perfis imunomodulatórios que podem ser detectadas entre as vias subcutânea e intradérmica durante infecções experimentais por *Leishmania* (Ribeiro-Gomes et al., 2014).

Para as lesões cutâneas na orelha, os resultados mostraram que os camundongos selvagens e TNFR1 KO desenvolveram lesões que persistiram até a décima quinta semana de infecção. Entretanto, os camundongos TNFR1 KO desenvolveram lesões cutâneas maiores que os camundongos selvagens, a partir da terceira semana (**Figura 2A**).

O parasitismo foi avaliado nas lesões e nos órgãos linfoides secundários (linfonodos drenantes e baço). Os resultados das análises do parasitismo no local da lesão mostraram perfis similares dos números de parasitas entre os camundongos

selvagens e TNFR1 KO ao longo do tempo analisado (**Figura 2B**). Os camundongos TNFR1 KO apresentam maiores números de parasitas nos linfonodos drenantes em todos os tempos analisados, quando comparados aos camundongos selvagens. Em tempos mais avançados da infecção (15 semanas), os camundongos selvagens parecem ter eliminado os parasitas dos linfonodos drenantes quando comparados aos camundongos TNFR1 KO (**Figura 2C**). As análises do número de parasitas no baço dos camundongos mostraram níveis significativos de *Leishmania* nesses órgãos em ambas as linhagens de camundongos a partir da sexta semana de infecção. Esses valores foram 100 vezes maiores duas semanas depois nos camundongos TNFR1 KO quando comparados aos animais selvagens. Após esse tempo, o título de parasitas foi reduzido, porém, nos camundongos TNFR1 KO ainda observamos a presença de parasitas (**Figura 2D**). Na Figura **2E** são mostrados os níveis de parasitas no local (orelha), no linfonodo drenante e no baço de camundongos TNFR1 KO após 15 semanas de infecção por *L. major*. Não foi possível detectar parasitas no baço, ao contrário do que observamos com a espécie de *L. braziliensis*.

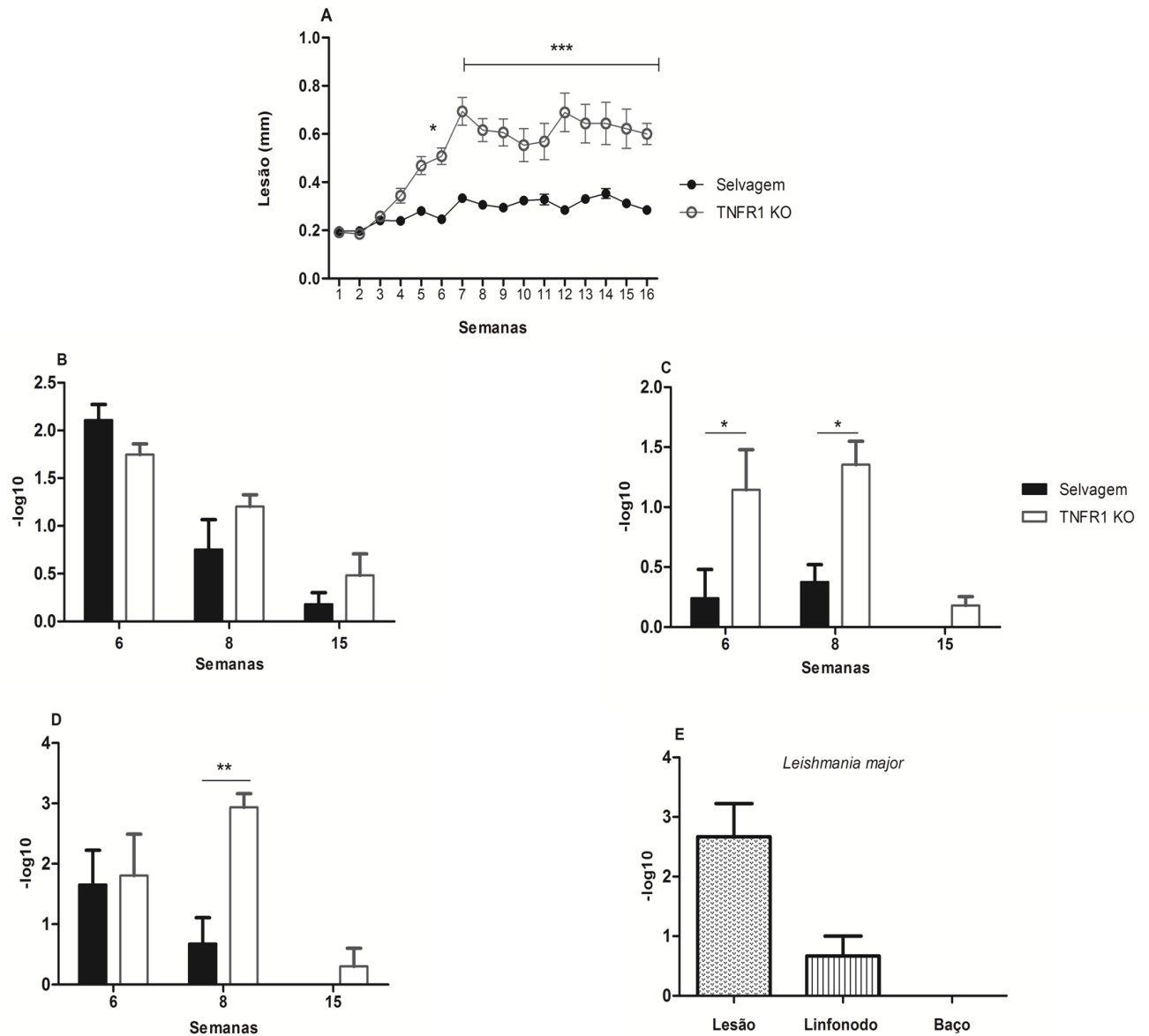


Figura 2. Infecção dos camundongos selvagens e TNFR1 KO pelo isolado PPS6 de *Leishmania braziliensis*. (A) Os camundongos foram infectados com 1×10^6 formas promastigotas de *L. braziliensis* e as espessuras das orelhas foram semanalmente medidas. Após seis, oito e 15 semanas da infecção, os camundongos foram eutanasiados, as lesões removidas e carga parasitária determinada pela técnica da diluição limitante no local de lesão (B), no linfonodo drenante (C) e no baço (D). (E) Carga parasitária em camundongos TNFR1 KO infectados com formas promastigotas estacionárias de *Leishmania major*. As médias das diluições máximas de cada grupo foram expressas pelo logaritmo negativo do título (última diluição **positiva**). Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni (*representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$). Foram utilizados cinco animais por grupo. Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

4.3. Análises histopatológicas das lesões cutâneas de camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados com *L. braziliensis*

Os resultados da observação macroscópica das lesões dos camundongos, durante a infecção por *L. braziliensis*, mostram uma deformação nas orelhas dos camundongos TNFR1 KO, em comparação aos camundongos selvagens, as quais adquirem um aspecto intumescido e ulcerativo por volta da oitava semana após inóculo. A partir desse momento a lesão se espalha por toda a área da orelha, deixando de estar pontualmente no local de injeção e se apresenta sem bordas definidas (**Figura 3A**).

Os resultados das análises histopatológicas das lesões dos camundongos TNFR1 KO infectados por *L. braziliensis* correlacionam-se ao aspecto macroscópico descrito nas lesões das orelhas. As análises mostraram uma inflamação intensa, capaz de atingir regiões superficiais e profundas da derme ventral e dorsal dos órgãos, com aspecto mais espessado nas lesões crônicas (15 semanas após infecção) dos camundongos TNFR1 KO quando comparados aos camundongos selvagens infectados com *L. braziliensis* (**Figura 3B** e **Figura 3C**). Na **figura 3D** as setas pequenas pretas indicam a presença de células mononucleares povoando uma inflamação moderada e difusa, restrita à região ventral da orelha do camundongo selvagem. As setas pretas pequenas evidenciam a presença predominante de células mononucleares, também, na pele de orelha dos camundongos TNFR1 KO, que apresenta uma inflamação crônica muito mais intensa, difusa e composta, também, por algumas células gigantes e uma população de neutrófilos em quantidade superior à amostra anterior (**Figura 3E**). Na **figura F** as setas pretas grandes indicam a presença de amastigotas coradas pela técnica de imunohistoquímica nas orelhas de camundongos selvagens após 6 semanas e que não

foram detectadas após 15 semanas de infecção (dados não mostrados). A figura é representativa dos dois grupos de camundongos.

Análises histopatológicas de amostras de coxim da pata direita e da pele do focinho de ambos os camundongos também foram realizadas com o objetivo de encontrar a presença de focos inflamatórios e parasitas em sítios diferentes do sítio de infecção. Os resultados não mostraram evidências de inflamação ou parasitas nesses locais analisados (dados não mostrados).

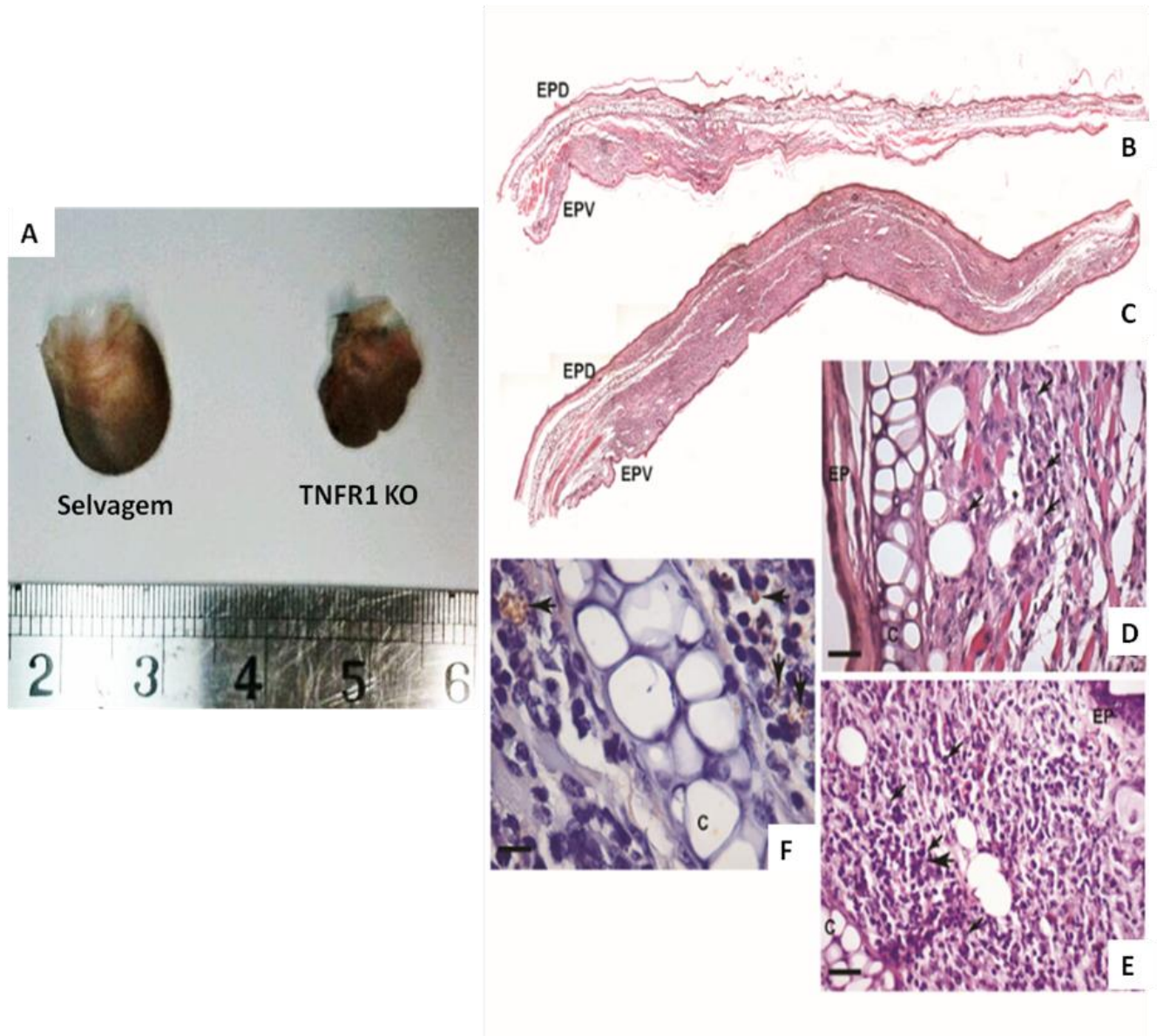


Figura 3. Análises histológicas das lesões cutâneas crônicas dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por *L. braziliensis*. Os camundongos foram infectados por via intradérmica na orelha com *L. braziliensis* (PPS6) (1×10^6). (A) Aspecto macroscópico das lesões de camundongos selvagens e TNFR1 KO após 15 semanas de infecção. Análises histológicas das lesões nas orelhas de camundongos selvagens (B) e em TNFR1 KO (C) após 6 semanas de infecção. Detalhes das orelhas mostram inflamação moderada em camundongos selvagens (D) e inflamação crônica, intensa e difusa em TNFR1 KO (E). As setas pequenas pretas em (D) e (E) indicam o predomínio de células mononucleares. Em F, imunohistoquímica evidenciando formas amastigotas de *L. braziliensis* após seis semanas de infecção na pele de camundongo selvagem, indicadas pelas setas pretas grandes. Foram utilizados quatro animais por grupo. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. EPD – epiderme dorsal; EPV- epiderme ventral; EP – epiderme; C – cartilagem. Coloração pela H&E (B - F). Barras em D, E e F representam $16 \mu\text{m}$ (400 x).

4.4 Análises histopatológicas dos órgãos linfoides secundários dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados com *Leishmania braziliensis*

Os resultados das análises da macroestrutura dos linfonodos drenantes mostraram que esses órgãos linfoides estão significativamente maiores nos camundongos TNFR1 KO, na décima quinta semana da infecção, em comparação aos linfonodos dos camundongos selvagens infectados com *L. braziliensis* (**Figura 4A**). Observa-se, ainda, que os linfonodos drenantes dos camundongos TNFR1 KO apresentam aspecto fibroso e intumescido e que tal característica parece se propagar por toda a rede linfática do pescoço do camundongo TNFR1 KO em comparação aos camundongos selvagens.

Os resultados das análises histopatológicas dos linfonodos dos camundongos selvagens infectados por *L. braziliensis* mostram hiperplasia dos cordões medulares (CM) e seios medulares (SM), com a formação de folículos (F) e centros germinativos (**Figuras 4D e E**). Não foi possível detectar a formação de folículos e centros germinativos nos linfonodos de TNFR1 KO, entretanto, os cordões e os seios medulares também eram hiperplásicos (**Figuras 4G e H**). Os resultados da análise do número de células, após 15 semanas de infecção, nos linfonodos drenantes dos camundongos selvagens e TNFR1 KO mostrou quatro vezes mais células nos linfonodos drenantes do TNFR1 KO em relação ao selvagem (**Figura 4B**).

No baço dos camundongos infectados com *L. braziliensis*, os resultados das análises histopatológicas mostraram hiperplasia e hipertrofia da polpa branca (PB) e da polpa vermelha (PV), com confluência dos folículos linfoides (F) e formação de centros germinativos (CG) nos órgãos dos camundongos selvagens (**Figura 4F**). Para o camundongo TNFR1 KO, foi observado no tecido esplênico, hiperplasia e hipertrofia da polpa branca (porém não tão intensa quanto nos camundongos selvagens) e com

formação de centros germinativos e nódulos linfóides menores (**Figura 4G**). Não foram observadas diferenças significativas no número de leucócitos na decima quinta semana entre os camundongos selvagens e TNFR1 KO (**Figura 4C**)

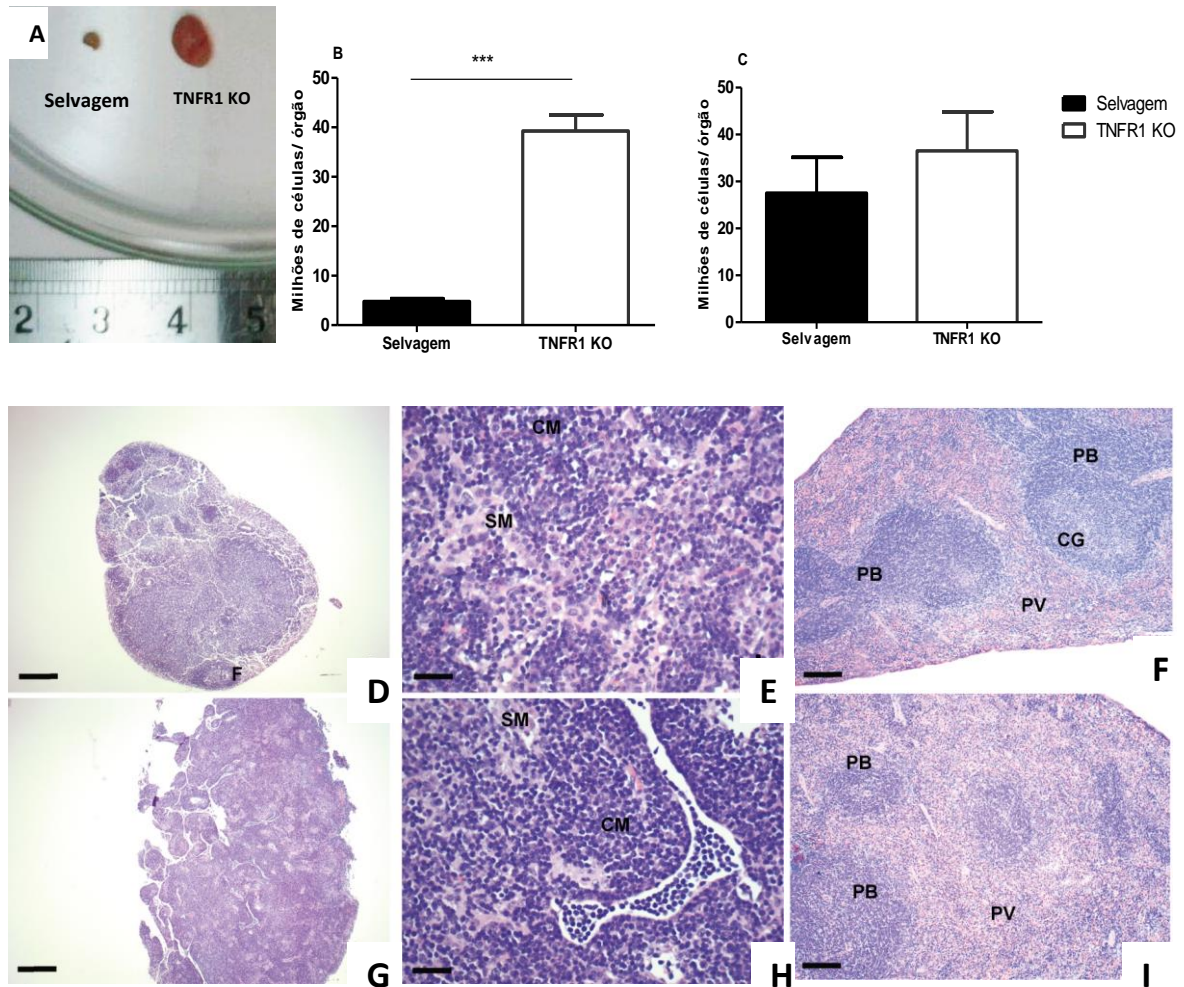


Figura 4. Análises histológicas e da celularidade dos órgãos linfóides dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por *L. braziliensis*. Os camundongos foram infectados por via intradérmica na orelha com *L. braziliensis* (PPS6) (1×10^6) e após 15 semanas de infecção foram eutanasiados e os linfonodos drenantes e baços extraídos e processados para a contagem do número total de linfócitos nesses órgãos. Em A é mostrado o aspecto macroscópico dos linfonodos drenantes de camundongos selvagens e TNFR1 KO após 15 semanas do inóculo. (B) total de células no linfonodo drenante de camundongos selvagens e TNFR1 KO e (C) total de células no baço de camundongos selvagens e TNFR1 KO. Barras representam a média \pm desvio padrão de quatro animais por grupo. * representa $p < 0,0001$ pelo *t* de Student. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. Análises histológicas de linfonodo do camundongo selvagem em aumento de 50x (barra = $62 \mu\text{m}$) (D) e de 400x (barra = $16 \mu\text{m}$) (E) e de baço dos selvagens em aumento de 200x (barra = $23 \mu\text{m}$) (F). Análises histológicas de linfonodo do camundongo TNFR1 KO em aumento de 50x (barra = $62 \mu\text{m}$) (G) e de 400x (barra = $16 \mu\text{m}$) (H) e no baço de TNFR1 KO em aumento de 200x (barra = $23 \mu\text{m}$) (I). Foram utilizados quatro animais por grupo. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. Coloração pela H&E (D - I). PB- polpa branca; PV- polpa vermelha centros germinativos; CG- centros germinativos; CM- cordões medulares; SM- seios medulares.

4.5. Avaliação do perfil de leucócitos presentes nas lesões de camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados com *Leishmania braziliensis*

A avaliação dos fenótipos dos leucócitos nas lesões de camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados com *L. braziliensis*, na sexta e décima quinta semanas, mostrou que há diferenças significativas entre as duas linhagens. Os resultados mostraram que o perfil de leucócitos nas lesões dos camundongos TNFR1 KO é significativamente composto de células T (CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺) (**Figura 5B** e **Figura 5C**) e de neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}) (**Figura 6B**) quando comparado às lesões dos camundongos selvagens. Os resultados não mostraram diferenças no perfil de células dendríticas (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ CD11C⁺ MHCII⁺) (**Figuras 6E** e **Figura 6F**) e de macrófagos (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ CD11C⁻ MHCII⁺ F4/80⁺) (**Figura 6C** e **Figura 6D**), nos tempos estudados, entre as lesões dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados com *L. braziliensis*.

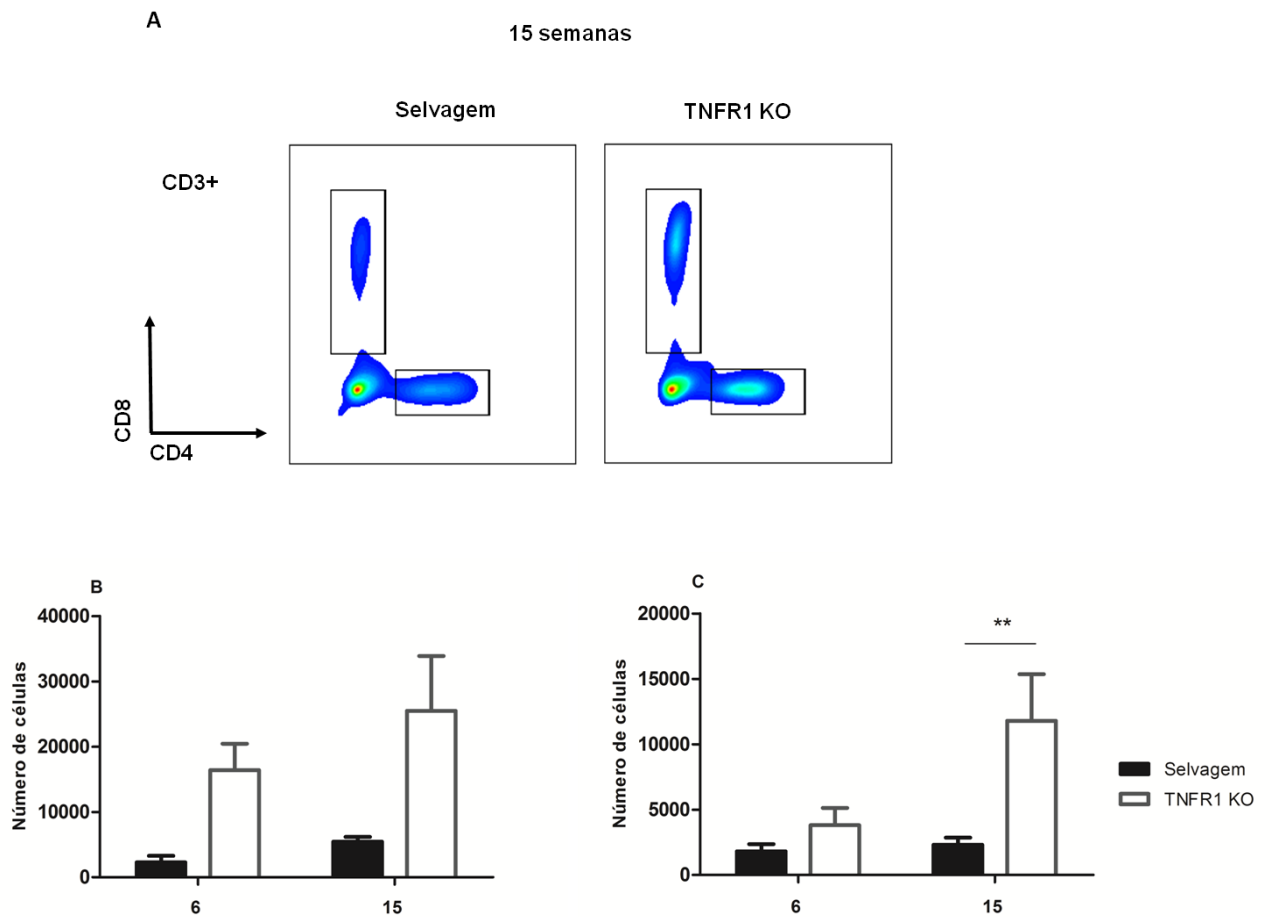


Figura 5. Análise do perfil do infiltrado de linfócitos nas lesões crônicas nos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por *L. braziliensis*. Os camundongos foram infectados por via intradérmica com 1×10^6 *L. braziliensis* (PPS6) na orelha. Após seis e 15 semanas de infecção os animais foram eutanasiados e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. (A) dot plots representam os gates das células T CD3+ (CD4+ e CD8+) da lesão de um dos cinco camundongos de cada grupo após 15 semanas de infecção. Números absolutos das células T CD3+CD4+ (B), T CD3+CD8+ (C). Barras representam a média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni em que ** representa $p < 0,01$. Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

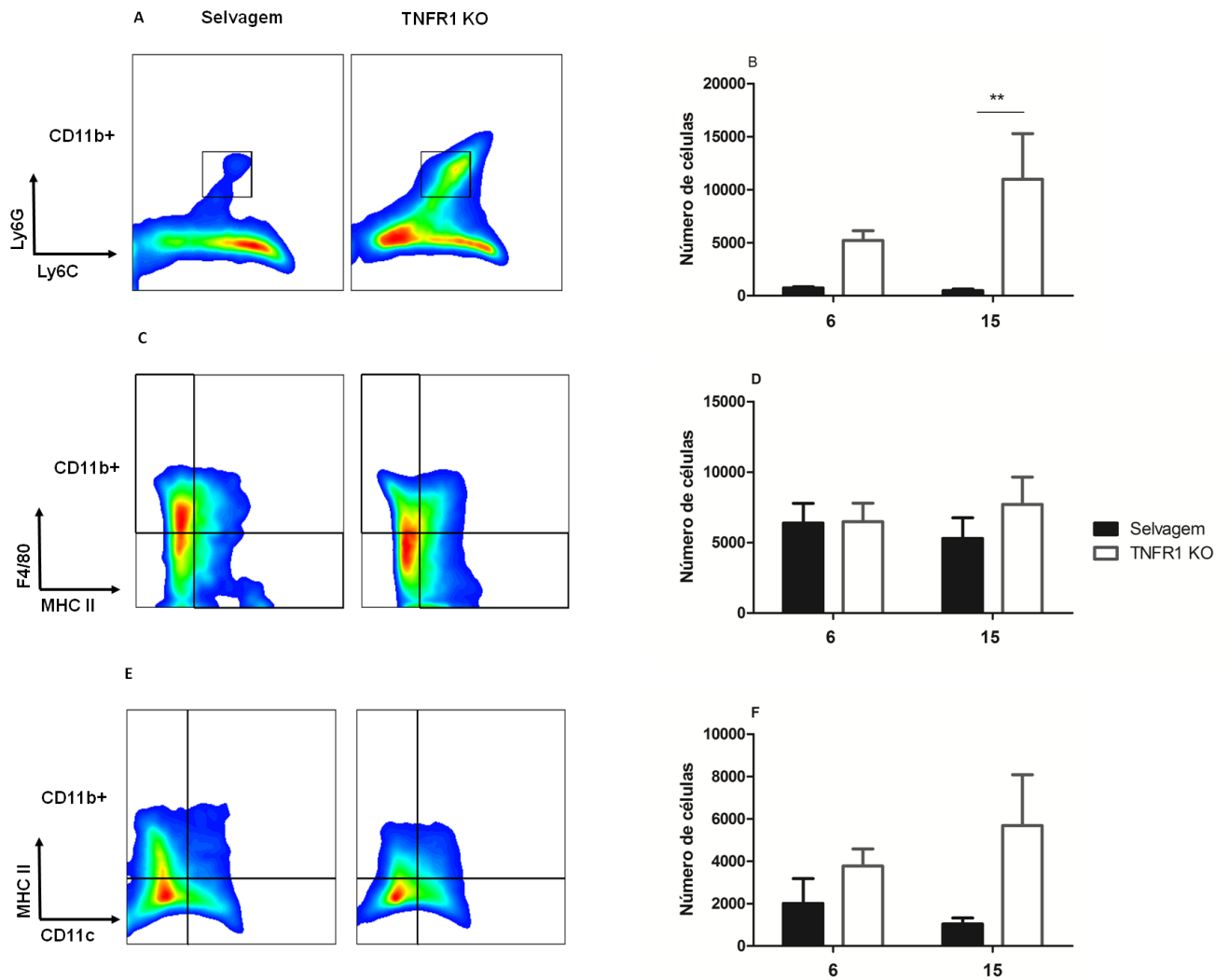


Figura 6. Análise do perfil do infiltrado de células da imunidade inata nas lesões crônicas nos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por *L. braziliensis*. Os camundongos foram infectados por via intradérmica com 1×10^6 *L. braziliensis* (PPS6) na orelha. Após seis e 15 semanas de infecção os animais foram eutanasiados e as lesões coletadas para a análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. *Dot plots* representam os gates (A) dos neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int}), (C) dos macrófagos (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ CD11c⁻ MHCII⁺ F4/80⁺) e (E) das células dendríticas (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ CD11c⁺ MHCII⁺) da lesão após 15 semanas de infecção. Números absolutos dos neutrófilos (B), dos macrófagos (D) e das células dendríticas (F). Barras representam a média \pm desvio padrão de cinco animais por grupo. Análise estatística feita pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni em que ** representa $p < 0,01$. Foram utilizados cinco animais por grupo. Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

4.6. Avaliação da produção de citocinas pró e anti inflamatórias nas lesões e nos órgãos linfoides dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados com *L. braziliensis*

Analizamos o perfil de citocinas (IFN- γ , IL-17, TNF e IL-10) nas lesões cutâneas e nos órgãos linfoides secundários das fases crônicas da infecção dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados com *L. braziliensis*.

A **Figura 7** mostra as concentrações de citocinas IFN- γ (**A**), TNF (**B**), IL-17 (**C**) e IL-10 (**D**) no local de lesão. Os resultados mostraram que há maiores concentrações de IFN- γ e TNF nas lesões dos camundongos TNFR1 KO após 15 semanas de infecção quando comparadas as lesões dos camundongos selvagens (**Figura 7A e 7B**). Para a IL-17, os resultados mostraram maior concentração de IL-17 nas lesões dos camundongos TNFR1 KO, na sexta semana de infecção, quando comparada às lesões dos camundongos selvagens. Entretanto, na décima quinta semana de infecção, observamos maior concentração de IL-17 nos camundongos selvagens quando comparada às concentrações nas lesões dos camundongos TNFR1 KO. Para esse mesmo tempo, também observamos que a concentração dessa citocina diminuiu nos camundongos TNFR1 KO em comparação a sexta semana da infecção (**Figura 7C**). Para a IL-10, não detectamos diferenças significativas nas concentrações nas lesões entre os camundongos selvagens e TNFR1 KO, na sexta e quinta semanas de infecção por *L. braziliensis* (**Figura 7D**).

Analizamos a relação entre as concentrações obtidas de IFN- γ e IL-10 nas lesões crônicas dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por *L. braziliensis*. Essas análises mostraram que após 15 semanas da infecção a produção de IFN- γ nas lesões dos camundongos TNFR1 KO é superior à produção de IL10, quando comparadas às lesões dos camundongos selvagens (**Figura 8A**). Quando invertemos a relação entre

ambas as citocinas, a partir da razão entre as concentrações de IL-10/IFN- γ (**Figura 8B**), observamos que no camundongo selvagem a produção de IL10 supera a de IFN- γ , 15 semanas após o inóculo.

Os resultados das análises das citocinas produzidas nos órgãos linfoides secundários (linfonodos drenantes e baço) dos camundongos selvagens e TNFR1 KO, nas fases crônicas da infecção por *L. braziliensis*, mostraram maior produção de IFN- γ , TNF e IL-17 nos camundongos TNFR1 KO quando comparados aos órgãos dos camundongos selvagens (**Figura 9A, B e C**, respectivamente; e **Figura 10A, B e C**, respectivamente). Em relação a IL-10, detectamos nos linfonodos drenantes de camundongos TNFR1 KO maior produção em relação aos linfonodos de camundongos selvagens somente após 15 semanas de infecção (**Figura 9D**). Já no baço (**Figura 10D**), verificamos a liberação de IL10 apenas nos camundongos TNFR1 KO, 6 semanas após o inóculo.

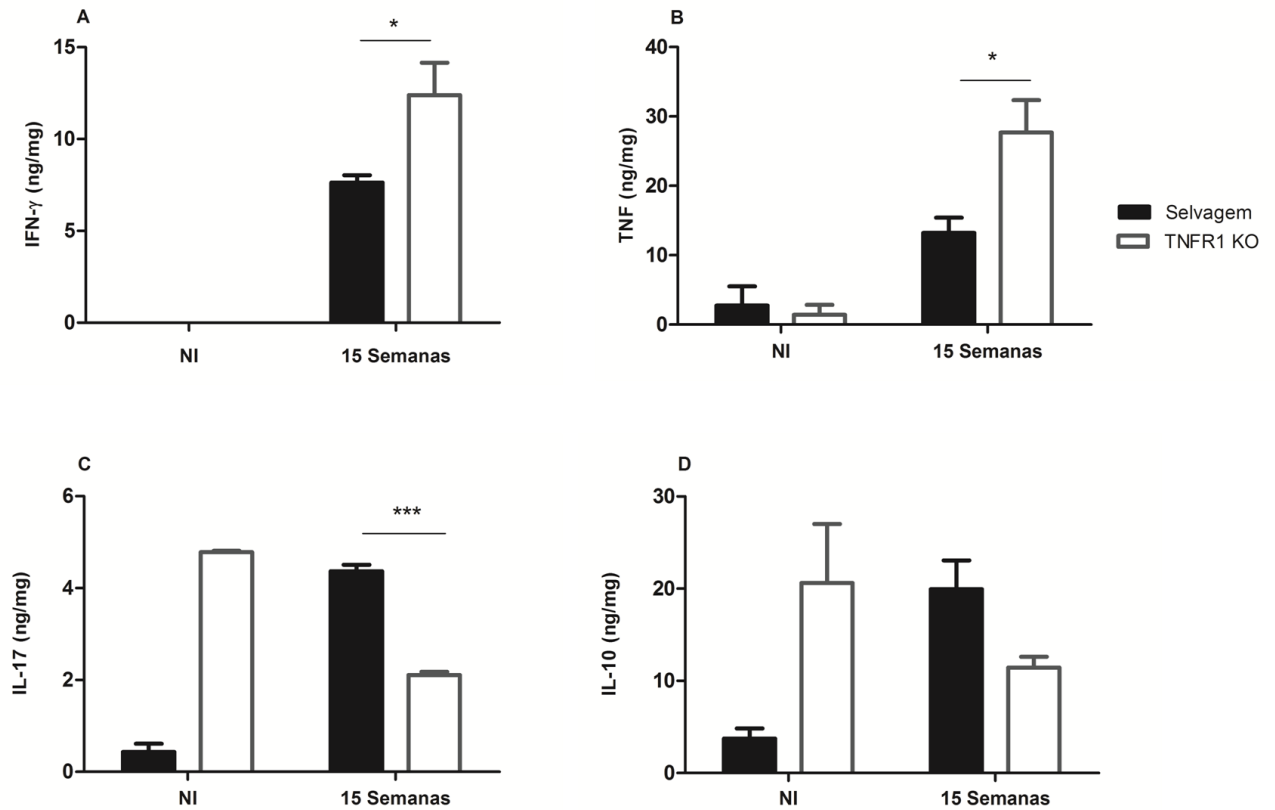


Figura 7. Análise das concentrações de citocinas no local de lesão dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por *L. braziliensis*. Grupos de camundongos foram infectados com *L. braziliensis* e após 15 semanas de infecção os animais foram sacrificados, as lesões coletadas, pesadas e processadas com inibidores de proteases. As concentrações de (A) IFN- γ , (B) TNF, (C) IL-17 e (D) IL-10 foram determinadas por ELISA. Barras representam a média \pm desvio padrão de três animais por grupo. *representa $p < 0,05$ e ***representa $p < 0,001$ pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni. Os resultados são a média de dois experimentos independentes. NI – Não infectado

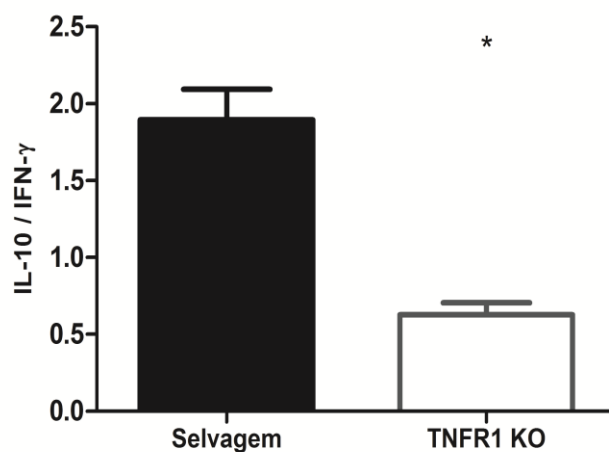


Figura 8. Análise das razões das produções de citocinas pro e antiinflamatórias no local de lesão dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por *L. braziliensis*. Os níveis de IFN- γ e IL-10 nas orelhas foram dosados como descrito na figura 6 e a razão entre as concentrações de IL-10/IFN- γ foram determinadas. *representa $p = 0,0276$ pelo teste T não pareado com correção de Welch. Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos de maneira independente.

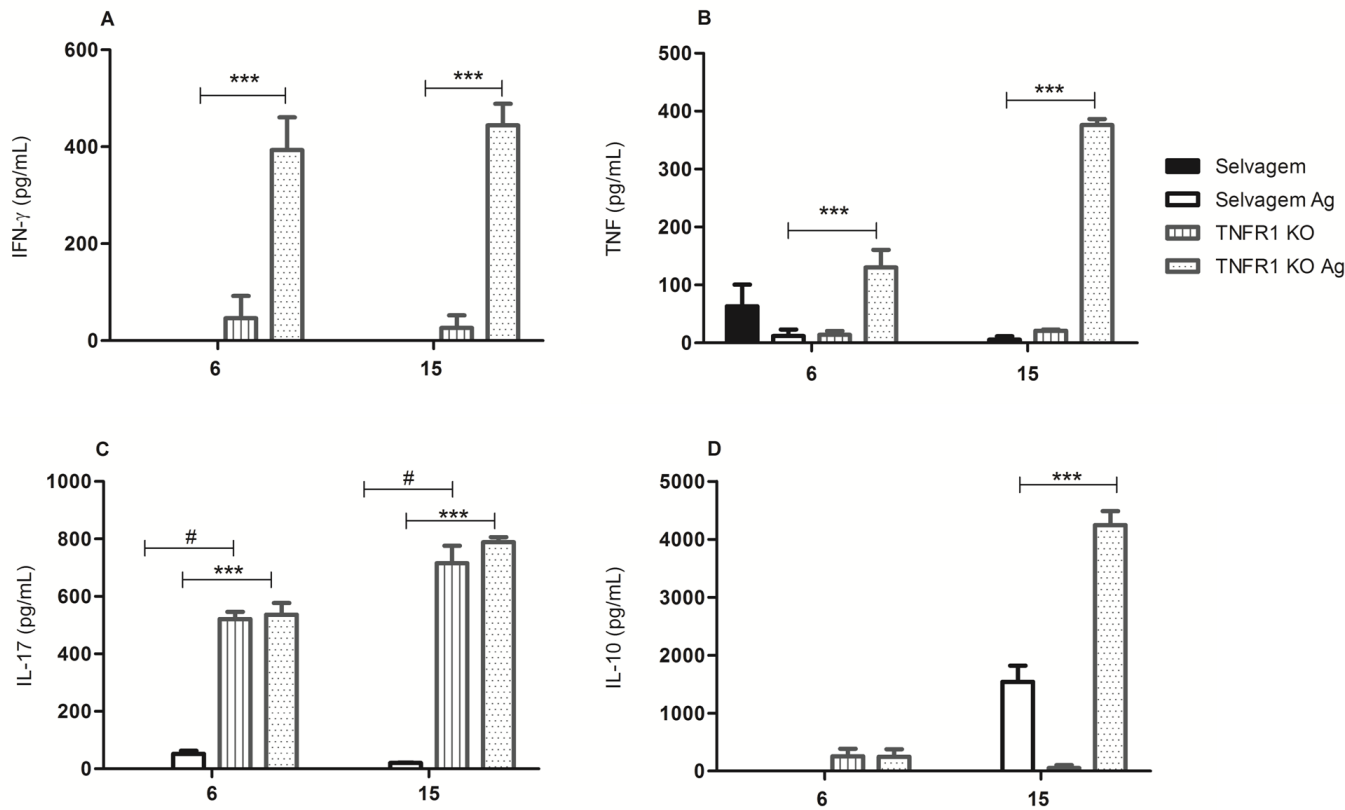


Figura 8. Análise da produção de citocinas por células de linfonodos drenantes dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por *L. braziliensis*. Grupos de camundongos selvagens e TNFR1 KO foram infectados com *L. braziliensis* e após seis e 15 semanas da infecção os camundongos foram sacrificados e os linfonodos drenantes foram coletados e processados. Os linfócitos foram estimulados com antígeno de *L. braziliensis* por 24 ou 72 horas. Após esse período os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de IFN- γ (A) e TNF (B), IL-17 (C) e IL-10 (D) determinadas por ELISA. Barras representam a média \pm desvio padrão ($n=3$ camundongos por grupo). # representa diferença significativa pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni entre grupos selvagem e TNFR1 KO sem estímulo ($p<0,001$). *** representa diferença significativa pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni entre grupos selvagem e TNFR1 KO estimulados ($p<0,001$). Os resultados são a média de dois experimentos independentes.

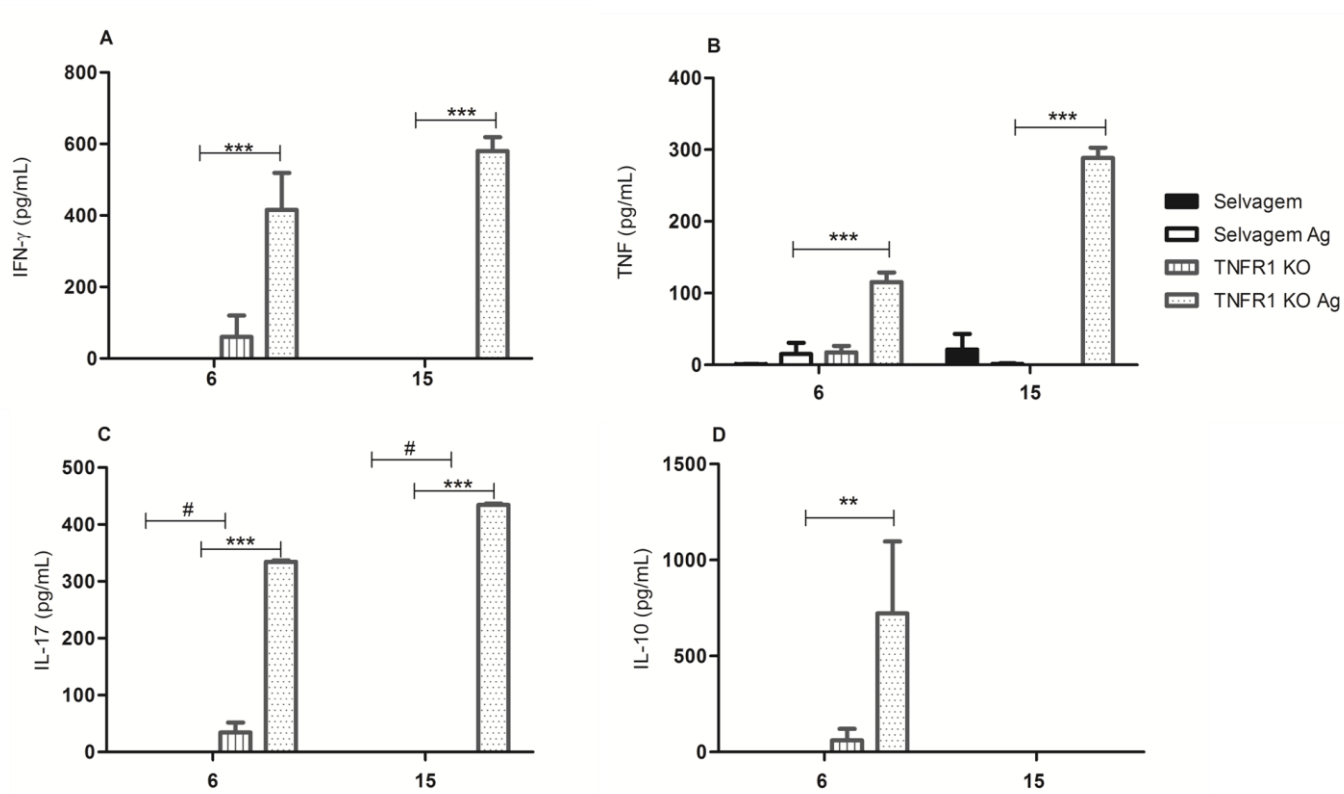


Figura 9. Análise da produção de citocinas por células de baços dos camundongos selvagens e TNFR1 KO infectados por *L. braziliensis*. Grupos de camundongos selvagem e TNFR1 KO foram infectados com *L. braziliensis* e após seis e 15 semanas da infecção os camundongos foram sacrificados e os baços foram coletados e processados. Os linfócitos foram estimulados com antígeno de *L. braziliensis* por 24 ou 72 horas. Após esse período os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de IFN- γ (A) e TNF (B), IL-17 (C) e IL-10 (D) determinadas por ELISA. Barras representam a média \pm desvio padrão ($n=3$ camundongos por grupo). # representa diferença significativa pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni entre grupos selvagem e TNFR1 KO sem estímulo ($p<0,001$). ** representa diferença significativa pelo teste Two-Way Anova seguido de Bonferroni entre grupos de camundongos selvagens e TNFR1 KO estimulados ($p<0,01$) e *** representa $p<0,001$. Os resultados são a média de dois experimentos independentes.

5. DISCUSSÃO

Anteriormente, mostramos que camundongos TNFR1 KO, quando comparados aos animais selvagens infectados com *L. major*, desenvolveram lesões cutâneas crônicas com características imunopatológicas semelhantes às encontradas nas lesões cutâneas em humanos com leishmaniose mucocutânea. Entretanto, essas lesões cutâneas não foram invasivas para os tecidos de mucosas dos camundongos estudados (Oliveira et al., 2012). Estudos das lesões das regiões de mucosas de humanos acometidos pela leishmaniose mucocutânea mostram que *L. braziliensis* é a principal espécie envolvida nos casos das lesões de acometimento das mucosas (Oliveira et al., 2013;Gomes et al., 2014a;Gomes et al., 2014b). Além disso, sugerem que a variabilidade genética intraespecífica determina a presença de fatores que habilitam certas cepas a subverter o sistema imune do hospedeiro e invadir outros tecidos (Mosser and Brittingham, 1997;Oliveira et al., 2013).

Um desses fatores pode estar relacionado ao metabolismo enzimático do parasita. Tem sido mostrado que um aumento nos níveis de ATP extracelular após a infecção é um potente estimulador da resposta imunológica do hospedeiro. Como mecanismo de escape, o parasita possui enzimas que hidrolisam esse ATP até adenosina, cuja sinalização com os receptores P1, presentes na membrana dos leucócitos, promove a ação de efeitos imunossupressivos que facilitam o estabelecimento do parasita (Paletta-Silva and Meyer-Fernandes, 2012;Leite et al., 2012). A infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* correlaciona a capacidade de induzir lesões mais severas a uma maior atividade das ecto-ATPases (de Almeida Marques-da-Silva et al., 2008). Além disso, as análises comparativas entre diferentes isolados de *L. braziliensis*,

detectaram maior atividade ectonucleotidásica nas promastigotas obtidas de mucosas acometidas, em relação às de lesões cutâneas. Esses dados reforçam que a habilidade em metabolizar nucleotídeos extracelulares pode estar relacionada com a indução de uma patologia mais grave e corroboram as ideias que relacionam a variabilidade genética à capacidade de disseminação em algumas cepas de *L. braziliensis* (Leite et al., 2012).

Outro trabalho, a partir da dosagem comparativa da atividade de arginase I em diferentes isolados, mostra que a atividade dessa enzima é significativamente maior em cepas obtidas de lesões da mucosa, em comparação às de lesões cutâneas (Vendrame et al., 2010) e sugere que essa característica favorece o desenvolvimento de lesões na mucosa. A hidrólise de l-arginina pela arginase leva a geração de poliaminas - essenciais para a proliferação de *Leishmania* dentro dos macrófagos - e provoca uma redução da disponibilidade desse aminoácido para a ativação celular (Modolell et al., 2009), o que pode estar ligado ao escape do parasita para outros sítios (Vendrame et al., 2010).

Estudos adicionais associam os fatores citados acima à presença de polimorfismos entre isolados de *L. braziliensis* nas lesões de mucosa e de pele (Schriefer et al., 2004). Em conjunto, esses estudos reforçam a ideia que o acometimento de mucosas pode estar relacionado com características específicas da espécie do parasita. Assim, questionamos se a infecção dos camundongos TNFR1 KO por *Leishmania braziliensis* poderia produzir lesões cutâneas crônicas e invasivas nas regiões de mucosas, como em humanos, a partir da infecção com isolados oriundos de mucosa humana (Leite et al., 2012;Gomes et al., 2014a)

Nossos resultados mostram que as lesões desenvolvidas em camundongos TNFR1 KO infectados por *L. braziliensis*, em comparação aos camundongos selvagens,

apresentam características muito similares às desenvolvidas durante a infecção por *L. major*: lesões cutâneas persistentes, intensa migração de neutrófilos e células T CD8+ e exacerbada produção de citocinas pró-inflamatórias nas lesões (Oliveira et al., 2012). Também, da mesma forma que a infecção por *L. major*, não detectamos o desenvolvimento de lesões em regiões de mucosas nos camundongos TNFR1 KO mesmo após a infecção intradérmica com *L. braziliensis* (ver **Tabela 1**). Entretanto, notamos a presença de parasitas nos órgãos linfoides secundários – em especial no baço – dos camundongos TNFR1 KO, sugerindo que *L. braziliensis* tem a capacidade de disseminar e provocar inflamação em órgãos linfoides secundários em fases crônicas da infecção. A partir desses dados, avaliamos a infecção de camundongos TNFR1 KO por *L. braziliensis*.

Primeiramente realizamos infecções subcutâneas nas patas dos camundongos TNFR1 KO, com as duas cepas de *L. braziliensis*. Nesse modelo de infecção observamos o desenvolvimento de uma doença crônica muito similar nos dois isolados, em que não foi detectada a disseminação das lesões cutâneas para os tecidos de mucosa, o que nos levou a questionar sobre a influência do sitio de inóculo no curso de infecção.

Estudos comparativos têm mostrado significativas variações no desenvolvimento da resposta imunológica à *Leishmania* a partir de diversas vias de inóculo. O espaço subcutâneo apresenta diferenças fisiológicas e funcionais em relação à pele (derme e epiderme), como por exemplo, o aporte celular em resposta ao parasita. Tem sido mostrado que a infecção intradérmica com formas promastigotas metacíclicas de *L. major*, em baixa dose, induz a atração massiva de neutrófilos nas fases iniciais e a geração de uma resposta adaptativa atrasada ou deficiente (Ribeiro-Gomes et al., 2014). Essa “fase silenciosa” (Belkaid et al., 1998; Belkaid et al., 2000; Cortes et al., 2010) facilita o estabelecimento do parasita nos macrófagos, porque dificulta a rápida ativação

da resposta celular do hospedeiro. Outro fator que parece influenciar fortemente a susceptibilidade em *Leishmania* é a presença de componentes da saliva do flebotomíneo, os quais induzem a liberação de citocinas Th2 nas células da derme que constituem a primeira linha de defesa do camundongo após a infecção intradérmica por *Leishmania* (Belkaid et al., 1998). Esses e outros dados (Baldwin et al., 2003;Ribeiro-Gomes et al., 2014) reforçam a ideia de que as várias vias de inóculo, junto com os componentes da infecção natural, induzem variações nas respostas Th1 e Th2, desde as fases iniciais da infecção.

De fato, o inóculo subcutâneo realizado nas patas do camundongo TNFR1 KO não mimetiza a via de infecção natural, que é intradérmica (Belkaid et al., 2000;Cortes et al., 2010;Ribeiro-Gomes et al., 2014). Um estudo comparativo em camundongos infectados de por via intradérmica pelo isolado PPS6, obtido de lesões de mucosa humana (Gomes et al., 2014a) e pelo isolado obtido de lesão cutânea humana (SSF) sugere que algumas diferenças na resposta imunológica do camundongo parecem influenciar o desenvolvimento da doença. Foi observado que o baixo parasitismo durante a infecção pela cepa PPS6 induz uma migração atrasada de linfócitos para o local de lesão, em relação à cepa SSF. Além disso, detectou-se uma baixa ativação de células dendríticas pela PPS6, medida pela diminuição da expressão de MHC II e de CD86, o que foi correlacionado a um prejuízo da função imunomoduladora do camundongo nas fases avançadas. Esse perfil parece estar associado a uma maior atividade enzimática da cepa PPS6 em relação ao isolado SSF e reforça as ideias de que o inóculo intradérmico do parasita, aliado aos fatores de virulência, são capazes de influenciar a resposta imunológica do hospedeiro (Leite et al., 2012;Gomes et al., 2014a). Por isso, optamos por testar a infecção por via intradérmica com o isolado PPS6, obtido de lesões de mucosas humanas.

Nas orelhas dos camundongos TNFR1 KO observamos o desenvolvimento de lesões crônicas similares às encontradas nas patas, porém com níveis mais baixos de parasitas no local, em fases tardias da doença. Uma baixa carga parasitária foi observada após 15 semanas de infecção, sugerindo que esse camundongo possui uma menor capacidade em controlar essa espécie do parasita como observamos anteriormente com *L. major* (Vieira et al., 1996;Oliveira et al., 2012). Essas observações parecem reproduzir o relatado durante o acometimento das lesões nas mucosas em humanos com leishmaniose mucocutânea. Alguns estudos sugerem que os parasitas que não foram eliminados do local de inóculo e dos órgãos linfóides secundários e que, ainda que presentes em baixos níveis, poderiam ser os responsáveis por desencadear o surgimento de lesões ulcerativas nos tecidos de mucosa do indivíduo (Saravia et al., 1990).

A análise dos linfonodos drenantes e dos baços de camundongos TNFR1 KO após a infecção por *L. braziliensis* evidenciou a presença de parasitas entre 6 e 8 semanas. O parasitismo no baço em camundongos com lesões cutâneas é uma particularidade que parece ser específica da infecção por essa espécie de *Leishmania* (Pereira et al., 2009), visto que não detectamos parasitas no baço de camundongos TNFR1 KO infectados com *L. major*. Um estudo envolvendo análises histológicas em camundongos BALB/c infectados por diferentes isolados de *Leishmania braziliensis* detectou parasitismo no baço e aglomerados de células mononucleares no fígado desses animais (Pereira et al., 2009). Esses achados corroboram os nossos indícios de que esse parasita possui capacidade de disseminar para além do sítio de infecção durante a leishmaniose tegumentar em direção ao linfonodo e ao baço dos camundongos TNFR1 KO, entre 6 e 8 semanas, em maiores níveis que no camundongo selvagem. Já na fase crônica de infecção (15 semanas após o inóculo), enquanto os títulos de parasitas eram

baixos em ambos os animais em todos os sítios analisados, verificou-se um persistente e vasto infiltrado inflamatório na orelha e nos órgãos linfoides do camundongo TNFR1 KO, mas não no animal selvagem. Isso nos sugere que a quantidade de parasitas no local de lesão, no linfonodo drenante e no baço dos camundongos TNFR1 KO parece não ser primordial para a manutenção da inflamação nas orelhas e nos órgãos linfoides até a fase crônica. Em outras palavras, mesmo presentes em baixos números, os parasitas induzem uma resposta inflamatória persistente no camundongo TNFR1KO. Isso, também, sugere que *L. braziliensis* possui a capacidade de invadir tecidos diferentes da pele onde foi inoculada, mas é controlada nas fases tardias de infecção (após oitava semana) em ambos os animais, em todos os locais onde fora anteriormente detectada.

As análises histopatológicas das orelhas dos camundongos selvagens e TNFR1 KO reforçam as observações macroscópicas. Visto que baixos níveis de parasitas foram detectados em ambos os grupos durante a fase crônica da doença no sítio de infecção, isso sugere que a deformação observada nas orelhas dos camundongos TNFR1 KO está relacionada à persistência de um infiltrado inflamatório intenso na fase crônica, que está ausente em camundongos selvagens. Um perfil imunopatológico similar foi observado pelo nosso grupo durante a infecção de ambos os animais por *L. major*, em que se correlaciona a inflamação exacerbada dos camundongos TNFR1 KO à ausência de células TUNEL positivas em um ensaio de apoptose (Vieira et al., 1996;Oliveira et al., 2012). Isso sugere que na ausência do receptor 1 (p55) de TNF os diversos sinais de morte celular deixam de ser desencadeados, o que contribui para a falta da regulação da inflamação nos animais TNFR1 KO. Já nos camundongos selvagens, a inflamação em fases avançadas é controlada pelos sinais apoptóticos das células inflamatórias nas lesões, disparados na presença do receptor p55. Essas ideias são reforçadas por estudos

que mostraram a importância da apoptose via TNF e TNFR1 na resolução de diversas outras patologias (Kanaly et al., 1999; Vujanovic et al., 2010; Hu et al., 2014).

A análise dos marcadores de superfície para caracterização dos fenótipos celulares no local de lesão mostrou uma maior quantidade de linfócitos T CD8⁺ e de neutrófilos nos camundongos TNFR1 KO em relação aos selvagens em fase crônica, sugerindo uma provável participação dessas células na manutenção das lesões.

Um papel contraditório tem sido descrito para os linfócitos T CD8⁺ nas infecções por diversas espécies de *Leishmania*. Na infecção experimental com *L. major*, essas células parecem mediar a resistência em fases iniciais, porque são ativadas primeiramente em relação aos linfócitos T CD4⁺ e, por meio da produção de IFN- γ , contribuem para a diferenciação das células Th1 (Herath et al., 2003; Novais et al., 2013). O papel protetor desses linfócitos também é evidenciado em casos de leishmaniose visceral humana, especialmente no fígado, onde as células T CD8⁺ parecem contribuir para a formação de granulomas, mas também auxiliam na redução da carga parasitária no baço (Basu et al., 2007). Já na infecção por *L. amazonensis* essas células parecem ter papel patogênico. A ativação de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ nas fases iniciais contribui para tornar o ambiente permissível ao parasito, devido à indução de um perfil misto de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-17 e IL-10) do tipo Th1 e Th2. Isso favorece a migração de células inflamatórias para o sítio de infecção, mas não as capacita a eliminar o parasita (Soong et al., 1997). A análise da função citotóxica desses linfócitos durante a infecção por *L. braziliensis* aponta para uma função patológica. Em humanos, a presença de linfócitos T CD8⁺ expressando granzima B (Dantas et al., 2013) e desgranulando (Novais et al., 2013), é correlacionada à extensão da necrose em lesões cutâneas após infecção por *L. braziliensis*, o que não acontece em relação as células T CD4⁺ (Santos et al., 2013; Dantas et al., 2013). Esses dados são reforçados por

evidências moleculares em que genes da via citolítica estão ativos em lesões provocadas por esse parasita, em comparação à pele normal (Novais et al., 2013)

Em relação aos neutrófilos observa-se, nas infecções por *L. major*, que eles constituem a primeira linha de defesa celular por meio da fagocitose do parasita em fases iniciais (Peters et al., 2008b). Entretanto, alguns estudos sugerem que os neutrófilos infectados e em apoptose poderiam constituir um mecanismo de entrada silenciosa do parasita nos macrófagos do hospedeiro (Ribeiro-Gomes et al., 2004; Ribeiro-Gomes et al., 2014). Já para a infecção em *L. braziliensis*, tem sido observado um maior infiltrado dessas células nas áreas de nasofaringe de pacientes com lesões de mucosa, o qual é significativamente reduzido nos pacientes tratados com fármacos anti-leishmania, sugerindo um papel dos neutrófilos na exacerbação da patologia (Guerreiro et al., 2000). Portanto, a nossa correlação entre linfócitos T CD8+ e neutrófilos com o infiltrado inflamatório exacerbado dos camundongos TNFR1 KO é reforçada pelos dados da literatura, o que nos sugere uma função patológica dessas células durante a infecção por *L. braziliensis*.

A caracterização da produção de citocinas no local de lesão correlaciona-se positivamente ao maior infiltrado inflamatório do camundongo TNFR1 KO, em relação ao selvagem, na fase crônica de infecção. Foram detectados maiores níveis de IFN- γ e TNF na lesão dos animais TNFR1 KO em comparação aos camundongos selvagens. Nossos dados estão de acordo ao já descrito para a caracterização do perfil de citocinas nas úlceras de mucosa humana (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998; Mendes et al., 2013; Oliveira et al., 2014). Visto que detectamos altos níveis IFN- γ paralelamente a uma grande quantidade de células T CD8+, sugerimos que na ausência do receptor 1 de TNF há um grande número de células produtoras de IFN- γ no local de lesão em fase crônica. Os linfócitos T CD8+ atuam tanto na produção dessa citocina quanto na

ativação dos linfócitos T CD4+, células se encontram bem descritas como fonte de IFN- γ em *L. major* e *L. amazonenses* (Mosmann et al., 2005). Dados da literatura mostram que o IFN- γ tem papel importante no recrutamento de mais células inflamatórias e também na sua ativação (Wang et al., 1994), o que, em fases tardias da infecção, quando o parasitismo já não é mais significativo, contribuiria para a manutenção e exacerbação da patologia. Os neutrófilos, que são as primeiras células a migrar para o local de lesão, iniciariam a produção de TNF após a fagocitose (Carlsen et al., 2013) e permaneceriam ativados até a fase crônica, visto que não recebem sinais de morte celular. O TNF continuamente secretado, por sua vez, provocaria a atração de macrófagos, linfócitos e outros leucócitos para a orelha infectada, mesmo após o controle do parasitismo, contribuindo com a manutenção da inflamação mesmo em fase crônica. A inflamação exacerbada em pacientes acometidos pela leishmaniose mucocutânea tem sido correlacionada ao TNF, visto que essa citocina é detectada em altos níveis nas lesões desses indivíduos (Oliveira et al., 2014;Galdino, Jr. et al., 2014).

Dados do nosso grupo a partir da infecção por *L. major* reforçam a ideia acima. As lesões de camundongos selvagens e TNFR1 KO apresentam baixos números de parasitas na fase tardia da infecção (Oliveira et al., 2012), sugerindo que o baixo parasitismo local não é o fator que induz a manutenção de uma inflamação exacerbada, visto que, na fase tardia da infecção a inflamação já se encontra resolvida no camundongo selvagens. Entretanto, o camundongo TNFR1 KO possui lesões significativas 15 semanas após o inóculo, assim como na infecção por *L. braziliensis*, sugerindo que um comprometimento da apoptose mediada pelo TNFR1 tem papel relevante na manutenção da inflamação desregulada, que fora desencadeada a partir das fases iniciais, quando o parasitismo ainda era alto. A presença da inflamação em fases

crônicas, por conseguinte, é constantemente reforçada pela produção de citocinas pró-inflamatórias.

Vieira e colaboradores (1996), ao estudarem a infecção crônica por *L. major* em camundongos TNFR1 KO mostraram que o receptor p55 e sua sinalização com o TNF parece não ser fundamental para a resolução do parasitismo, visto que o camundongo é capaz de reduzi-lo a níveis insignificantes, mas é fundamental para a resolução da inflamação, já que o local de lesão permanece inflamado após a morte do parasita. Dados adicionais reforçam que os dois receptores de TNF não são fundamentais para a produção de óxido nítrico e eliminação do parasita. Acredita-se que a ativação de macrófagos para essa função seja feita a partir de linfócitos T, por meio da secreção de IFN- γ e da sinalização via CD40 e CD40L como segundo sinal (Nashleanas and Scott, 2000). Nós sugerimos que na falta do receptor 1, o TNF secretado na orelha poderia estar agindo a partir do receptor 2 (TNFR2 ou p75) e promovendo sinais de sobrevivência celular. TNFR2 não possui o domínio de morte citoplasmático que provoca a apoptose e, além disso, sua ativação dispara uma cascata de sinalizações que culmina na translocação de NFkB para o núcleo e a subsequente transcrição de genes de sobrevivência (Faustman and Davis, 2013). Em contrapartida, alguns estudos experimentais indicam que o TNFR2 está envolvido no controle da regulação da inflamação em um modelo de tumor e em insuficiência cardíaca (Kanaly et al., 1999; Hu et al., 2014).

Com relação à IL-10, não detectamos diferenças significativas nas presença dessa citocina nas lesões dos dois camundongos. Alguns trabalhos relacionam a persistência de parasitas à reativação das lesões após a cura aparente (Saravia et al., 1990) em humanos. Em camundongos, a manutenção de parasitas nas orelhas e nos linfonodos drenantes de camundongos C67BL/6, após a resolução da infecção por *L.*

major, parece ser dependente dessa citocina (Belkaid et al., 2001). O papel regulador de IL-10 é bem evidente em pacientes com leishmaniose cutânea, por meio da supressão de TNF e, conseqüentemente, da produção de óxido nítrico, em fases finais da doença (Faria et al., 2005). Essas ideias podem ser correlacionadas às nossas observações nos camundongos C57BL/6 selvagens, os quais, nos tempos tardios da infecção por *L. braziliensis*, apresentam baixos níveis de TNF e IFN- γ no sítio de infecção, assim como menor infiltrado inflamatório, mas apresentam níveis significativos de IL-10. Porém, em pacientes com a forma mucocutânea, não há um consenso com relação ao papel da IL-10. Enquanto alguns trabalhos detectam níveis inferiores nesses pacientes em relação àqueles com a forma cutânea (Vieira et al., 2013), outros estudos mostram concomitante produção de IL-10, IFN- γ e TNF, sugerindo uma resposta imune mista (Cabrera et al., 1995; Silveira et al., 1998; Ives et al., 2011; Nogueira et al., 2014). Um dos estudos mostrou que, enquanto na leishmaniose cutânea a IL-10 parece suprimir a produção de IFN- γ em PBMCs estimuladas com antígeno de *Leishmania*, nos casos de leishmaniose de mucosa essa supressão não é observada (Bacellar et al., 2002), o que corrobora os nossos dados obtidos a partir da comparação entre as concentrações de IFN- γ e IL-10. Na fase crônica da infecção detectamos maior produção de IL-10 em relação à de IFN- γ nos camundongos selvagens, sugerindo que a IL-10 poderia estar suprimindo a produção de IFN- γ na lesão e contribuindo para a resolução da patologia nesse animal. Porém, nos camundongos TNFR1 KO, detectamos concentrações superiores de IFN- γ no local de lesão, mesmo na presença de IL-10. Alguns estudos evidenciam a ausência da expressão do receptor de IL-10 nos leucócitos em lesões severas (Faria et al., 2005), o que poderia ser um dos fatores pelo qual a IL-10 não regula a inflamação. Dessa forma, nossos dados sugerem que, no modelo experimental da infecção de

camundongos TNFR1 KO por *L. braziliensis*, a IL-10 pode não ser capaz de modular a inflamação nas lesões.

A função da IL-17 nas infecções por *Leishmania* ainda não está bem esclarecida. Estudos em *L. donovani* evidenciam que essa citocina, em sinergismo com IFN- γ (Nascimento et al., 2014) ou IL-22 (Pitta et al., 2009), exerce papel protetor, o qual não é observado em situações em que ela está ausente. Em *L. braziliensis* a IL-17 parece ter papel contraditório, ora mediando a patologia em casos de inflamações crônicas (Bacellar et al., 2009; Gonzalez-Lombana et al., 2013), ora promovendo a cura espontânea em camundongos infectados (Vargas-Inc et al., 2008; Nascimento et al., 2014). Novais e colaboradores, em 2013, mostram que a patologia nas lesões humanas associadas à função desregulada de linfócitos T CD8+ não é devida o aumento na produção de IL-17, mas sim à atividade citolítica dessas células. Por isso, nossos resultados sugerem que os efeitos dessa citocina se relacionam mais à proteção que à patologia, considerando-se produção superior nos camundongos selvagens – os quais já resolveram a inflamação após 15 semanas de infecção – em relação aos camundongos TNFR1 KO.

Nos órgãos linfoides secundários, observamos maiores níveis de IFN- γ , TNF e IL-17 nas fases avançadas da doença nos camundongos TNFR1 KO em relação aos selvagens, enquanto que IL-10 foi detectada nesse tempo em maiores níveis apenas nos linfonodos de TNFR1 KO, em relação ao selvagens. Esses dados se encontram de acordo com as nossas análises histopatológicas, que mostram maior infiltrado de células inflamatórias nos linfonodos drenantes e baços dos animais TNFR1 KO em relação aos selvagens. Tais análises nos sugerem que o inóculo de *L. braziliensis* é capaz de desencadear uma inflamação crônica e disseminada em camundongos TNFR1 KO,

muito similar às dos pacientes acometidos pela leishmaniose mucocutânea (Jones et al., 1987; Gaze et al., 2006).

Em conclusão, nossos dados mostraram que apesar da inflamação exacerbada mantidas nas lesões crônicas provocadas pela presença de células inflamatórias e do parasita, como na infecção dos camundongos TNFR1 KO por *L. major*, não houve acometimento de mucosas nos animais TNFR1 KO infectados por *L. braziliensis*. Esse fato nos sugere que a determinação da severidade da patologia induzida por esse parasita não é fruto da presença de um único fator, mas da combinação de fatores múltiplos, em que merecem destaque além das respostas do hospedeiro, as variações entre os diferentes isolados da espécie de *L. braziliensis*. No nosso modelo tentamos contemplar diversos desses fatores. Em relação à *Leishmania braziliensis* trabalhamos com a cepa PPS6, cuja capacidade de colonizar as mucosas humanas parece estar relacionada à indução de uma resposta imunológica deficiente no momento do estabelecimento da infecção (Leite et al., 2012). Essa deficiência provocada pelo inóculo intradérmico poderia ser mantida pela própria incapacidade do camundongo TNFR1 KO em promover o controle da inflamação, o que, de acordo com nossas expectativas, criaria um ambiente permissivo a migração do parasita para as mucosas, o que não ocorreu. Com relação aos fatores inerentes ao parasita, por exemplo, tem sido observado que mesmo os diferentes isolados de *L. braziliensis* obtidos de mucosas humanas são capazes de induzir variações nas respostas imunológicas (Leite et al., 2012; Oliveira et al., 2013; de Araujo et al., 2014). Além disso, um importante estudo comparativo entre pacientes acometidos com a forma cutânea e mucocutânea correlaciona as formas amastigotas em certas lesões de mucosa humana à presença de um retrovírus, que poderia ser o responsável pela maior expressão de componentes pró-inflamatórios via TLR3 e consequente subversão do sistema imunológico, o que

contribuiria para a manutenção do parasita a níveis imperceptíveis (Ives et al., 2011). Entretanto, esse parece não ser o caso do nosso isolado PPS6, de acordo com experimentos conduzidos pelo grupo da professora Dra. Fátima Ribeiro Dias, da Universidade Federal de Goiânia (dados não publicados). Com relação aos fatores inerentes ao hospedeiro, merecem atenção os polimorfismos associados aos genes de TNF e IL-6 influenciando a susceptibilidade em pacientes com a forma mucocutânea, mas não em pacientes com lesões cutâneas localizadas (Cabrera et al., 1995; Castellucci et al., 2006). Adicionalmente, um estudo de caso na Turquia descreve a presença de amastigotas com DNA positivo para o complexo *Leishmania donovani* em um paciente com lesões nasais típicas de leishmaniose mucocutânea (Gul et al., 2013). Essa é uma situação pouco comum considerando a espécie de parasita detectada na lesão, mas que pode estar relacionada à capacidade rara de parasitas em hibridizar porções do maxicículo do kDNA, o que é corroborado experimentalmente dentro de flebotomíneos co-infectados (Akopyants et al., 2009).

Tabela 1. Características comuns descritas entre as lesões de pacientes com leishmaniose mucocutânea e as lesões crônicas desenvolvidas nos camundongos TNFR1 KO infectados por *L. major* e *L. braziliensis*

Características	Leishmaniose mucocutânea	Referências	TNFR1 KO infectados com <i>L. major</i>	TNFR1 KO infectados com <i>L. braziliensis</i>
Lesões cutâneas crônicas	Sim	Amato et al., 2008 Oliveira et al., 2012	Sim	Sim
Infiltrado inflamatório intenso nas lesões crônicas	Sim	Boaventura et al., 2010 Bacellar et al., 2002	Sim	Sim
Carga parasitária baixa nas lesões	Sim	De Moura et al., 2005 Vargas et al., 2008	Sim	Sim
Altos níveis de IFN-γ e TNF nas lesões	Sim	Novoa et al., 2001	Sim	Sim
Defeito na regulação da resposta imune inflamatória nas lesões	Sim	Da Cruz et al., 1996	Sim	Não avaliado
Presença de altos números de células T CD8+ e neutrófilos nas lesões	Sim	Guerreiro et al., 2000 Boaventura et al., 2010	Sim	Sim
Disseminação para outros sítios	Sim	Ronet et al., 2012 Gomes et al., 2014	Não	Sim
Invasão de tecidos de mucosas	Sim	Amato et al., 2003 Amato et al., 2008	Não	Não

6. CONCLUSÃO

A busca pelo modelo experimental de leishmaniose mucocutânea, no nosso grupo, tem mostrado desde 1996 que a patologia desenvolvida no camundongo TNFR1 KO, após a infecção por *L. major*, mostra similaridade à doença desenvolvida em humanos, porém com o parasitismo e a inflamação restritos ao local de lesão e ao linfonodo drenante. Por ser incomum o acometimento de mucosas em pacientes infectados por *L. major*, por algum tempo nos questionamos sobre a influência dos fatores inerentes às espécies de *Leishmania* em promover a disseminação para essas regiões.

O presente trabalho mostrou que camundongos TNFR1 KO, quando infectados por *L. braziliensis*, são capazes de desenvolver uma patologia de natureza crônica e disseminada para os linfonodos e baço, muito similar àquela encontrada em humanos com leishmaniose mucocutânea. Porém, as observações histopatológicas indicam que tal disseminação parece não atingir os tecidos de mucosa desse camundongo.

Concluimos que os fatores inerentes ao parasita parecem exercer grande influência no curso da infecção, visto que *L. braziliensis* é capaz de disseminar e inflamar sítios diferentes do local de inóculo no camundongo TNFR1 KO, ao contrário da *L. major*. As observações das mucosas nos levam a ressaltar, porém, que a manifestação da doença é o resultado da interação de múltiplos fatores, inerentes não só ao parasita, mas também ao hospedeiro. Por isso, ainda que busquemos reduzir as variações entre as vias de infecção natural e experimental durante as infecções por *Leishmania braziliensis*, as pequenas variações entre a resposta imunológica humana e murina parecem influenciar com bastante relevância o acometimento de mucosas.

Nossas observações para a infecção do camundongo TNFR1 KO possibilitam perspectivas de outros estudos sobre o desenvolvimento de lesões na leishmaniose mucocutânea assim como estudos no tratamento às formas crônicas de leishmaniose.

7. BIBLIOGRAFIA

Afonso, L. C., and P. Scott, 1993, Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*: *Infect.Immun.*, v. 61, no. 7, p. 2952-2959.

Akopyants, N. S., N. Kimblin, N. Secundino, R. Patrick, N. Peters, P. Lawyer, D. E. Dobson, S. M. Beverley, and D. L. Sacks, 2009, Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector: *Science*, v. 324, no. 5924, p. 265-268.

Alborzi, A., G. R. Pouladfar, M. Fakhar, M. H. Motazedian, G. R. Hatam, and M. R. Kadivar, 2008, Isolation of *Leishmania tropica* from a patient with visceral leishmaniasis and disseminated cutaneous leishmaniasis, southern Iran: *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 79, no. 3, p. 435-437.

Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, and B. M. den, 2012, Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence: *PLoS.One.*, v. 7, no. 5, p. e35671.

Alvar, J., S. Yactayo, and C. Bern, 2006, Leishmaniasis and poverty: *Trends Parasitol.*, v. 22, no. 12, p. 552-557.

Amato, V., J. Amato, A. Nicodemo, D. Uip, V. Amato-Neto, and M. Duarte, 1998, [Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate]: *Ann.Dermatol.Venereol.*, v. 125, no. 8, p. 492-495.

Amato, V. S., H. F. de Andrade, and M. I. Duarte, 2003, Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment: *Acta Trop.*, v. 85, no. 1, p. 39-49.

Amato, V. S., F. F. Tuon, H. A. Bacha, V. A. Neto, and A. C. Nicodemo, 2008, Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment: *Acta Trop.*, v. 105, no. 1, p. 1-9.

Arevalo, J. et al., 2007, Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis: *J.Infect.Dis.*, v. 195, no. 12, p. 1846-1851.

Bacellar, O., D. Faria, M. Nascimento, T. M. Cardoso, K. J. Gollob, W. O. Dutra, P. Scott, and E. M. Carvalho, 2009, Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis: *J.Infect.Dis.*, v. 200, no. 1, p. 75-78.

Bacellar, O., H. Lessa, A. Schriefer, P. Machado, J. A. Ribeiro de, W. O. Dutra, K. J. Gollob, and E. M. Carvalho, 2002, Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients: *Infect.Immun.*, v. 70, no. 12, p. 6734-6740.

Bajenoff, M., B. Breart, A. Y. Huang, H. Qi, J. Cazareth, V. M. Braud, R. N. Germain, and N. Glaichenhaus, 2006, Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging: *J.Exp.Med.*, v. 203, no. 3, p. 619-631.

Baldwin, T. M., C. Elso, J. Curtis, L. Buckingham, and E. Handman, 2003, The site of *Leishmania major* infection determines disease severity and immune responses: *Infect.Immun.*, v. 71, no. 12, p. 6830-6834.

Barral, A., J. Guerreiro, G. Bomfim, D. Correia, M. Barral-Netto, and E. M. Carvalho, 1995, Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*: *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 53, no. 3, p. 256-259.

Barral, A., E. A. Petersen, D. L. Sacks, and F. A. Neva, 1983, Late metastatic Leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease: *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 32, no. 2, p. 277-285.

Barral-Netto, M., A. Barral, C. Brodskyn, E. M. Carvalho, and S. G. Reed, 1995, Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis: *Parasite Immunol.*, v. 17, no. 1, p. 21-28.

Basu, R., S. Roy, and P. Walden, 2007, HLA class I-restricted T cell epitopes of the kinetoplastid membrane protein-11 presented by *Leishmania donovani*-infected human macrophages: *J.Infect.Dis.*, v. 195, no. 9, p. 1373-1380.

Belkaid, Y., K. F. Hoffmann, S. Mendez, S. Kamhawi, M. C. Udey, T. A. Wynn, and D. L. Sacks, 2001, The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure: *J.Exp.Med.*, v. 194, no. 10, p. 1497-1506.

Belkaid, Y., S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro, and D. L. Sacks, 1998, Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis: *J.Exp.Med.*, v. 188, no. 10, p. 1941-1953.

Belkaid, Y., S. Mendez, R. Lira, N. Kadambi, G. Milon, and D. Sacks, 2000, A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity: *J.Immunol.*, v. 165, no. 2, p. 969-977.

Boaventura, V. S. et al., 2006, Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil: *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 75, no. 2, p. 267-269.

Boaventura, V. S. et al., 2010, Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines: *Eur.J.Immunol.*, v. 40, no. 10, p. 2830-2836.

Cabrera, M., M. A. Shaw, C. Sharples, H. Williams, M. Castes, J. Convit, and J. M. Blackwell, 1995, Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis: *J.Exp.Med.*, v. 182, no. 5, p. 1259-1264.

Carlsen, E. D., C. Hay, C. A. Henard, V. Popov, N. J. Garg, and L. Soong, 2013, *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms: *Infect.Immun.*, v. 81, no. 11, p. 3966-3974.

Castellucci, L. et al., 2006, IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil: *J.Infect.Dis.*, v. 194, no. 4, p. 519-527.

Cortes, D. F. et al., 2010, Low and high-dose intradermal infection with *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* in C57BL/6 mice: *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 105, no. 6, p. 736-745.

Costa, J. M., K. C. Vale, I. N. Cecilio, N. K. Osaki, E. M. Netto, M. S. Tada, F. Franca, M. C. Barreto, and P. D. Marsden, 1987, [Psychosocial and stigmatizing aspects of mucocutaneous leishmaniasis]: *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*, v. 20, no. 2, p. 77-81.

Cruz, I., M. A. Morales, I. Noguera, A. Rodriguez, and J. Alvar, 2002, *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users: *Lancet*, v. 359, no. 9312, p. 1124-1125.

Cupolillo, E., E. Medina-Acosta, H. Noyes, H. Momen, and G. Grimaldi, Jr., 2000, A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*: *Parasitol.Today*, v. 16, no. 4, p. 142-144.

Da-Cruz, A. M., M. P. de Oliveira, P. M. De Luca, S. C. Mendonca, and S. G. Coutinho, 1996, Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis: *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 91, no. 2, p. 225-229.

Dantas, M. L., J. M. de Oliveira, L. Carvalho, S. T. Passos, A. Queiroz, L. H. Guimaraes, P. Machado, E. Carvalho, and S. Arruda, 2014, Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis: *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 109, no. 2, p. 202-209.

Dantas, M. L., J. C. Oliveira, L. Carvalho, S. T. Passos, A. Queiroz, P. Machado, E. Carvalho, and S. Arruda, 2013, CD8+ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis: *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*, v. 46, no. 6, p. 728-734.

de Almeida Marques-da-Silva, J. C. de Oliveira, A. B. Figueiredo, J. D. de Souza Lima, C. M. Carneiro, J. L. Rangel Fietto, and L. C. Crocco Afonso, 2008, Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection: *Microbes.Infect.*, v. 10, no. 8, p. 850-857.

de Araujo, C. F., V. M. Silva, A. Cronemberger-Andrade, L. S. Aragao-Franca, V. C. Rocha, P. S. Santos, and L. Pontes-de-Carvalho, 2014, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* amastigote extracts differ in their enhancement effect on *Leishmania* infection when injected intradermally: *BMC.Res.Notes*, v. 7, p. 70.

de Camargo, R. A., A. C. Nicodemo, D. V. Sumi, E. M. Gebrim, F. F. Tuon, L. M. de Camargo, R. Imamura, and V. S. Amato, 2014, Facial structure alterations and abnormalities of the paranasal sinuses on multidetector computed tomography scans of patients with treated mucosal leishmaniasis: *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 8, no. 7, p. e3001.

Desjeux, P., 1996, Leishmaniasis. Public health aspects and control: *Clin.Dermatol.*, v. 14, no. 5, p. 417-423.

Dominguez, M., I. Moreno, C. Aizpurua, and A. Torano, 2003, Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood: *Microbes.Infect.*, v. 5, no. 6, p. 507-513.

Faria, D. R. et al., 2005, Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis: *Infect.Immun.*, v. 73, no. 12, p. 7853-7859.

Faustman, D. L., and M. Davis, 2013, TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine: *Front Immunol.*, v. 4, p. 478.

Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak, and B. R. Bloom, 1995, Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice: *Immunity.*, v. 2, no. 6, p. 561-572.

Galdino, H., Jr. et al., 2014, Interleukin 32gamma (IL-32gamma) is highly expressed in cutaneous and mucosal lesions of American Tegumentary Leishmaniasis patients: association with tumor necrosis factor (TNF) and IL-10: *BMC.Infect.Dis.*, v. 14, p. 249.

Gaze, S. T. et al., 2006, Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population: *Scand.J.Immunol.*, v. 63, no. 1, p. 70-78.

Gomes, C. M. et al., 2014a, *Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1beta, IL-6, IL-10 and TGF-beta by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents: *Parasite Immunol.*, v. 36, no. 5, p. 225-231.

Gomes, C. M., N. A. de Paula, M. V. Cesetti, A. M. Roselino, and R. N. Sampaio, 2014b, Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a *L. (V.) braziliensis*-endemic area: *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, v. 79, no. 4, p. 413-418.

Goncalves, N. S., M. Ghaem-Maghami, G. Monteleone, G. Frankel, G. Dougan, D. J. Lewis, C. P. Simmons, and T. T. MacDonald, 2001, Critical role for tumor necrosis factor alpha in controlling the number of luminal pathogenic bacteria and immunopathology in infectious colitis: *Infect.Immun.*, v. 69, no. 11, p. 6651-6659.

Gonzalez-Lombana, C., C. Gimblet, O. Bacellar, W. W. Oliveira, S. Passos, L. P. Carvalho, M. Goldschmidt, E. M. Carvalho, and P. Scott, 2013, IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection: *PLoS.Pathog.*, v. 9, no. 3, p. e1003243.

Goto, H., and J. A. Lindoso, 2010, Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.*, v. 8, no. 4, p. 419-433.

Guerreiro, J. B., A. A. Cruz, A. Barral, H. A. Lessa, H. Rocha, and E. M. Carvalho, 2000, Mucosal leishmaniasis: quantitative nasal cytology as a marker of disease activity and indicator of healing: *Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.*, v. 109, no. 1, p. 89-94.

Gul, H. C., F. Tosun, A. Karakas, O. Koru, O. Onguru, G. Mert, B. A. Besirbellioglu, and C. P. Eyigun, 2013, A case of mucosal leishmaniasis: Mimicking intranasal tumor with perforation of septum: *J.Microbiol.Immunol.Infect.*

Herath, S., P. Kropf, and I. Muller, 2003, Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal

IFN-gamma production by CD4(+) T cells: *Parasite Immunol.*, v. 25, no. 11-12, p. 559-567.

Herwaldt, B. L., 1999, Leishmaniasis: *Lancet*, v. 354, no. 9185, p. 1191-1199.

Hu, X. et al., 2014, Transmembrane TNF-alpha Promotes Suppressive Activities of Myeloid-Derived Suppressor Cells via TNFR2: *J.Immunol.*, v. 192, no. 3, p. 1320-1331.

Ives, A. et al., 2011, Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis: *Science*, v. 331, no. 6018, p. 775-778.

Jones, T. C. et al., 1987, Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*: *J.Infect.Dis.*, v. 156, no. 1, p. 73-83.

Kanaly, S. T., M. Nashleanas, B. Hondowicz, and P. Scott, 1999, TNF receptor p55 is required for elimination of inflammatory cells following control of intracellular pathogens: *J.Immunol.*, v. 163, no. 7, p. 3883-3889.

Kumar, R., N. Singh, S. Gautam, O. P. Singh, K. Gidwani, M. Rai, D. Sacks, S. Sundar, and S. Nylen, 2014, Leishmania Specific CD4 T Cells Release IFN-gamma That Limits Parasite Replication in Patients with Visceral Leishmaniasis: *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 8, no. 10, p. e3198.

Launois, P., A. Gummy, H. Himmelrich, R. M. Locksley, M. Rocken, and J. A. Louis, 2002, Rapid IL-4 production by Leishmania homolog of mammalian RACK1-reactive CD4(+) T cells in resistant mice treated once with anti-IL-12 or -IFN-gamma antibodies at the onset of infection with *Leishmania major* instructs Th2 cell development, resulting in nonhealing lesions: *J.Immunol.*, v. 168, no. 9, p. 4628-4635.

Leite, P. M. et al., 2012, Ecto-Nucleotidase Activities of Promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* Relates to Parasite Infectivity and Disease Clinical Outcome: *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 6, no. 10, p. e1850.

Loria-Cervera, E. N., and F. J. Andrade-Narvaez, 2014, Animal models for the study of leishmaniasis immunology: *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo*, v. 56, no. 1, p. 1-11.

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent: *J.Biol.Chem.*, v. 193, no. 1, p. 265-275.

Maroli, M., M. D. Feliciangeli, L. Bichaud, R. N. Charrel, and L. Gradoni, 2013, Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern: *Med.Vet.Entomol.*, v. 27, no. 2, p. 123-147.

Marra, F., M. C. Chiappetta, and V. Vincenti, 2014, Ear, nose and throat manifestations of mucocutaneous Leishmaniasis: a literature review: *Acta Biomed.*, v. 85, no. 1, p. 3-7.

Marsden, P. D., 1986, Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911): *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, v. 80, no. 6, p. 859-876.

Marsden, P. D., 1994, Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Tres Bracos, Bahia-Brazil: *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*, v. 27, no. 2, p. 93-101.

- Martinez, J. E., Alba, L. Arias, M. A. Escobar, and N. G. Saravia, 1992, Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination: *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, v. 86, no. 4, p. 392-394.
- Mendes, D. S., M. L. Dantas, J. M. Gomes, W. L. Santos, A. Q. Silva, L. H. Guimaraes, P. R. Machado, E. M. Carvalho, and S. Arruda, 2013, Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4+, CD20+, CD68+, CD31+ and vW+ cells in non-ulcerated lesions of disseminated leishmaniasis: *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 108, no. 1, p. 18-22.
- Mitropoulos, P., P. Konidas, and M. Durkin-Konidas, 2010, New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment: *J.Am.Acad.Dermatol.*, v. 63, no. 2, p. 309-322.
- Modolell, M. et al., 2009, Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis: *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 3, no. 7, p. e480.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman, 2005, Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986: *J.Immunol.*, v. 175, no. 1, p. 5-14.
- Mosser, D. M., and A. Brittingham, 1997, *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation: *Parasitology*, v. 115 Suppl, p. S9-23.
- Murray, H. W., H. Masur, and J. S. Keithly, 1982, Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity: *J.Immunol.*, v. 129, no. 1, p. 344-350.
- Nascimento, M. S., V. Carregaro, D. S. Lima-Junior, D. L. Costa, B. Ryffel, M. Duthie, J. A. de, R. P. de Almeida, and J. S. da Silva, 2014, IL-17A ACTS SYNERGISTICALLY WITH IFN-gamma TO PROMOTE PROTECTION AGAINST *Leishmania infantum* INFECTION: *J.Infect.Dis.*
- Nashleanas, M., and P. Scott, 2000, Activated T cells induce macrophages to produce NO and control *Leishmania major* in the absence of tumor necrosis factor receptor p55: *Infect.Immun.*, v. 68, no. 3, p. 1428-1434.
- Nathan, C. F., T. J. Prendergast, M. E. Wiebe, E. R. Stanley, E. Platzer, H. G. Remold, K. Welte, B. Y. Rubin, and H. W. Murray, 1984, Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma: *J.Exp.Med.*, v. 160, no. 2, p. 600-605.
- Naude, P. J., J. A. den Boer, P. G. Luiten, and U. L. Eisel, 2011, Tumor necrosis factor receptor cross-talk: *FEBS J.*, v. 278, no. 6, p. 888-898.
- Nogueira, R. S., A. Gomes-Silva, R. C. Bittar, M. D. Silva, V. S. Amato, M. M. da Silva, M. P. Oliveira-Neto, S. G. Coutinho, and A. M. Da-Cruz, 2014, Antigen-triggered interferon-gamma and interleukin-10 pattern in cured mucosal leishmaniasis patients is shaped during the active phase of disease: *Clin.Exp.Immunol.*, v. 177, no. 3, p. 679-686.

Novais, F. O. et al., 2013, Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis: *PLoS.Pathog.*, v. 9, no. 7, p. e1003504.

Oliveira, C. F. et al., 2012, Characterization of chronic cutaneous lesions from TNF-receptor-1-deficient mice infected by *Leishmania major*: *Clin.Dev.Immunol.*, v. 2012, p. 865708.

Oliveira, F., A. Báfica, A. B. Rosato, C. B. Favali, J. M. Costa, V. Cafe, M. Barral-Netto, and A. Barral, 2011, Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis: *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 85, no. 1, p. 70-73.

Oliveira, F. S., C. M. Valete-Rosalino, S. J. Pacheco, F. A. Costa, A. O. Schubach, and R. S. Pacheco, 2013, American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels: *Parasit.Vectors.*, v. 6, p. 189.

Oliveira, W. N., L. E. Ribeiro, A. Schrieffer, P. Machado, E. M. Carvalho, and O. Bacellar, 2014, The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis: *Cytokine*, v. 66, no. 2, p. 127-132.

Paletta-Silva, R., and J. R. Meyer-Fernandes, 2012, Adenosine and immune imbalance in visceral leishmaniasis: the possible role of ectonucleotidases: *J.Trop.Med.*, v. 2012, p. 650874.

Pereira, C. G. et al., 2009, Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection: *Vet.Parasitol.*, v. 165, no. 3-4, p. 231-240.

Peters, N. C. et al., 2008a, In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies: *Science*, v. 321, no. 5891, p. 970-974.

Peters, N. C. et al., 2008b, In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies: *Science*, v. 321, no. 5891, p. 970-974.

Pitta, M. G. et al., 2009, IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*: *J.Clin.Invest*, v. 119, no. 8, p. 2379-2387.

Reithinger, R., J. C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander, and S. Brooker, 2007, Cutaneous leishmaniasis: *Lancet Infect.Dis.*, v. 7, no. 9, p. 581-596.

Ribeiro-de-Jesus, A., R. P. Almeida, H. Lessa, O. Bacellar, and E. M. Carvalho, 1998, Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis: *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v. 31, no. 1, p. 143-148.

Ribeiro-Gomes, F. L. et al., 2004, Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection: *J.Immunol.*, v. 172, no. 7, p. 4454-4462.

Ribeiro-Gomes, F. L., E. H. Roma, M. B. Carneiro, N. A. Doria, D. L. Sacks, and N. C. Peters, 2014, Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania major*: *Infect.Immun.*, v. 82, no. 7, p. 2713-2727.

Ronet, C., S. M. Beverley, and N. Fasel, 2011, Mucocutaneous leishmaniasis in the New World: the ultimate subversion: Virulence., v. 2, no. 6, p. 547-552.

Ruiz, J. H., and I. Becker, 2007, CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis: Parasite Immunol., v. 29, no. 12, p. 671-678.

Sacks, D., and N. Noben-Trauth, 2002, The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice: Nat.Rev.Immunol., v. 2, no. 11, p. 845-858.

Sacks, D. L., 1989, Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes: Exp.Parasitol., v. 69, no. 1, p. 100-103.

Salam, N., W. M. Al-Shaqha, and A. Azzi, 2014, Leishmaniasis in the Middle East: Incidence and Epidemiology: PLoS.Negl.Trop.Dis., v. 8, no. 10, p. e3208.

Santos, C. S. et al., 2013, CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis: J.Invest Dermatol., v. 133, no. 6, p. 1533-1540.

Saravia, N. G., K. Weigle, I. Segura, S. H. Giannini, R. Pacheco, L. A. Labrada, and A. Goncalves, 1990, Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection--reactivation or reinfection?: Lancet, v. 336, no. 8712, p. 398-402.

Schaible, U. E., P. H. Schlesinger, T. H. Steinberg, W. F. Mangel, T. Kobayashi, and D. G. Russell, 1999, Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes: J.Cell Sci., v. 112 (Pt 5), p. 681-693.

Schriefer, A. et al., 2004, Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis: Infect.Immun., v. 72, no. 1, p. 508-514.

Shakya, N., S. A. Sane, P. Vishwakarma, P. Bajpai, and S. Gupta, 2011, Improved treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) by using combination of ketoconazole, miltefosine with an immunomodulator-Picroliv: Acta Trop., v. 119, no. 2-3, p. 188-193.

Silveira, F. T. et al., 1998, T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*: Parasite Immunol., v. 20, no. 1, p. 19-26.

Silveira, F. T., R. Lainson, and C. E. Corbett, 2004, Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review: Mem.Inst.Oswaldo Cruz, v. 99, no. 3, p. 239-251.

Soong, L., C. H. Chang, J. Sun, B. J. Longley, Jr., N. H. Ruddle, R. A. Flavell, and D. McMahon-Pratt, 1997, Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection: J.Immunol., v. 158, no. 11, p. 5374-5383.

Souza, A. S., A. Giudice, J. M. Pereira, L. H. Guimaraes, A. R. de Jesus, T. R. de Moura, M. E. Wilson, E. M. Carvalho, and R. P. Almeida, 2010, Resistance of

Leishmania (*Viannia*) *braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-alpha production: *BMC.Infect.Dis.*, v. 10, p. 209.

Stobie, L., S. Gurunathan, C. Prussin, D. L. Sacks, N. Glaichenhaus, C. Y. Wu, and R. A. Seder, 2000, The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 97, no. 15, p. 8427-8432.

Tracey, D., L. Klareskog, E. H. Sasso, J. G. Salfeld, and P. P. Tak, 2008, Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review: *Pharmacol.Ther.*, v. 117, no. 2, p. 244-279.

Vargas-Inc, L. Xin, and L. Soong, 2008, *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses: *J.Immunol.*, v. 180, no. 11, p. 7537-7545.

Vendrame, C. M., L. D. Souza, M. D. Carvalho, K. Salgado, E. M. Carvalho, and H. Goto, 2010, Insulin-like growth factor-I induced and constitutive arginase activity differs among isolates of *Leishmania* derived from patients with diverse clinical forms of *Leishmania braziliensis* infection: *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, v. 104, no. 8, p. 566-568.

Vieira, E. L., T. S. Keesen, P. R. Machado, L. H. Guimaraes, E. M. Carvalho, W. O. Dutra, and K. J. Gollob, 2013, Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size: *Parasite Immunol.*, v. 35, no. 2, p. 65-72.

Vieira, L. Q., M. Goldschmidt, M. Nashleanas, K. Pfeffer, T. Mak, and P. Scott, 1996, Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication: *J.Immunol.*, v. 157, no. 2, p. 827-835.

Vujanovic, L., D. E. Szymkowski, S. Alber, S. C. Watkins, N. L. Vujanovic, and L. H. Butterfield, 2010, Virally infected and matured human dendritic cells activate natural killer cells via cooperative activity of plasma membrane-bound TNF and IL-15: *Blood*, v. 116, no. 4, p. 575-583.

Wang, Z. E., S. L. Reiner, S. Zheng, D. K. Dalton, and R. M. Locksley, 1994, CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*: *J.Exp.Med.*, v. 179, no. 4, p. 1367-1371.

Yoneyama, K. A., L. D. de Peder, M. V. Lonardoni, and T. G. Silveira, 2007, Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay in patients from Northern Parana State, Brazil: *Braz.J.Infect.Dis.*, v. 11, no. 3, p. 360-364.