

Gregório Guilherme Almeida

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS RELACIONADOS À RESISTÊNCIA E
SUSCETIBILIDADE NA COINFEÇÃO EXPERIMENTAL MURINA
DE *Leishmania major* COM *Rhipicephalus sanguineus* OU *Ascaris
lumbricoides*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia Investigativa.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Gonçalves

Co-Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Crocco Afonso

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Belo Horizonte – MG

2017

A447a Almeida, Gregório Guilherme.
Aspectos imunológicos relacionados à resistência e suscetibilidade na
coinfecção experimental murina de *Leishmania major* com *Rhicephalus*
sanguineus ou *Ascaris lumbricoides* [manuscrito]. / Gregório Guilherme
Almeida. - - Belo Horizonte: 2017.
82f.: il.
Orientador: Ricardo Gonçalves.
Coorientador: Luis Carlos Crocco Afonso.
Área de concentração: Patologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina.
1. *Leishmania major*. 2. Coinfecção. 3. *Rhicephalus sanguineus*. 4.
Dissertações Acadêmicas. I. Gonçalves, Ricardo. II. Afonso, Luis Carlos
Crocco. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
IV. Título.

NLM: QX 70

*À minha mãe, Inêz Maria de Almeida, meu
maior exemplo de força e resiliência.*

**“O que foi feito é preciso conhecer para melhor prosseguir.
Falo assim sem tristeza, falo por acreditar que
é cobrando o que fomos que nós iremos crescer.”**

O que foi feito deverá, Milton Nascimento.

Agradecimentos

A carreira científica é mais que uma escolha: é um comprometimento de uma vida inteira. São horas longe da família e dos amigos. Horas de planejamento, execução e análise. Horas revirando suas anotações para descobrir o que deu errado. E em poucos momentos a felicidade de um acerto, de uma descoberta. Tudo isso para que? Tudo isso porque? Por que aquela pulga atrás da sua orelha não te deixa aceitar respostas fáceis. Você detesta respostas fáceis que vem sem o esforço da pesquisa, que não passaram pelo crivo racional. E como recompensa, a eterna sensação da ignorância. Tenho menos certezas hoje do que tinha a quatro anos atrás. É o peso de quem experimentou derrotas e conquistas. A vida científica é uma vida de devoção à busca da verdade. É a vida que eu escolhi e pela qual me comprometo.

Agradeço a todos os professores que passaram pela minha vida. Agradeço a seus exemplos mais que suas lições. Aqui cheguei pelo meu esforço e pelo valor dos ensinamentos deles. Agradeço ao professor Ricardo Gonçalves pela acolhida e pela liberdade que ele me permitiu ter de me desenvolver. Agradeço sobretudo pela amizade além da relação professor-aluno, que, estou certo, ficará para além desta tese. Ao professor Wagner Tafuri pela confiança, pela acolhida, a amizade e pela diária injeção de autoestima. Ao professor Luís Crocco (figura séria que quando eu menos esperava me surpreendeu com um abraço paternal e uma dose de cachaça) pelo imenso aprendizado e pela confiança. Ao Dr. Rodrigo Soares, pelos sábios conselhos, por ajustar finamente minha sintonia com a vida profissional que eu pretendo seguir e pela profunda amizade que cultivamos.

Aos meus grandes amigos, Renata Gomes e Daniel Coscarelli, por me aturarem falando de trabalho nos poucos momentos que esses quatro anos nos permitiram ter juntos. Quero sempre tê-los perto, embora a rotina da vida adulta nos mantenha longe.

À minha família, em especial, minha mãe e meus irmãos, Bruno e Bárbara. Sei que sou ausente em presença, mas sempre os levo comigo na mente e no peito. Espero que um dia eu possa compensar o tempo que passamos longe.

Ao William, meu companheiro em todas as horas, pelo carinho, pela compreensão, pelo apoio irrestrito e por acreditar em mim e nos meus sonhos.

Aos amigos do LPL pelos quatro anos de trabalho e amizade. Dividimos mais que o espaço: dividimos sonhos e perspectivas, sucessos e fracassos, lágrimas e sorrisos. Sobretudo compartilhamos tudo o que um objetivo em comum nos trouxe. Obrigado pelo aprendizado e pela confiança.

Agradeço aos muitos colaboradores deste projeto, os quais seria impossível concluir. À Naylene, Paula e Márcia do LFIH, por sofrerem comigo com as infestações de *R. sanguineus* que eram sempre imprevisíveis. Ao professor Ricardo Nascimento que estendeu as mãos para ajudar neste projeto. Ao Professor Matias Szabó que inúmeras vezes me enviou carrapatos do seu laboratório. Ao professor Ricardo Fujiwara por também abrir as portas do seu laboratório e pelos sábios conselhos. Ao professor Alexander Birbrair pela confiança e pelos conselhos. Às técnicas e secretárias do departamento de patologia, Vânia, Raquel, Luciana, Jaqueline, Regina, Marília e Dona Olinda. Obrigado pela convivência, ajuda e carinho recíproco, e por adorarem as sobremesas que faço.

Agradeço aos colegas e pesquisadores do curso de Biologia do Parasitismo em Woods Hole, por me darem a visão de um outro patamar da ciência. Este curso foi essencial na minha formação acadêmica, renovou meus votos com minha vontade de ser cientista e me inspirou a ir além. Agradeço especialmente meu amigo Rafael Polidoro, pela amizade, pelos conselhos e pelo entusiasmo que compartilhamos pela ciência.

Agradeço a todos os professores e colegas do departamento de patologia, sobretudo aos amigos do NIPE e do LPC, com quem convivi e atazanei muito nos últimos quatro anos.

Por fim agradeço ao sofrido povo brasileiro, quem realmente financia a igualmente sofrida ciência brasileira. Nestes tempos de retrocesso eu espero que minha humilde contribuição seja um passo à frente no entendimento de uma doença que assombra nosso povo. Espero que um dia esse conhecimento que me custou quatro anos de dedicação, e o suor de milhões de brasileiros, seja de real utilidade para construir um país melhor. Espero um dia retornar ao povo brasileiro todo o investimento feito em mim. Seguimos na luta com esperança.

ÍNDICE

Lista de figuras	viii
Lista de Abreviaturas	xi
Resumo.....	xii
Abstract	xiii
1 Introdução.....	14
2 Revisão de literatura.....	16
2.1 Biologia de <i>Leishmania</i> spp.....	16
2.2 A infecção do hospedeiro vertebrado	17
2.3 Leishmaniose visceral canina	21
2.4 Comorbidades e o efeito da imunomodulação por parasitos.....	23
2.5 Justificativa.....	25
3 Material e Métodos	27
3.1 Animais e parasitos.....	27
3.2 Isolamento de metacíclicas e infecção	27
3.3 Quantificação da carga parasitária por qPCR.....	28
3.4 Produção de macrófagos derivados de medula óssea	29
3.5 Ensaio de dessensibilização de receptores purinérgicos.....	29
3.6 ELISA para detecção de IgG anti- <i>Leishmania</i>	30
3.7 ELISA de captura	30
3.8 Análise estatística	31
Capítulo I	32
4 Objetivos.....	32
4.1 Objetivo Geral	32
4.2 Objetivos específicos	32
5 Delineamento experimental da coinfeção.....	32
6 Resultados	35
6.1 Estabelecimento do modelo	35
6.2 Resposta imune humoral	38
6.3 Avaliação do papel da Adenosina salivar no fenótipo observado.....	42
Capítulo II	47
4 Objetivo geral	47
4.1. Objetivos específicos	47

5	Material e métodos.....	47
5.1.	Parasitas.....	47
5.2.	Quantificação da carga parasitária por diluição limitante.....	48
5.3.	Delineamento experimental.....	48
6	Resultados.....	50
Capítulo III.....		51
4	Objetivo geral.....	51
5	Delineamento, Animais e Parasitos.....	51
6	Resultados.....	51
7	Discussão.....	55
8	Conclusões e Perspectivas.....	64
9	Referências Bibliográficas.....	65
Anexo 1.....		80
Anexo 2.....		81
Anexo 3.....		82

Lista de figuras

- Figura 1** – Aspectos do modelo experimental de infestação por *Rhipicephalus sanguineus* em camundongos. ...32
- Figura 2** – Delineamento experimental da infestação por *R. sanguineus* e infecção por *L. major*. ...33
- Figura 3** – Curso da infecção em camundongos C57BL/6 e BALB/c infestados com *R. sanguineus*. ...34
- Figura 4** – Carga parasitária na pata de camundongos C57BL/6 e BALB/c após oito semanas de infecção. ...35
- Figura 5** – Parasitismo tecidual no baço na quinta e na oitava semana pós-infecção em camundongos C57BL/6. ...35
- Figura 6** – Cinética do parasitismo tecidual na pata e no baço de camundongos C57BL/6 na quinta e oitava semana de infecção. ...36
- Figura 7** – Desenvolvimento da lesão e carga parasitária na décima primeira semana de infecção em camundongos C57BL/6. ...36
- Figura 8** – Curso da infecção na orelha de camundongos C57BL/6 previamente infestados com *R. sanguineus* e infectados com *L. major*. ...37
- Figura 9** – Títulos de anticorpos IgG total contra antígeno solúvel de *L. major*, em camundongos C57BL/6 e BALB/c previamente infestados com *R. sanguineus*. ...38
- Figura 10** – Títulos das subclasses de anticorpos IgG contra antígeno solúvel de *Leishmania major*, em camundongos C57BL/6 e BALB/c previamente infestados com *R. sanguineus*....38

- Figura 11** – Títulos das subclasses de anticorpos IgG1 contra antígeno solúvel de *Leishmania major*, em camundongos C57BL/6 e BALB/c previamente infestados com *R. sanguineus*....39
- Figura 12** – Títulos de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2 contra antígeno solúvel de *Leishmania major*, em camundongos C57BL/6 após cinco ou oito semanas de infecção. ...40
- Figura 13** – Títulos de anticorpos IgE total, em camundongos C57BL/6 e BALB/c previamente infestados com *R. sanguineus* e infectados com *L. major*. ...41
- Figura 14** – Níveis séricos de IL-10 em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* e previamente infestados ou não com *R. sanguineus*. ...42
- Figura 15** – Esquema do protocolo de tratamento em camundongos tratados com um agonista de receptores purinérgicos. ...42
- Figura 16** – Desenvolvimento da lesão em camundongos tratados com agonistas de receptores purinérgicos. ...43
- Figura 17** – Desenvolvimento da lesão em camundongos inoculados com saliva de *R. sanguineus*. ...44
- Figura 18** – Efeito do agonista purinérgico (NECA) sobre a produção de IL-10 em macrófagos derivados de medula-óssea. ...45
- Figura 19** – Efeito do agonista purinérgico (NECA) sobre a produção de TNF- α em macrófagos derivados de medula-óssea. ...45
- Figura 20** – Delineamento experimental da infecção por *Ascaris lumbricoides* e infecção por *L. major*. ...48
- Figura 21** – Desenvolvimento da lesão em camundongos BALB/c previamente infectados com 3 doses de *A. lumbricoides* e infectados com *L. major*. ...49

- Figura 22** – Carga parasitária de *L. major* em camundongos BALB/c previamente infectados com 3 doses de *A. lumbricoides*. ...49
- Figura 23** – Desenvolvimento da lesão em camundongos Δ dbl-GATA1 infectados com *Leishmania amazonensis*. ...51
- Figura 24** – Avaliação das metástases por *L. amazonensis* em camundongos Δ dbl-GATA1 ...51
- Figura 25** – Curva de mortalidade de camundongos Δ dbl-GATA1 infectados com *Leishmania amazonensis*. ...52
- Figura 26** – Desenvolvimento da lesão em camundongos Δ dbl-GATA1 infectados com *Leishmania major*. ...53
- Figura 27** – Curva de mortalidade de camundongos Δ dbl-GATA1 infectados com *Leishmania major*. ...53
- Figura 28** – Avaliação das metástases por *L. major* em camundongos Δ dbl-GATA1. ...54

Lista de Abreviaturas

LV – Leishmaniose visceral

LT – Leishmaniose tegumentar

LCM – Leishmaniose cutâneo-mucosa

PKDL – Leishmaniose cutânea pós calazar (*Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis*)

CD – Grupo de diferenciação (*Cluster of Differentiation*)

T_H – Linfócitos T auxiliares

TNF – Fator de necrose tumoral

IFN - Interferon

IL – Interleucina

Ig – Imunoglobulina

MCP – Proteína quimiotática de macrófagos

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

TCR – Receptor de linfócito T

RAG – Gene de ativação da recombinação

SFB – Soro fetal bovino

MEM – Meio essencial mínimo

Pro^{met} – Promastigotas metacíclicas

PNA – Aglutinina de amendoim (*Peanut agglutinin*)

PCR – Reação em cadeia de polimerase

qPCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativa

kDNA - Ácido desoxirribonucleico de cinetoplasto

BSA – Albumina sérica bovina

SDS – Duodecil sulfato de sódio

ABTS - ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benz-tiazolino sulfônico

HRP – Peroxidase de rabanete (Horseradish peroxidase)

NECA – 5'-(N-etilcarboxiamido) adenosina

ELISA – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

Resumo

Os cães são considerados os principais reservatórios domésticos de leishmaniose visceral no Brasil e em muitas regiões do mundo. Na natureza, uma grande variedade de coinfeções pode ocorrer em cães, especialmente aquelas causadas por carrapatos e vermes intestinais. A saliva de carrapatos possui propriedades farmacológicas capazes de contornar os mecanismos de coagulação, inflamação e percepção do hospedeiro. Helmintos geralmente conduzem a resposta imune a um perfil de T_H2 , benéfico para os parasitos do gênero *Leishmania*. O papel da imunomodulação produzida por carrapatos ou vermes na infecção por *Leishmania* spp. é pouco conhecido. Camundongos (C57BL/6 e BALB/c) foram previamente infestados, uma única vez, por duas fêmeas adultas de *Rhipicephalus sanguineus* na pele dorso-torácica, por 7 a 10 dias e infectados com 10^5 promastigotas metacíclicas de *Leishmania major* na pata posterior esquerda, bem como um grupo não infestado. Como grupo de controle para alguns experimentos, os camundongos foram infestados por *R. sanguineus* foram inoculados na pata com PBS estéril. A espessura da pata foi monitorada semanalmente. O parasitismo e alguns parâmetros imunológicos foram medidos após cinco e oito semanas de infecção. Os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* e IL-10 foram medidos em soros por ELISA e a carga parasitária na pele e no baço foi medida por qPCR. Camundongos BALB/c foram previamente infectados três vezes com 2000 ovos embrionados de *Ascaris lumbricoides* e depois infectados com *L. major* como descrito anteriormente. A infestação com *R. sanguineus* promoveu um menor aumento na espessura da pata infectada quando comparado a camundongos não infestados. No entanto, a carga parasitária na pata e no baço foi ligeiramente maior nos grupos infestados. Nenhuma diferença no inchaço da pata foi observada em camundongos BALB/c, mas a carga parasitária na pata foi ligeiramente maior no grupo infestado. Curiosamente, os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* IgG1 e IgG2 foram menores em camundongos oito semanas após o final da infestação. Não foram observadas diferenças em camundongos infectados com *A. lumbricoides*, quando comparados aos controles. Além disso, o papel dos eosinófilos foi avaliado durante a infecção de *Leishmania* usando camundongos que não possuíam essas células. Os camundongos deficientes em eosinófilos mostraram um pior desenvolvimento da doença devido ao aumento do número de lesões metastáticas na pele e redução da sobrevivência após o desafio. Nossos dados sugerem fortemente que carrapatos podem afetar a imunidade e o curso da doença em camundongos co-infectados com *Leishmania major*.

Abstract

Dogs are considered the main domestic reservoirs of visceral leishmaniasis in Brazil and many regions of the world. In nature, a wide range of coinfections may take place in dogs, especially those caused by brown ticks and worms. Tick's saliva has many properties aiming the vector to circumvent the clothing, inflammatory and perception mechanisms of the host. Worms, usually drive the immune response to a T_H2 profile which is beneficial to *Leishmania* parasites. However, the role of the immunomodulation driven by ticks or worms in the outcome of leishmaniasis is poorly known and is still a missing step of the host-parasite interface. Mice (C57BL/6 and BALB/c) were previously infested once by two adult females of *Rhipicephalus sanguineus* on the dorso-thoracic skin, for 7 to 10 days and infected with 10^5 metacyclic promastigotes of *Leishmania major* in the left hind paw as well as a non-infested group. As a control group for some experiments, mice infested by *R. sanguineus* were inoculated in the footpad with sterile PBS. Footpad thickness was monitored weekly. Parasitism and immunologic parameters were measured at five and eight weeks post infection. The titers of anti-*Leishmania* antibodies and IL-10 were measured in sera by ELISA and the parasite load in the skin and spleen was measured by qPCR. BALB/c mice were previously infected thrice with 2000 embrionated eggs of *Ascaris lumbricoides* and then infected with *L. major* as described before. Infestation with *R. sanguineus* promoted a minor increase in the thickness of the infected footpad when compared to non-infested mice. However, the parasite load in the paw and spleen was slightly higher in infested groups. Moreover, no difference in footpad swelling was observed in BALB/c mice, but the parasite load in the footpad was slightly higher in the infested group. Interestingly, titers of anti-*Leishmania* IgG1 and IgG2 antibodies were lower in infested mice eight weeks after the end of infestation. No differences were sought in mice infected with *A. lumbricoides*, when compared with their control. Moreover, the role of eosinophils were evaluated during the infection of *Leishmania* using mice lacking these cells. Mice depleted of eosinophils showed a worst development of the disease due to enhanced numbers of metastatic lesions in the skin and reduced survival after challenge. Our data strongly suggests that ticks may affect the immunity and the course of the disease in co-infected mice harboring *Leishmania major*.

1 Introdução

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por mais de vinte espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) e transmitidas pela picada de pelo menos 98 espécies de flebotomíneos. Ocorrem em 102 países, áreas ou territórios, onde estima-se que mais de um bilhão de pessoas vivam sob o risco de contrair a enfermidade (WHO, 2016). Nos últimos cinco anos foram relatados mais de um milhão de novos casos, sendo destes, mais de 180 mil de leishmaniose visceral e mais de 960 mil de leishmaniose tegumentar (WHO, 2017a). Estima-se que a leishmaniose visceral seja responsável por mais de 20 mil mortes anualmente (WHO, 2017b), mortalidade que, dentre as doenças parasitárias é superada somente pela malária (WHO, 2010).

A doença apresenta um variado espectro de manifestações clínicas, usualmente divididas em leishmaniose tegumentar, leishmaniose cutaneomucosa, leishmaniose cutânea pós-calazar e leishmaniose visceral. A forma tegumentar é a mais comum e se apresenta como lesões ulceradas únicas ou múltiplas, indolores, de bordas elevadas e bem delimitadas e centro de fundo avermelhado com granulações grosseiras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; WHO, 2016). Alguns pacientes podem apresentar lesões nodulares não ulceradas disseminadas por todo o corpo, uma forma rara e grave da doença tegumentar conhecida como leishmaniose tegumentar anérgica difusa (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). A forma mucosa da doença ocorre em alguns indivíduos que contraíram a forma tegumentar, e se caracteriza clinicamente pela destruição das mucosas oral e/ou nasal (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). A leishmaniose dérmica pós-kala-azar (PKDL) é uma seqüela de leishmaniose visceral causada por *Leishmania donovani* que aparece como erupção macular, papular ou nodular geralmente no rosto, nos braços, nos troncos e em outras partes do corpo. Ocorre principalmente na África Oriental e no subcontinente indiano, onde 5-10% dos pacientes com kala-azar desenvolvem a condição (WHO, 2010; ZIJLSTRA, 2016).

Várias espécies de *Leishmania* podem causar a forma tegumentar. No Brasil destacam-se a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* como principais espécies causadoras desta enfermidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Por outro lado, duas espécies de *Leishmania* são

consideradas como causadoras de leishmaniose visceral: *Leishmania (L.) donovani*, causa da leishmaniose visceral antroponótica em alguns países na África, Ásia e Oceania e *Leishmania (L.) infantum*, causadora da leishmaniose visceral zoonótica nas Américas, norte da África, Europa e Ásia central e ocidental (WHO, 2010).

A leishmaniose visceral é considerada a forma mais perigosa da doença, uma vez que fatal em 95% dos casos não tratados (WHO, 2010). A doença é caracterizada por manifestações clínicas como a febre irregular, hepatoesplenomegalia anemia e emagrecimento progressivo. Em casos mais graves a doença evolui para febre constante, caquexia, hemorragias, icterícia e ascite, levando o paciente ao óbito se não tratada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No Brasil, cães domésticos são os principais hospedeiros vertebrados, agindo como reservatório, acometidos pela leishmaniose visceral, uma vez que em algumas regiões do país a soro prevalência chega a 10% da população canina (HARHAY et al., 2011). A doença no cão é muito semelhante à clinicamente apresentada pelo ser humano, com exceção às lesões cutâneas, comuns em cães. Cães são considerados o principal reservatório urbano e rural da doença, servindo como fonte de infecção para flebotomíneos (ASHFORD, 1996). Durante décadas um dos principais pilares das estratégias de controle da LV foi a eutanásia compulsória de cães soro reagentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). No entanto, esta estratégia têm sido amplamente questionada devido à falta de comprovação de sua eficácia e por fatores que envolvem o bem-estar animal (ASHFORD, 1996; COURTENAY et al., 2002). Apesar das mudanças nas estratégias de controle da LV no Brasil, o cão segue como principal reservatório doméstico, tendo inegável papel na permanência da endemia urbana (ASHFORD, 1996; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; HARHAY et al., 2011).

A doença se caracteriza por afetar principalmente populações caninas, em regiões com piores indicadores socioeconômicos (CAIAFFA et al., 2005; COURA-VITAL et al., 2011; DE ARAÚJO et al., 2013). É provável que muitos destes animais apresentem situações nutricionais e de saúde débeis, e condições ambientais que os predispõe a outras doenças, principalmente ecto e endoparasitárias. Embora a prevalência da coinfeção por *Leishmania infantum* e endo/ectoparasitos não tenha sido adequadamente avaliada, podemos supor não ser incomum encontrarmos cães infectados com este tripanosomatídeo e que também apresentem infestação por carrapatos e/ou helmintos. O papel destas coinfeções na imunidade do cão e na epidemiologia da doença são, portanto, desconhecidas.

2 Revisão de literatura

2.1 Biologia de *Leishmania* spp.

Parasitas do gênero *Leishmania* são intracelulares, habitando o interior de células do sistema fagocítico mononuclear. Possuem um ciclo de vida heteroxeno, precisando de dois hospedeiros para completar o ciclo biológico: um vetor flebotomíneo fêmea e um hospedeiro mamífero. Flebotomíneos se infectam ao se alimentar em um hospedeiro mamífero infectado. Com o repasto sanguíneo-tissular, são ingeridas formas amastigotas imóveis presentes no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos teciduais (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

No intestino do inseto, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas pró-cíclicas, formas móveis, lentas e pequenas, com pequeno flagelo anterior e que se reproduzem por um processo de divisão binária (KAMHAWI, 2006). Estas formas são confinadas no intestino no flebotomíneos pela matriz peritrófica, uma película de quitina, proteínas e proteoglicanas secretados pelo epitélio intestinal do inseto para promover a digestão do alimento ingerido (SECUNDINO et al., 2005).

Após 2 a 3 dias da ingestão do repasto sanguíneo a matriz peritrófica se rompe, liberando formas flageladas longas e delgadas de *Leishmania*, chamadas de nectomonadas. As formas nectomonadas dão origem às formas leptomonadas, curtas e delgadas, que se multiplicam e se espalham por todo o intestino médio e anterior do flebotomíneos entre o quarto e o sétimo dia após a alimentação (KAMHAWI, 2006). Cinco dias após a alimentação do vetor, as formas haptomonadas de flagelo e corpo curto podem ser encontradas aderidas à válvula estomodeal do inseto, o que acredita-se, promove uma degeneração desta válvula permitindo a passagem das formas metacíclicas quando da alimentação do flebotomíneos (KAMHAWI, 2006).

As promastigotas metacíclicas são as formas infectantes, menores, com um longo flagelo e com maior motilidade que as pró-cíclicas. São encontradas no intestino anterior e podem ser regurgitadas no local da picada quando ocorre um novo repasto sanguíneo-tissular (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; KAMHAWI, 2006). Apresentam inúmeras adaptações das moléculas de membrana que as diferem das outras formas de *Leishmania* e propiciam sua sobrevivência no hospedeiro vertebrado e aumentam sua infectividade (GREGORY; OLIVIER,

2005). Promastigotas metacíclicas são, por exemplo, mais resistentes à lise pelo complemento. Esta maior resistência, se acredita, é devido à cadeias de lipofosfoglicano (LPG) de membrana mais longas presentes em metacíclicas (PUENTES et al., 1989). Além do LPG, o glicocálix que reveste as promastigotas é composto por Glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) e diversas glicoproteínas, que o tornam mais espesso nas formas metacíclicas, mas que é discreto ou muito reduzido, respectivamente nas promastigotas pró-cíclicas e amastigotas (PIMENTA; SARAIVA; SACKS, 1991). Além disso a metaloprotease de superfície gp63, interfere na clivagem de C3 impedindo a formação da C5 convertase, inibindo assim a lise mediada pelo complemento e favorecendo a opsonização dos parasitos e sua internalização (BRITTINGHAM et al., 1995).

Promastigotas metacíclicas podem ainda secretar uma substância viscosa conhecida como gel secretório de promastigotas (PSG), que no intestino anterior do vetor formam um tampão adesivo que obstrui a luz intestinal e que, acredita-se, bloqueia a válvula estomodeal induzindo o regurgitamento do conteúdo intestinal do vetor contendo as formas infectantes do parasito (ROGERS et al., 2010). Um dos principais componentes deste PSG são moléculas de proteofosfoglicanos filamentosos (fPPG), reconhecidamente um fator de virulência de *Leishmania*, uma vez que, juntamente com a saliva do inseto, promovem um aumento das lesões na pele provocadas por algumas espécies de *Leishmania* (ROGERS et al., 2004; ROGERS; BATES, 2007; TITUS; RIBEIRO, 1988).

No hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas inoculadas no tecido são fagocitadas por macrófagos onde se diferenciam em amastigotas, formas pequenas, arredondadas e sem flagelo, dando sequência ao ciclo biológico (GREGORY; OLIVIER, 2005). Somente as formas amastigotas são encontradas no hospedeiro mamífero, onde parasitam células do sistema monocítico fagocitário.

2.2 A infecção do hospedeiro vertebrado

Inúmeros fatores se associam para determinar a manifestação das formas clínicas da leishmaniose. O desenvolvimento da doença envolve aspectos como espécie ou cepa de *Leishmania* e sua virulência, *background* genético de susceptibilidade ou resistência do hospedeiro vertebrado bem como sua resposta imune e as interações destes com o vetor. A interação entre estes fatores é responsável pelo desenvolvimento das diversas apresentações

clínicas da doença (ALEXANDER; BRYSON, 2005; SCOTT, 2003; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

Durante as etapas iniciais da infecção, a primeira linha de defesa da imunidade inata são as proteínas do complemento presentes na “poça de sangue” e tecido da picada do flebotômíneo. No entanto, promastigotas metacíclicas são mais resistentes à lise mediada pelo complemento. Uma metaloprotease de membrana, a gp63, é capaz de clivar a proteína C3 do complemento em C3c e C3bi, uma forma inativa da proteína capaz de opsonizar os parasitos e promover sua fagocitose pelos macrófagos através da ligação com o receptor de complemento tipo 3 (CR3) (BRITTINGHAM et al., 1995). Este receptor é uma das principais vias de fagocitose na infecção natural e promove rápida fagocitose do parasito. Na ausência de complemento a infecção é mais demorada e menos eficiente (MOSSER; EDELSON, 1985). A presença da cobertura de LPG, uma densa camada de longas cadeias de LPG na membrana celular de promastigotas metacíclicas, também atua minimizando os efeitos da lise mediada pelo complemento. Promastigotas *lpg1^{-/-}*, que carecem de uma enzima essencial na síntese de LPGs, são mais sensíveis à lise pelo complemento e apresentam virulência reduzida nos modelos murinos de infecção (SPÄTH et al., 2003).

Evidências experimentais mostraram que nos momentos iniciais após à inoculação das promastigotas metacíclicas um infiltrado inflamatório composto por neutrófilos é recrutado para o local da infecção (PETERS et al., 2008). O papel dos neutrófilos na infecção é controverso e dependente da espécie de *Leishmania* em questão e do *background* genético do hospedeiro podendo auxiliar no estabelecimento da infecção ou na morte do parasito. Recentemente estes aspectos foram revisados por outros (SCOTT; NOVAIS, 2016). Neutrófilos são capazes de fagocitar as formas metacíclicas que em poucas horas perdem seu flagelo e se transformam em amastigotas. Neste ponto, neutrófilos podem albergar o parasito disponibilizando a seguir as formas amastigotas para a onda de macrófagos e células dendríticas recrutados para o tecido nas horas subsequentes à infecção (PETERS et al., 2008). Evidências no modelo de infecção com *Leishmania major* em camundongos C57BL/6, evidenciaram que a quimiocina CCL3, secretada por neutrófilos nos momentos iniciais da infecção, é uma forte indutora da migração de células dendríticas para a pele de camundongos infectados (CHARMOY et al., 2010).

Além dos neutrófilos outras células são também recrutadas para o local de infecção. Plaquetas ativadas após a lesão vascular devido à picada do flebotomíneo, podem atrair uma população de monócitos efetores capazes de matar *Leishmania* (GONCALVES et al., 2011). Uma subpopulação de monócitos inflamatórios migra para os sítios de infecção na pele onde auxiliam no controle do parasito pela produção de radicais livres de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Trabalho recente publicado por GLENNIE *et al.* (2017) demonstrou também a importante participação dos monócitos no controle da infecção tardia, após ativação de linfócitos TCD4⁺ de memória, produtores de IFN- γ , presentes no local da infecção. (GLENNIE et al., 2017). Monócitos humanos ativados por IFN- γ podem secretar radicais livres de oxigênio e são capazes de matar *Leishmania braziliensis in vitro* (NOVAIS et al., 2014). O papel dos monócitos nos momentos iniciais da infecção ainda está por ser totalmente desvendado, mas evidências apontam no sentido de que são células importantes no controle da leishmaniose.

Eosinófilos, por outro lado, são absolutamente negligenciados nos estudos acerca da infecção natural por espécies de *Leishmania*. Há fortes evidências da presença de eosinófilos nos momentos iniciais da infecção. De fato, estudos mostraram que, em camundongos C57BL/6 previamente sensibilizados com picadas ou glândula salivar de flebotomíneos, os eosinófilos eram a maior população de células presentes no sítio da picada (BELKAID et al., 2000a). Por outro lado, em camundongos não sensibilizados essa população era grandemente excedida pela de neutrófilos, observação corroborada por outros (CHARMOY et al., 2010; PETERS et al., 2008). Eosinófilos também foram substancialmente observados na pele de cães previamente expostos à picadas de flebotomíneos em um ensaio experimental e sua migração parece ser elicitada por determinados componentes da saliva de flebotomíneos (COLLIN et al., 2009). Componentes salivares aparentemente também podem promover eosinofilia transitória em cães quando inoculada saliva de *Lutzomyia longipalpis* por via intradérmica (PARANHOS et al., 1993).

Os aspectos da imunidade inata no contexto da infecção por *Leishmania* não são completamente compreendidos. No entanto, um grande esforço foi realizado nas últimas décadas na compreensão dos aspectos da imunidade adquirida contra este parasito. Como foco central destes estudos encontra-se o papel de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (T_H) na regulação da susceptibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania*, em especial *L. major*.

Modelos experimentais murinos têm sido utilizados para melhor compreensão dos fatores

determinantes das manifestações clínicas da doença. A infecção de camundongos das linhagens BALB/c com *L. major* leva ao estabelecimento de uma resposta do tipo T_H2 (REINER; LOCKSLEY, 1995; SCOTT et al., 1988). Esta resposta caracteriza-se por um predomínio da produção local de citocinas como IL-10 e IL-4, que atuam nos macrófagos inibindo a síntese de óxido nítrico e induzindo, em contrapartida, a síntese de poliaminas, favorecendo a multiplicação do parasito e o desenvolvimento da doença (INIESTA et al., 2002; KROPF, 2005). Entretanto, camundongos C57BL/6 infectados com o mesmo parasito não desenvolvem lesões graves em função de apresentarem uma resposta celular protetora do tipo T_H1, caracterizada pela produção de IFN- γ e TNF- α . Este perfil de citocinas se relaciona com a resistência à infecção pela sua capacidade de ativar macrófagos potencializando sua atividade microbicida determinada pela expressão da óxido nítrico sintase 2 (iNOS) e conseqüentemente a síntese de óxido nítrico (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; WEI et al., 1995).

O perfil de citocinas presente nos tecidos é principalmente produzido por subpopulações de linfócitos T auxiliares. Foi demonstrado que linfócitos T_H1 produzem citocinas como TNF- α e IFN- γ , que induzem mecanismos efetores em macrófagos que culminam com a eliminação do parasito e resolução das lesões. Por outro lado, a ausência da resposta do tipo I é associada ao perfil de susceptibilidade. Um perfil de citocinas produzidas por linfócitos do tipo T_H2, com destaque para IL-4 e IL-10, é capaz de suprimir os mecanismos efetores da resposta T_H1, inibindo os mecanismos microbicidas de macrófagos, levando a uma proliferação do parasito e ao desenvolvimento de lesões (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). O chamado “paradigma T_H1/T_H2”, norteou os caminhos da imunologia das leishmanioses por muitos anos, e embora seja um modelo que explica satisfatoriamente a imunidade adquirida contra este parasito, ele não pode ser universalmente aplicado (ALEXANDER; BRYSON, 2005).

O modelo T_H1/T_H2, quando observado de forma simplista, não explica os eventos de resistência e susceptibilidade para outros modelos de infecção. Por exemplo, camundongos C57BL/10, naturalmente resistentes a *L. major*, são incapazes de resolver a infecção quando infectados com *L. amazonensis*, sem, no entanto, produzirem altos níveis de IL-4 nos estágios tardios da infecção (AFONSO; SCOTT, 1993). Ainda, o desenvolvimento de lesões cutâneas em humanos infectados com *L. braziliensis* se relaciona com altos níveis de citocinas do tipo 1, ao passo que pacientes com infecções subclínicas apresentam baixos níveis destas citocinas (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; FOLLADOR et al., 2002). Evidências recentes apontam células T

citotóxicas como principais moduladores das lesões observadas em pacientes com leishmaniose tegumentar (NOVAIS et al., 2013; SCOTT; NOVAIS, 2016). Outros tipos celulares recentemente descobertos podem atuar no curso da doença, mas mais estudos são necessários para tornar claro o seu papel (GOLLOB et al., 2008). Evidências de novas populações celulares atuando ativamente no curso da leishmaniose têm sido frequentemente relatadas, e são de grande importância para a maior compreensão desta doença, adicionando camadas de complexidade ao modelo anterior de resposta T_H1/T_H2 .

2.3 Leishmaniose visceral canina

A leishmaniose visceral no cão é uma doença multisistêmica que se caracteriza pela presença de sinais clínicos inespecíficos. A maior parte dos animais quando sintomáticos apresentam baixo escore corporal, perda de peso, anorexia, prostração, linfadenomegalia e dermatopatias (BANETH et al., 2008). Cães sintomáticos apresentam alta carga parasitária em órgãos como o fígado, baço e linfonodos, mas especialmente na pele, o que o condiciona a ser um reservatório epidemiológico importante (ASHFORD, 1996; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Cães assintomáticos são comuns no ambiente e se caracterizam por apresentar poucos ou nenhum sinal clínico da doença, porém com carga parasitária e sorologia variável (BANETH et al., 2008; REIS et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Os aspectos imunológicos da leishmaniose visceral canina são controversos e o modelo clássico T_H1/T_H2 não explica satisfatoriamente os fenômenos de resistência e susceptibilidade nos cães, uma vez que não há uma polarização da resposta como ocorre no modelo murino (BANETH et al., 2008).

Cães naturalmente infectados apresentam maior expressão de $IFN\gamma$ na medula, linfonodos e no baço, independente da apresentação de sinais clínicos (ALVES et al., 2009; CORREA et al., 2007; LAGE et al., 2007; QUINNELL et al., 2001). Aparentemente, a produção de $IFN\gamma$ nestes tecidos correlacionou, em maior ou menor grau, com um perfil de resistência, sendo mais elevado em animais assintomáticos. Este achado também foi corroborado por outros que observaram uma maior produção de $IFN\gamma$ em células monocíticas periféricas (PBMC) de animais assintomáticos quando estimuladas com diferentes antígenos (BOGGIATTO et al., 2010; CHAMIZO; MORENO; ALVAR, 2005). Por outro lado, há maior produção de IL-10

pelas células do baço, linfonodos e PBMC de cães sintomáticos (ALVES et al., 2009; BOGGIATTO et al., 2010; LAGE et al., 2007).

Fortes evidências apontam no sentido de que a resistência é mediada pela atividade de células T, uma vez que em animais assintomáticos estas células respondem a estímulos específicos se replicando e produzindo citocinas de ambos os perfis, T_H1 ou T_H2 (BOGGIATTO et al., 2010; CABRAL; O'GRADY; ALEXANDER, 1992). Aparentemente há uma correlação positiva entre a frequência de linfócitos T $CD8^+$ e a ausência de sinais clínicos da doença em cães (REIS et al., 2009), mas os mecanismos que permeiam essa correlação ainda não foram demonstrados. Animais sintomáticos por outro lado apresentam diminuição do total de linfócitos T que se tornam irresponsivos a estímulos *in vitro*, um importante marcador do desenvolvimento da doença (BOGGIATTO et al., 2010; DE ALMEIDA LEAL et al., 2014; PINELLI et al., 1994). A exaustão de células T pode ser atribuída a um aumento na expressão de moléculas inibitórias, em especial a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) (ESCH et al., 2013). Por fim, é observando um aumento do infiltrado mononuclear e da carga parasitária na pele de animais sintomáticos. A análise da expressão de quimiocinas revelou uma correlação positiva com a expressão de CCL2, CCL4, CCL5, CCL21 e CXCL8, e uma correlação negativa entre carga parasitária e expressão de CCL24 (MENEZES-SOUZA et al., 2012).

Uma importante característica da progressão da doença são os altos títulos de anticorpos encontrados em animais sintomáticos, uma condição conhecida como gamopatia policlonal (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). A chamada gamopatia policlonal é um aumento dos níveis séricos de imunoglobulinas observada em algumas doenças infecciosas e mielomas (GEIGY et al., 2013). Cães sintomáticos apresentam elevados níveis de anticorpos de diversos isotipos, em especial IgG (REIS et al., 2006). Os níveis das subclasses de IgG caninas IgG1 e IgG2 foram estudados extensivamente na tentativa de estabelecer uma correlação entre os níveis séricos da subclasse e o desfecho clínico da infecção. No entanto estes estudos apresentaram resultados frequentemente conflitantes, possivelmente devido à falta de especificidade dos reagentes comerciais (DAY, 2007). A gamopatia policlonal crônica é incriminada como sendo a causa da deposição de imunocomplexos que cursam com vasculite em diversos órgãos, levando animais com o tempo à insuficiência renal crônica (BANETH et al., 2008; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014; LOPEZ et al., 1996).

Em cães sintomáticos, a exaustão dos linfócitos T nos órgãos linfoides torna-se falsamente compensada pela proliferação e aumento da atividade das células B. Esta atividade, juntamente com a atividade de plasmócitos, histiócitos e macrófagos, explica a linfadenomegalia generalizada, esplenomegalia e hiperglobulinemia, que marcam a evolução clínica dessa doença (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

Embora os mecanismos que determinam a resistência e susceptibilidade de cães ainda não estejam completamente compreendidos, o componente genético é certamente um potencial determinante. Dois genes já foram identificados como conferindo susceptibilidade em cães (ALTET et al., 2002; QUINNELL et al., 2003). Embora a predisposição genética tenha sua validade e importância, fatores ambientais como nutrição, exposição aos flebotomíneos e comorbidades podem influenciar a susceptibilidade dos animais (BANETH et al., 2008). E estudos neste sentido são raros na literatura relacionada à leishmaniose.

2.4 Comorbidades e o efeito da imunomodulação por parasitos

O predomínio da resposta do tipo T_H2 é comumente relatado em algumas helmintíases e ectoparasitoses. Nestas infestações parasitárias, a resposta humoral é caracterizada pela produção aumentada de IgE, eosinofilia e mastocitose, alterações consideradas desejáveis para o controle da infestação (COLLIN et al., 2009; SCHOELER; MANWEILER; WIKEL, 1999; WAMBRE; JAMES; KWOK, 2012; WIKEL, 2013; WIKEL; ALARCON-CHAIDEZ, 2001).

Helmintos são capazes de modular a resposta imune em humanos alterando a apresentação clínica de doenças como asma e síndrome de Cröhn (KITAGAKI et al., 2006; SUMMERS, 2005). Este efeito pode estar diretamente ligado à habilidade de alguns helmintos em induzir a secreção de citocinas regulatórias, como a IL-10, promovendo um predomínio da resposta T_H2 ou a expansão da população de linfócitos T regulatórios (MAIZELS, 2005).

Helmintíases podem influenciar tanto na evolução clínica quanto na resposta imunológica de pacientes com LT. Um estudo realizado por O'NEAL et al, (2007) demonstrou que pacientes coinfectados com *Leishmania braziliensis* e helmintos levam mais tempo para se curar do que pacientes com LC sem helmintos. Em um período de 90 dias, a cura foi obtida por 70% dos pacientes coinfectados e 92% dos pacientes livres de helmintos. O mesmo estudo demonstrou que pacientes coinfectados apresentaram um predomínio da resposta T_H2 , caracterizada por

níveis de IgE e IL-5 elevados quando comparados com pacientes livres de helmintos (O'NEAL et al., 2007). Um estudo mais recente ainda associa o desenvolvimento da forma mucosa da leishmaniose com a presença de helmintos intestinais (AZEREDO-COUTINHO et al., 2016).

RODRIGUEZ-SOSA et al. (2006) demonstraram que a coinfeção entre *L. major* ou *L. mexicana* com *Taenia crassiceps*, produziu lesões maiores e favoreceu o parasitismo, com base nos valores da carga parasitária observados nos camundongos coinfectados. Foi observado ainda um aumento da produção de IL-4 em culturas de linfonodos de camundongos BALB/c coinfectados, e a maior indução de macrófagos alternativamente ativados, a qual foi relacionada com o favorecimento da infecção (RODRIGUEZ-SOSA et al., 2006).

Da mesma forma camundongos C57BL/6 previamente infectados com *Schistosoma mansoni* tiveram um atraso na resolução das lesões cutâneas provocadas por *L. major*. Foi observada uma redução na produção de IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico em culturas de células de linfonodos poplíteos, além da produção de altos níveis de IL-4 quatro semanas após a infecção (LA FLAMME; SCOTT; PEARCE, 2002).

Ectoparasitoses são muito comuns em cães. Dentre as diversas ectoparasitoses, destacam-se os carrapatos como os mais significantes vetores artrópodes em animais (HEUKELBACH et al., 2012). Estes aracnídeos podem evadir a resposta imune de hospedeiros mamíferos para permanecer fixado por longos períodos de tempo se alimentando na pele. Há evidências de que a modulação da resposta imune do hospedeiro pelo carrapato é um fator chave para a transmissão de patógenos (WIKEL; ALARCON-CHAIDEZ, 2001).

A infestação por carrapatos pode produzir um ambiente de citocinas do tipo T_H2. Extrato de glândula salivar de *Dermacentor andersoni* foi capaz de suprimir a produção de citocinas T_H1 em camundongos (RAMACHANDRA; WIKEL, 1992), enquanto um predomínio de resposta T_H2 foi observada em camundongos C3H/HeN infestados com *Rhipicephalus sanguineus* (FERREIRA; SILVA, 1999). Além disso, estudos prévios demonstraram que a infestação por ninfas de *Ixodes scapularis* foi capaz de modular a resposta imune de camundongos BALB/c e C3H/HeN, suprimindo significativamente os níveis de IL-2 e IFN- γ e aumentando os níveis de IL-4 e IL10 em cultura de esplenócitos (SCHOELER; MANWEILER; WIKEL, 1999).

R. sanguineus (Latreille,1806) é a espécie de carrapato mais comum em canídeos, sendo encontrado por todo o mundo (DANTAS-TORRES, 2008). Apesar da sua prevalência em cães, estes carrapatos podem parasitar diversos animais, selvagens ou domésticos, inclusive humanos. São vetores de importantes patógenos como *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, e há indícios de que esse carrapato possa transmitir mecanicamente *Leishmania infantum* (DANTAS-TORRES, 2008, 2011; DANTAS-TORRES et al., 2010).

Cães e camundongos C3H/HeJ infestados por *R. sanguineus* apresentam um distúrbio da migração celular para os sítios da picada e são incapazes de produzir uma resposta de hipersensibilidade tardia à saliva deste parasito (FERREIRA et al., 2003). De fato, cães infestados desenvolvem uma reação de hipersensibilidade imediata, com intensa produção de IgE total (SZABÓ et al., 2003). Além disso, foram encontradas altas concentrações de adenosina na saliva deste carrapato, e sua atividade imunorregulatória com a indução de grandes quantidades de IL-10 foi demonstrada previamente (OLIVEIRA et al., 2011).

2.5 Justificativa

Cães infectados com *L. infantum* apresentam uma resposta imune mista com citocinas comuns à resposta T_H1 e T_H2 . A doença clínica no cão cursa com um aumento da resposta humoral, com proliferação de linfócitos B, e produção de imunoglobulinas, características compatíveis com a resposta T_H2 . Além disso, a IL-10, altamente produzida por animais sintomáticos, é capaz de inibir a resposta celular efetora contra *Leishmania* mediante a inativação de macrófagos e da sua produção de óxido nítrico, considerada uma das principais vias de eliminação do parasito. Por outro lado, sabe-se que infestações maciças por helmintos ou carrapatos são responsáveis por modular a resposta imune do hospedeiro, promovendo um predomínio da resposta humoral, com produção de citocinas como IL-5, IL-13, IL-10 e IL-4, aumento nos níveis séricos de imunoglobulinas e inibição das respostas imune celular e da hipersensibilidade tardia.

Estudos de coinfeção com *Leishmania* tem se concentrado nas diferentes manifestações fenotípicas entre os grupos, na avaliação dos perfis de citocinas e na avaliação da carga parasitária dos mesmos. No entanto, poucos estudos avaliaram as alterações dos tipos celulares, a expressão de quimiocinas nos tecidos parasitados e suas reais influências no comportamento clínico e desenvolvimento da doença, principalmente em cães.

Não se sabe por exemplo o que determina um padrão de resistência ou suscetibilidade em cães ou mesmo no homem. Sabe-se através de estudos de imunologia básica, que os estágios iniciais da infecção podem ser determinantes na definição de um animal resistente ou suscetível. A presença de IL-4 ou IL-12 no momento da apresentação antigênica, é fundamental no direcionamento da resposta imune adaptativa, que irá controlar ou não o parasitismo, e, por conseguinte, a doença (SCOTT et al., 1996).

Apesar da prevalência de endo e ectoparasitos em cães serem capazes de induzir condições que representam um ambiente mais propício para o desenvolvimento de uma resposta imunológica incompetente há poucos estudos associando a presença desses parasitos e a infecção por *L. infantum* em cães. Portanto, considerando que coinfeções são comuns e ocorrem frequentemente em condições naturais, hipotetizamos que interações com esses parasitos seriam capazes de modular a resposta imune do hospedeiro, tornando-o mais susceptível ou resistente, ou mesmo influenciando o curso do processo patológico.

Evidências apontam fortemente que as condições de saúde e nutrição de animais naturalmente infectados, e as possíveis coinfeções, possam ser determinantes no direcionamento da doença. Isso se revela ainda mais notório, quando se tenta reproduzir a doença experimentalmente em cães, onde dificilmente há o desenvolvimento de uma doença clinicamente típica de cães naturalmente infectados. Provavelmente porque os cães, quando infectados em condições naturais, encontram-se em situação imunológica que os coloca em estado de suscetibilidade frente à infecção pela *Leishmania*. Isto posto, fica evidente que coinfeções podem interferir no curso da doença.

Didaticamente os objetivos, resultados e discussão são aqui tratados em três capítulos. O trabalho principal tem como objetivo ser uma prova de conceito demonstrando o efeito da imunomodulação promovida pela infestação por carrapatos no curso da leishmaniose experimental. Avaliamos alguns aspectos imunológicos da coinfeção entre carrapatos e *Leishmania major* no modelo murino.

Adicionalmente ao trabalho principal, um breve capítulo relata a coinfeção experimental entre *Ascaris lumbricoides* e *Leishmania major* também no modelo murino. Por fim, um terceiro capítulo descreve observações sobre o papel dos eosinófilos, importante célula envolvida nas

respostas imunes contra ecto e endoparasitos, na infecção crônica por *Leishmania* spp. utilizando uma linhagem de camundongos que não possuem esse tipo celular.

3 Material e Métodos

3.1 Animais e parasitos

Os camundongos BALB/c e C57BL/6 utilizados neste estudo foram fornecidos pelo CEBIO (ICB-UFMG). Os animais foram previamente vermifugados e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia em estantes ventiladas, com água e comida *ad libitum*. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA, protocolo 336/2013, Anexo 1) e segue rigorosamente as metodologias propostas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Parasitos da espécie *Leishmania major* (MHOM/IL/81/Friedlin) foram cultivados em meio de cultura α -MEM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino, Cultilab), 100U/mL de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina (US Biological, MA, EUA).

Fêmeas adultas de *R. sanguineus* livres de patógenos, foram cedidos pelo laboratório do Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó da Universidade Federal de Uberlândia e criadas no insetário do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, do Departamento de Parasitologia da UFMG, sob supervisão do Prof. Dr. Ricardo Nascimento.

3.2 Isolamento de metacíclicas e infecção

Para a infecção, promastigotas metacíclicas foram isoladas utilizando aglutinina de amendoin (PNA), como previamente descrito (SPÄTH et al., 2003). Para o isolamento foram utilizadas culturas de fase estacionária (5 a 7 dias), submetidas a uma centrifugação de 2200xg por 10 minutos a 4° C. A seguir o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de promastigotas foi ressuspenso em 2mL de PBS estéril contendo 0,5mg de PNA. Após 15 minutos de repouso, a amostra foi centrifugada a 100xg por 5 minutos a 4° C, e o sobrenadante contendo as formas metacíclicas foi coletado, centrifugado a 2200xg por 10 minutos a 4° C. O *pellet* contendo as

formas metacíclicas (pro^{met}) foi então novamente ressuspensa em 30mL de PBS, centrifugado a 2200xg/10min/4°C e novamente ressuspensa em 1mL de PBS estéril. As promastigotas foram então contadas em câmara de Neubauer e sua concentração foi ajustada para 10⁷ promastigotas/mL (10⁵ pro^{met}/inóculo).

3.3 Quantificação da carga parasitária por qPCR

Após eutanásia dos animais, amostras de 25mg de tecido da pata infectada foram coletadas e congeladas a -20° C até o uso. O baço dos animais foi coletado, macerado em triturador de vidro com 2mL de PBS estéril, e posteriormente centrifugado a 100xg por 5 minutos a 4° C. Após, 1mL do sobrenadante foi coletado e centrifugado a 2200xg/10 minutos/4° C. O pellet foi ressuspensa em 200µL de PBS estéril e congelado a -20° C até o uso.

O DNA do tecido da pata e da suspensão de células do baço foi extraído seguindo o protocolo do kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, GmbH & Co., Düren, Alemanha). A seguir a concentração e a qualidade do DNA das amostras foi mensurada no equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Para a reação, as amostras foram diluídas em água livre de nucleases (Thermo Scientific) na concentração de 10ng/µL. A reação foi realizada com 5µL de SYBR green (Applied Biosystems), 0,2µL de cada primer (IDT, CA, EUA), 0,6µL de água livre de nucleases e 4µL (40ng) das amostras. Para produção de uma curva padrão foram realizadas extrações de DNA de suspensões de células contendo quantidades conhecidas de macrófagos peritoneais murinos e/ou promastigotas de *L. major* contadas em câmara de Neubauer.

Para estimar a carga parasitária foram usados iniciadores direcionados à região conservada de minicírculos de kDNA de *Leishmania* spp. (*Forward*: 5'-SSSCCMCTATWTTACAC AACCCC-3' ; *Reverse*: 5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3') e β-Actina de camundongo (*Forward*: 5'- CGCTGGTCGTCGACAACG-3' ; *Reverse*: 5'-CTGACCCATTCCCACCAT-3'). Os valores de Ct obtidos foram interpolados no gráfico de regressão Log-linear das curvas padrão de kDNA e β-Actina e os resultados foram expressos como número de parasitos por 10⁵ células de hospedeiro.

3.4 Produção de macrófagos derivados de medula óssea

Macrófagos derivados de medula-óssea foram produzidos conforme o protocolo descrito por Goncalves and Mosser (2015). Após eutanásia, fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 foram coletados, dissecados e tiveram suas epífises decepadas com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Após, o conteúdo das diáfises era lavado com meio DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino, Cultilab), 100U/mL de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (US Biological, MA, EUA) e acondicionadas em tubos cônicos de polipropileno de 50mL (Cralplast, China). O volume de meio era ajustado para 35mL e o tubo centrifugado a 500xg por 10 minutos a 4° C. A seguir, o sobrenadante era desprezado e as células ressuspendidas em 1mL de meio DMEM completo. Uma alíquota de 20µL foi retirada para a contagem em câmara de Neubauer e para o cálculo da porcentagem de viabilidade celular pela solução de Azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Após a contagem o volume era ajustado para 4×10^6 células/mL e 100µL dessa solução eram distribuídos em placas de petri estéreis (Corning, USA), contendo 10mL de meio de cultura de macrófagos (DMEM completo contendo 20% de meio de cultura de células L-929). As placas eram então incubadas a 37° C em estufa a 5% de CO₂ e umidade de 75% por 10 dias. No terceiro dia de cultura, 5mL de meio de cultura de macrófagos era adicionada às placas. Os macrófagos diferenciados eram usados após 7 a 10 dias de incubação.

3.5 Ensaio de dessensibilização de receptores purinérgicos

Macrófagos derivados de medula-óssea de camundongos C57BL/6 foram obtidos conforme descrito anteriormente. As células foram plaqueadas em placas de 48 poços na concentração de 5×10^5 células por poço. As células foram então incubadas em meio DMEM completo por uma hora à 37° C em estufa a 5% de CO₂ e umidade de 75% para adesão dos macrófagos à placa. Após, as células foram incubadas (dessensibilizadas) com uma solução de N-etilcarboxiamidoadenosina (NECA) na concentração final de 1µM ou 10µM, por 2, 4, 8 ou 12 horas em triplicata. Após cada um dos períodos de dessensibilização, os poços eram lavados com DMEM incompleto e as células eram estimuladas pela adição de uma solução contendo 1µM ou 10µM de NECA e 1µg/mL de LPS na concentração final. Após o estímulo, as células permaneceram por um período de 8 horas à 37° C em estufa a 5% de CO₂ e umidade de 75%. Após esse período o sobrenadante foi retirado para dosagem de IL-10 e TNF-α.

3.6 ELISA para detecção de IgG anti-*Leishmania*

Para avaliação das concentrações de imunoglobulinas específicas, placas de 96 poços (Costar/Corning, NY, EUA) foram sensibilizadas com 50µL/poço de uma solução contendo tampão carbonato de sódio (Na₂CO₃ 15mM, NaHCO₃ 35mM) e 2µg de antígeno solúvel de *Leishmania* por 18 horas a 4°C. Após três etapas de lavagem com uma solução de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST), a placa foi incubada por 2 horas a 25° C com tampão de bloqueio (PBS, BSA 1%). A seguir, a placa foi submetida novamente a três etapas de lavagem, e após, amostras de soro diluídas em tampão diluente (PBS, Tween 20 0,05%, BSA 0,1%) ao título de 1:100 (goat anti mouse IgG1, IgG2a/b/c, IgG3 – Southern Biotech, gentilmente cedidos pelo Prof. Ricardo Fujiwara) foram adicionadas aos poços em duplicata. Após 2 horas de incubação a 25° C a placa foi novamente lavada e os anticorpos secundários, conjugados com HRP e diluídos em tampão diluente ao título de 1:2000, foram adicionados aos poços. Após 2 horas de incubação a 25° C a placa foi novamente lavada e aos poços foi adicionado 50µL da solução de revelação (tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 4,0, ABTS 0,05%, H₂O₂ 0,05%). Após a revelação a reação foi parada com a adição de 50µL de uma solução de SDS 1%. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 415 nm em espectrofotômetro de microplacas (Epoch Biotek, EUA).

3.7 ELISA de captura

Para dosagem das citocinas IL-10 e TNF- α foram utilizados kits comerciais seguindo rigorosamente a metodologia descrita pelo fornecedor (Peprotech, EUA). Brevemente, placas (Costar/Corning, NY, EUA) foram sensibilizadas com anticorpos anti-IL-10 ou anti-TNF- α murinos por 18 horas. As placas foram incubadas para bloqueio utilizando uma solução de PBS-2% de BSA por uma hora e lavadas a seguir. Amostras de soro ou de sobrenadante foram adicionadas utilizando a diluição 1:2 em PBST (PBS, Tween 20 0,05%, BSA 0,1%), incubadas por duas horas à temperatura ambiente, e lavadas a seguir. Um anticorpo anti-IL-10 ou anti-TNF- α , ambos conjugados com HRP, foram adicionados aos poços seguindo a diluição do kit e incubados por 30 minutos. As placas foram reveladas com uma solução de revelação e a reação interrompida com SDS 1%, conforme descrito acima (item 3.6). A absorbância foi medida no comprimento de onda de 415 nm em espectrofotômetro de microplacas (Epoch Biotek, EUA).

Para dosagem de IgE total, as placas foram incubadas com solução (50µl/poço) contendo anticorpo de rato anti-IgE de camundongos 0,5 mg mL⁻¹ (Southern Biotechnology) e diluídos (1:250) em tampão carbonato pH = 9,6 por, no mínimo, 18 horas a 4 °C. O bloqueio foi feito com uma solução de PBS-0,25% m/V caseína por uma hora a temperatura ambiente (200 µl/poço). Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05% V/V Tween-20 por duas vezes. O soro dos animais (50 µL soro) foi incubado por 2 h em temperatura ambiente no escuro. Na seqüência, as placas foram novamente lavadas e realizou-se a incubação com o anticorpo secundário de rato anti IgE de camundongo conjugado com biotina, sendo 50 µL por poço por 1h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas por cinco vezes com solução salina-0,05% V/V Tween-20 e incubadas com estreptavidina ligada a peroxidase (Sigma), 50µL/poço na concentração de 1:10000, por 1 hora em temperatura ambiente; Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo conjugado foi feito através da incubação com 4 mg de OPD, 2 µL de H₂O₂ diluídos em 10 mL de tampão citrato pH 5,0 a 100 µl/poço. A reação foi paralisada pela adição de 20 µL/poço de H₂SO₄ 2N. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 492nm em espectrofotômetro de microplacas (Epoch Biotek, EUA). Os anticorpos para esta metodologia foram gentilmente cedidos pela professora Ana Maria Caetano de Faria do laboratório de imunobiologia do ICB,

3.8 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à distribuição das variáveis utilizando os algoritmos disponíveis no software GraphPad Prism v5.0. Variáveis de distribuição paramétrica foram avaliadas pelos testes *t* de student quando dois grupos eram avaliados ou *oneway* ANOVA, quando mais de dois grupos eram avaliados. Dados com distribuição não paramétrica foram avaliados com o teste de Mann Whitney quando dois grupos e Kruskal Wallis quando mais de dois grupos. O método *Two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni foi utilizado quando mais de duas observações eram avaliadas sobre as mesmas variáveis. Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando P<0,05.

Capítulo I

Coinfecção entre *Leishmania major* e *Rhipicephalus sanguineus*.

4 Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Estudar os aspectos imunológicos celulares e humorais no sangue e em órgãos afetados pela infecção em camundongos BALB/c e C57BL/6 coinfectados com *Rhipicephalus sanguineus* e *Leishmania major*.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar qualitativamente as lesões produzidas na pele e baço de camundongos coinfectados, com base nos tipos celulares e sua prevalência.
- Estimar a carga parasitária de *L. major* na pele e baço de camundongos previamente infestados com teleóginas de *R. sanguineus*.
- Avaliar o perfil humoral de imunoglobulinas específicas anti-*Leishmania*.

5 Delineamento experimental da coinfecção

Para o experimento de coinfecção entre *R. sanguineus* e *L. major*, camundongos fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, das linhagens BALB/c ou C57BL/6, foram divididas em 4 grupos:

- **Grupo Infestado** – Animais previamente infestados com *R. sanguineus* e infectado com 10^5 promastigotas metacíclicas (pro^{met}) na pata caudal direita.
- **Grupo Não Infestado** – Animais infectados com 10^5 pro^{met} na pata caudal direita somente.
- **Grupo Controle** – Infestados com *R. sanguineus* somente.
- **Grupo Naïve** – Não infectados e não infestados.

Para a infestação, os camundongos eram anestesiados com uma dose de 0,15mg de Xilazina e 1,6mg de Cetamina, diluídos em PBS estéril em um volume final de 50µL por via

intraperitoneal. Após a confirmação do plano anestésico, câmaras de alimentação confeccionadas a partir de microtubos de polipropileno de 1,5mL foram coladas no dorso dos camundongos com adesivo de contato (Brascoplast, brascola) 24 horas antes da infestação. Para infestação, em cada câmara foram adicionadas duas fêmeas adultas e um macho. As câmaras foram checadas diariamente e os carrapatos se alimentavam por um período de sete a dez dias (fig. 1).

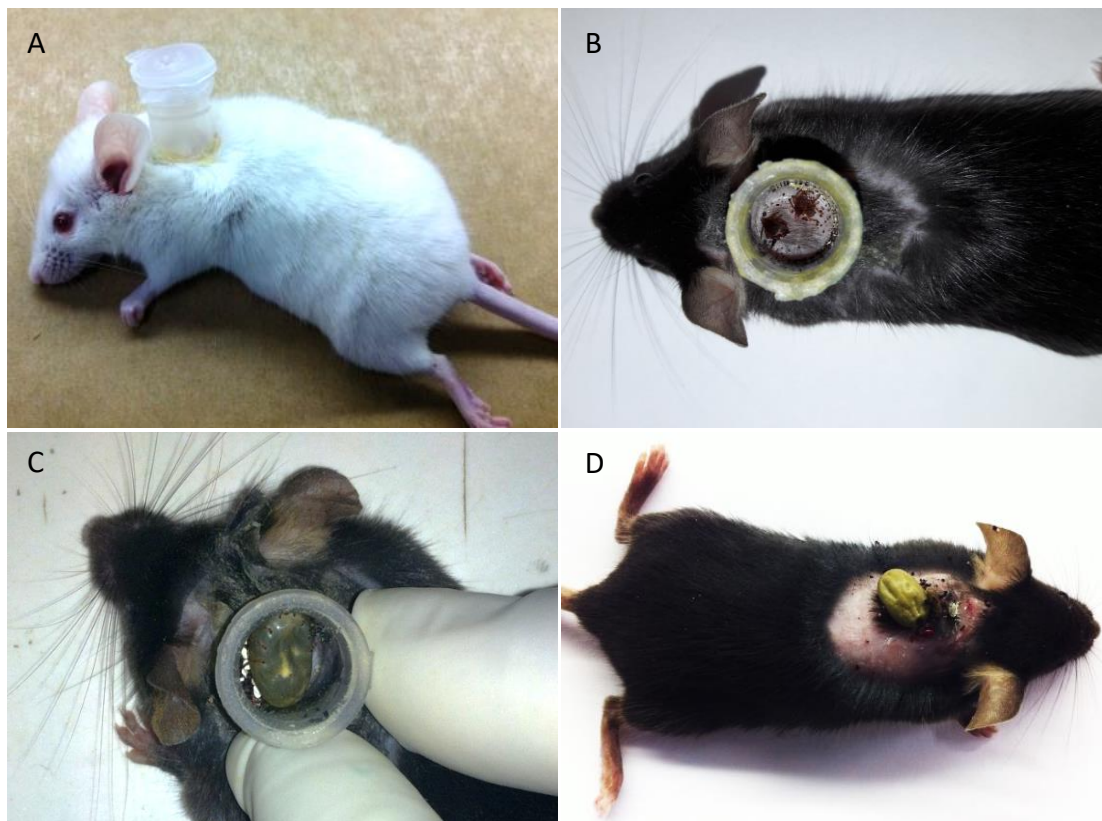


Figura 1 – Aspectos do modelo experimental de infestação por *Rhipicephalus sanguineus* em camundongos: Câmaras de alimentação para carrapatos foram aderidas à pele dos camundongos utilizando os pelos adjacentes. Camundongos C57BL/6 ou BALB/c eram previamente anestesiados para o procedimento (A). Após 24 horas o adesivo estava completamente seco os carrapatos (duas fêmeas e um macho adulto) eram colocados dentro da câmara. Entre 2 a 4 dias os carrapatos se fixavam no hospedeiro iniciando a alimentação (B). O período completo de alimentação dos carrapatos variava entre 7 a 10 dias, período no qual um reforço de adesivo era aplicado para manter a fixação das câmaras. Ao término da alimentação os machos e fêmeas ingurgitadas se desprendiam espontaneamente do hospedeiro (C). Durante o período de alimentação os camundongos retiravam as câmaras com os pelos aderidos formando um alo sem pelos ao redor do local de fixação (D).

A infecção com *L. major* foi realizada após o término da infestação, quando todos os carrapatos se soltavam espontaneamente do hospedeiro. O inóculo continha 10^5 promastigotas metacíclicas em 10 μ l de PBS. Nos grupos controle e naïve foi injetado um volume de 10 μ L de PBS estéril. As patas foram medidas semanalmente com auxílio de um paquímetro (Pantec, SP, Brasil). O crescimento da lesão foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata infectada e a espessura da pata não infectada. Um esquema do desenho experimental é descrito na figura 2.

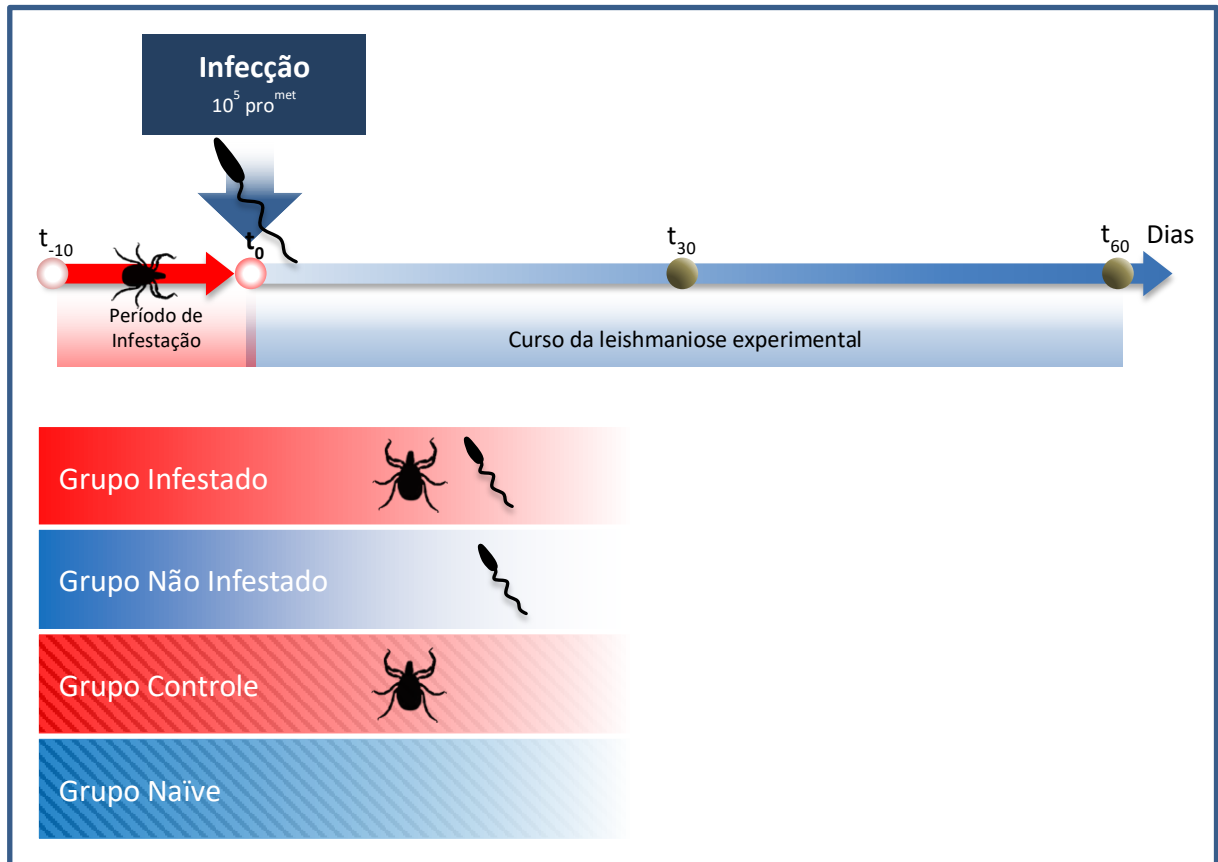


Figura 2 – Desenho experimental: Para o experimento de coinfeção entre *R. sanguineus* e *L. major*, camundongos fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, das linhagens BALB/c ou C57BL/6, foram divididas em 4 grupos: Infestado, Não infestado, Controle e Naïve. A infecção com *Leishmania major* era feita quando as fêmeas ingurgitavam e se desprendiam espontaneamente do hospedeiro, após um período de alimentação de 7 a 10 dias. Após a infecção os camundongos eram acompanhados por um período de até 60 dias para avaliação da lesão na pata e da carga parasitária.

6 Resultados

6.1 Estabelecimento do modelo

Camundongos C57BL/6 previamente infestados com *R. sanguineus* apresentam um menor crescimento da pata quando comparados a camundongos não infestados (fig. 3 - A). Por outro lado, camundongos BALB/c sob as mesmas condições experimentais, apresentaram desenvolvimento semelhante da lesão, e carga parasitária semelhante após oito semanas (fig. 3 - B).

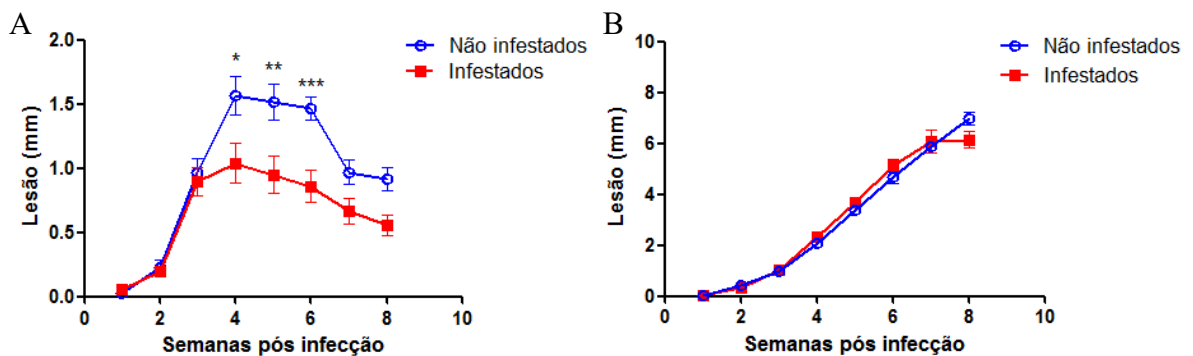


Figura 3 - Curso da infecção em camundongos C57BL/6 e BALB/c infestados com *R. sanguineus*: Camundongos C57BL/6 (A; n=14 a 16) ou BALB/c (B; n=5 a 7) previamente infestados ou não por *R. sanguineus* foram infectados na pata posterior direita com 10^5 pro^{met} de *L. major*. O crescimento da lesão foi medido semanalmente até a oitava semana pós infecção. O eixo y representa a média das diferenças entre a espessura das patas infectadas e não infectadas \pm erro padrão. Análise estatística feita pelo teste *t* de Student onde * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ e *** = $P < 0,001$. Resultados representam a média de um (B) ou três experimentos independentes (A).

Contrapondo o menor crescimento da pata no modelo C57BL/6, o grupo infestado apresentou uma carga parasitária, na pata infectada, semelhante ao grupo não infestado após oito semanas de infecção (fig. 4 - A). Não foi observada diferença entre os grupos infestado e não infestado quando avaliada a carga parasitária nas patas de camundongos BALB/c na oitava semana após a infecção (fig. 4 - B).

A carga parasitária dos grupos estudados no modelo C57BL/6 foi avaliada na quinta semana pós-infecção, no ponto da curva onde foi observada uma diferença significativa entre os tamanhos das patas. A carga parasitária neste ponto foi significativamente maior no baço do grupo infestado com *Rhipicephalus sanguineus* (fig.5 - A). Não houve diferença na carga parasitária no baço entre os grupos na oitava semana pós infecção (fig. 5 - B).

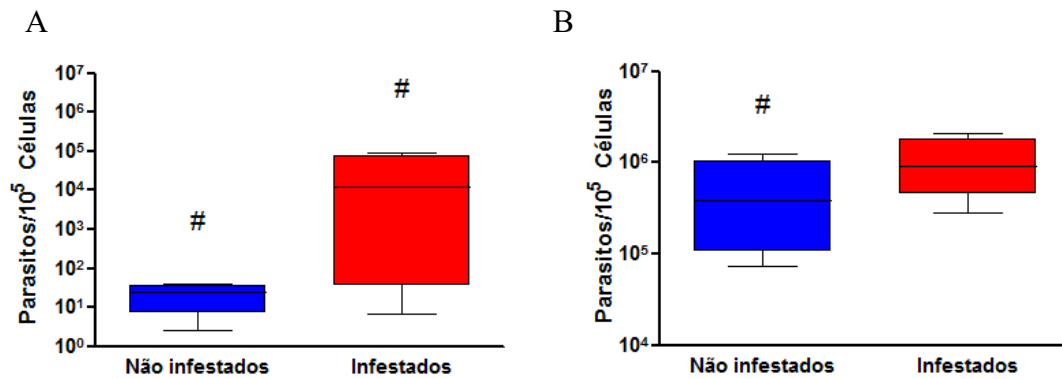


Figura 4 - Carga parasitária: Quantificação da carga parasitária de uma amostra representativa de 25mg de tecido da pata infectada (n=5) na oitava semana pós-infecção em camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B) previamente infestados com *R. sanguineus*. O eixo y representa o número de parasitos por 10⁵ células do hospedeiro inferido por PCR quantitativo. Análise estatística feita pelo teste *t* de Student (A) e Mann-Whitney (B). “#” representa *outliers* detectados pelo teste de Grubbs a um nível de significância de 0,05%. Dados representativos de um experimento.

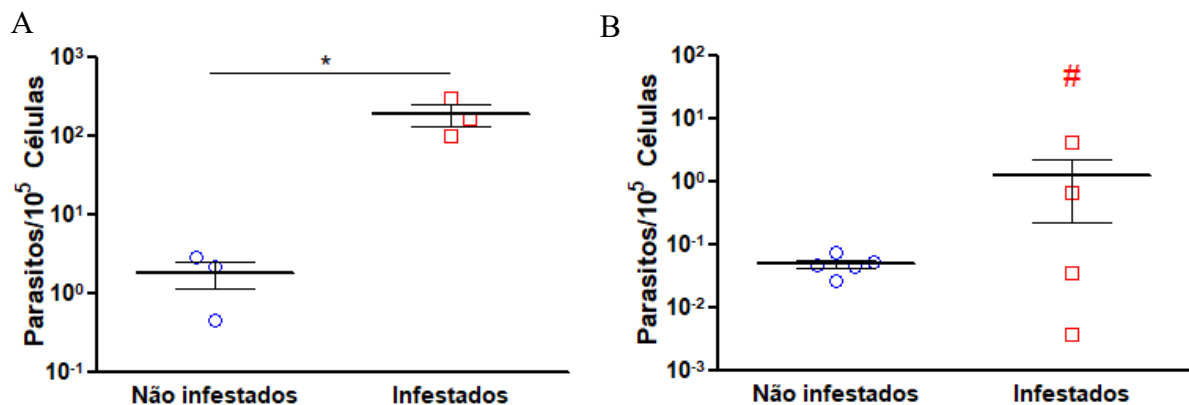


Figura 5 – Parasitismo tecidual no baço na quinta (A) e na oitava (B) semana pós-infecção: Camundongos C57BL/6 previamente infestados ou não infestados por *R. sanguineus* foram infectados na pata posterior direita com 10⁵ pro^{met} de *L. major*. O baço *in totum* (B) foi removido, pesado, macerado e 200µL foram utilizados para a extração de DNA. As amostras foram submetidas ao protocolo de PCR quantitativo. O eixo y representa o número de parasitos por 10⁵ células do hospedeiro. “#” representa *outliers* detectados pelo teste de Grubbs ao nível de significância de 0,05%. Análise estatística feita pelo teste Mann-Whitney. Dados representativos de um experimento (n=3, para 5 semanas e n=5, para 8 semanas).

Considerando os resultados de carga parasitária nos diferentes tempos foi possível observar uma redução da carga parasitária da quinta para a oitava semana em ambos os grupos, tanto no baço quanto na pele (fig. 6).

Em um dos experimentos, o desenvolvimento da lesão nos camundongos C57BL/6 foi acompanhado até a décima primeira semana pós-infecção e observou-se uma redução constante da espessura da pata de ambos os grupos que se desenvolveram de forma semelhante a partir da oitava semana pós-infecção (fig. 7 – A). Contudo, corroborando a tendência observada na

oitava semana, a carga parasitária na décima primeira semana foi significativamente maior no grupo infestado ($P=0,02$; fig. 7 – B).

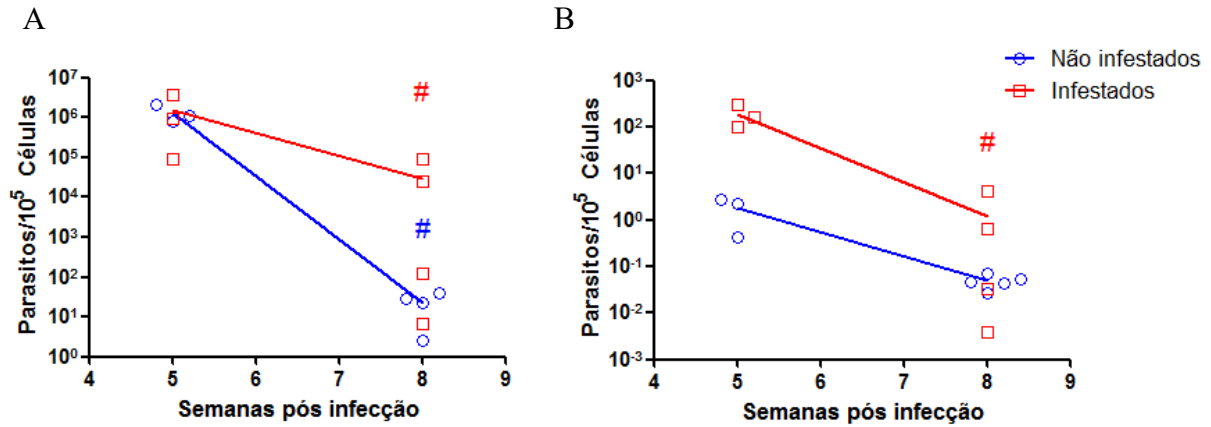


Figura 6 – Cinética do parasitismo tecidual na pata (A) e baço (B): Camundongos C57BL/6 previamente infestados ou não infestados por *R. sanguineus* foram infectados na pata posterior direita com 10^5 pro^{met} de *L. major*. O baço *in totum* (B) foi removido, pesado, macerado e 200 μ L foram utilizados para a extração de DNA. As amostras foram submetidas ao protocolo de PCR quantitativo. O eixo y representa o número de parasitos por 10^5 células do hospedeiro. “#” representa *outliers* detectados pelo teste de Grubbs a um nível de significância de 0,05.

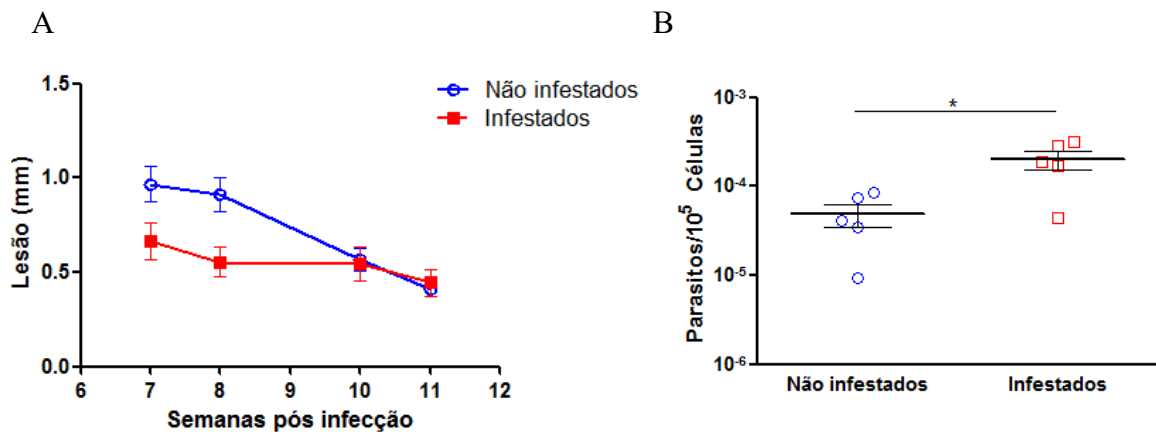


Figura 7 - A: Curso da infecção: Camundongos C57BL/6 (n=5) previamente infestados ou não infestados por *R. sanguineus* foram infectados na pata posterior direita com 10^5 pro^{met} de *L. major*. O crescimento da lesão foi medido semanalmente até a décima primeira semana pós infecção. O eixo y representa a média das diferenças entre a espessura das patas infectadas e não infectadas \pm erro padrão. **B: Carga parasitária:** Quantificação da carga parasitária de uma amostra representativa de 25mg de tecido (n=5). O eixo y representa o número de parasitos por 10^5 células do hospedeiro. Análise estatística feita pelo teste *t* de Student, onde * $P=0,016$.

Com o objetivo de avaliar se havia influência do local do inóculo no fenótipo observado, camundongos C57BL/6 foram infestados com *R. sanguineus* no dorso e infectados com 10^3 promastigotas metacíclicas de *L. major* por via intradérmica na orelha. Neste modelo, não foi possível observar a redução do tamanho da lesão no grupo infestado como observado no modelo de infecção na pata. No entanto, observa-se um atraso no desenvolvimento da lesão da terceira para quarta semana (fig. 8 – A). Quando avaliada a carga parasitária nas orelhas, não foi encontrada diferença estatística significativa (fig. 8 – B).

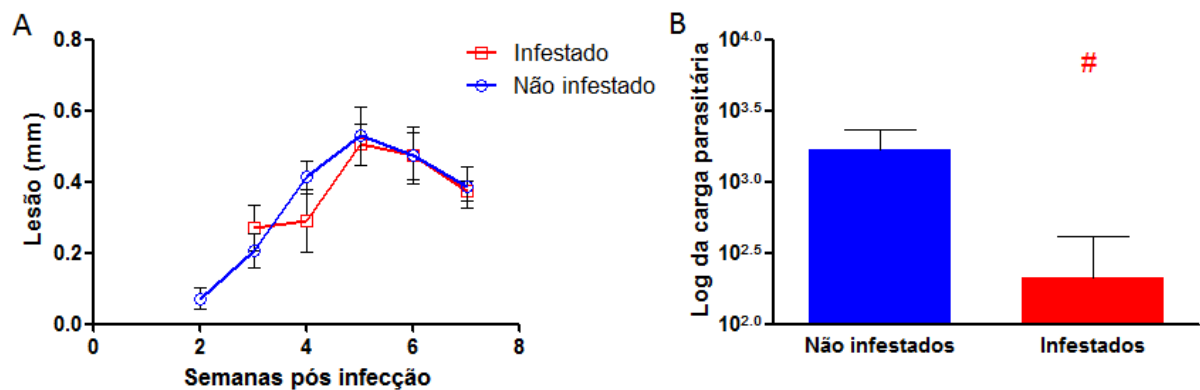


Figura 8 – A: Curso da infecção na orelha: Camundongos C57BL/6 previamente infestados por *R. sanguineus* (n=4) ou não (n=5) foram infectados na orelha direita com 10^3 pro^{met} de *L. major*. O crescimento da lesão foi medido semanalmente até a sétima semana pós infecção. O eixo y representa a média das diferenças entre a espessura das orelhas infectadas e não infectadas \pm erro padrão. Análise estatística feita pelo teste Mann-Whitney. **B: Carga parasitária:** Quantificação da carga parasitária na orelha por diluição limitante na oitava semana após a infecção. O eixo y representa log da última diluição onde foram encontrados parasitos. Análise feita pelo método Mann-Whitney. “#” representa *outliers* detectados pelo teste de Grubbs a um nível de significância de 0,05. Dados representativos de um experimento.

6.2 Resposta imune humoral

A resposta imune humoral foi avaliada na quinta e oitava semana de infecção. A quantificação relativa dos títulos de anticorpos específicos contra *L. major* foi dosada a partir de amostras de soro pelo método ELISA convencional descrito previamente. Camundongos C57BL/6 previamente infestados por *R. sanguineus* apresentaram títulos significativamente menores de IgG total α -*L. major* (fig. 9 – A). O mesmo não foi observado em camundongos BALB/c sob as mesmas condições (fig. 9 – B).

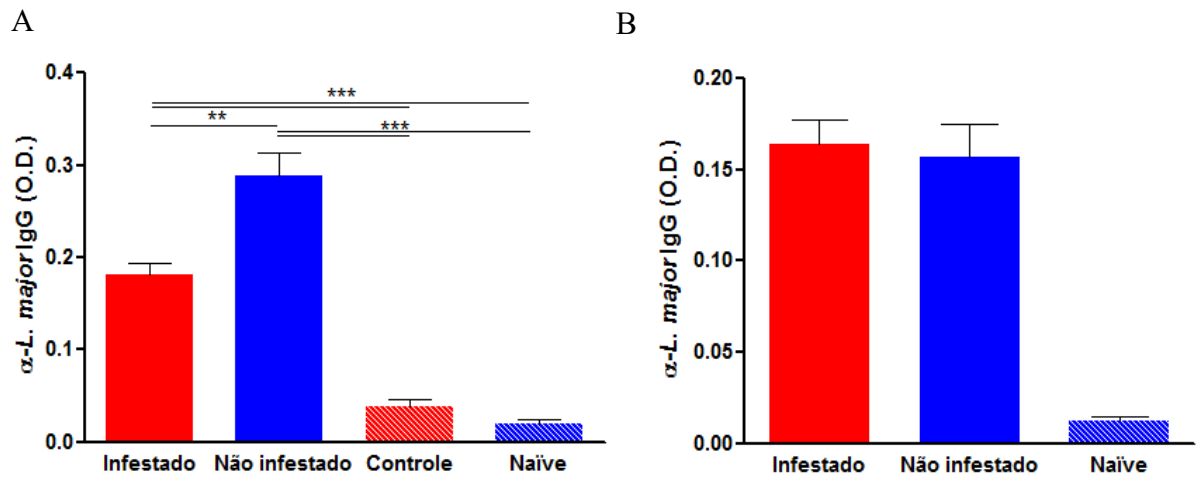


Figura 9 – Títulos de anticorpos IgG total contra antígeno solúvel de *Leishmania major*, na oitava semana de infecção em camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B), infestados ou não por *R. sanguineus*, dosados por ELISA convencional conforme descrito anteriormente. Cada amostra foi dosada em duplicata. O grupo controle consiste em animais infestados e não infectados. O eixo y representa a média dos valores de absorvância \pm erro padrão para cada grupo. Análise estatística feita pelo teste *t* de Student onde **P < 0,01 e ***P < 0,001. Dados representativos de dois experimentos (A) e um experimento (B).

Camundongos C57BL/6 previamente infestados por *R. sanguineus* apresentaram títulos significativamente menores de IgG1 α -*L. major* (fig. 10 – A). Em relação às subclasses de IgG2, foi observado que camundongos C57BL/6 previamente infestados apresentaram títulos de IgG2b muito inferiores àqueles encontrados nos camundongos não infestados, não ocorrendo o mesmo a subclasse IgG2c nesta linhagem (fig. 10 – A).

Por outro lado, nenhuma diferença foi observada nos títulos das subclasses de IgG em camundongos BALB/c, que apresentaram valores de absorvância muito próximos para todas as subclasses (fig. 10 – B). Vale ressaltar que os valores de IgG1 foram substancialmente maiores em camundongos BALB/c que em camundongos C57BL/6 (fig. 11).

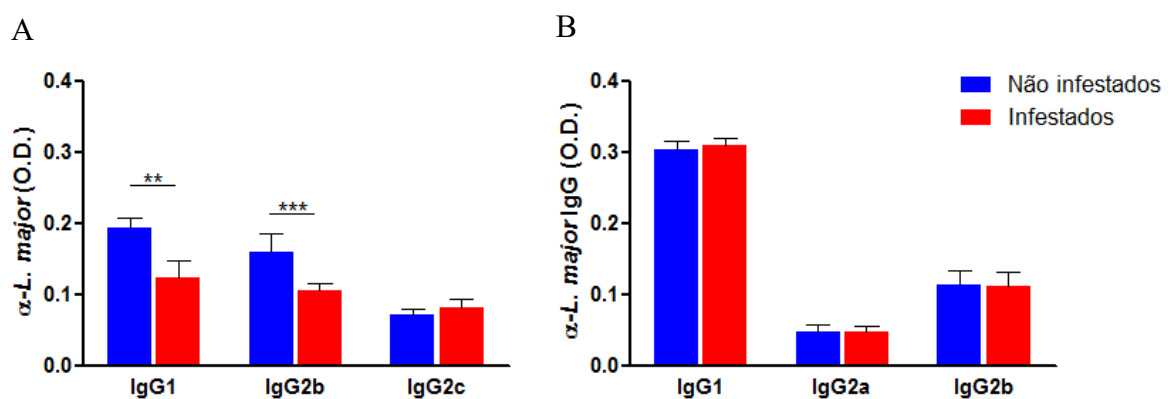


Figura 10 – Títulos das subclasses de anticorpos IgG contra antígeno solúvel de *Leishmania major*, na oitava semana de infecção em camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B), infestados ou não por *R. sanguineus*, dosados por ELISA convencional conforme descrito anteriormente. Cada amostra foi dosada em duplicata. O grupo controle consiste em animais infestados e não infectados. O eixo y representa a média dos valores de absorvância \pm erro padrão para cada grupo. Análise estatística feita pelo teste *t* de Student onde **P < 0,01 e ***P < 0,001. Dados representativos de dois experimentos (A) e um experimento (B).

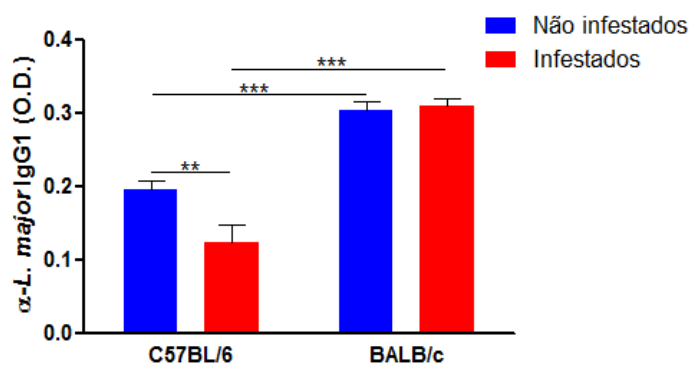


Figura 11 – Títulos das subclasses de anticorpos IgG1 contra antígeno solúvel de *Leishmania major*, em camundongos C57BL/6 e BALB/c, dosados por ELISA convencional conforme descrito anteriormente. Cada amostra foi dosada em duplicata. O grupo controle consiste em animais infestados e não infectados. O eixo y representa a média dos valores de absorbância \pm erro padrão para cada grupo. Análise estatística feita pelo teste *t* de Student onde ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. Dados representativos de um experimento.

Com relação à sorologia dos animais na quinta semana de infecção, pudemos observar que não houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos em nenhuma das subclasses de IgG em camundongos C57BL/6 (fig. 12 – A). No entanto, quando avaliamos a cinética da soroconversão da quinta para a oitava semana, percebemos que esta é menos acentuada em animais previamente infestados, sobretudo para a subclasse IgG2b (fig.12 – C, D e E).

Camundongos BALB/c infectados apresentam títulos mais elevados de IgE total que camundongos C57BL/6 sob as mesmas condições (fig. 13). Interessantemente, camundongos C57BL/6 previamente infestados e infectados com *L. major* apresentaram títulos de IgE total mais elevados que animais não infestados (fig. 13 – A). Ainda, a simples infestação não foi capaz de elevar os títulos de IgE em camundongos controle, isto é, previamente infestados com *R. sanguineus* mas não infectados com *L. major* (fig. 13 – A). Não foi observada diferença entre os grupos infestado e não infestado no que diz respeito a títulos de IgE em camundongos BALB/c. No entanto, ambos os grupos os títulos foram significativamente maiores que em camundongos naïve (fig. 13 – B). Infelizmente não foi possível avaliar os títulos de IgE em camundongos BALB/c do grupo controle.

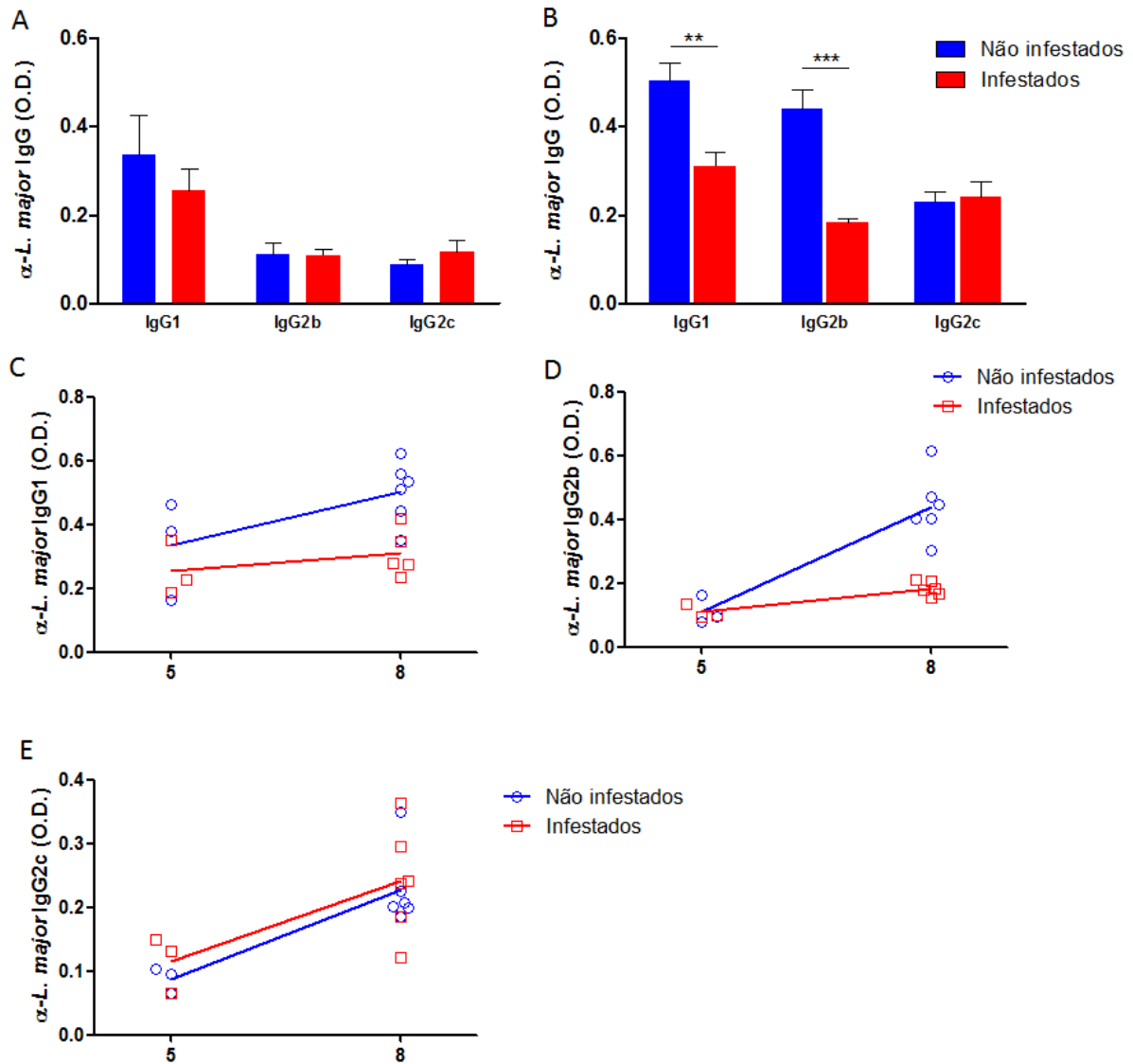


Figura 12 - Títulos de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2 contra antígeno solúvel de *Leishmania major*, em camundongos C57BL/6 com 5 (A) e 8 (B) semanas de infecção. Os títulos foram dosados por ELISA convencional conforme descrito anteriormente. Cada amostra foi dosada em duplicata. O grupo controle consiste em animais infestados e não infestados (dados não mostrados). A cinética da soroconversão da quinta para a oitava semana é mostrada para os isotipos IgG1 (C), IgG2b (D) e IgG2c (E). O eixo y representa a média dos valores de absorbância \pm erro padrão para cada grupo. Análise estatística feita pelo teste *t* de Student, sendo ** = $P < 0,01$ e *** = $P < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos (8 semanas) e um experimento (5 semanas).

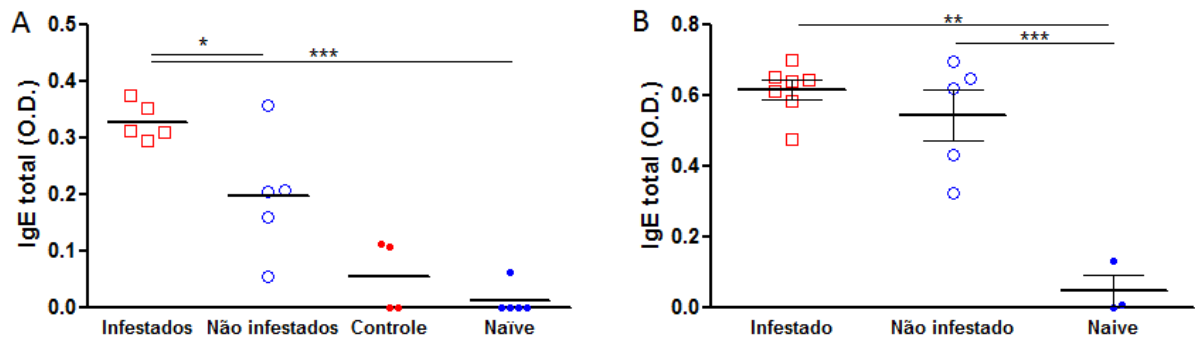


Figura 13 – Títulos de anticorpos IgE total, em camundongos C57BL/6 (A) e BALB/c (B), dosados por ELISA de captura conforme descrito anteriormente. Cada amostra foi dosada em duplicata. O eixo y representa a média dos valores de absorvância \pm erro padrão para cada grupo. Análise estatística feita pelo teste *t* de Student onde ** = $P < 0,01$ e *** = $P < 0,001$. Dados representativos de um experimento.

6.3 Avaliação do papel da Adenosina salivar no fenótipo observado

A partir do achado que saliva de *R. sanguineus* contém altas concentrações de adenosina (OLIVEIRA et al., 2011) e que essa molécula apresentou grande atividade imunomodulatória *in vitro*, um experimento foi delineado para avaliar o desenvolvimento da lesão causada por *L. major* em camundongos C57BL/6 tratados com um agonista do receptor purinérgico. Tendo em vista que uma das principais consequências da ativação dos receptores purinérgicos pela Adenosina é a produção da IL-10, a concentração desta citocina foi aferida em células e tecidos de camundongos infestados e não infestados.

Não foi observada diferença significativa nas concentrações de IL-10 em camundongos infestados com *Rhhipicephalus sanguineus*, infectados ou não por *L. major* (fig. 14 – A - B).

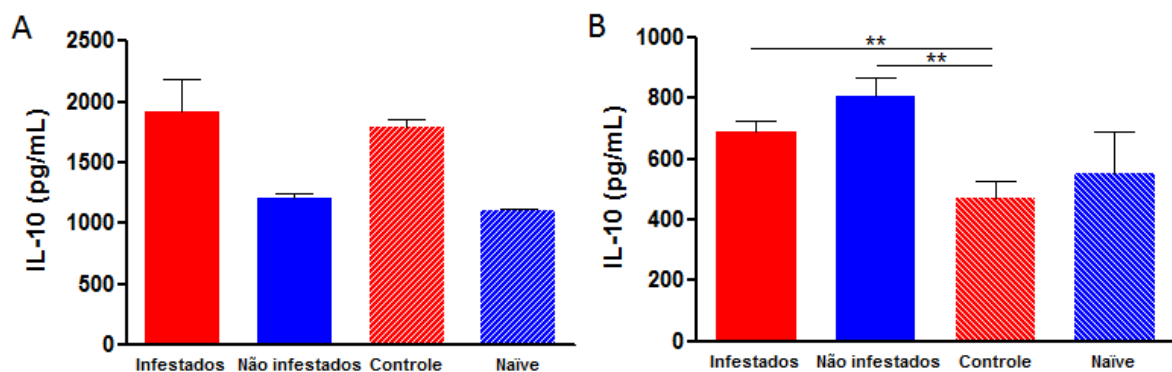


Figura 14 – Níveis séricos de IL-10 em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* e previamente infestados ou não com *R. sanguineus*. Os níveis séricos de IL-10 foram dosados por ELISA de captura (Peprotech) na quinta (A, n=3) e na oitava (B, n=5) semana pós infecção com *Leishmania major*. O eixo y representa os valores de IL-10 em pg/mL. As barras representam a média + erro padrão para cada grupo. Análise estatística feita pelo teste Mann-Whitney onde ** = $P < 0,01$. Dados representativos de um experimento.

Para confrontar a hipótese de que a adenosina presente na saliva de *R. sanguineus* era o modulador da resposta imune produzindo o fenótipo observado, desenhamos um experimento em que camundongos eram tratados com um agonista purinérgico N-etilcarboxamidoadenosina (NECA).

Camundongos C57BL/6 foram tratados por 14 dias consecutivos com uma dose diária de 1 nmol de NECA ou seu veículo, dimetilsulfóxido a 1,6% (DMSO), e em seguida foram inoculados com um total de 10^5 pro^{met} de *L. major* na pata caudal direita, 7 dias após o início do tratamento, e acompanhados por até 16 semanas (fig. 15). Foi observado um maior desenvolvimento da lesão em ambos os grupos tratados em relação ao controle (fig. 16 – A), sugerindo um efeito derivado do veículo e não do agonista. A administração dos fármacos não interferiu no processo de resolução da lesão.

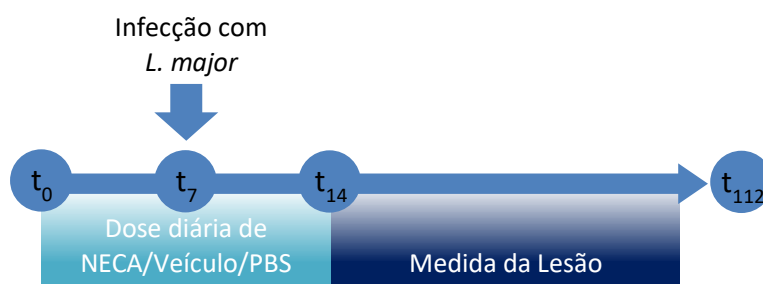


Figura 15 – Esquema do protocolo de tratamento em camundongos tratados com um agonista de receptores purinérgicos. A: Doses diárias de 8nmol de NECA ou 10 μ L de DMSO 1,6% (veículo) ou PBS estéril (controle) foram administrados por 14 dias seguidos na pata caudal direita de camundongos C57BL/6 (n=5). No sétimo dia após o início do tratamento os animais foram infectados com 10^5 pro^{met} de *L. major* na pata caudal direita. A espessura das patas foi medida semanalmente até a décima sexta semana.

Na tentativa de maximizar o efeito das moléculas, um novo experimento foi delineado no qual as moléculas de interesse foram administradas juntamente com as promastigotas metacíclicas de *Leishmania major*. Neste experimento adicionamos um grupo em que as promastigotas metacíclicas foram inoculadas na presença de 1nmol de adenosina diluída em PBS e o desenvolvimento das lesões foi acompanhado semanalmente. Embora tenha sido observado um atraso no desenvolvimento das lesões no grupo tratado com Adenosina, não foram observadas diferenças significativas utilizando este modelo (fig.16 – B).

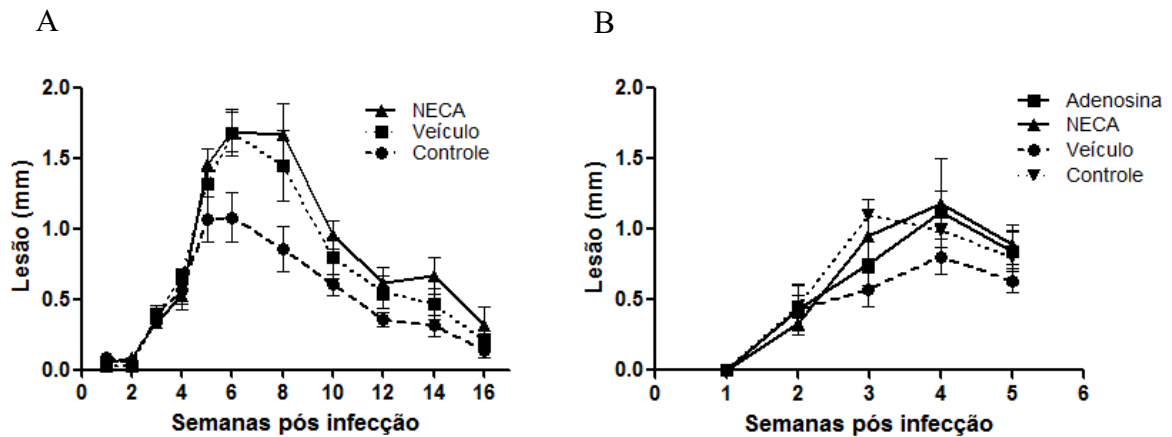


Figura 16 - Desenvolvimento da lesão em camundongos tratados com agonistas de receptores purinérgicos. A: Doses diárias de 8nmol de NECA ou 10µL de DMSO 1,6% (veículo) ou PBS estéril (controle) foram administrados por 14 dias seguidos na pata caudal direita de camundongos C57BL/6 (n=5). No sétimo dia após o início do tratamento os animais foram infectados com 10^5 pro^{met} de *L. major* na pata caudal direita. A espessura das patas foi medida semanalmente. B: Camundongos C57BL/6 (n=3) foram tratados com uma única dose de 1nmol de NECA ou Adenosina ou 10µL de DMSO 1,6% (veículo) ou 10µL de PBS estéril (controle) e simultaneamente infectados com 10^5 pro^{met} de *L. major* na pata caudal direita. A espessura das patas foi medida semanalmente. As barras superiores e inferiores expressam o erro-padrão.

Com o objetivo de avaliar o potencial da saliva de *R. sanguineus* como imunomodulador no modelo C57BL/6 infectado com *L. major*, camundongos foram infectados com uma dose de 10^5 pro^{met} conforme descrito anteriormente, na presença de saliva de *R. sanguineus* ou pilocarpina (fig. 17). Embora o grupo inoculado na presença de saliva tenha apresentado lesões maiores que o grupo controle, não foi observada diferença estatística no desenvolvimento da lesão dos grupos testados até a 7^a semana de infecção (fig. 17).

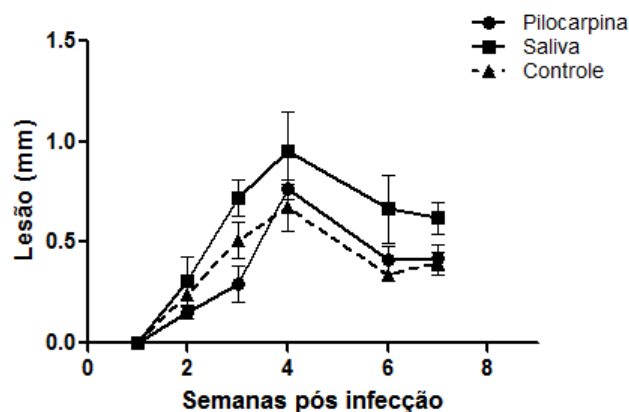


Figura 17 - Desenvolvimento da lesão em camundongos inoculados com saliva de *R. sanguineus*. Camundongos C57BL/6 (n=3) foram infectados com 10^5 pro^{met} de *L. major* na pata caudal direita, juntamente com uma dose local de saliva de *R. sanguineus* ou pilocarpina. O crescimento da lesão foi medido semanalmente. O eixo y representa a média das diferenças entre a espessura das patas infectadas e não infectadas \pm erro padrão.

Uma vez que o fenótipo observado com a administração de agonistas purinérgicos não foi como o esperado, testamos a hipótese de que as aplicações frequentes em altas doses dos agonistas promoveriam uma dessensibilização dos receptores purinérgicos nas células do hospedeiro. Para avaliar esta hipótese, macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de camundongos C57BL/6 foram induzidos por 10 dias na presença de meio condicionante produzido a partir de células L-929, conforme descrito previamente (GONÇALVES; MOSSER, 2015).

As células foram plaqueadas em placas de 48 poços contendo 5×10^5 células por poço e estimuladas com meio contendo NECA a 1 ou 10 μM por 2, 4, 8 ou 12 horas. Após o período de dessensibilização o meio era removido e adicionado um novo meio contendo como estímulo 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS e 1 ou 10 μM de NECA. Alguns poços não recebiam NECA e, portanto, não eram dessensibilizados (controle). O estímulo era mantido por 8 horas quando o sobrenadante foi retirado para a dosagem de IL-10.

Embora sem diferença estatística, pudemos observar um breve período de dessensibilização de 6 a 12 horas após o estímulo em que os macrófagos produziram uma concentração menor de IL-10 (fig. 18).

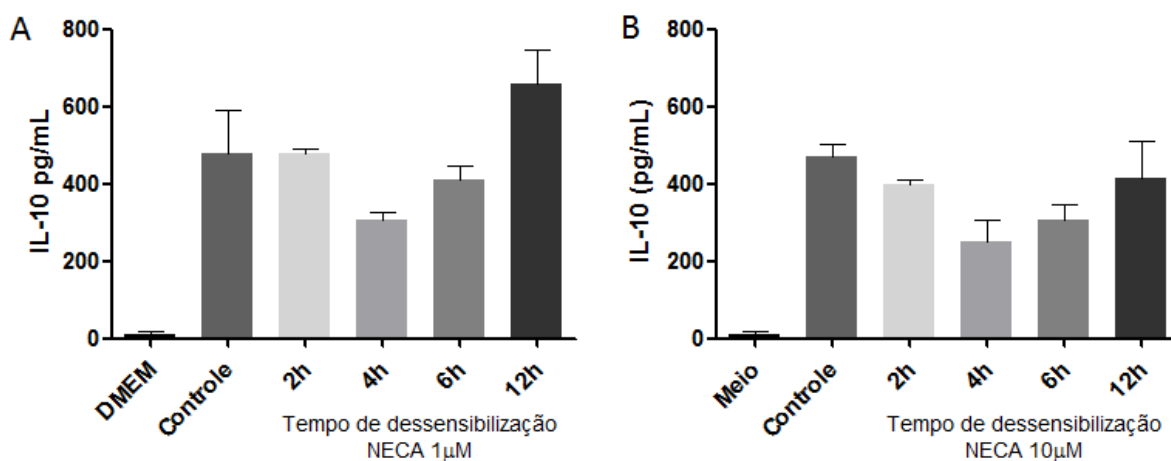


Figura 18 - Efeito do agonista purinérgico (NECA) sobre a produção de IL-10 em macrófagos derivados de medula óssea. BMDMs foram cultivados conforme descrito anteriormente. As células foram dessensibilizadas na presença do agonista por 2, 4, 8 ou 12 horas e então estimuladas com LPS na presença do agonista nas concentrações de 1 μM (A) ou 10 μM (B). As barras representam a média \pm erro padrão dos valores de IL-10 obtidos no ELISA. Dados representativos de 3 experimentos independentes.

O mesmo experimento foi utilizado para avaliar a produção de TNF- α por BMDMs, e observamos uma drástica redução na produção dessa molécula em macrófagos estimulados pelo agonista purinérgico. No entanto, células previamente expostas ficam refratárias à presença de NECA, voltando a produzir TNF- α quando estimuladas na presença de LPS (fig. 19). Aparentemente, um período entre 2 a 4 horas foi necessário para que os receptores purinérgicos dos macrófagos fossem dessensibilizados, permitindo um retorno na produção de TNF- α , embora em níveis muito menores (fig. 19).

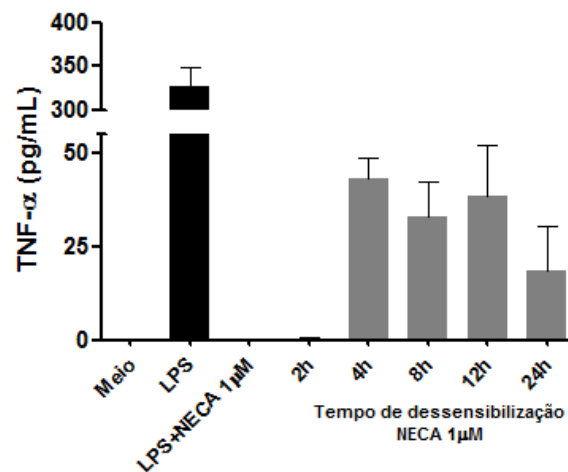


Figura 19 - Efeito do agonista purinérgico (NECA) sobre a produção de TNF- α em macrófagos derivados de medula óssea. BMDMs foram cultivados conforme descrito anteriormente. As células foram dessensibilizadas na presença do agonista por 2, 4, 8 ou 12 horas e então estimuladas com LPS na presença do agonista nas concentrações de 1 μ M. As barras representam a média \pm erro padrão dos valores de TNF- α obtidos no ELISA. Dados representativos de um experimento.

Capítulo II

Coinfecção *Ascaris lumbricoides* e *Leishmania major*

4 Objetivo geral

Estudar os aspectos imunológicos celulares e humorais no sangue e em órgãos afetados pela doença em camundongos BALB/c e coinfectados com *Ascaris lumbricoides* e *Leishmania major*.

4.1. Objetivos específicos

- Avaliar qualitativamente as lesões produzidas na pele e baço de camundongos coinfectados, com base nos tipos celulares e sua prevalência.
- Estimar a carga parasitária de *L. major* na pele e baço de camundongos previamente infestados com teleóginas de *A. lumbricoides*.

5 Material e métodos

5.1. Parasitos

Para o experimento de coinfecção com *A. lumbricoides* e *L. major*, formas adultas de *A. lumbricoides* foram coletadas de humanos e mantidos em porcos de uma granja experimental. Os ovos foram isolados dos úteros de fêmeas por maceração mecânica e posteriormente purificados pelo uso de *cell strainers* de 70µm (SPL life sciences, Korea). Os ovos foram então incubados em uma solução de H₂SO₄ 0,2M para embrionarem. Após 30 dias os ovos embrionados foram lavados e sua concentração foi ajustada para a dose de 2500 ovos em 200µL de inóculo em PBS. As infecções foram realizadas por via oral com o auxílio de agulhas de gavagem, em três doses com o intervalo de 14 dias entre cada dose.

5.2. Quantificação da carga parasitária por diluição limitante

Após eutanásia as patas ou orelhas foram removidas e maceradas em um macerador de vidro contendo 2mL de PBS contendo 100U/mL de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (US Biological, MA, EUA). O tecido macerado foi transferido para tubos de fundo cônico e centrifugados a 100xg/1 minuto a 4° C e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo cônico, o volume completado para 15mL de PBS com antibióticos e a seguir centrifugado a 2000xg/10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 1mL de meio de cultura α -MEM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino, Cultilab), 100U/mL de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina(US Biological, MA, EUA).

A seguir 200µL de cada cultura foram transferidos para placas de cultura de 96 poços e diluídos sucessivamente ao Log de base 10 ou 4. Após 7 dias as culturas foram checadas diariamente até o décimo dia quando os poços foram avaliados individualmente para verificar a presença de formas promastigotas. Os resultados foram expressos como Log do valor do último poço contendo formas promastigotas.

5.3. Delineamento experimental

Camundongos fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, das linhagens BALB/c foram divididas em 4 grupos:

- **Grupo Infestado** – Animais previamente infectados com *Ascaris lumbricoides* e infectado com 10^5 promastigotas metacíclicas (pro^{met}) na pata caudal direita.
- **Grupo Não Infestado** – Animais infectados com 10^5 pro^{met} na pata caudal direita somente.
- **Grupo Controle** – Infectados com *A. lumbricoides* somente.
- **Grupo Naïve** – Não infectados e não infestados.

A infecção por *L. major* foi realizada simultaneamente à última infecção com *Ascaris lumbricoides*, conforme descrito no capítulo II (fig. 20).

As patas foram medidas semanalmente com auxílio de um paquímetro (Pantec, SP, Brasil). O crescimento da lesão foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata infectada e a espessura da pata não infectada.

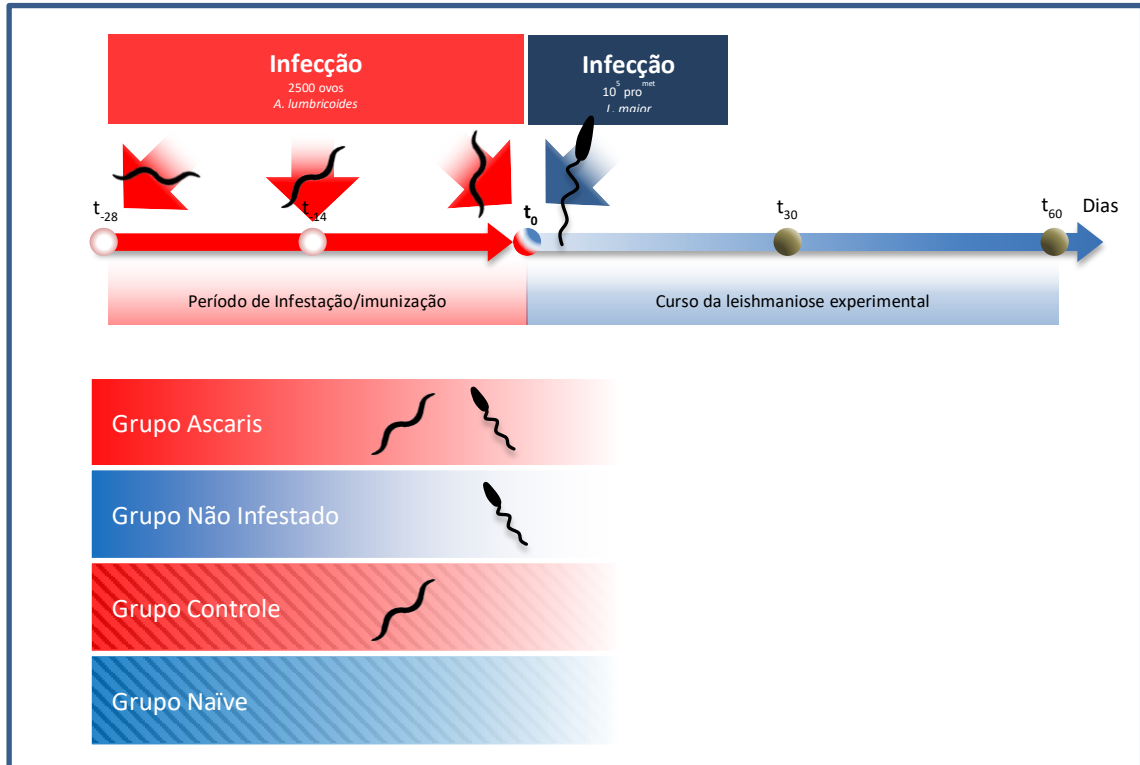


Figura 20 – Desenho experimental: Para o experimento de coinfecção entre *Ascaris lumbricoides* e *L. major*, camundongos BALB/c fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, foram divididas em 4 grupos: Infestado, Não infestado, Controle e Naïve. A infecção com *Leishmania major* era após 3 infecções com 2500 ovos larvados de *A. lumbricoides* como intervalo de 14 dias entre as infecções. Após a infecção com *L. major* os camundongos eram acompanhados por um período de até 60 dias para avaliação da lesão na pata e da carga parasitária.

6 Resultados

Não foram observadas diferenças no desenvolvimento das lesões após oito semanas de infecção com *L. major*, entre os grupos infectados ou não infectados com *Ascaris lumbricoides* (fig. 21). A carga parasitária no baço e pata dos animais também não apresentou diferenças significativas (fig. 22).

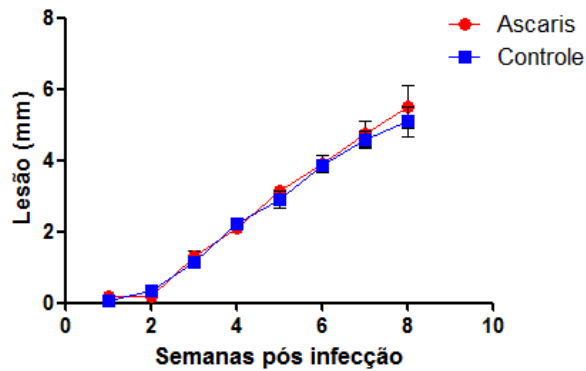


Figura 21 - Desenvolvimento da lesão: Camundongos BALB/c (n=5) previamente infectados com 3 doses de *A. lumbricoides* foram infectados com 10^5 pro^{met} de *L. major* na pata caudal direita. O crescimento da lesão foi medido semanalmente até a oitava semana. O eixo y representa a média das diferenças entre a espessura das patas infectadas e não infectadas \pm erro padrão. Análise estatística feita pelo teste Kruskal Wallis.

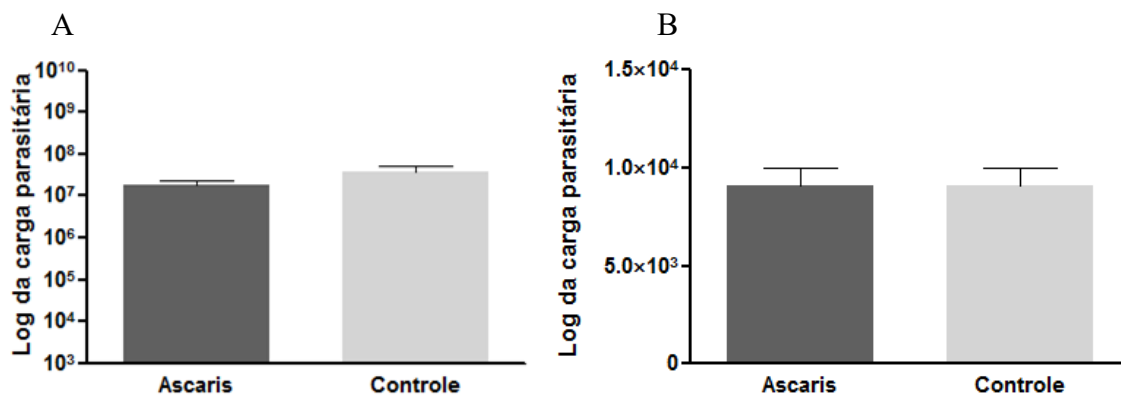


Figura 22 – Carga parasitária: Camundongos BALB/c (n=5) previamente infectados com 3 doses de *A. lumbricoides* foram infectados com 10^5 pro^{met} de *L. major* na pata caudal direita. Após oito semanas os animais foram eutanasiados, as patas (A) e baços (B) coletados e submetidos ao protocolo de diluição limitante. Resultados expressam a média obtida para cada animal \pm erro padrão. Análise estatística feita pelo teste Kruskal Wallis.

Capítulo III

Estudo do papel dos eosinófilos na infecção experimental por *Leishmania* spp.

4 Objetivo geral

Estudar os aspectos imunológicos celulares e humorais de camundongos deficientes em eosinófilos infectados com *Leishmania major* ou *Leishmania amazonensis*.

5 Delineamento, Animais e Parasitos

Camundongos Δ dbl-GATA1 e IL-4^{-/-}, gentilmente cedidos pela Professora Débora Negrão, do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, além de camundongos C57BL/6 e BALB/c provenientes do CBIO (ICB-UFMG) foram infectados com 2×10^6 promastigotas estacionárias de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) ou *Leishmania major* (MHOM/IL/81/Friedlin) por via intradérmica na pata caudal esquerda, e acompanhados por até 16 ou 20 semanas de infecção, respectivamente. As patas foram medidas semanalmente com auxílio de um paquímetro (Pantec, SP, Brasil). O crescimento da lesão foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata infectada e a espessura da pata não infectada. A presença de metástases foi avaliada nos membros, cauda, pálpebras e orelhas. A carga parasitária foi determinada por diluição limitante na oitava semana pós-infecção conforme descrito no capítulo II. Baço, fígado, pele e linfonodos foram coletados e processados para rotina histopatológica. A avaliação sorológica foi realizada conforme descrito no capítulo I.

Este projeto tem a aprovação do comitê de ética em experimentação animal sob o número de protocolo 21/2016 (Anexo 2).

6 Resultados

Foi observado um maior número de lesões nodulares e/ou ulceradas em diversas regiões do corpo nos camundongos deficientes em eosinófilos, a partir de nove semanas de infecção. Na décima terceira semana de infecção, a presença de metástases nos membros, focinho, orelhas e cauda foi de respectivamente 100%, 90%, 70% e 10% nos camundongos Δ dbl-GATA1, contra

60%, 30%, 40% e 0% nos camundongos BALB/c (fig. 24). Elevada mortalidade (80%) foi observada na linhagem deficiente com relação aos seus controles (20%) (fig. 25). Não foram observadas diferenças no tamanho da lesão, carga parasitária na pata ou nos aspectos histopatológicos dos grupos estudados (fig. 23).

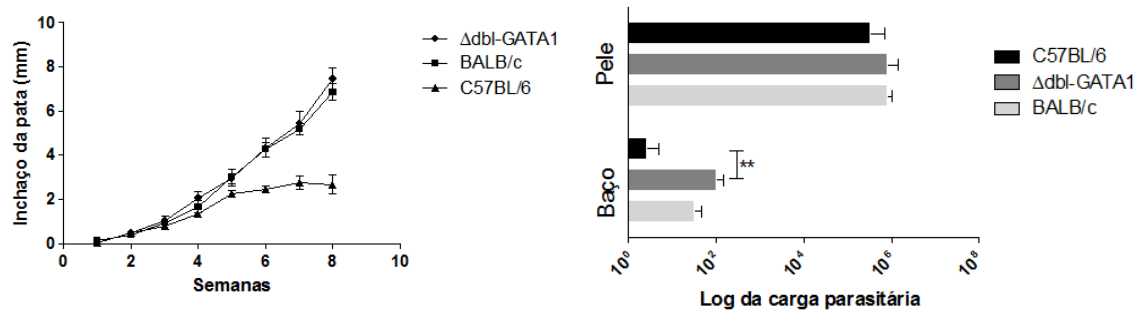


Figura 23 – Desenvolvimento da lesão: Camundongos das linhagens mencionadas foram infectados com 2×10^6 promastigotas de fase estacionária de *L. amazonensis* no membro caudal esquerdo. O crescimento da lesão foi medido semanalmente até a oitava semana (A). O eixo y representa a média das diferenças entre a espessura das patas infectadas e não infectadas \pm erro padrão. Após oito semanas de infecção os animais foram eutanasiados e as patas e baços foram coletados e submetidos ao protocolo de diluição limitante (B). Análise estatística feita pelo teste Kruskal Wallis.

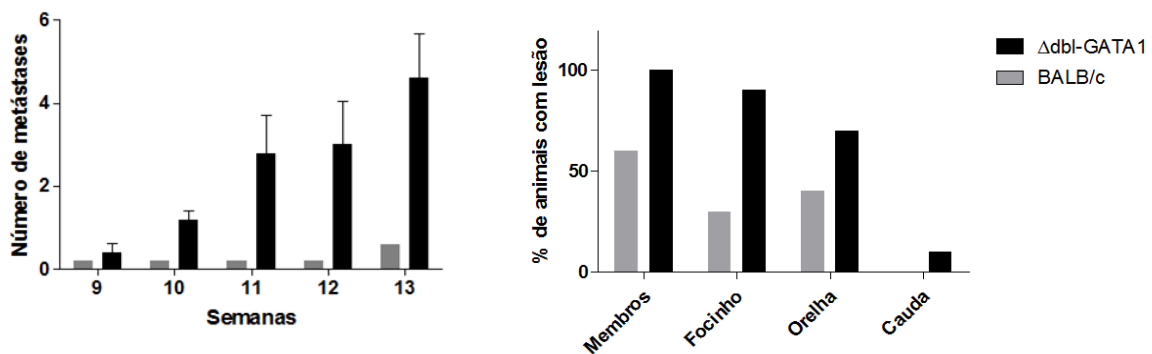


Figura 24 – Avaliação das metástases: Número de metástases observadas entre duas linhagens susceptíveis a *L. amazonensis* (A) e estratificação percentual de animais com lesões localizadas em diferentes partes do corpo (B). Os camundongos foram observados semanalmente e inspecionados para a presença de nódulos ou lesões sugestivas de metástases nos membros, cauda, focinho, boca, orelhas e olhos. As barras representam a média do número de lesões ectópicas por grupo. Análise estatística feita pelo teste de Mann-Whitney, sendo $P=0,01$, ($n=5$)

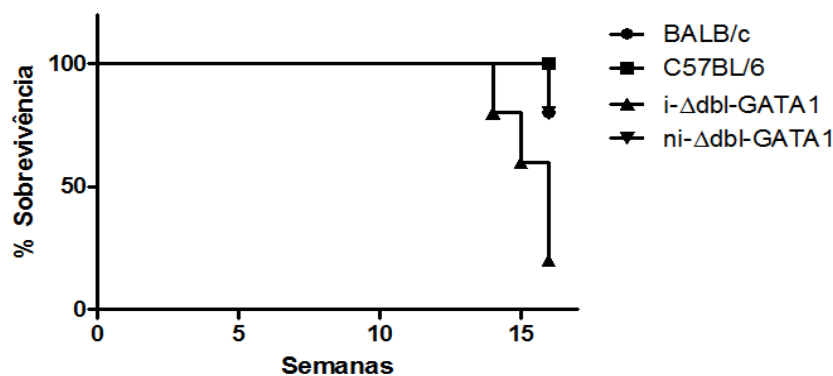


Figura 25 – Curva de sobrevivência das diferentes linhagens de camundongos infectados ou não com *L. amazonensis*. Foi observada maior mortalidade nos camundongos Δ dbl-GATA1 infectados quando comparados aos BALB/c e C57BL/6. No entanto, não houve diferença entre os camundongos Δ dbl-GATA1 infectados (i) e não infectados (ni) ($n=5$).

Com relação à infecção da linhagem Δ dbl-GATA1 com *L. major*, o mesmo padrão de desenvolvimento da lesão foi observado quando comparado a camundongos BALB/c (fig. 26 – A). No entanto, a carga parasitária na pele desta linhagem foi discretamente maior que a dos camundongos BALB/c (fig. 26 – B). Como observado para *L. amazonensis*, a mortalidade encontrada na linhagem deficiente em eosinófilos também foi superior àquela encontrada em BALB/c (fig. 27) e o número de lesões ectópicas também foi discretamente superior, neste caso, sem diferença estatística (fig. 28).

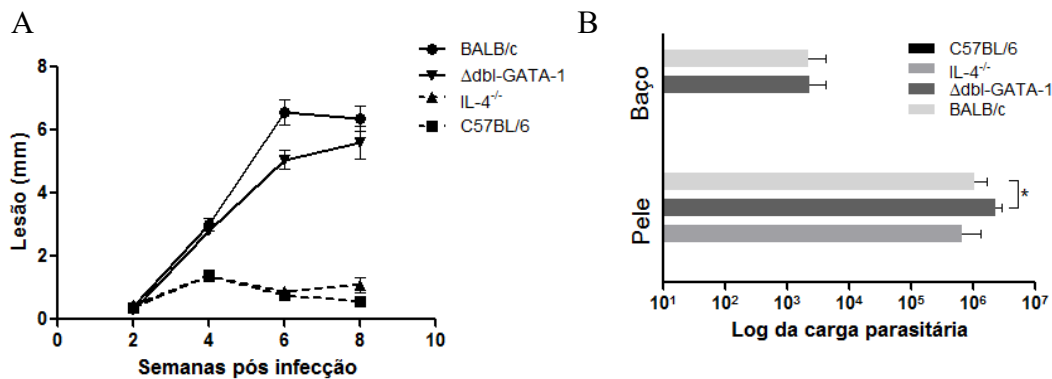


Figura 26 – Desenvolvimento da lesão: Camundongos das linhagens mencionadas foram infectados com 2×10^6 promastigotas de fase estacionária de *L. major* no membro caudal esquerdo. O crescimento da lesão foi medido semanalmente até a oitava semana (A). O eixo y representa a média das diferenças entre a espessura das patas infectadas e não infectadas \pm erro padrão. Após oito semanas de infecção os animais foram eutanasiados e as patas e baços foram coletados e submetidos ao protocolo de diluição limitante (B). Análise estatística feita pelo teste Mann Whitney, sendo * = $P < 0,05$.

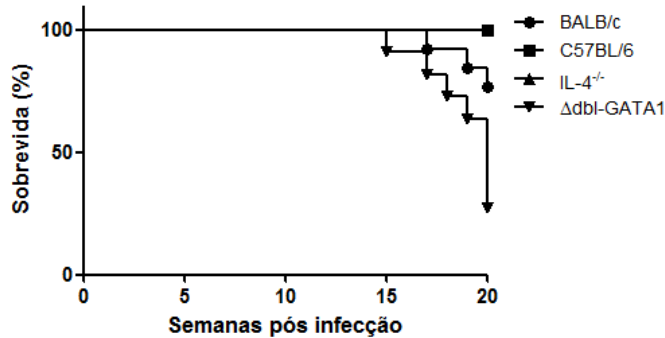


Figura 27 – Curva de sobrevivência das diferentes linhagens de camundongos infectados ou não com *L. major*. Foi observada maior mortalidade nos camundongos Δ dbl-GATA1 infectados quando comparados aos BALB/c e C57BL/6. Análise estatística feita pelo teste de Mann Whitney, sendo $P < 0,05$.

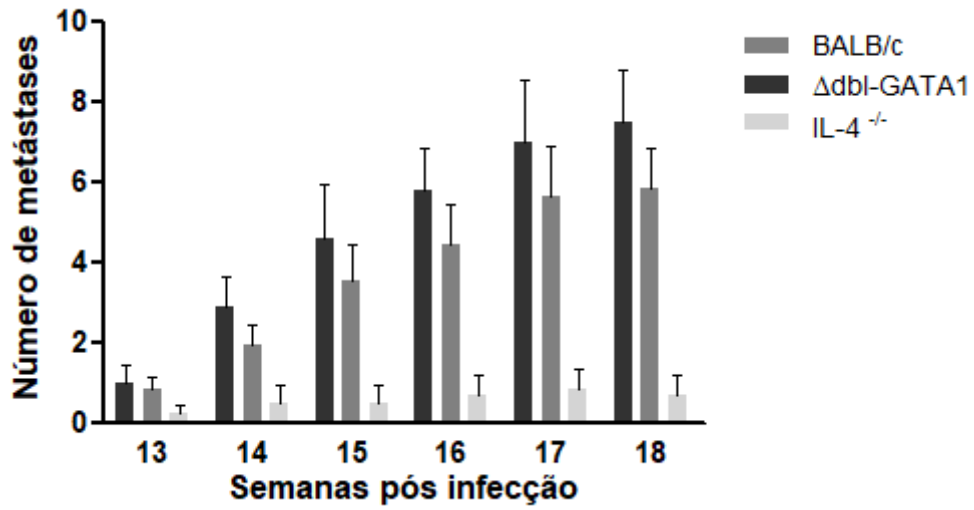


Figura 28 – Avaliação das metástases: O número de metástases observadas entre duas linhagens susceptíveis a *L. major*. Os camundongos foram observados semanalmente e inspecionados para a presença de nódulos ou lesões sugestivas de metástases nos membros, cauda, focinho, boca, orelhas e olhos. As barras representam a média do número de lesões ectópicas por grupo. Análise estatística feita pelo teste de Mann-Whitney, (n=5).

7 Discussão

O trabalho principal descrito no capítulo I evidenciou como a infestação prévia por *Rhipicephalus sanguineus* foi capaz de modular a resposta imune de camundongos interferindo do desenvolvimento da lesão e da carga parasitária. No entanto, antes de considerarmos os resultados algumas condições devem ser observadas.

Os resultados observados na figura 3 – A, são a compilação de três experimentos independentes. Nos três experimentos, as condições experimentais foram ótimas: os carrapatos demoraram até 3 dias para iniciar a alimentação, se alimentaram por até 10 dias e as fêmeas ingurgitadas se desprenderam espontaneamente do hospedeiro. Nestes experimentos, o tempo máximo entre o desprendimento das fêmeas ingurgitadas e a infecção por *L. major* foi de até 12 horas. Em alguns experimentos, nesse momento algumas fêmeas quase totalmente ingurgitadas precisaram ser removidas para que a infecção com *L. major* ocorresse com todos os animais do grupo em condições experimentais semelhantes. Animais em que a ingurgitação no momento da infecção fosse parcial ou ausente eram excluídos deste grupo experimental. Em todos os experimentos o mesmo inóculo foi usado para todos os animais, sempre utilizando uma cultura de *Leishmania major* até a terceira passagem.

Por outro lado, alguns outros experimentos que não foram mostrados nesta tese, não reproduziram bem o modelo observado, tendo o grupo infestado desenvolvido lesões semelhantes ou às vezes maiores que a do grupo não infestado. Em geral, nestes experimentos, os carrapatos não completavam o ingurgitamento, ou morriam por ressecamento durante a alimentação. As causas desse problema não são completamente entendidas, mas acreditamos que resíduos de acaricidas utilizados no centro de bioterismo no período destes experimentos, possam ser a causa da morte prematura dos carrapatos. Portanto, como as condições experimentais em que estes experimentos ocorreram não foram ótimas, estes dados não foram considerados nas análises.

Vale ainda ressaltar que camundongos não são hospedeiros naturais de *R. sanguineus*, o que torna a alimentação neste hospedeiro dificultosa, tendo em vista que em vários experimentos o primeiro grupo de carrapatos colocados nas câmaras não se fixava e precisavam ser trocados. Estes achados reforçam os resultados encontrados, e sugerem que é necessária uma alimentação

completa dos carrapatos em condições ótimas para que o efeito seja observado. De fato, o trabalho de ANATRIELLO et al., 2010, mostrou que a saliva do carrapato varia muito a sua composição, de acordo com o tempo. A saliva liberada em diferentes momentos no hospedeiro, varia muito sua composição. Isso pode explicar as diferenças em resultados, visto que os efeitos gerados no hospedeiro, podem estar relacionados com os diferentes componentes da saliva liberados no momento da infecção por *L. major*. Apesar das dificuldades na padronização e na manutenção da homogeneidade dos grupos acreditamos que o fenótipo mostrado representa a história natural da comorbidade, baseado em uma série de evidências que apresentaremos a seguir. Mas principalmente pelo fato de que no cão, estas infestações por carrapatos ocorrem com um grande número de parasitos, que completam o ciclo de alimentação no hospedeiro, antes de se desprenderem. O que nos leva a acreditar que os experimentos com o ciclo completo de alimentação de 10 dias, representa a melhor reprodução experimental do que ocorre naturalmente.

Sendo assim, nossos resultados demonstraram que camundongos C57BL/6, naturalmente resistentes à infecção por *L. major*, apresentaram, após a infestação por carrapatos, um menor espessamento da pata no decorrer da infecção. Interessantemente, o fenótipo observado nesta linhagem se deu após uma única infestação pelo carrapato, que finalizou logo antes da infecção por *L. major*. O efeito desta infestação, no entanto, só pode ser notado a partir da quarta semana após a infecção, quando observamos um menor inchaço na pata (fig. 3). Inicialmente este resultado sugere um efeito protetor da infestação no desenvolvimento da lesão. No entanto, a carga parasitária observada na 11ª semana, período em que as lesões eram equivalentes em tamanho em ambos os grupos, foi significativamente maior no grupo infestado (fig. 7 - B).

O achado de lesões menores com maior carga parasitária foi relatado por outros (GLENNIE et al., 2017). Um menor espessamento das patas pode ser um efeito sistêmico da atividade da saliva inoculada no dorso dos camundongos na migração de leucócitos para o local da infecção por *Leishmania major*. De fato, a capacidade da saliva ou de componentes da saliva de *R. sanguineus* em inibir a migração celular já foi demonstrada (DÉRUAZ et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008). Neste caso, também deve ser avaliado o número médio de amastigotas por célula infectada, para testar a hipótese de que em animais infestados há menos células inflamatórias e um número maior de amastigotas por macrófago infectado. Estas hipóteses serão testadas posteriormente.

Ao contrário de outros artrópodes, carrapatos precisam se fixar em seus hospedeiros por longos períodos de tempo para completar o repasto sanguíneo. Para se desvencilhar da resposta imune do hospedeiro, estes artrópodes evoluíram no sentido de produzir uma plethora de substâncias imunomoduladoras nas glândulas salivares (FRANCISCHETTI, 2009). A divulgação do sialotranscriptoma de *R. sanguineus* revelou que em determinadas fases do período de alimentação determinados transcritos são mais ou menos expressos (ANATRIELLO et al., 2010). Isso sugere uma interação dinâmica entre os componentes produzidos pela glândula salivar e a resposta inflamatória do hospedeiro.

Elevadas concentrações de adenosina (~100µM) e PGE₂ (~100nM) foram encontradas em saliva de *R. sanguineus* e foram capazes modular a resposta de células dendríticas a agonistas de receptores tipo-Toll *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2011). A adenosina regula a função do sistema imune inato e adaptativo através da segmentação de praticamente todos os tipos de células envolvidas na orquestração da resposta inflamatória (HASKO; PACHER, 2007). Dos quatro receptores de adenosina (A1, A2A, A2B, A3), os receptores A2A são os principais envolvidos na imunossupressão promovida pela adenosina e são expressos em diversos leucócitos como monócitos/macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, células endoteliais, eosinófilos, células epiteliais, bem como linfócitos, células NK e células NKT (HASKO; PACHER, 2007; LINDEN, 2011; SHETH et al., 2014). Adenosina ainda exibe atividade como um potente inibidor da agregação plaquetária (CUSACK; HOURANI, 1981; FUENTES et al., 2014). Com base nestes dados, tentamos reproduzir o efeito da infestação pela administração de 5'-N-carboxiamidoadenosina (NECA), um agonista purinérgico com afinidade para os receptores A1 e A2 (fig. 16).

Conforme mostrado nos resultados, não obtivemos sucesso em reproduzir o fenótipo observado no modelo, utilizando infestação após aplicação do agonista purinérgico. Acreditamos que atuação do veículo (DMSO) como anti-inflamatório, possa ter influenciado neste resultado (ELISIA et al., 2016; SHIRLEY; STEWART; MIRELMAN, 1978). Usamos doses diárias de DMSO 1,6% por via intramuscular ou subcutânea e observamos um aumento da lesão na pata a partir da 4^a semana de infecção. Doses menores tiveram efeito anti-inflamatório *in vivo* e, *in vitro* e doses semelhantes a que usamos induziram uma diminuição da produção de citocinas pro-inflamatórias além de inibir a polarização de macrófagos, especialmente para o tipo M1, reconhecidamente importante para eliminação do parasito (ELISIA et al., 2016). Acreditamos que o efeito observado foi, portanto, uma interferência promovida pela ação adversa do DMSO.

Novos experimentos deverão avaliar diferentes esquemas de administração do agonista na tentativa de minimizar os efeitos do veículo. Ainda assim, a dinâmica do desenvolvimento do parasito nestas circunstâncias deverá ser avaliada.

Na tentativa de reproduzir melhor o efeito da saliva do carrapato, desenhamos um experimento em que uma dose de 1nmol de Adenosina era administrada juntamente com o inóculo de metacíclicas na pata de camundongos C57BL/6 (fig. 16 – B). Observamos um discreto atraso no desenvolvimento da lesão, corroborando resultados encontrados por outros utilizando *Leishmania braziliensis* (DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008). Embora este resultado sugira que uma única dose de adenosina no momento da infecção seja capaz de interferir no curso da doença, novos ensaios deverão demonstrar se a aplicação de adenosina tem efeito sistêmico e altera o curso da leishmaniose experimental da mesma forma que a infestação por *R. sanguineus*. Se esta hipótese for verdadeira, será uma forte evidência no sentido de demonstrar o efeito imunomodulador sistêmico da saliva. Ainda, novos experimentos utilizando inibidores não seletivos de receptores purinérgicos devem ser usados no contexto da infecção por *Leishmania*.

Embora seja razoável propor que doses sistêmicas de adenosina por períodos compatíveis com uma infestação por carrapatos teriam um efeito acumulativo na imunomodulação, algumas considerações devem ser ponderadas. A meia-vida tecidual da adenosina é muito fugaz (TO; LINDEN, 2001), embora tenha um efeito potente na modulação da resposta imune no local da aplicação (COHEN; MOSSER, 2013; LINDEN, 2011). No entanto, esse efeito pode ser limitado por doses altas e/ou prolongadas uma vez que os receptores A₂ estão sujeitos à dessensibilização pelo agonista (MUNDELL; BENOVIC; KELLY, 1997; MUNDELL; KELLY, 2011). Este efeito foi demonstrado nos macrófagos nas figuras 18 e 19. No entanto, observou-se um retorno à produção de IL-10 nos macrófagos estimulados pelo agonista após 4h de dessensibilização, que embora tenha ocorrido também com TNF- α , não atingiu neste, níveis tão elevados quanto o estímulo somente com LPS (fig. 19). Embora estes resultados sugiram a dessensibilização transitória de macrófagos pelos agonistas purinérgicos, os dados apresentados são insuficientes para concluir sobre este efeito e, portanto, novas réplicas deverão ser feitas.

Uma vez que o efeito derivado da infestação foi observado em nível sistêmico, avaliamos a hipótese de que níveis séricos de IL-10 estariam elevados em camundongos infestados. Embora

sem significância estatística, notamos níveis mais elevados de IL-10 no soro de camundongos infestados com *R. sanguineus* na quinta semana após a infecção (fig. 14). Os resultados sugerem que este efeito foi derivado da infestação e não da infecção por *L. major* uma vez que o grupo controle também apresentou níveis mais elevados. O efeito não foi observado na oitava semana, no entanto, ambos os grupos infectados com *Leishmania* apresentaram níveis de IL-10 significativamente maiores que o controle, e similares aos camundongos naïve. Estes resultados são discordantes com outros resultados observados na literatura científica, sobretudo no que diz respeito aos altos níveis séricos de IL-10 detectados pelo ELISA neste experimento (JANKOVIC et al., 2007; LOUIS et al., 1998). Embora os grupos, infestado e controle, apresentem de fato maiores densidades óticas detectadas no ELISA, novos experimentos serão realizados para avaliar a real concentração de IL-10 sérica nestes animais.

Por fim, avaliamos os níveis séricos de imunoglobulinas anti-*Leishmania* no soro dos animais experimentais. Como esperado, camundongos BALB/c apresentaram maiores títulos específicos de IgG total anti-*Leishmania* que camundongos C57BL/6 oito semanas após a infecção. Não foi observada nesta linhagem diferenças entre os grupos infestados e não infestados. Por outro lado, camundongos C57BL/6 previamente infestados por *R. sanguineus* apresentaram títulos de IgG menores que o grupo não infestado (fig. 10). É importante salientar que essas diferenças foram observadas oito semanas após o fim da infestação por *R. sanguineus*, mostrando uma notável consequência da infestação a longo prazo.

Este achado é especialmente importante, pois levanta a hipótese de que cães infestados de carrapatos poderiam ter uma elevada redução dos níveis séricos de imunoglobulinas a ponto de serem indetectáveis em testes sorológicos. Uma vez que cães de áreas endêmicas são frequentemente parasitados por carrapatos, acreditamos que esta hipótese traz sérias reflexões do ponto de vista da saúde pública e deverá ser cuidadosamente avaliada em futuros projetos. Interessantemente, dois trabalhos não encontraram correlação entre a infestação por *Rhipicephalus sanguineus* e a sorologia positiva para *Leishmania infantum* (PAZ et al., 2010, 2013).

Quando avaliadas as subclasses de IgG específicas nestes animais observamos títulos significativamente menores de IgG1 e IgG2b. Estudos mostraram que no modelo BALB/c e C57BL/6 um predomínio de IgG1 sobre IgG2a se correlaciona com o desenvolvimento da doença, ao passo que uma alta relação IgG2a/IgG1 se correlaciona com menor susceptibilidade

a *L. major* (EBRAHIMPOOR; PAKZAD; AJDARY, 2013). Isso se deve ao fato de que a produção de IgG1 é regulada por citocinas do tipo T_H2 (IL-4 e IL-10), ao passo que a síntese das subclasses IgG2a e IgG2c é regulada por citocinas do perfil T_H1 (IFN- γ e IL-12)(VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014).

Interessantemente, os níveis séricos de IgG2b foram consistentemente menores no grupo infestado após oito semanas de infecção. Há evidências de que o *switching* para essa classe é mediado por TGF- β (DEENICK; HASBOLD; HODGKIN, 1999; VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014), embora tenha sido demonstrado que células de linfonodo de camundongos C3H/HeJ previamente infestados com *R. sanguineus*, estimuladas com ConA produziram grandes quantidades (2ng/mL) de TGF- β (FERREIRA; SILVA, 1999). Por outro lado, foi relatado que adenosina é importante na geração de subclasses de IgG (SCHENA et al., 2013). Futuros experimentos devem avaliar o potencial da saliva de *R. sanguineus* em modular a mudança de classe de imunoglobulinas.

Podemos concluir que a infestação por *R. sanguineus* modulou a resposta imune do hospedeiro o deixando mais susceptível à infecção por *L. major*. Este achado corrobora resultados prévios que demonstram a capacidade de *R. sanguineus* em modular a resposta imune de camundongos para um perfil T_H2, além de promover a ausência de uma resposta de hipersensibilidade tardia em cães e camundongos (FERREIRA; SILVA, 1999). Saliva de *R. sanguineus* também é capaz de interferir na maturação e migração de células dendríticas, reduzindo a produção de IL-12 por essas células, inibindo ainda a produção de citocinas pró inflamatórias como o TNF- α e IL-12 por macrófagos derivados de medula-óssea, além de induzir uma maior produção de IL-10 (CAVASSANI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011). Estes achados também foram corroborados por outros (FERREIRA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008; SZABÓ; BECHARA, 1999). Porém, não foi possível elucidar os mecanismos que permeiam essa imunomodulação.

O potencial imunomodulador da saliva de *R. sanguineus* já foi demonstrado em trabalhos prévios, brevemente discutidos na introdução. Um elegante trabalho de Deruaz e colaboradores (2008), demonstrou a atividade anti-inflamatória de evasina-1 e evasina-3, proteínas ligantes de quimiocinas (CHBPs), presente na saliva de *R. sanguineus*. A administração de evasina-1 ou evasina-3 recombinante foi capaz de inibir a migração celular em modelos murinos de

resposta T_{H1} e T_{H2}, psoríase, lesão pulmonar por bleomicina e artrite induzida por antígenos (DÉRUAZ et al., 2008). Este potencial foi corroborado por outros trabalhos (BONVIN; POWER; PROUDFOOT, 2016; DÉRUAZ et al., 2013).

Evasina-1 é um ligante seletivo de CCL3, CCL4 e CCL18 (BONVIN; POWER; PROUDFOOT, 2016; DÉRUAZ et al., 2008). Interessantemente, camundongos C57BL/6 tratados com evasina-1 previamente à infecção por *L. major* apresentaram uma menor produção de IgG1 e IgG2b anti-leishmania, e carga parasitária discretamente superior ao seu grupo controle (CHARMOY et al., 2010). Vale salientar que, embora não haja uma estimativa da concentração de evasinas na saliva de *R. sanguineus*, há evidências de transcritos tanto de evasina-1 quanto evasina-3 na glândula salivar deste carrapato durante toda a sua fase de alimentação (ANATRIELLO et al., 2010). Portanto, é provável que o fenótipo observado pelo nosso grupo seja decorrente da ação das evasinas salivares. Novos experimentos serão delineados para avaliar esta hipótese.

Considerando o fato de que infestações por carrapatos são frequentes em cães, sobretudo aqueles provenientes de áreas pouco assistidas por políticas públicas, e com base nos nossos resultados, hipotetizamos que estas infestações podem interferir no desenvolvimento dos sinais clínicos da doença, propiciando o aparecimento de animais assintomáticos não detectáveis pelos testes sorológicos e interferindo na eficácia das vacinas comerciais amplamente administradas em populações caninas urbanas.

Com isso, as infestações por carrapato ganham grande relevância na discussão das estratégias de controle. Se nossa hipótese for verdadeira, populações caninas infectadas com *Leishmania* e infestadas por carrapatos, e possivelmente outros ectoparasitos, são subdiagnosticadas em inquéritos epidemiológicos, com o agravante de que possivelmente estes animais alberguem em sua pele um grande número de parasitos. Corrobora com esta hipótese a baixa correlação encontrada entre a positividade na sorologia para *Leishmania* e a presença de carrapatos em cães (PAZ et al., 2013). Novos experimentos serão desenvolvidos para avaliar a validade desta hipótese.

Em relação à coinfeção com *Ascaris lumbricoides*, os resultados preliminares não evidenciaram diferenças no perfil de susceptibilidade à infecção por *L. major*. No entanto,

novos experimentos serão delineados para avaliar o desenvolvimento das lesões com apenas uma infecção de *A. lumbricoides*, e também no modelo C57BL/6.

Uma característica em comum e amplamente reconhecida entre as parasitoses intestinais causadas por helmintos e infestações por carrapatos, é um aumento do número total de eosinófilos circulantes. Este aumento se correlaciona com níveis séricos elevados de IL-5, uma citocina relacionada à resposta T_H2 (SANDERSON, 1992). Embora os aspectos da resposta do tipo 2 seja bem estudada no contexto da leishmaniose, o papel dos eosinófilos no curso da doença ainda não é totalmente esclarecido.

Camundongos Δ dbl-GATA1 apresentam uma dupla deleção no sítio de alta afinidade para o promotor GATA1, o que induz uma deficiência na maturação de eosinófilos, resultando na ausência de eosinófilos circulantes (YU et al., 2002). Essa linhagem tem sido constantemente utilizada em estudos funcionais de eosinófilos e processos alérgicos, porém nunca estudada no contexto da leishmaniose. No capítulo III descrevemos os resultados referentes à infecção experimental dessa linhagem com duas espécies de *Leishmania*.

Observamos que embora o desenvolvimento da lesão seja similar ao seu *background* (BALB/c), camundongos deficientes em eosinófilos infectados com *L. amazonensis* apresentaram metástases precocemente e números maiores de metástases em diferentes regiões anatômicas. Ainda, a taxa de mortalidade por esta linhagem foi maior, quando comparada a camundongos BALB/c. Um padrão similar foi observado nas diferentes linhagens infectadas com *L. major*, embora a diferença no número e distribuição das metástases seja menos evidente neste modelo.

Os eosinófilos estão presentes na reação inflamatória inicial após a infecção com parasitas de *Leishmania* e seu papel no desenvolvimento de lesões ou sua capacidade de interferir na resposta imune não foi estudado de forma satisfatória (BELKAID et al., 2000a, 2000b). De fato, os eosinófilos também são encontrados nos gânglios linfáticos durante a leishmaniose tegumentar murina e humana (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2010). Além disso, os eosinófilos foram considerados exclusivamente células efetoras por um longo tempo e novos dados indicam que esta célula pode influenciar a resposta imune adaptativa através da secreção de citocinas ou pela capacidade de apresentar antígeno (CHU et al., 2014; RAVIN; LOY, 2015; ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

A importância das lesões metastáticas observadas no desenvolvimento da doença é provavelmente maior do que o mostrado, já que os camundongos com um maior número de lesões metastáticas morreram primeiro, começando na décima quarta semana, tornando parcial qualquer análise do número de lesões ectópicas após a décima terceira semana. No entanto, as lesões metastáticas não eram uma característica exclusiva de camundongos com ausência de eosinófilos, já que se nódulos similares foram observados em camundongos BALB/c. A avaliação das metástases foi interrompida na 13^a semana, uma vez que os primeiros camundongos morreram nesta semana. Curiosamente, os membros eram mais propensos a ter lesões ectópicas, seguidas pelo plano nasal e orelhas. Interessantemente, as primeiras lesões apareceram na perna contralateral ou nos membros anteriores.

Os eosinófilos foram associados a um menor grau de metástase em alguns tipos de câncer, embora seu papel no controle de metástases de câncer ainda seja especulativo (IKUTANI et al., 2012; LEIGHTON et al., 1996; OHASHI et al., 2000). No granuloma esquistossomótico, eosinófilos compõem até 50% das células no granuloma. No entanto, um estudo em Δ dblGATA-1 não mostrou impacto na carga de vermes, na deposição de ovos ou na formação de granulomas além da depleção de eosinófilos em si (SWARTZ et al., 2006).

Outra explicação possível é que os eosinófilos podem secretar proteases de tecido que podem permitir que as células migrem do tecido infectado (GROBLEWSKA et al., 2012). De fato, a MMP-9 é secretada por eosinófilos e pode dividir o colágeno IV, que está associado à lâmina basal promovendo a adesão das células à matriz extracelular (NAGASE, 1999). Ainda, não se pode excluir que o resultado observado não seja, de fato, devido à falta de eosinófilos, uma vez que camundongos Δ dblGATA-1 demonstraram ter deficiências na sobrevivência de basófilos e possivelmente em outras células (MAJEWSKI et al., 2006; NEI et al., 2013; SUGIYAMA et al., 2008). Além disso, é possível que a presença de eosinófilos no local da infecção seja apenas devido à secreção de IL-5 e IL-4 pelas células T_H2 (COLLINS, 1995; MOCHIZUKI et al., 1998).

Embora os resultados sejam sugestivos de um padrão, novos experimentos deverão ser delineados para a melhor avaliação da resposta desta linhagem contra as espécies de *Leishmania* citadas. Ainda será determinado o desenvolvimento de lesões causadas por *L. braziliensis* nesta linhagem.

8 Conclusões e Perspectivas

Podemos concluir que a infestação por *Rhipicephalus sanguineus* interfere no curso da doença e nos parâmetros imunológicos de camundongos resistentes à infecção por *Leishmania major*. Este trabalho é uma prova de conceito que demonstra a influência da infestação por carrapatos no desenvolvimento da leishmaniose no hospedeiro. O mecanismo pelo qual essa interferência ocorre não pôde ser determinado devido a inúmeras dificuldades na reprodução do modelo. Novos experimentos devem ser delineados para avaliar se o padrão observado em camundongos se repete em cães em condições próximas da infecção natural. Se a observação se repetir será de grande impacto para clínicos veterinários e mesmo para a vigilância epidemiológica, pois influenciará diretamente no diagnóstico de cães infectados por *Leishmania infantum*. Novos experimentos deverão ser delineados para avaliar se a infecção prévia por helmintos é capaz de interferir no curso da leishmaniose.

Eosinófilos aparentemente estão relacionados à resistência contra a infecção por *Leishmania major* ou *L. amazonensis*. No entanto, novos experimentos deverão avaliar o papel dos eosinófilos na infecção por *Leishmania* em modelos de resistência (com o *background* C57BL/6) usando preferencialmente a infecção “natural”, com flebotomíneos.

9 Referências Bibliográficas

AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and immunity**, v. 61, n. 7, p. 2952–9, 1993.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. **T helper (h)1/Th2 and Leishmania: Paradox rather than paradigm** *Immunology Letters*, 2005.

ALTET, L. et al. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in Leishmaniasis-susceptible dogs. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2763–2771, 2002.

ALVES, C. F. et al. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349–358, 2009.

ANATRIELLO, E. et al. An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 450, 2010.

ASHFORD, R. W. **Leishmaniasis reservoirs and their significance in control** *Clinics in Dermatology*, 1996.

AZEREDO-COUTINHO, R. B. G. et al. Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 154, p. 42–49, 2016.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–30, 1 jul. 2008.

BELKAID, Y. et al. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6704–6709, 2000a.

BELKAID, Y. et al. 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. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 2, p. 969–977, 2000b.

BOGGIATTO, P. M. et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 2, p. 267–273, 2010.

BONVIN, P.; POWER, C. A.; PROUDFOOT, A. E. I. Evasins: Therapeutic potential of a new family of chemokine-binding proteins from ticks. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. JUN, 2016.

BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 155, n. 6, p. 3102–11, 15 set. 1995.

CABRAL, M.; O’GRADY, J.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite Immunology**, v. 14, n. 5, p. 531–539, 1992.

CAIAFFA, W. T. et al. The urban environment from the health perspective: the case of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 21, n. 3, p. 958–967, 2005.

CAVASSANI, K. A. et al. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology**, v. 114, n. 2, p. 235–245, 2005.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, n. 1–2, p. 67–75, 2005.

CHARMOY, M. et al. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. **PLoS Pathogens**,

v. 6, n. 2, 2010.

CHU, D. K. et al. Indigenous enteric eosinophils control DCs to initiate a primary Th2 immune response in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 8, p. 1657–1672, 2014.

COHEN, H. B.; MOSSER, D. M. Extrinsic and intrinsic control of macrophage inflammatory responses. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 5, p. 913–919, 2013.

COLLIN, N. et al. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 5, 2009.

COLLINS, P. D. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 4, p. 1169–1174, 1995.

CORREA, A. et al. Evaluation of transformation growth factor beta(1), interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3–4, p. 267–274, 2007.

COURA-VITAL, W. et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, 2011.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314–1320, 2002.

CUSACK, N. J.; HOURANI, S. M. 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine: a potent inhibitor of human platelet aggregation. **British Journal of Pharmacology**, v. 72, n. 3, p. 443–7, 1981.

DANTAS-TORRES, F. **The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)**

(Acari: Ixodidae): From taxonomy to control *Veterinary Parasitology*, 2008.

DANTAS-TORRES, F. et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitology Research**, v. 106, n. 4, p. 857–860, 2010.

DANTAS-TORRES, F. **Ticks as vectors of *Leishmania* parasites** *Trends in Parasitology*, 2011.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. **Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 2006.

DAY, M. J. **Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: A review and analysis of pitfalls in interpretation** *Veterinary Parasitology*, 2007.

DE ALMEIDA LEAL, G. G. et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p. 472–482, 2014.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA, E. et al. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 8, p. 850–857, 2008.

DE ARAÚJO, V. E. M. et al. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 11, p. e2540, 2013.

DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKY, C. I. **The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection** *Frontiers in Immunology*, 2012.

DE OLIVEIRA CARDOSO, F. et al. Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 12, p. 1933–40, 2010.

DEENICK, E. K.; HASBOLD, J.; HODGKIN, P. D. Switching to IgG3, IgG2b, and IgA is

division linked and independent, revealing a stochastic framework for describing differentiation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 9, p. 4707–14, 1999.

DÉRUAZ, M. et al. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 9, p. 2019–2031, 2008.

DÉRUAZ, M. et al. Evasin-4, a tick-derived chemokine-binding protein with broad selectivity can be modified for use in preclinical disease models. **FEBS Journal**, v. 280, n. 19, p. 4876–4887, 2013.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 276, 2012.

EBRAHIMPOOR, S.; PAKZAD, S. R.; AJDARY, S. IgG1 and IgG2a profile of serum antibodies to Leishmania major amastigote in BALB/c and C57BL/6 mice. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 12, n. 4, p. 361–367, 2013.

ELISIA, I. et al. DMSO represses inflammatory cytokine production from human blood cells and reduces autoimmune arthritis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, 2016.

ESCH, K. J. et al. Programmed Death 1-Mediated T Cell Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Impairs Phagocyte Function. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 11, p. 5542–5550, 2013.

FERREIRA, B. R. et al. Antigens from Rhipicephalus sanguineus ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 35–48, 2003.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 434–439, 1999.

FOLLADOR, I. et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of

Leishmania braziliensis infection. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34, n. 11, p. E54–E58, 2002.

FRANCISCHETTI, I. M. . The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, v. Volume, n. 14, p. 2051, 2009.

FUENTES, E. et al. Inhibition of platelet activation and thrombus formation by adenosine and inosine: Studies on their relative contribution and molecular modeling. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

GEIGY, C. et al. Multiple myeloma in a dog with multiple concurrent infectious diseases and persistent polyclonal gammopathy. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n. 1, p. 47–54, 2013.

GLENNIE, N. D. et al. Skin-resident CD4+ T cells protect against Leishmania major by recruiting and activating inflammatory monocytes. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 4, p. e1006349, 2017.

GOLLOB, K. J. et al. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: A balancing act between protection and pathology. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 10, p. 1338–1343, 2008.

GONCALVES, R. et al. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 6, p. 1253–1265, 2011.

GONÇALVES, R.; MOSSER, D. M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. In: **Current Protocols in Immunology**. [s.l: s.n.]. p. 14.1.1-14.1.16.

GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite Leishmania. **Parasitology**, v. 130, n. S1, p. S27, 2005.

GROBLEWSKA, M. et al. **The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer***Folia Histochemica et*

Cytobiologica, 2012.

HARHAY, M. O. et al. **Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil** **Trends in Parasitology**, 2011.

HASKO, G.; PACHER, P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 3, p. 447–455, 2007.

HEUKELBACH, J. et al. High prevalence of intestinal infections and ectoparasites in dogs, Minas Gerais State (southeast Brazil). **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1913–1921, 2012.

IKUTANI, M. et al. Identification of Innate IL-5-Producing Cells and Their Role in Lung Eosinophil Regulation and Antitumor Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 2, p. 703–713, 2012.

INIESTA, V. et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 3, p. 113–118, 2002.

JANKOVIC, D. et al. Conventional T-bet⁺ Foxp3⁻ Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 273–283, 2007.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–45, 1 set. 2006.

KITAGAKI, K. et al. Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 1628–1635, 2006.

KOUTINAS, A F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 2, p. 527–38, 2014.

- KROPF, P. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **The FASEB Journal**, 2005.
- LA FLAMME, A. C.; SCOTT, P.; PEARCE, E. J. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 7, p. 339–345, 2002.
- LAGE, R. S. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 115, n. 1–2, p. 135–145, 2007.
- LEIGHTON, S. E. J. et al. Prevalence and prognostic significance of tumor-associated tissue eosinophilia in nasopharyngeal carcinoma. **Cancer**, v. 77, n. 3, p. 436–440, 1996.
- LINDEN, J. Regulation of Leukocyte Function by Adenosine Receptors. **Advances in Pharmacology**, v. 61, p. 95–114, 2011.
- LOPEZ, R. et al. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B**, v. 43, n. 8, p. 469–74, 1996.
- LOUIS, H. et al. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. **Hepatology**, v. 28, n. 6, p. 1607–1615, 1998.
- MAIZELS, R. M. **Infections and allergy - Helminths, hygiene and host immune regulation** **Current Opinion in Immunology**, 2005.
- MAJEWSKI, I. J. et al. A mutation in the translation initiation codon of Gata-1 disrupts megakaryocyte maturation and causes thrombocytopenia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 38, p. 14146–51, 2006.
- MENEZES-SOUZA, D. et al. Higher expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 chemokines in the skin associated with parasite density in canine visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. 2007.

MOCHIZUKI, M. et al. IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 1, p. 60–8, 1998.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 135, n. 4, p. 2785–2789, 1985.

MUNDELL, S. J.; BENOVIC, J. L.; KELLY, E. A Dominant Negative Mutant of the G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 Selectively Attenuates Adenosine A2 Receptor Desensitization. **Molecular Pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 991–998, 1997.

MUNDELL, S.; KELLY, E. Adenosine receptor desensitization and trafficking. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1808, n. 5, p. 1319–28, 2011.

NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 31, p. 21491–21494, 1999.

NEI, Y. et al. GATA-1 regulates the generation and function of basophils. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. 18620–18625, 2013.

NOVAIS, F. O. et al. Cytotoxic T Cells Mediate Pathology and Metastasis in Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, 2013.

NOVAIS, F. O. et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 8, p. 1288–1296, 2014.

O'NEAL, S. E. et al. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 1, p. 142–148, 2007.

OHASHI, Y. et al. Significance of tumor associated tissue eosinophilia and other inflammatory cell infiltrate in early esophageal squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**, v. 20, n. 5, p. 3025–3030, 2000.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1 α and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 6, p. 705–716, 2008.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Deconstructing tick saliva: Non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10960–10969, 2011.

PARANHOS, M. et al. Development of eosinophilia in dogs intradermally inoculated with sand fly saliva and *Leishmania* (*Leishmania*) Chagasi stationary-phase promastigotes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 2, p. 249–251, 1993.

PAZ, G. F. et al. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case–control study in dogs from a Brazilian endemic area. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 97, n. 2, p. 131–133, nov. 2010.

PAZ, G. F. et al. Ectoparasites and anti-*Leishmania* antibodies: Association in an observational case-control study of dogs from a Brazilian endemic area. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 112, n. 1–2, p. 156–159, 2013.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008.

PIMENTA, P. F. P.; SARAIVA, E. M. B.; SACKS, D. L. The comparative fine structure and

surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. **Experimental Parasitology**, v. 72, n. 2, p. 191–204, 1991.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–235, 1994.

PUENTES, S. M. et al. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 143, n. 11, p. 3743–3749, 1989.

QUINNELL, R. J. et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 9, p. 1421–4, 2001.

QUINNELL, R. J. et al. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, v. 55, n. 1, p. 23–28, 2003.

RAMACHANDRA, R. N.; WIKEL, S. K. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. **Journal of medical entomology**, v. 29, n. 5, p. 818–826, 1992.

RAVIN, K. A.; LOY, M. **The eosinophil in infection Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, 2015.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The Regulation of Immunity to *Leishmania Major*. **Annual Review of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 151–177, 1995.

REIS, A. B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3–4, p. 102–116, 2006.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 87–95, 2009.

RODRIGUEZ-SOSA, M. et al. Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. **Cellular Immunology**, v. 242, n. 2, p. 61–71, 2006.

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

ROGERS, M. E. et al. *Leishmania infantum* proteophosphoglycans regurgitated by the bite of its natural sand fly vector, *Lutzomyia longipalpis*, promote parasite establishment in mouse skin and skin-distant tissues. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 11, p. 875–879, 2010.

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 0818–0825, 2007.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 147–174, 2006.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002.

SANDERSON, C. J. Interleukin-5, Eosinophils, and Disease. **Blood**, v. 79, n. 12, p. 3101–3109, 1992.

SCHENA, F. et al. Dependence of Immunoglobulin Class Switch Recombination in B Cells on Vesicular Release of ATP and CD73 Ectonucleotidase Activity. **Cell Reports**, v. 3, n. 6, p. 1824–1831, 2013.

SCHOELER, G. B.; MANWEILER, S. A.; WIKEL, S. K. *Ixodes scapularis*: Effects of Repeated Infestations with Pathogen-Free Nymphs on Macrophage and T Lymphocyte Cytokine Responses of BALB/c and C3H/HeN Mice. **Experimental Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 239–248, 1999.

SCOTT, P. et al. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer

protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **The Journal of experimental medicine**, v. 168, n. 5, p. 1675–84, 1988.

SCOTT, P. et al. Early IL-4 production does not predict susceptibility to *Leishmania major*. **Exp Parasitol**, v. 84, n. 2, p. 178–187, 1996.

SCOTT, P. Development and regulation of cell-mediated immunity in experimental leishmaniasis. **Immunologic research**, v. 27, n. 2–3, p. 489–498, 2003.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.

SECUNDINO, N. F. C. et al. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 6, p. 928–938, 2005.

SHETH, S. et al. **Adenosine receptors: Expression, function and regulation** *International Journal of Molecular Sciences*, 2014.

SHIRLEY, S. W.; STEWART, B. H.; MIRELMAN, S. Dimethyl sulfoxide in treatment of inflammatory genitourinary disorders. **Urology**, v. 11, n. 3, p. 215–220, 1978.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. **Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

SPÄTH, G. F. et al. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9536–41, 5 ago. 2003.

SUGIYAMA, D. et al. Differential context-dependent effects of friend of GATA-1 (FOG-1)

on mast-cell development and differentiation. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 1924–1932, 2008.

SUMMERS, R. W. Trichuris suis therapy in Crohn's disease. **Gut**, v. 54, n. 1, p. 87–90, 2005.

SWARTZ, J. M. et al. Schistosoma mansoni infection in eosinophil lineage-ablated mice. **Blood**, v. 108, n. 7, p. 2420–2427, 2006.

SZABÓ, M. P. J. et al. Antibody and blood leukocyte response in Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) tick-infested dogs and guinea pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 49–59, 2003.

SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H. Sequential histopathology at the Rhipicephalus sanguineus tick feeding site on dogs and guinea pigs. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, n. 11, p. 915–928, 1999.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. Salivary gland lysates from the sand fly Lutzomyia longipalpis enhance Leishmania infectivity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 239, n. 4845, p. 1306–1308, 1988.

TO, P.; LINDEN, J. MOLECULAR APPROACH TO ADENOSINE RECEPTORS : Receptor-Mediated Mechanisms of Tissue Protection. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 775–787, 2001.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. **Immune response to leishmania: Paradox rather than paradigm** **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2007.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, 2014.

WAMBRE, E.; JAMES, E. A.; KWOK, W. W. **Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy** **Current Opinion in Immunology**, 2012.

WEI, X. Q. et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 408–411, 1995.

WHO. Control of the Leishmaniases. World Health Organization, Geneva. **Tech Rep Ser**, v. 949, n. March, p. 22–26, 2010.

WHO. **GHO Leishmaniasis**. Disponível em:

<<http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISH?lang=en>>. Acesso em: 2 jul. 2017a.

WHO. **WHO | Leishmaniasis**. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 2 jul. 2017b.

WIKEL, S. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: Host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. NOV, 2013.

WIKEL, S. K.; ALARCON-CHAIDEZ, F. J. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 3–4, p. 275–287, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly epidemiological record**, v. 91, n. 5, p. 287–96, 2016.

YU, C. et al. Targeted Deletion of a High-Affinity GATA-binding Site in the GATA-1 Promoter Leads to Selective Loss of the Eosinophil Lineage In Vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 11, p. 1387–1395, 2002.

ZIJLSTRA, E. E. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 464, 23 ago. 2016.

Anexo 1



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 336 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Estudo de aspectos imunológicos relacionados à resistência e suscetibilidade na coinfeção entre *Leishmania infantum*, helmintos e/ou ectopar", que tem como responsável Ricardo Gonçalves, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 20/05/2014. Este certificado espira-se em 20/05/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 336 / 2013, related to the Project entitled "Immunological aspects of resistance and susceptibility in *Leishmania infantum* co-infection between, helminths and / or ectoparasites", under the supervision of Ricardo Gonçalves, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 20/05/2014. This certificates expires in 20/05/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG
 Belo Horizonte, 20/05/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 2



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 21 / 2016, relativo ao projeto intitulado "Papel dos eosinófilos na patogênese da leishmaniose experimental murina", que tem como responsável Ricardo Gonçalves, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 05/04/2016. Este certificado espira-se em 05/04/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 21 / 2016, related to the Project entitled "Role of eosinophils on the pathogenesis of murine experimental leishmaniasis", under the supervision of Ricardo Gonçalves, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 05/04/2016. This certificate expires in 05/04/2021.

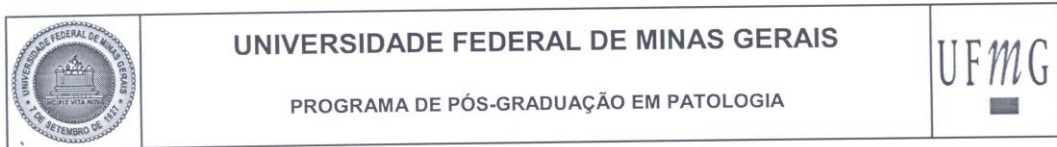
Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 05/04/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 3



FOLHA DE APROVAÇÃO

Estudo dos aspectos imunológicos relacionados à resistência e suscetibilidade na coinfeção entre *Leishmania* spp., helmintos e/ou ectoparasitos.


GREGÓRIO GUILHERME ALMEIDA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 03 de agosto de 2017, pela banca constituída pelos membros:



 Prof(a). Ricardo Gonçalves - Orientador
 UFMG


 Prof(a). Luis Carlos Crocco Afonso
 UFOP


 Prof(a). Luara Isabela dos Santos
 (CPqRR - FIOCRUZ)


 Prof(a). Ricardo Nascimento Araújo
 UFMG


 Prof(a). Alexandre Barbosa Reis
 UFOP


 Prof(a). Andrea Teixeira de Carvalho
 Fiocruz

Belo Horizonte, 3 de agosto de 2017.