



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Núcleo de Medicina Tropical

Análise da Interação de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* com Células Dendríticas Humanas

LUCAS FERREIRA CAXANGÁ RODRIGUES

Brasília – DF, 2020

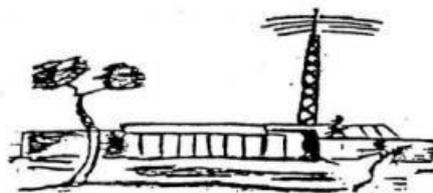
Análise da Interação de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* com Células Dendríticas Humanas

LUCAS FERREIRA CAXANGÁ RODRIGUES

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Cecília Beatriz Fiuza Favali

Co-orientadora: Dr^a. Sarah de Athayde Couto Falcão



Brasília, DF

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fa Ferreira Caxangá Rodrigues, Lucas
Análise da Interação de *Leishmania braziliensis* e
Leishmania infantum com Células Dendríticas Humanas / Lucas
Ferreira Caxangá Rodrigues; orientador Cecília Beatriz
Fiuza Favali; co-orientador Sarah de Athayde Couto Falcão.
-Brasília, 2020. 136 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina Tropical) -
Universidade de Brasília, 2020.

1. Células Dendríticas. 2. *Leishmania braziliensis*. 3.
Leishmania infantum. 4. Relação Parasito-Hospedeiro. 5.
Doença Tropical Negligenciada . I. Fiuza Favali, Cecília
Beatriz, orient. II. de Athayde Couto Falcão, Sarah, co
orient. III. Título.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Lucas Ferreira Caxangá Rodrigues

Análise da Interação de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* com
Células Dendríticas Humanas

Universidade de Brasília

Medicina Tropical: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

Data da defesa da dissertação

11 de fevereiro de 2020

Banca Examinadora

Profa. Dr^a Cecília Beatriz Fiuza Favali - Universidade de Brasília

(Presidente)

Profa. Dr^a Carla Nunes de Araújo – Universidade de Brasília

(Banca Externa)

Prof. Dr. André Moraes Nicola – Universidade de Brasília

(Banca Interna)

Profa. Dr^a Livia Ribeiro Mendonça – Universidade de Brasília

(Suplente)

*“Tentaram nos enterrar,
mas não sabiam
que éramos sementes!”*

Autor desconhecido.

Dedicatória

Dedico esse trabalho à senhora Hermelina Pereira Caxangá Rodrigues, minha mãe, que a cargo de toda sua generosidade e amor incondicional, abdicou de toda sua individualidade e conforto, priorizando a educação e formação de caráter, para o desenvolvimento como ser humano, do meu irmão e eu. Apesar de todas as dificuldades, se dedicou integralmente a nossa formação acadêmica e pessoal, o que me leva a não dedicar somente esse trabalho, mas também esse título de mestre. Por fim, dedico à minha avó Maria das Dores Caxangá (*In memorian*), que junto à minha mãe, representa à mim, a personificação de força, generosidade e idoneidade.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Porf^a. Dra. Cecília Favali, que me acolheu nessa empreitada e teve a confiança de me orientar em algo tão importante em minha vida. Também à minha co-orientadora Dra. Sarah Falcão, que foi peça fundamental para o meu desenvolvimento acadêmico, e que em parte devo a ela a minha trajetória dentro da Universidade.

Gostaria de agradecer à MSc. Elane Maciel, hoje companheira de laboratório, mas a quem devo o conhecimento da vida profissional. À Giulia Lopes, que junto com a Elane, dividiu essa etapa comigo, agradeço pelo companheirismo e a fonte de apoio em todos momentos. Às companheiras de laboratório, Fabiana Andrade e Livia Mendonça, que dividiram todas suas experiências e companheirismo nos mais diversos momentos. Com essa equipe formamos uma amizade e parceria, que compensou todas as horas de trabalho e esforço dedicado. Sem esquecer a equipe integrante do Laboratório Biologia do Gene, formado por pessoas incríveis que tornaram o ambiente de trabalho muito melhor.

Agradeço imensamente minha família, que está crescendo com a chegada de minha sobrinha Maria Angelina, que com todas as limitações me deram suporte e compreenderam a importância deste momento, antes mesmo de mim, sendo meu porto seguro, sem eles não seria possível.

Aos meus amigos que são tantos, que não seria possível nomeá-los todos, agradeço por me incentivarem e dividirem diversos momentos marcantes, esse sendo talvez o mais importante, e por compreender a minha ausência.

Por fim, à Universidade de Brasília, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio e Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) pelo financiamento.

Ilustrações

Figuras

Figura 1. Mapa epidemiológico da distribuição mundial da leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea	20
Figura 2. Mapa epidemiológico de distribuição no Brasil da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar	22
Figura 3. Formas amastigotas e promastigotas da <i>Leishmania</i>	27
Figura 4. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> no hospedeiro humano	32
Figura 5. Patogênese e regulação da leishmaniose	40
Figura 6. Células Dendríticas	46
Figura 7. Desenho experimental	49
Figura 8. Figura representativa da estratégia de análise para caracterização fenotípica de DCs.....	57
Figura 9. Figura representativa da estratégia de análise para caracterização fenotípica de DCs <i>bystanders</i> e infectadas	59
Figura 10. Taxa de infecção por <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	60
Figura 11. Expressão de CD1a e CD11c na DCs infectadas por <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	61
Figura 12. Expressão de CD1a e CD11c em DCs <i>bystanders</i> e infectadas	63
Figura 13. Expressão de CD209 em DCs após co-cultura com <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	64
Figura 14. Expressão de CD209 em células dendríticas <i>bystanders</i> e infectadas.....	65
Figura 15. Expressão de moléculas relacionadas com a maturação e a migração de DCs após co-cultura com <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	67
Figura 16. Expressão de moléculas relacionada com a maturação e a migração de células dendrítica <i>bystanders</i> e infectadas.....	69
Figura 17. Expressão de HLA-DR e moléculas co-estimuladoras CD40, CD86, CD80 e da molécula inibidora PD-L1 em DCs	72
Figura 18. Expressão de HLA-DR e moléculas co-estimuladoras CD40, CD86, CD80 e da molécula inibidora PD-L1 em células dendríticas <i>bystanders</i> e infectadas	76

Quadro

Quadro 1. Estratégia para marcação fenotípica em células dendríticas.	55
---	----

Lista de abreviaturas

BM-DCs – Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea

cDC – Células Dendríticas Clássicas

CFSE – Éster de Succinimidil Carboxifluoresceína

CLRs – Receptores de Lectina Dependentes de Cálcio

DC-SIGN – *Dendritic-Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin*

DTN – Doenças Tropical Negligenciadas

GPI – Glicosilfosfatidinositol

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

HLA-DR – *Human Leukocyte Antigen* (Antígeno Leucitário Humano)

IFN – Interferon

IL – Interleucina

LC – Leishmaniose Cutânea

LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa

LM – Leishmaniose Mucocutânea

LPG – Lipofosfoglicano

LPS – Lipopolissacarídeo

LT – Leishmaniose Tegumentar

LV – Leishmaniose Visceral

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

NET – Redes Extracelular

NM – Novo Mundo

NOS - Espécies reativas de nitrogênio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAMPs – Padrões Moleculares Associado a Patógenos

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico

pDC – Células Dendríticas Plasmocitóides

PNMs – Polimorfonucleares

PPG – Proteofosfatoglicano

PRRs – Receptores de Reconhecimento Padrão

RNAi – RNA de interferência

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SLA – Antígeno solúvel

TLRs – *Toll-like* receptor (Receptor do tipo Toll)

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

VM – Velho Mundo

Órgãos Financiadores

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Apoio e Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF)

Sumário

1. Introdução.....	16
1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas	16
1.2. Leishmaniose.....	17
1.2.1. Formas clínicas	17
1.2.2. Epidemiologia.....	19
1.2.3. Agente Etiológico	22
1.2.4. Vetor.....	28
1.2.5. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	29
1.3. Reconhecimento da <i>Leishmania</i>	32
1.5. Células Dendríticas.....	41
2. Justificativa	47
3. Objetivos.....	48
3.1. Objetivo Geral	48
3.2. Objetivo específicos	48
4. Desenho Experimental	49
5. Metodologia	50
5.1. Parasito	50
5.2. Obtenção de células mononucleares humanas de sangue total periférico.....	50
5.3. Separação de células CD14+ por coluna magnética	51
5.4. Diferenciação <i>in vitro</i> de células dendríticas a partir de monócitos.....	52
5.5. Infecção de células dendríticas com <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	53
5.5.1. Marcação de <i>Leishmania</i> com CFSE e infecção de células dendríticas.....	53
5.6. Marcação de moléculas de superfície.....	54
5.7. Análise Estatística.....	55
6. Resultados.....	56
6.1. Caracterização fenotípica de células dendríticas.....	56
6.2. Caracterização de células dendríticas <i>bystanders</i> e infectadas.....	58
6.3. Quantificação da taxa de infecção e carga parasitária em células dendríticas infectadas por <i>Leishmania</i> por citometria de fluxo	59
6.4. Caracterização de diferenciação em células dendríticas após a co-cultura com <i>Leishmania</i>	60
6.5. Caracterização de diferenciação em células dendrítica <i>bystanders</i> e infectadas em co-cultura com <i>Leishmania</i>	62

6.6.	Expressão do receptor DC-SIGN em células dendríticas em co-cultura com <i>Leishmania</i>	63
6.7.	Expressão do receptor DC-SING em células dendríticas <i>bystanders</i> e infectadas em co-cultura com <i>Leishmania</i>	64
6.8.	Expressão de moléculas relacionadas a maturação e a migração de células dendríticas co-cultura com <i>Leishmania</i>	65
6.9.	Expressão de moléculas relacionadas com a maturação e a migração de células dendríticas <i>bystanders</i> e infectadas co-cultura com <i>Leishmania</i>	67
6.10.	Expressão de moléculas relacionadas à ativação e exaustão de linfócitos em células dendríticas em co-cultura com <i>Leishmania</i>	70
6.10.1.	Expressão de HLA-DR em células dendríticas	70
6.10.1.	Expressão das moléculas co-estimuladoras e inibidora em células dendríticas	70
6.11.	Expressão de moléculas relacionadas à ativação e exaustão de linfócitos em células dendríticas <i>bystanders</i> e infectadas em co-cultura com <i>Leishmania</i>	73
6.11.1.	Expressão de HLA-DR em células dendríticas <i>bystander</i> e infectadas.....	73
6.11.2.	Expressão das moléculas co-estimuladoras e inibidora em células dendríticas <i>bystanders</i> e infectadas	73
7.	Discussão	77
8.	Conclusão.....	88
9.	Referência Bibliográfica.....	89
10.	Anexo	110
	110
11.	Apêndice	111
11.1.	Apêndice 1.....	111
11.2.	Apêndice 2.....	112
11.3.	Apêndice 3.....	113
11.4.	Apêndice 4.....	114

Resumo

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, que está associada a população de vulnerabilidade, com baixo poder socioeconômico, que possui duas formas clínicas principais, leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose cutânea (LC). Sendo que no Brasil os protozoários das espécies, *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*, são os principais agentes etiológicos responsáveis pela LV e LC, respectivamente. A *Leishmania* no Brasil é transmitida através do vetor do gênero *Lutzomyia*, que no momento da hematofagia inocula os parasitos no hospedeiro humano, nas formas promastigotas metacíclicas, que podem ser reconhecidas por células dendríticas (DCs). As DCs são de extrema importância, pois conectam a imunidade inata à adaptativa, por sua capacidade de ativar linfócitos e mediar a resposta imune, protegendo o hospedeiro na infecção causada pelo parasito. Porém, já foi observado que a *Leishmania* é capaz de modular a resposta destas células interferindo na condução da resposta imune e, por consequência estabelece a infecção e a persistência do mesmo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a infecção de DCs por *L. infantum* e *L. braziliensis*, e se estas espécies de *Leishmania* modulam a expressão de moléculas de superfícies em DCs. Para isso, foram utilizados monócitos do sangue periférico de humanos, provenientes de *buffy coats*, cedidas pela Fundação Hemocentro de Brasília. Os monócitos foram submetidos a indução da diferenciação em DCs em cultura suplementada com IL-4 e GM-CSF. Após 7 dias, as DCs foram incubadas com *L. infantum* ou *L. braziliensis*, previamente marcadas com CFSE. Depois de 24h, as moléculas de superfície de DCs foram marcadas com anticorpos e adquiridas por citometria de fluxo. Por citometria de fluxo foi observado que *L. braziliensis* e *L. infantum* tiveram capacidade de infectar as DCs. As espécies de *L. braziliensis* e *L. infantum* não mostraram capacidade de modular a expressão de moléculas de caracterização fenotípicas de diferenciação em DCs com as moléculas CD1a e CD11c. Porém, *L. infantum* induziu um perfil de migração em DCs pelo aumento da expressão da molécula CCR7. Além disso, *L. infantum* induziu um perfil de maturação observado pelo aumento da expressão da molécula CD83 e da molécula co-estimuladora CD80 em DCs infectada apenas. Contudo não induziram a alteração da expressão de outras moléculas relacionadas a apresentação de antígenos como, HLA-DR, CD40 e CD86, nem a expressão da molécula inibidora PD-L1. Já *L. braziliensis* não mostrou o mesmo comportamento que *L. infantum*, pois não induziu a alteração da expressão de nenhuma destas moléculas em DCs. Diante disso DCs infectadas por *L. infantum* adquirem um perfil de migração, maturação e com maior capacidade de ativar linfócitos T. O mesmo não ocorre em células dendríticas infectadas por *L. braziliensis*.

Palavras chave: Células Dendrítica, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* e Relação Parasito-Hospedeiro.

Abstract

The leishmaniasis is a neglected tropical disease, which is associated with the vulnerable population, with low socioeconomic power. The leishmaniasis has two main clinical forms, a Visceral Leishmaniasis (VL) and a Cutaneous Leishmaniasis (LC). In Brazil, the protozoa *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* are the main etiological agents responsible for VL and LC, respectively. The *Leishmania* in Brazil is transmitted through a vector of the genus *Lutzomyia*, the vector in the time of hematophagy, it inoculates metacyclic forms of parasite in the human host, that forms can be recognized by dendritic cells (DCs). As DCs are extremely important, they connect innate and adaptive immunity, due to their ability to activate lymphocytes and mediate the immune response that protects the hosts of parasite's infection. However, *Leishmania* has already managed to show modular responses to these cells that interfere with the conduction of the immune response, and as a consequence to establish an infection and persistence of the parasite. So, the aim of this work was to analyze the infection of DCs by *L. infantum* or *L. braziliensis*, and if these *Leishmania* species modulate the expression of surface molecules in DCs. For this, we obtained DCs derived from monocytes of human peripheral blood, buffy coat, provided by Fundação Hemocentro de Brasília, which were subjected to differentiation of culture supplemented by IL-4 and GM-CSF. After 7 days, the DCs were incubated with *L. infantum* or *L. braziliensis*, stained previously with CFSE. After 24h, the surface molecules of DCs were marked and acquire by flow cytometry. The *L. braziliensis* and *L. infantum* were capable of infecting DCs by infection rate by flow cytometry. As *L. braziliensis* and *L. infantum* are not able to modulate the expression of phenotypic characterization molecules in DCs, CD1a and CD11c. However, *L. infantum* induces a profile of migration in DCs by increasing the expression of the CCR7 molecule. In addition, *L. infantum* induced a maturation profile by the expression of the CD83 maturation molecule and the CD80 co-stimulatory molecule, only in infected DCs, but did not significantly alter the expression of other molecules related to the presentation of antigens such as, HLA-DR, CD40 and CD86, as well as the expression of the inhibition molecule PD-L1. *L. braziliensis* did not exhibit the same behavior as *L. infantum*, as it does not alter the significant form of expression of any molecule in DCs. Therefore, the DCs infected by *L. infantum* acquire a migration and maturation profile, but it is not possible to observe the same interaction of DCs and *L. braziliensis*.

Keywords: Dendritic cells, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum* and host-parasite relationship.

1. Introdução

1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas

O termo “doenças tropicais negligenciadas” (DTNs) foi denominado para designar as 17 doenças que estão relacionadas às regiões tropicais e subtropicais, nas quais estão associadas às questões geográficas, econômicas e sociais(1). As DTNs estão diretamente relacionadas às populações marginalizadas, em situação de extrema pobreza e desigualdade. Normalmente estas regiões têm fraco poder socioeconômico, de forma que as DTNs impactam na morbidade e mortalidade da população mundial, e ainda, as pessoas que são acometidas por estas doenças sofrem com o estigmas e preconceitos(1).

Junto ao “*Millennium Development Goals*” (Objetivos de Desenvolvimento do Milênio)(2), a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2003, começou a desenvolver um plano de combate às DTNs. Entre os anos de 2003 a 2007 foi desenvolvido o “*Global plan to combat neglected tropical diseases 2008-2015*” (plano global para o combate das doenças tropicais negligenciadas), que tinha como objetivo diminuir ou erradicar estas doenças por meio de cinco estratégias: prevenção por quimioterápicos; intensificação da gestão de casos; controle vetorial; abastecimento seguro de água, saneamento e higiene; e saúde veterinária.

Então, em 2015, foi implementada a “*Agenda for Sustainable for Development*” (agenda para o desenvolvimento sustentável), tendo como um dos objetivos acabar com a epidemia de DTNs e outras doenças até 2030(3). Sendo que em 2012, a OMS iniciou o *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases* (programa especial para pesquisa e treinamento em doenças tropicais), que constatou maior interesse e investimentos, em

pesquisa e combate, de doenças como Malária, Tuberculose e HIV/AIDS. Porém, outras DTNs como a doença de Chagas e leishmaniose não receberam a mesma atenção, tornando-se matérias prioritárias para o recebimento de investimentos e desenvolvimento de pesquisas(4).

1.2. Leishmaniose

1.2.1. Formas clínicas

A leishmaniose é uma antropozoonose que acomete principalmente mamíferos vertebrados, que têm como agente etiológico, um protozoário do gênero *Leishmania*. Em humanos a leishmaniose possui duas formas clínicas principais: a leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). É importante destacar que os sinais e sintomas clínicos da doença estão, normalmente, relacionados à resposta imunológica do hospedeiro frente ao parasito(5).

A LV ou Calazar, está especialmente associada ao acometimento de crianças e indivíduos imunocomprometidos. Na fase inicial, a LV caracteriza-se por febre, palidez na pele e mucosas, com uma possível hepatoesplenomegalia. Ainda pode evoluir para febre irregular, emagrecimento progressivo e o aumento da hepatoesplenomegalia, nesta fase geralmente há o comprometimento dos órgãos atingidos. Caso o paciente não tenha o tratamento adequado, evolui para um quadro de febre constante e a falência dos órgãos comprometidos, ocasionando um estado de desnutrição, edemas dos membros inferiores, hemorragia e icterícia, que progride ao óbito(6).

Na LV as *Leishmanias* são inicialmente inoculadas na derme pelo vetor e, então, estes parasitos são fagocitados por células da resposta imune inata,

que migram para órgãos internos, possivelmente este mecanismo é fundamental para a rápida manifestação hepática. Nas primeiras quatro semanas após a infecção, há uma rápida proliferação dos parasitos no fígado que, posteriormente, acomete o baço. Ao infectar o fígado, as *Leishmanias* proliferam-se nas células de *Kupffer*, o que está associado à diminuição de uma resposta imune pró-inflamatória, e o aumento do perfil anti-inflamatório(7).

Posteriormente há o recrutamento de neutrófilos, monócitos, linfócitos CD4+ e CD8+, com formação de granulomas hepáticos, promovendo o perfil pró-inflamatório da resposta imunológica, que favorece a eliminação do parasito. Enquanto no baço a variação entre as respostas imunes pró e anti-inflamatórias afeta a ação de células apresentadoras de antígenos (APCs) na ativação de linfócitos T. Como consequência, gera intensa proliferação da *Leishmania*, que leva o aumento dos órgãos afetados(7).

Na LT, a doença pode ser dividida em três principais formas clínicas: leishmaniose cutâneo difusa (LCD), leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LM) e leishmaniose cutânea ou leishmaniose cutânea localizada (LC ou LCL). Os casos de LCD são raros, pois está relacionada às características específicas do paciente, no qual sua resposta imune não promove a eliminação do parasito, levando à disseminação do protozoário pelo tecido cutâneo. A LM afeta a região das mucosas, normalmente da face, ocasionando a destruição das fossas nasais, lábio e palato nos hospedeiros infetados. Esta intensa destruição tecidual é em decorrência de uma resposta imunológica exacerbada em um perfil Th1 com a presença de células T CD8+(7,8).

A LC se caracteriza por lesões limitadas na pele normalmente em regiões únicas, com bordas bem definidas, chamadas de *úlceras de Baurú*. Estas lesões são devido à resposta imune celular do hospedeiro, que normalmente se encaminha para a cura espontânea. A LC é a forma clínica

mais comum da doença, correspondendo à mais de 90% dos casos de leishmaniose(7,8).

1.2.2. Epidemiologia

A OMS destaca as LV e LC, como as formas clínicas mais comuns da doença com altas taxas de endemicidade, principalmente em países localizados, na África, Ásia, Oriente Médio e América Latina(9). Em 2018, os casos de leishmaniose foram notificados em 97 países, dos quais 8 países foram endêmicos para LV, sendo 21 endêmicos apenas para LC e 68 países endêmicos para ambas formas clínicas LV e LC(10).

No mesmo ano, foram notificados 16.976 casos de LV, e sete países foram responsáveis por mais de 90% dos casos reportados: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul. Contudo, foram reportados 257.952 de novos casos de LC, dos quais cerca de 88% dos casos foram relatados em 11 países: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, a República Islâmica do Irã, Iraque, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria e Tunísia(10) (Figura 1).

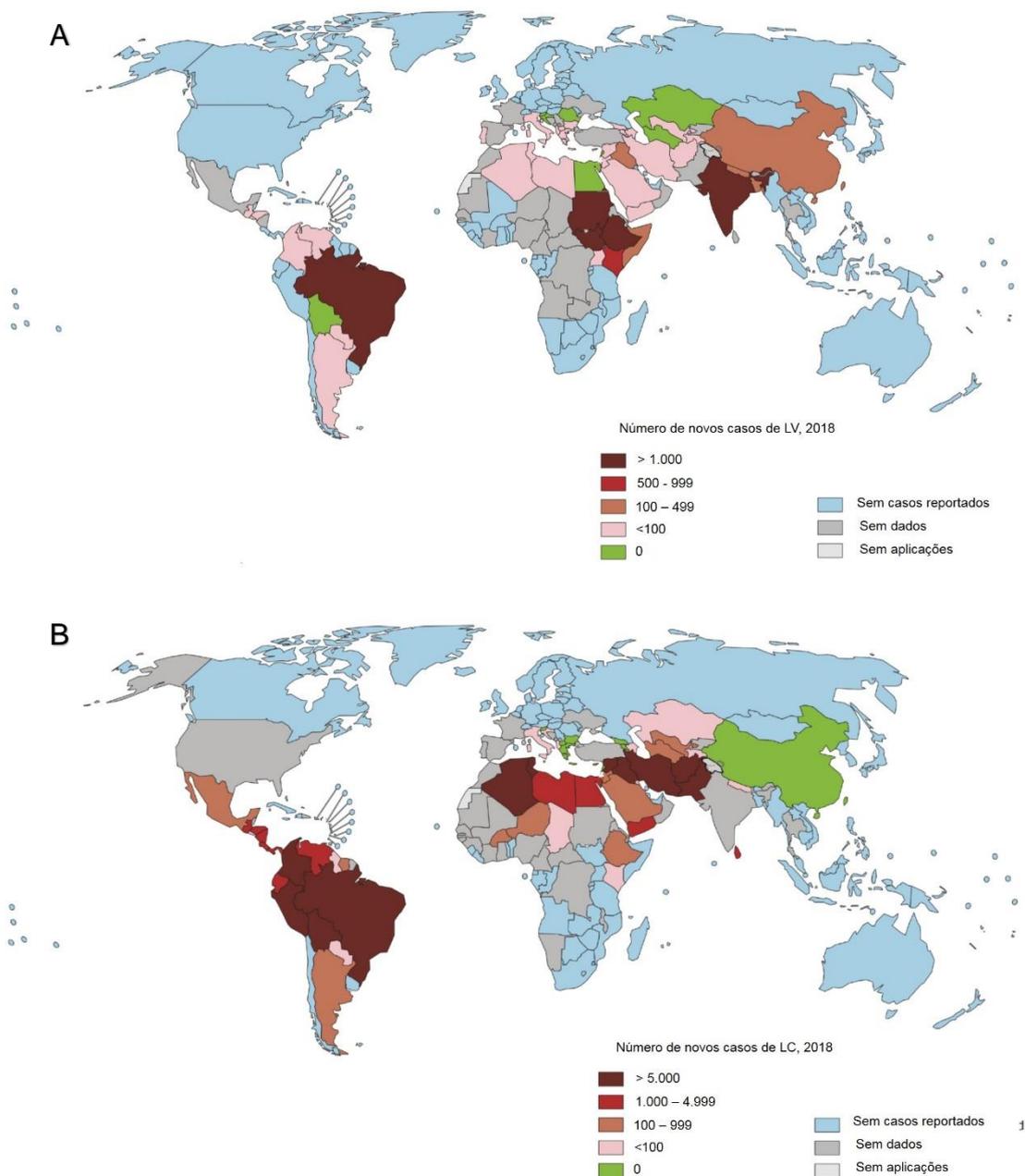


Figura 1. Mapa epidemiológico da distribuição mundial da leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea. (A) O mapa apresenta a distribuição mundial da leishmaniose visceral, representando o número de novos casos reportados em 2018, apresentando o status de endemicidade por país. (B) O mapa apresenta a distribuição mundial da leishmaniose cutânea, o número de novos casos reportados em 2018, bem como a distribuição e o status de endemicidade de cada país. Figura adaptada da Organização Mundial da Saúde, Leishmaniose, 2020.

Nas Américas, em 2018, 12 países foram endêmicos para LV, sendo registrado 3.562 novos casos, que apresentou uma redução de 16% em relação a 2017. Apesar da redução do número de casos de LV, o Brasil apresentou 97% dos casos reportados nas Américas. Neste mesmo ano o Brasil reportou 3.466 casos de LV, dos quais 737 casos foram notificados na Região Norte, 1.735 na Região Nordeste, 11 na Região Sul, 428 no Sudeste e 122 na Região Centro-Oeste, com o total de 289 óbitos em todo país(11). Na Região Centro-Oeste foram reportados 76 casos em Mato Grosso do Sul, 14 casos em Mato Grosso, 28 casos em Goiás e 2 casos reportados no Distrito Federal (DF)(11) (Figura 2 A).

Tratando-se da LT, enquanto a OMS diferencia os casos de LC e LM, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e Ministério da Saúde (MS), não possuem boletins epidemiológicos que discriminam as notificações entre as diversas formas clínicas de LT. Nas Américas a média anual do número de novos casos vem caindo. Em 2018, apresentou uma incidência de 46.041 de casos, sendo que o Brasil junto com seis outros países apresentou 84% dos casos nas Américas. Neste mesmo ano, o Brasil reportou 16.432 novos casos, apresentando cerca de 35,69% dos casos americanos, com um aumento de 38% em relação a 2016 de LC(12).

No Brasil estes novos casos estão distribuídos, na Região Norte com 7.519 casos, na Região Nordeste com 3.717 novos casos, na Região Sul com 158 casos reportados, no Sudeste com 1.646 e na Região Centro-Oeste com 2.086 casos notificados(13). Por outro lado, a forma tegumentar da doença teve 81 casos em Mato Grosso do Sul, 1.797 casos em Mato Grosso, 206 casos em Goiás e 2 casos no Distrito Federal (DF)(13) (Figura 2 B).

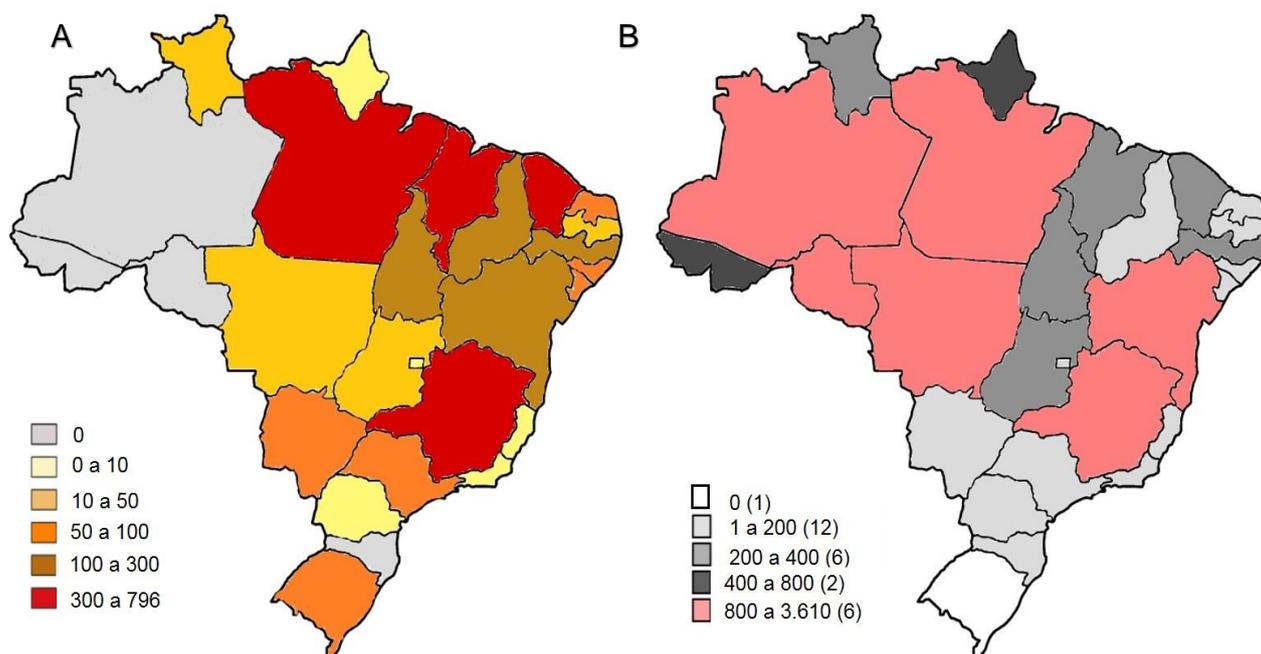


Figura 2. Mapa epidemiológico de distribuição no Brasil da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar. (A) O mapa representa a distribuição dos novos casos reportados de leishmaniose visceral, divididos por Unidades Federativas (UFs) mostrando o status de endemicidade, no Brasil, em 2018. (B) O mapa representa a distribuição de novos casos reportados de leishmaniose tegumentar no Brasil, divididos por Unidades Federativas (UFs) mostrando o status de endemicidade, em 2018. Figura feita pelo próprio autor com base nos dados fornecidos pelo Ministério da Saúde, 2020.

1.2.3. Agente Etiológico

A leishmaniose é uma doença infecciosa, causada pelo microrganismo pertencente ao reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Ainda o gênero *Leishmania* pode se subdividir em dois principais subgêneros, *Leishmania* e *Vianna*. O subgênero *Leishmania* possui os complexos *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* e *Leishmania mexicana*. Já o subgênero *Vianna* compreende os complexos *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis*, que estão ligados à leishmaniose humana(6,8,14).

Estes complexos englobam as principais espécies, de interesse médico, das quais pode-se destacar algumas como, a *Leishmania amazonensis*, *Leishmania pifanoi* e *Leishmania mexicana*, que estão

relacionadas à LM, podendo eventualmente causar forma LCD. A *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, são os principais agentes da LV. Sendo que *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania venezuelensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamensis*, estão relacionadas principalmente à LC com lesões localizadas(6,8,14).

Há evidências que estes protozoários existem a mais de 100 milhões de anos. Pois foram encontrados microrganismos, descritos como um Tripanossomatidae Kinetoplastida, denominado *Paleoleishmania proterus* no trato digestório de fósseis, considerados vetores pré-históricos, o *Palaeomyia burmitis*(15). Porém a primeira descrição de leishmaniose em humanos, se deu por meio da análise da medula óssea de múmias egípcias de mais de 4.000 anos. Nestas múmias, provenientes da Núbia no continente africano, foi encontrado e amplificado o DNA de *L. donovani*, levando a acreditar que a *Leishmania* teve origem no continente Africano(16).

Contudo, pesquisadores ainda divergem sobre a exata origem da *Leishmania*. Uma das hipóteses, afirma que o parasito tenha se originado na região Paleártico, que compreende parte da Europa, Oriente Médio, África e Ásia, essa região denomina-se como o Velho Mundo (VM). Esta hipótese se baseia em evidências de fósseis, de vetores e reservatórios roedores, infectados por espécies de *Leishmania* já extintas(17,18).

Através da passagem terrestre de *Bering* estes vetores e reservatórios, levaram a *Leishmania* para o que se conhece como Novo Mundo (NM), primeiramente na América do Norte, incluindo Flórida e México, região esta denominada por Neártico. Posteriormente, chegaram às regiões Neotropicais, que incluem a América Central e América do Sul. Os fatores climáticos e ambientais favoreceram a maior diversidade de espécies no NM em relação ao VM. Em relação a esta diversidade de espécies, surgiu a hipótese que, na verdade, a origem do parasito se deu na região Neotropical e depois se espalhou para as demais regiões. Mas ainda há algumas inconsistências,

porque apenas a diversidade de espécies não é suficiente para suportar esta hipótese(17,18).

Há também a hipótese do supercontinente, na qual sugere que o subgênero *Leishmania* e seus complexos evoluíram no continente africano e depois se espalharam para as regiões adjacentes. No NM, pela similaridade com *L. major*, acredita-se que o complexo *Leishmania mexicana* diferenciou-se ao chegarem na região Neártico através do estreito de *Bering*. E, ao se instalarem na região Neotropical, América Latina, pelas especificidades geográficas, deu origem às espécies *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*. Entretanto do subgênero *Vianna* que após a separação dos continentes, desenvolveu-se na América do Sul, dando origem a variedade de espécies hoje conhecidas(17,18).

As primeiras descrições da leishmaniose antecedem o século XIX, com registros de lesões ulceradas na pele, que se assemelhavam aos sintomas que se conhece como LC atualmente. Há também a descrição de sinais e de sintomas clínicos da LV que era chamada de Calazar(17,18).

O gênero *Leishmania* foi descrito, em 1903, em uma missão na Índia, o general do exército britânico William Boog Leishman observou formas ovoides de trypanosoma, em amostra proveniente do baço, após necropsia de um soldado britânico, que veio a óbito decorrente da febre de “*Dum dum*”. Esta febre tinha os sintomas característicos da LV, recebendo este nome por estar relacionada à uma cidade específica da Índia(19).

No mesmo ano, Charles Donovan também observou as mesmas formas ovoides de trypanosoma em amostra do baço, de um nativo indiano, que sofria da mesma doença que o soldado britânico. Então, ambos pesquisadores, Leishman e Donovan, convergiam no pensamento que estes corpos ovoides analisados tratavam-se de uma nova espécie de microrganismo, que seriam capazes de provocar a doença de Calazar(20,21). Posteriormente, Ronald Ross também observou estes mesmos corpos

ovoides e propôs que esta nova espécie fosse denominada como *Leishmania donovani*. A partir de então o termo *Leishmania* passou a ser utilizado, como o gênero dos parasitos capazes de causar a leishmaniose(22).

Em 1908, Nicolle e seu grupo de pesquisa, identificou em crianças da Tunísia uma espécie diferente da *L. donovani*, que causava a LV em crianças, assim recebeu o nome de *L. infantum*. Neste mesmo ano, outro grupo de pesquisa também identificou esta mesma espécie em cães da região que, desde então, o cão passou a ser considerado o reservatório doméstico da *Leishmania*(17,23).

No Brasil, em 1934, pela primeira vez foi evidenciado um caso de LV. Em 1937, Cunha e Evandro Chagas observaram em laboratório um comportamento diferente na infecção causada pelo parasito isolado no Brasil, comparado às espécies existentes no VM. Assim, acreditava-se ser uma espécie diferente daquelas conhecidas, denominando então, como *Leishmania chagasi*(14,24). Todavia, com os avanços dos métodos moleculares, em 1999, Mauricio e colaboradores comprovou que não é possível diferenciar a *L. chagasi* da *L. infantum*, pela análise de DNA, o que levou a *Leishmania chagasi* passar a ser denominada como *Leishmania infantum*(25). Supõe-se que *L. infantum* foi trazida às Américas por meio das grandes navegações, através dos colonizadores e seus cães infectados(17).

A LC após a cura espontânea, deixa cicatrizes extensas no local da lesão. Como a LC predomina nas regiões tropicais e subtropicais, estas lesões ficaram conhecidas como úlceras tropicais. Em 1903, ao observar a amostra da lesão, de um paciente que sofria desta lesão ulcerada, foram identificadas aquelas mesmas formas observadas por Leishman e Donovan, porém como as doenças tinham características distintas, levou James Wright a propor a espécie *Helcosoma tropicum*(26), que, em 1906, passou a ser denominada de *L. tropica*(14).

Contudo, em 1914, foram identificados parasitos de tamanho diferentes em pacientes com lesões na pele, e foi proposto a divisão em subgêneros *Leishmania tropica minor* e *Leishmania tropica major*(17). Todavia, em 1973, Brayn e colaboradores propuseram uma reclassificação sob os critérios de reservatório, vetor, localização geográfica e altitude, havendo a separação em duas espécies, *Leishmania tropica* e *Leishmania major*(27).

Nas Américas o primeiro caso de LT foi identificado, em 1909, num paciente que apresentava uma lesão mucocutânea, na cidade *Baurú* em São Paulo, surgindo assim o nome “*úlcera de Baurú*” para as lesões presentes na LC. Posteriormente foi encontrado o parasito nestas lesões, porém acreditava-se que a *L. tropican*, do VM, era o mesmo agente que causava as lesões nas Américas(17,18). Entretanto, Gaspar Vianna concluiu que os parasitos que causavam as *úlceras de Baurú*, tratava-se de uma espécie distinta. Esta espécie foi denominada de *Leishmania brasilienses*, que depois sofreu uma alteração para *Leishmania braziliensis*. Durante algum tempo acreditava-se que *L. braziliensis* seria o único agente etiológico da LC no continente americano, porém uma variedade de espécies foi encontrada no NM posteriormente(14).

Atualmente há mais de 20 espécies de *Leishmania* descritas tanto no VM quanto no NM, que podem causar leishmaniose em humanos. Portanto, é importante destacar os principais agentes etiológicos presentes no Brasil e que foram objetos deste estudo, as espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*, que causam a leishmaniose visceral e a leishmaniose cutânea, respectivamente(14,18).

A *Leishmania* é um parasito que possui fases com morfologias distintas, entre elas as formas amastigotas e promastigotas. Por ser um parasito intracelular obrigatório, as formas intracelulares, são denominadas de amastigota, que são formas mais arredondadas e curtas, com pouca motilidade, por terem o flagelo encurtado(6,8) (Figura 3). Estas formas encontram-se em células do sistema fagocitário mononuclear de mamíferos

vertebrados, que são considerados reservatórios, que garantem a sobrevivência e reprodução do parasito até ser transmitido ao hospedeiro suscetível(28).

No caso da *L. infantum* e *L. braziliensis*, nos ambientes silvestres, têm como reservatórios de preferência os marsupiais e raposas. Já nos ambientes rurais e periurbanos, roedores em geral(29–31), e os cães(32), são considerados reservatórios. Os cães receberam este *status*, como dito anteriormente, após terem sido encontrados cães infectados por *L. infantum*, mesma espécie que acometia crianças na região da Tunísia(17). Os humanos são considerados hospedeiros da *Leishmania*, ou seja, aqueles que garantem a subsistência e alojamento do parasito, sendo suscetíveis à doença(28).

As formas promastigotas da *Leishmania* são as formas extracelulares, que estão presentes preferencialmente no hospedeiro invertebrado, o vetor, que possuem em seu microambiente condições favoráveis para o desenvolvimento e para a disseminação do agente infeccioso(6,8,28) (Figura 3).

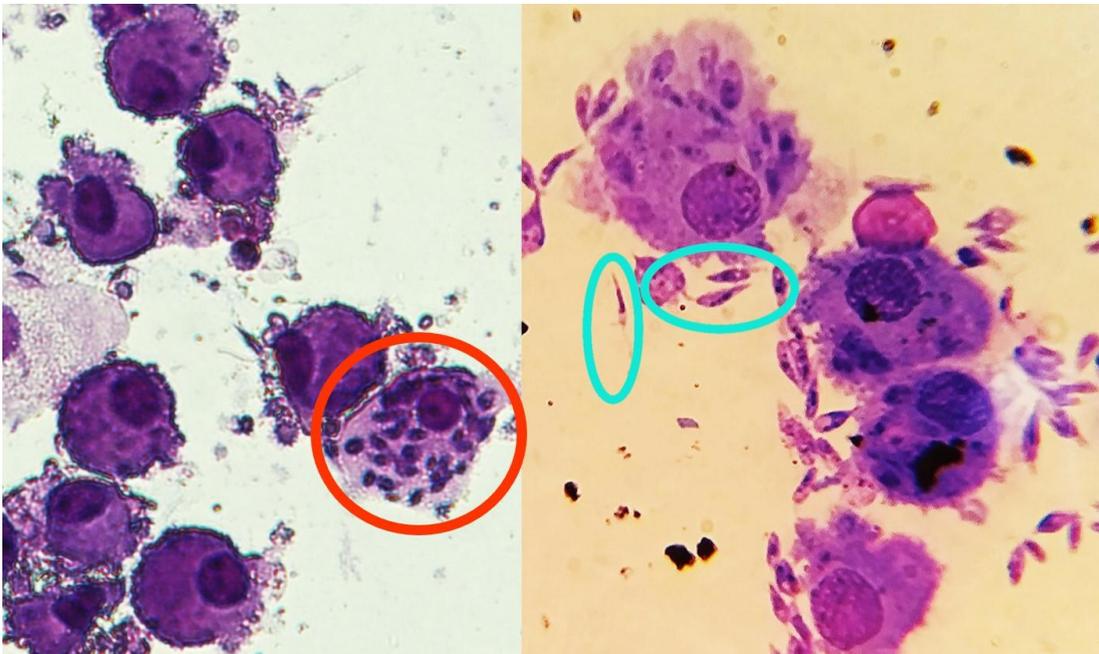


Figura 3. Formas amastigotas e promastigotas da *Leishmania*. Na figura à esquerda observa-se uma célula dendrítica infectada por *L. infantum* dentro do círculo vermelho, com as formas intracelulares, amastigotas. E na figura à direita, dentro dos círculos em azul, são as formas extracelulares, promastigotas. Fonte do próprio autor.

1.2.4. Vetor

A leishmaniose é uma doença vetor-dependente, e a sua transmissão ocorre, principalmente, pela ação do inseto flebotomíneo. Esse vetor é da ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae(33). Pode-se destacar dois gêneros principais, gênero *Phlebotominus* e gênero *Lutzomyia*, que correspondem aos gêneros de 98 espécies capazes de transmitir a leishmaniose(33). Porém, existem mais de 800 espécies descritas de vetores que transmitem a *Leishmania*(18).

Originalmente Rodani denominou o vetor capaz de transmitir a leishmaniose como “*Flebotomus*” que, depois, foi alterado para *Phlebotominus*. Posteriormente, Franca denominou o gênero *Lutzomyia* como o vetor responsável pela disseminação da leishmaniose no Novo Mundo(34).

Entretanto, propuseram que a classificação do gênero *Lutzomyia* seria genérica, restringindo-o à subgênero do gênero *Phlebotominus*. Porém, Young e Fairchild, em 1974, refutaram esta proposta garantindo a complexidade e diferença entre os gêneros. Assim, Lewis, em 1977, propôs a divisão nos gêneros, *Phlebotominus* presente em parte da África e Ásia, Oriente Médio e região Mediterrânea (VM) e o gênero *Lutzomyia*, o principal vetor da leishmaniose no NM, compreendendo a extensão de toda América Latina(34). Sendo que o vetor do gênero *Lutzomyia* apresenta grande importância devido sua dispersão em todo território brasileiro e o potencial risco de disseminação da leishmaniose(35–37).

Para o desenvolvimento do vetor é necessária, umidade e temperaturas elevadas, porém diferente de outros vetores invertebrados, como os mosquitos, não necessita de água no seu estado larval. Os ovos são postos pela fêmea em ambientes protegidos das intempéries da natureza, como da luz solar e a chuva. Além disso, estes ambientes de preferência para

o desenvolvimento das larvas possuem grandes quantidades de material orgânico(33,38,39).

Os estágios do vetor, se caracterizam pela eclosão dos ovos por aproximadamente 6 dias. Passando para a fase de larval, que dura por volta de 3 semanas, até o desenvolvimento de pupa, que varia de 25 a 59 dias. E a fase adulta compreende em torno de 35 a 69 dias. O tempo de desenvolvimento do inseto pode variar de acordo com a espécie e as condições do ambiente. Depois de adultos, destacando os vetores do gênero *Lutzomyia*, têm por característica de voos baixos de alcance curto, hábitos alimentares noturnos e alimentação silenciosa, preferencialmente se alimentam de substâncias ricas em açúcares, como a seiva de plantas. Porém, as fêmeas precisam alimentar-se de sangue para o desenvolvimento dos ovos e para ovoposição(33,38,39).

1.2.5. Ciclo biológico da *Leishmania*

O vetor ao se alimenta dos reservatórios infectados, ingere as formas amastigotas da *Leishmania*, que no vetor se diferencia em promastigotas, que passam pelo processo de metaciclo genese, tornando-se promastigotas metacíclicas. Assim o vetor infectado ao fazer a hematofagia em hospedeiros mamíferos vertebrados, incluindo os humanos, inocula as *Leishmanias* nas formas promastigotas metacíclicas, que têm tropismo por células do sistema fagocitário mononuclear. Nestas células os parasitos promastigotas se diferenciam em amastigotas, que são as formas replicantes. Assim, as amastigotas multiplicam-se até romperem as células e direcionarem-se para outra célula de interesse ou podem ser ingeridas novamente pelo vetor(40,41)(Figura 4).

É preciso que o vetor seja competente na transmissão do parasito, ou seja, a *Leishmania* tem que ser capaz de infectar e sobreviver às barreiras imunológicas do vetor, definidas pelos mecanismos da via clássica como o

suco gástrico, as vias de receptores Toll, espécies reativas de oxigênio (ROS)(42), além da via JAK-STAT(43) e RNA de interferência (RNAi)(44), como também, moléculas antimicrobianas secretadas pelo inseto(45,46) e até a mesmo a composição da sua microbiota(47,48).

A *Leishmania* possui moléculas de glicosilfosfatidinositol (GPI), proteofosfatoglicano (PPG) e lipofosfoglicano (LPG) em toda sua superfície, sendo consideradas também como fatores de virulência. Estas moléculas são importantes para garantir a sobrevivência do parasito no vetor, protegendo-os contra proteólise da digestão(44,49).

A molécula de LPG, ainda, está relacionado à ancoragem da *Leishmania* no intestino médio ou a porção torácica do intestino do vetor, que se prende ao epitélio através do flagelo. Assim, impede a ação do peristaltismo, que promove a persistência e garante o desenvolvimento da *Leishmania*. Após a diferenciação nas formas metacíclicas, o parasito necessita de açúcares para sua sobrevivência e por quimiotaxia se encaminha para a região das glândulas salivares do vetor(44,49).

Em 1990, Killick-Kendrick compilou os estudos que observou o desenvolvimento da *Leishmania* no vetor, que comparava as formas mais arredondadas e ovaladas, com menor motilidade, devido ao flagelo curto, chamadas de paramastigotas ou promastigota procíclica, encontradas na parte bucal, esôfago e faringe do vetor, com as formas alongadas e flageladas, com alta motilidade e que se desenvolvia no intestino do vetor (50,51).

Em 1985, Sacks demonstrou a diferença entre promastigotas infectivas e não infectivas, abordando pela primeira vez a metacilogênese, *in vitro*(50,52). Posteriormente, foi demonstrada a presença de promastigotas metacíclicas de *Leishmania* na glândulas salivares do vetor, mostrando que a infecção ocorria na hora da alimentação, pela liberação dos parasitos por

regurgitação durante a hematofagia(53), e, devido ao processo de metacicloênese, o parasito teria maior sucesso em sua infecção(54).

Ao serem inoculadas, as *Leishmanias* em sua forma promastigotas, e ao encontrarem as células do sistema fagocitário mononuclear, acredita-se que a interação inicial seja pelos antígenos presentes no flagelo, que estes antígenos sinalizam para a fagocitose das células. Além disso, acredita-se que *Leishmania* tenha uma internalização ativa, pela movimentação contínua do flagelo, danificando a integridade da membrana, que pode alterar a composição do vacúolo parasitóforo das células infectadas, garantindo a infecção e sobrevivência do parasito(55).

Na formação do vacúolo parasitóforo a *Leishmania* inicia seu processo de diferenciação nas formas amastigotas, que possuem a menor superfície de contato com as substâncias provenientes do estresse oxidativo, com espécies reativas de nitrogênio (NOS) e oxigênio (ROS), e ainda lisozimas, liberadas no vacúolo, tornando o ambiente ácido. Estas substâncias hostis ao parasito, secretadas pelas células do hospedeiro, promovem a destruição do parasito. A sua transformação em amastigota garante sua sobrevivência e disseminação do parasito(55).

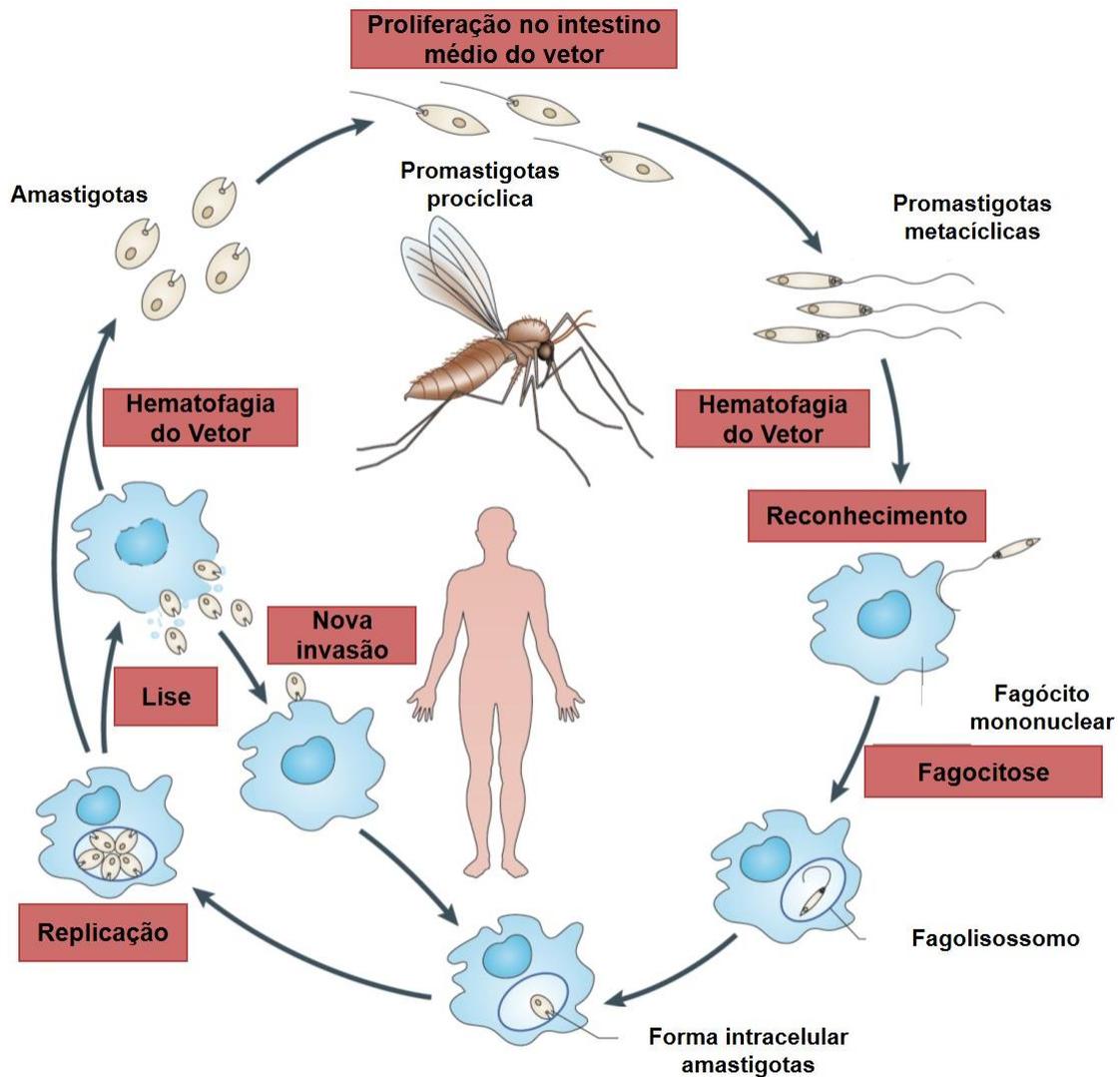


Figura 4. Ciclo biológico da *Leishmania* no hospedeiro humano. O vetor ingere as formas amastigotas do hospedeiro infectado, onde as *Leishmanias* se diferenciam em promastigotas procíclicas, se multiplicam e passam pela metociclogênese, se transformam em promastigotas metacíclicas, que são inoculadas no hospedeiro humano no momento da hematofagia. As *Leishmanias* metacíclicas são reconhecidas pelo célula do sistema fagocitário mononuclear, que fagocitam o parasito e formam o fagolisossomo, onde a *Leishmania* se diferencia em amastigota, forma intracelular replicante, e se multiplica ao passo que rompem as células infectada, infectando novas células mononucleares ou volta ao ciclo do vetor. Fonte adaptado de Kaye & Scott, 2011.

1.3. Reconhecimento da *Leishmania*

O reconhecimento da *Leishmania*, está relacionado ao reconhecimento dos padrões moleculares associado a patógenos (PAMPs), por meio dos

receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que estão presentes, principalmente, nas células da imunidade inata. Podendo destacar os receptores do tipo Toll (*toll-like receptor*, TLRs), que possuem uma gama de receptores (do TLR-1 ao 10), com papel fundamental no reconhecimento de antígenos microbianos diversos, gerando uma resposta e promovendo a proteção do organismo(56,57).

O TLR-2 tem desempenhado papel de destaque no reconhecimento da *Leishmania*, dado que células 239T estimuladas por LPG de *L. major*, induziu a ativação das células via do MyD88 e induziu a ativação de linfócitos T(58). Em outro estudo, TLR-2 em células mononucleares foi bloqueado, e posteriormente estas células foram estimuladas por LPG de *L. major*, este bloqueio diminuiu a produção de IL-12 e IFN- γ , além de auxiliar na persistência do patógeno inibindo a produção de ROS(59).

Na infecção por *L. braziliensis* com DCs derivada da medula óssea (BM-DCs) de camundongos, que apesar de demonstrar que a via de ativação por MyD88 é fundamental para o controle de infecção, a ausência do TLR-2, favoreceu o recrutamento de DCs para o local da infecção, promovendo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e maior ativação de linfócitos T(60). Este mesmo comportamento também foi observado na infecção por *L. donovani*, que na ausência de TLR-2, inibiu a ação do parasito(61,62).

Entretanto, outros grupos de PRRs mostraram estar relacionados no reconhecimento da *Leishmania*, a exemplo dos receptores de manoses que demonstraram ser uma importante molécula no reconhecimento de *L. donovani* por macrófagos, quando o parasito estava opsonizado pela molécula CR3(63). Por outro lado, o receptor de manoses (MR ou CD206), mostrou não ser fundamental para o reconhecimento de *L. major* e *L. donovani* em células mononucleares da medula óssea(64).

Posteriormente foi demonstrado que, CR3 e CR4, não estavam relacionadas com a fagocitose de *L. major* por BM-DCs de camundongos.

Visto que, DCs reconheciam a *Leishmania*, através dos receptores de FcγR II/III, imunoglobulinas (Ig) G, que induziu a produção de IL-12 e proliferação de linfócitos, controlando a infecção por *L. major*(65).

Além disso, é importante destacar a ação do grupo de receptores de lectina dependentes de cálcio (CLRs) na proteção da leishmaniose(66), já que as *Leishmanias*, quando na forma promastigotas metacíclicas possuem uma vasta expressão das molécula de LPG, fosfoglicanos e glicoproteínas em sua superfície(67)(68). Fazendo com que os grupos receptores de maior interesse, sejam aqueles responsáveis pelo reconhecimento de carboidratos, sendo que CLRs reconhecem principalmente manose, fucose e carboidratos, derivados de microrganismos, como vírus, bactérias e helmintos(69,70).

Os CLRs por serem expressos principalmente em DCs, e ao reconhecerem os antígenos por estes receptores, promovem uma resposta rápida e potente capaz de regular as respostas de linfócito T. Além disso, DCs possuem uma vasta expressão destes receptores(69,70), como por exemplo a molécula “*Dendritic-cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin*” (DC-SIGN ou CD209), receptor que está relacionado, principalmente, no reconhecimento a patógenos como fungos e bactérias(71–73), promovendo a ativação de DCs, inclusive com capacidade de modular e ativar as vias dos TLRs(74).

Diante disso, Appelmeik e colaboradores, demonstrou a alta avidéz de glicoconjugados de microrganismos à molécula DC-SIGN, inclusive de *L. mexicana*, que ao bloquear DC-SIGN expresso em células mutantes K562, diminui a carga parasitária nestas células(75). Em trabalho feito pelo grupo, Falcão e colaboradores, certificaram que *L. braziliensis* e *L. infantum* modularam a expressão de CD209 em DCs derivada de monócitos (moDCs) humanos, induzindo diminuição da expressão de DC-SIGN na presença da *Leishmania*, o que sugere ser uma via de internalização destes parasitos(76).

O trabalho de Colmenares e colaboradores demonstrou que amastigotas de *L. pifanoi*, dependem da expressão de CD209 para infectar

células K562(77), que posteriormente reproduziu o mesmo resultado com o bloqueio de DC-SIGN em células K562 que reduziu a infecção de *L. pifanoi*, *L. donovani* e *L. infantum*, tal como em DCs derivadas de monócitos humanos na infecção de *L. pifanoi* e *L. infantum*(78). Todavia, em estudo com moDCs humanas que DC-SIGN foi bloqueado, não foi observada a diminuição da taxa de infecção de *L. mexicana*, nas formas amastigotas e promastigotas, em relação as DCs não bloqueadas(79).

1.4. Relação Parasito-Hospedeiro

Na hematofagia o vetor possui mecanismos que garantam sua alimentação que, por consequência, permite que a infecção da *Leishmania* seja bem-sucedida, com componentes anticoagulante, vasodilatadores e até imunomoduladores, presentes saliva do vetor. Estes componentes induzem macrófagos e DCs à produzirem citocinas anti-inflamatórias, como IL (interleucina)-10 e prostaglandinas, inibindo as citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF)- α e IFN (interferon)- γ , não somente prejudicando a ativação de linfócitos T, como direcionando a polarização da resposta para um padrão de linfócitos T auxiliares (*T helper*, Th)²(80,81).

Ao serem inoculadas, as formas promastigotas metacíclicas são reconhecidas pelas células do sistema imune, no caso os neutrófilos ou polimorfonucleares (PNMs). Os PMNs são as primeiras células a chegarem no sítio de infecção e têm funções protetora, como a fagocitose, liberação de DNA em redes extracelular (NETs) e grânulos, além da secreção de TNF- α , que tem se mostrado uma citocina importante no controle da infecção por *Leishmania*, induzindo inclusive a destruição da *Leishmania* em macrófagos por ROS(82–85).

Embora os PNMs tenham se mostrado um fator importante na proteção da leishmaniose, outras evidências mostram o papel de potencial

disseminador da infecção. Apesar da picada do vetor induzir a apoptose de PNMs, há um aumento das formas intracelulares nestas células(86,87), que recentemente foi comprovada, pela primeira vez, formas replicantes de *L. mexicana* em PNMs, semelhantes as amastigotas encontradas em fagócitos mononucleares(88).

Além do mais, o estabelecimento da infecção silenciosa pela *Leishmania* se inicia quando o parasito modula a apoptose dos PNMs infectados, que normalmente possuem vida curta. A *Leishmania* prolonga a meia vida de PNMs infectados, até o recrutamento das células do sistema fagocitário mononuclear, e depois induz a morte destes PNMs infectados por apoptose, favorecendo a infecção das células de interesse após a fagocitose dos corpos apoptóticos dos PNMs contendo os parasitos ainda vivos. Este fenômeno da infecção silenciosa ficou conhecido como “cavalo de Tróia”(89–91). Nesta forma de infecção, PNMs apoptóticos infectados, secretam citocinas anti-inflamatórias e ao serem fagocitados por DCs, demonstraram interferir na atuação destas pela inibição da ativação de linfócito TCD4+ e TCD8+(92,93).

Entretanto ao serem fagocitadas, *L. donovani* demonstrou através dos glicocomponentes, LPG e GPI, a habilidade de sobreviver ao fagossomo quando internalizada por células fagocíticas mononucleares. A *L. donovani* induz o retardamento da maturação do fagolisossomo e a inibição da ação dos componentes microbicidas, criando um ambiente favorável para o seu desenvolvimento(94–96).

A *L. infantum* mostrou interferir na maturação de BM-DCs de camundongos, diminuindo a expressão de CD40 e CD86, ainda interferiu nas vias de ativações de DCs, diminuindo a produção de INF- γ , e apesar do aumento da produção de IL-12, também houve o aumento de IL-10(97). A *L. amazonensis* também mostrou interferir na diferenciação e maturação de moDCs, conseqüentemente interferindo na resposta eficiente de DCs contra o parasito(98). Além disso, *L. amazonensis* demonstrou promover a

persistência da infecção, por estabelece um estado de anergia a resposta Th1(99).

Ainda *L. major* demonstrou ter capacidade de regular a produção de IL-10 e IL-4 em camundongos pela molécula Ox40L, quando comparado com os camundongos nocaute(100). O mesmo foi observado em BALB/c infectados por *L. donovani*, que houve menor recrutamento de DCs para o baço, inibição da produção de TNF- α , IFN- γ e IL-12, além da indução da maior produção de IL-10, IL-4 e TGF- β (101).

Na infecção por *L. braziliensis* em moDCs de pacientes com esquistossomose, doença que induz uma resposta anti-inflamatória, através de IL-10 e resposta mediada por células Tregs, com alta expressão de CTLA-4. DCs reduziram a secreção de IL-12, TNF- α no microambiente, induzindo assim uma baixa expressão de HLA-DR, e moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, em DCs e CD28 em linfócitos T, interferindo na ativação e respostas destes linfócitos(102).

Em contraponto, DCs têm fundamental importância para o controle da infecção por *L. major*. Quando presente, DCs conduzem a resposta protetiva mesmo em indivíduos suscetível à doença(103–105). Para a proteção da doença é fundamental a ação efetiva pela maturação de DCs, que tem como característica o aumento da expressão de moléculas relacionadas à apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T, como a moléculas HLA-DR, CD80, CD86 e CD40(106).

Neste sentido, BM-DCs de camundongos infectadas por *L. mexicana*, induziu a maturação destas células e uma resposta mediada por IL-12(107). Como no trabalho do grupo feito por Falcão e colaboradores, *L. infantum* e *L. braziliensis*, demonstraram não afetar a expressão de HLA-DR e induziram um aumento da expressão de CD86 em moDCs de humanos(76). Bem como DCs recuperada dos órgão linfoides secundários de camundongos infectados com *L. braziliensis*, estas DCs mostraram ser capazes de ativar linfócitos,

promovendo o aumento do número de linfócitos CD4+ e CD8+, tanto ativos quanto de memória, além de diminuir expressão de IL-4 e aumentar a expressão de IFN- γ (99).

Em BM-DCs de camundongos, *L. braziliensis* promoveu a maturação de DCs pelo aumento da expressão de CD40 e CD83, além de aumentar a secreção de IL-12, induzindo a proliferação de linfócitos T CD4+, a maior secreção de INF- γ em relação a IL-10, polarização de Th1, ainda induziu a ativação das vias de imunidade contra parasitos intracelulares(108).

Na infecção de camundongos BALB/c com *L. major*, foi observada a secreção de IL-12, promovendo a ativação de Th1 mediante a presença de INF- γ (109). Sendo que as células de pacientes com LV, quando reestimuladas com antígeno solúvel (SLA) de *Leishmania*, induziram a ativação de linfócitos T, marcado pelo aumento da secreção de INF- γ (110,111).

Além disso, trabalho feito com *L. amazonensis* quando opsonizadas com soro de pacientes com LV, induziram o reconhecimento e internalização do parasito por BM-DCs, como também promoveram a maturação de DCs e o controle da doença(112). Assim como a vacinação camundongos com DCs tratadas com proteínas antigênicas, N-terminal LiFE-2 e CpG oligodeoxynucleotideos, induziram uma resposta Th1, com produção de IFN γ , TNF- α , e IL2 e supressão de IL-10(113).

Após todas as evidências demonstradas, fica claro que a resposta protetiva à leishmaniose trata-se da resposta pro-inflamatória, mediada por células, com um perfil Th1 de linfócitos TCD4+, com ativação da resposta citotóxica mediada por linfócitos TCD8+ e citocinas inflamatórias, podendo destacar a presença das citocinas IL-12, TNF- α e IFN- γ . Porém, é necessária a regulação desta resposta pró-inflamatória pela resposta anti-inflamatória, mediada, principalmente por linfócitos T reguladores (Treg) e pela citocina IL-10, para controlar a resposta pro-inflamatória celular. Pois, quando esta

resposta é exacerbada pode gerar danos e destruição tecidual, configurada principalmente, pelas lesões características de LC(114–116).

Entretanto a *Leishmania* também demonstrou eficiente regulação das moléculas inibidoras capazes de levar os linfócitos T à exaustão ou anergia. como em paciente que apresentava LC por *L. amazonenses*, monócitos do sangue periférico aumentou a expressão de PD-L1 quando reestimulado por SLA de *L. amazonenses*(117). Contudo, em células de pacientes com LV, o bloqueio da molécula PD-L1 não surtiu efeito na taxa de infecção e na produção de IFN- γ , porém os autores sugerem que há exaustão de linfócitos TCD8+ induzido pela *Leishmania*, promovendo sua persistência(118).

Em trabalho realizado por Fonseca-Martins e colaboradores, foi observado o sucesso no bloqueio de PD-L1 e PD-1 em camundongos BALB/C infectados com *L. amazonensis*. Após o bloqueio houve a proliferação de células CD4 e CD8 e o aumento de IFN- γ , além da diminuição da carga parasitária no camundongo(119).

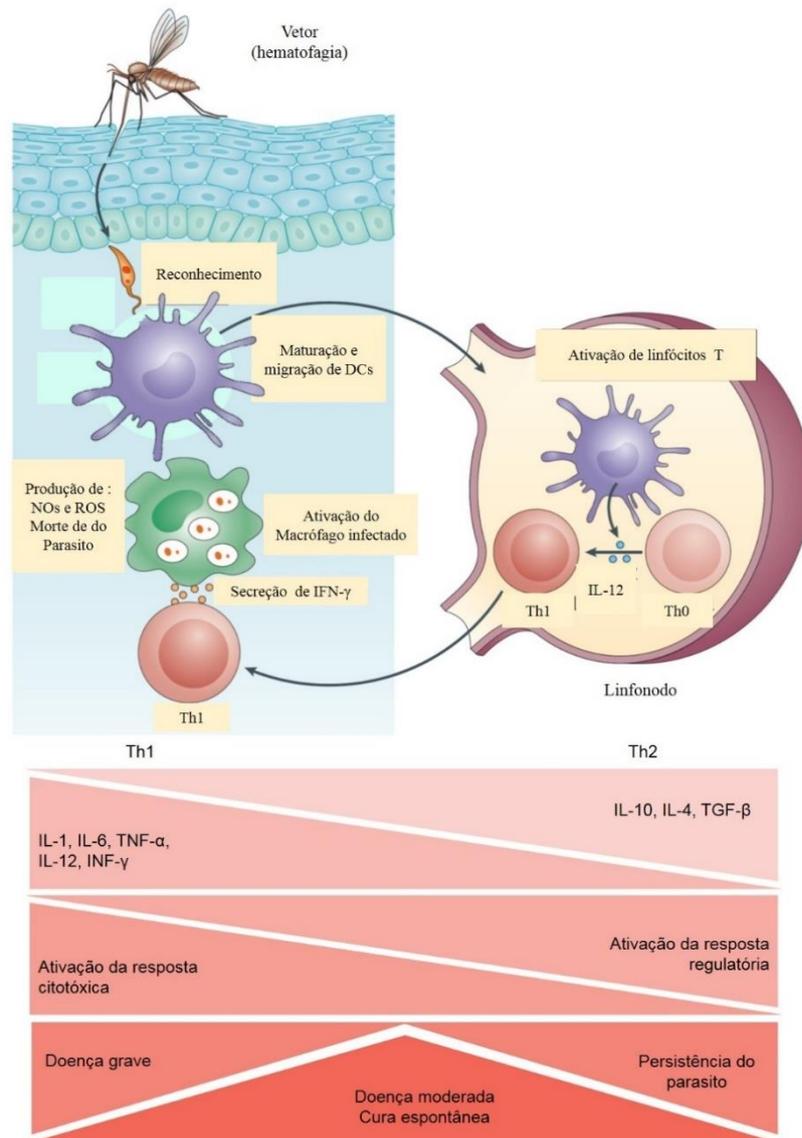


Figura 5. Patogênese e regulação da leishmaniose. Na primeira parte da figura ocorre o processo de patogênese frente a *Leishmania*, que ao vetor se alimentar do hospedeiro humano (hematofagia), inocula os parasitos que são reconhecidos pelas células dendríticas que internalizam e processam o parasito. Neste processo elas migram e quando maduras chegam aos órgãos linfoides secundários (linfonodo), onde ativam linfócitos T CD4 e estimulam a sua diferenciação de Th0 para Th1 pelo estímulo de IL-12. Que por sua vez as células Th1 migram ao sítio de infecção e por meio da secreção de IFN- γ , ativam macrófagos infectados, que aumentam a produção de NOs e ROS, que leva a morte do parasito, assim se caracteriza a resposta imune protetora na leishmaniose. Na segunda parte da figura isso fica claro, que no lado esquerdo, o perfil de resposta Th1 exacerbado, caracterizado pela secreção de citocinas inflamatórias, IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e INF- γ , com característica da resposta citotóxica, leva a doença grave, que na leishmaniose cutânea gera uma lesão grave. Entretanto no lado esquerdo, mostra a resposta Th2 exagerada, com a presença de citocinas anti-inflamatória, IL-10, IL-4 e TGF- β , com ativação da resposta regulatória, que promove a persistência do parasito, o que leva doença grave, a forma difusa no caso da leishmaniose cutânea. O equilíbrio entre as duas respostas, tendo a resposta Th1 para eliminação do parasito, regulada pela Th2 para minimizar os danos ao tecido, seria a forma ideal, levando a cura espontânea da doença. Fonte adaptado de: Scott & Novais, 2016.

1.5. Células Dendríticas

As DCs têm demonstrado, como visto anteriormente, sua importância na condução da resposta na infecção por *Leishmania*(114). As DCs são importante células que compõem o sistema fagocitário mononuclear, e foram primeiramente descritas por Steinman e Cohn, em 1973. Quando observaram células mononucleares advindas de órgãos linfoides secundários periféricos de camundongo, que divergiam daquelas células mononucleares já descritas. Devido a sua morfologia disforme foi sugerida o termo “célula dendrítica” (*dendritic cell*)(120). Por conseguinte, foi observada sua alta motilidade e migração, evidenciando sua importância na resposta imune e na ativação do linfócitos T(121).

As DCs só passaram a integrar o sistema fagocitário mononuclear devido sua caracterização e descrição. Sendo que, como os macrófagos, DCs também podem se diferenciar a partir dos monócitos(121,122). Isto só foi evidenciado após a descoberta de citocinas, os fatores de estímulo ao crescimento de colônias (“*colony stimulating factor*”- CSF), que promoviam a proliferação de células, principalmente células mononucleares(123), visto que alguns destes fatores também induziam o desenvolvimento de granulócitos e macrófagos, que passaram a ser denominados como GM-CSF(124).

Após a descoberta, GM-CSF mostrou estimular a produção e proliferação de DCs a partir de células precursoras da medula óssea(125). Posteriormente, em 1994, Sallusto e Lanzavecchia demonstraram uma eficiente metodologia, gerando com sucesso DCs a partir de monócitos humanos do sangue periférico, *in vitro*, usando GM-CSF combinada à interleucina (IL)-4, o que permitiu o desenvolvimento de pesquisa e maior descrição de DCs(126).

Contudo DCs possuem diversos subgrupos e, além das DCs derivadas de monócitos (“*monocyte-derived DCs*”, moDCs), pode-se destacar as células

de Langerhans (*Langerhans cells*, LC), DCs plasmocitóides (*plasmacytoid DC*, pDC) e DC clássicas ou convencionais (*classical DC*, cDC) que têm funções e características fenotípicas distintas(127).

Baseados nos conhecimentos adquiridos até então, julgava-se que DCs possuíam origem de precursores de origem mieloide. Porém, verificou-se que cDC e pDC podem expressar marcadores de origem linfoides em sua superfície, como cDCs que expressam CD4 e CD8. Isso levou a acreditar que alguns subgrupos de DCs poderiam ter origem a partir de precursores linfoides. Todavia ao testarem essa hipótese verificou-se que todos os subgrupos de DCs têm capacidade de diferenciarem a partir de precursores linfóide, dependendo dos estímulos às células. Então, acredita-se que pré-DCs saem da medula óssea e devido aos estímulos empregado nestas células, pré-DCs se diferenciam no processo de migração ao local de residência(127–129).

As cDCs, que foram as primeiras a serem descritas, e reside principalmente nos órgãos linfoides, e pode ser dividida em dois grupos distintos. A cDC1, que tem como função principal a ativação de linfócitos T CD8 e uma resposta inflamatória polarizando a resposta para Th1. Como também cDC2, que possuem maior capacidade de ativar linfócitos T CD4, e em sua atuação pode desenvolver a tolerância da resposta imune, induzindo a polarização em um perfil Th2 e ativação de T reguladoras (Tregs), bem como sua maior presença no timo induzindo a tolerância central de linfócitos. As cDC1 e cDC2, se diferem pela expressão de moléculas, principalmente na superfície destas células, sendo que cDC1 expressam HLA-DR, e o receptor CD205, porém apresentam baixa expressão de CD11c. Enquanto cDC2 tem o perfil fenotípico, CD11+ e CD11b+, HLA-DR+, CD172a+(127–129).

As pré-DCs também podem se diferenciar em pDC que tem características fenotípicas de não expressarem CD11c e possuem baixa expressão de HLA-DR, porém possui o perfil CD123+, CD304+, CCR2+, CXCR3+. As pDCs primeiro foram descritas como monócitos plasmocitóides,

por estarem normalmente na circulação sanguínea e presentes em baixas quantidade na circulação linfática e nos tecidos periféricos, com alta eficiência na resposta contra infecções virais, pela secreção de interferon (IFN) do tipo I (IFN-I) e têm pouca ação na ativação de linfócitos(127–129).

As LCs se diferenciam da demais pela exclusiva e vasta expressão de *langerin*, que são receptores de lectina dependente cálcio, altamente expressas na superfície de LCs, reconhecem e se ligam principalmente, a manoses(130). Além disso, LCs expressam CD1a e CD1c, e têm alta expressão de CD11c. As LCs foram encontradas primeiramente na epiderme do tecido cutâneo de camundongos, em seguida, observaram sua residência também no fígado, rins, mucosa, entre outros tecidos. Elas possuem como principal função na imunologia nestes tecidos, tanto no combate a agente infecciosos, como na recuperação dos mesmos, induzindo a tolerância periférica da resposta imune, mediando a ação e polarização da resposta de linfócitos T nesses ambientes(127–129).

As moDCs têm origem diferente das demais, sendo que os monócitos circulantes se diferenciam em DCs após migração aos tecidos, que depende dos mediadores presentes nos mesmos. As mo-DCs têm grande capacidade de migração para os órgãos linfoides secundários e maior capacidade em ativar linfócitos T(127–129).

As mo-DCs quando diferenciadas se encontram no seu estado imaturo, pois ainda não tiveram contato com antígenos externos, possuindo como característica a elevada expressão da molécula CD1a, que faz parte da família do Complexo de Principal de Histocompatibilidade maior ("*major histocompatibility complex*" – MHC)(131), com propriedade de apresentar antígenos lipídicos derivados de agentes infecciosos aos linfócitos T(132). Como também a molécula CD11c pertencente ao grupo de moléculas adesinas intercelular (*intercellular adhesion molecule*, ICAM-1), que auxiliam na motilidade de DCs, inclusive para a apresentação de antígenos aos LTs,

foram identificadas previamente como exclusivas de DCs, entretanto essa molécula também é expressa em outras células mononucleares(133,134).

Além do mais, mo-DCs imaturas ainda possuem uma alta expressão das moléculas do complexo MHC, que possui duas classes, MHC classe I e II (MHC-I e MHC-II) sendo o conjunto de genes que codificam as moléculas responsáveis pela apresentação de antígenos proteicos aos linfócitos T, ambos expressos em mo-DCs, principalmente o MHC-II, que em humanos recebe o nome de antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen*, HLA-DR)(106,134).

As mo-DCs também apresentam em sua superfície moléculas relacionadas com a apresentação de antígenos para linfócitos Ts, as moléculas, co-estimuladoras, como as moléculas da família B7, CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2). Estas moléculas responsáveis pelo segundo sinal de ativação dos linfócitos T após o reconhecimento de peptídeos microbianos apresentados através da molécula de MHC. A ausência deste segundo sinal leva os linfócitos a se tornarem anérgicos. Além disso, destaca-se outra molécula co-estimuladora, o CD40, que se liga ao CD40 ligante (CD40L) de linfócitos T, com a finalidade de sinalizar para DCs aumentarem a expressão das moléculas B7-1/2(135,136).

Entretanto, mo-DCs podem reconhecer microrganismos através dos receptores de lectina dependente de cálcio (CLRs), como CD209 altamente expresso em mo-DCs, que reconhecem principalmente carboidratos(129). Ao reconhecerem antígenos não próprios, mo-DCs passam a ter o perfil de células maduras. No processo de maturação, DCs passam a expressar a molécula CD83(106). Esse processo ainda é marcado pela migração de DCs, através da expressão do receptor de quimiocina CC (CCR-7), molécula responsável pelo direcionamento aos órgãos linfoides secundários (137)(138), com auxílio da moléculas de adesão CD62 ligante (CD62L), um ligante de selectina responsável pelo rolamento de DCs pelos tecidos e migração de DCs(139).

Nos órgãos linfoides secundários DCs possuem função efetora de apresentação aumentada, que está relacionada à intensificação da expressão das moléculas co-estimuladoras, para maior apresentação de antígenos aos linfócitos T(106). Essa maturação das DCs pode ser induzida pelo reconhecimento e interação com antígenos microbianos, inclusive *in vitro*, após o reconhecimento do lipolissacarídeo (LPS), uma endotoxina presente em bactérias gram-negativas como a *Escherichia coli*(140) e mediada por citocinas pró-inflamatória(129).

Por outro lado, a falta dos sinais pró-inflamatórios somados à presença de citocinas anti-inflamatórias, que pode ser induzidas por agentes infecciosos, levam DCs a permanecerem no seu estado imaturo, pela baixa expressão de moléculas co-estimuladoras, CD80 e CD86, podendo induzir a anergia dos linfócitos T. Neste perfil DCs induzem uma resposta de tolerância, mediada pela ativação de Tregs induzidas, pela ausência do segundo sinal na apresentação de antígenos. Além disso, DCs passam a expressar a molécula de morte celular programada ligante 1 (“*programmed death-ligant*” – PD-L1 ou CD274), que está relacionada à exaustão de linfócitos T, levando a ação limitada desses linfócitos pela anergia mediada por essa molécula(129).

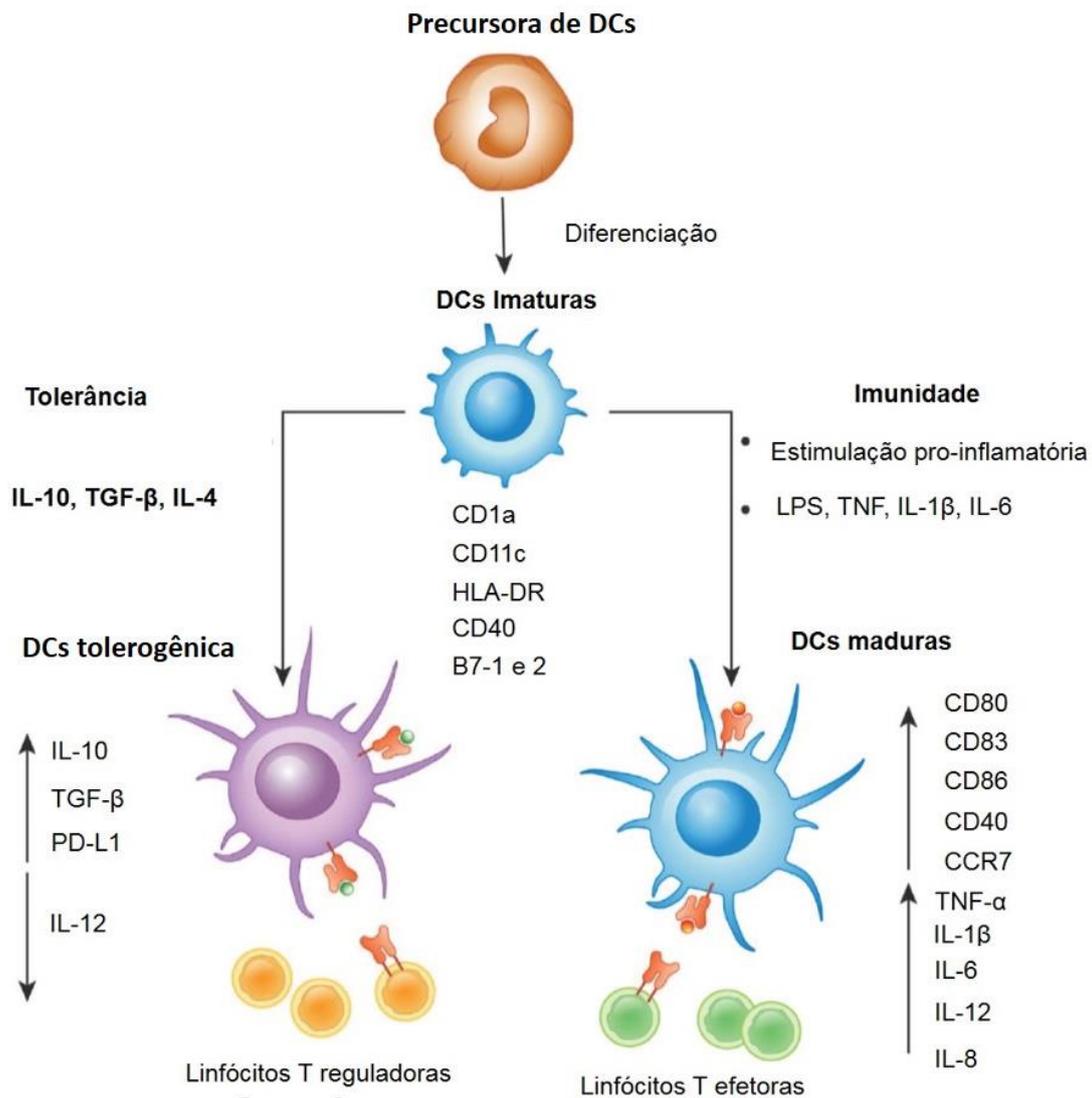


Figura 6. Células Dendríticas. As DCs têm uma precursora oriunda da medula óssea que são as pré-DCs, que se diferenciam em diversos subtipos. No caso as DCs derivadas de monócitos são diferenciadas a partir dos monócitos circulantes que no tecido se tornam DCs imaturas, as DCs derivadas de monócitos possuem características fenotípicas por apresentar as moléculas CD1a, CD11c, HLA-DR (MHC-II), CD40, moléculas da família B71 e 2, CD80 e CD86, respectivamente. Em um ambiente de infecção e inflamação, secreção de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, e ao reconhecer um antígeno microbiano, que pode-se destacar o LPS, DCs estimuladas a maturação que passam a expressar CD83 e CCR7, além de aumentar a expressão de moléculas co-estimuladoras, CD40, CD80 e CD86, aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12, assim conseguem promover a ativação de linfócitos Ts. Entretanto quando se tem o estímulo anti-inflamatório de, com a presença de IL-10, TGF- β , IL-4, por exemplo. DCs se diferenciam em um perfil de DCs tolerogênicas, que por sua vez secretam IL-10, TGF- β , co supressão de IL-12 e aumento da molécula inibidora de linfócitos Ts, PD-L1, nessas condições se tem ativação das células T reguladoras. Fonte adaptado de: Fucikova, et al (2019).

2. Justificativa

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, que está no grupo de prioridade da OMS. Essa doença tem grande incidência e prevalência, com destaque para o Brasil, que sempre se apresenta no topo de países com elevado número de casos. A leishmaniose tem grande relevância por estar relacionada a regiões e populações em situações de vulnerabilidade, com pouco interesse e investimento.

Os estudos na área têm demonstrado o quanto essa patologia tem evoluído junto a humanidade, evidenciando suas peculiaridades adquiridas de acordo com cada espécie e indivíduo. Além do que, a maioria dos estudos se restringe a modelos animais isogênicos, que em alguns casos mostram ter comportamento diferente, quanto a modelos humanos, por características específicas de cada ser.

Por isso, o interesse de trabalhos com modelos humanos tem crescido cada vez mais e, conseqüentemente, a importância das células dendríticas tem sido observada. Portanto, as DCs se destacam, pois fazem parte do sistema imune inato e são essenciais para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. A *Leishmania*, por sua vez, é um parasito intracelular obrigatório, tem capacidade de infectar DCs e possuem habilidade de modular a repostas induzindo a tolerância e a anergia de linfócitos e promovendo a persistência do parasito. Portanto os estudos da interação parasito-hospedeiro são de suma importância, para que se conheça os mecanismos da resposta imune de células dendríticas às espécies locais, *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a modulação de moléculas de superfícies em células dendríticas humanas infectadas por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*.

3.2. Objetivo específicos

- ✓ Determinar a taxa de infecção/porcentagem de células dendríticas infectadas por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*;
- ✓ Caracterizar fenotipicamente células dendríticas na presença de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*;
- ✓ Analisar os efeitos da infecção na expressão das moléculas de superfície em células dendríticas.

4. Desenho Experimental

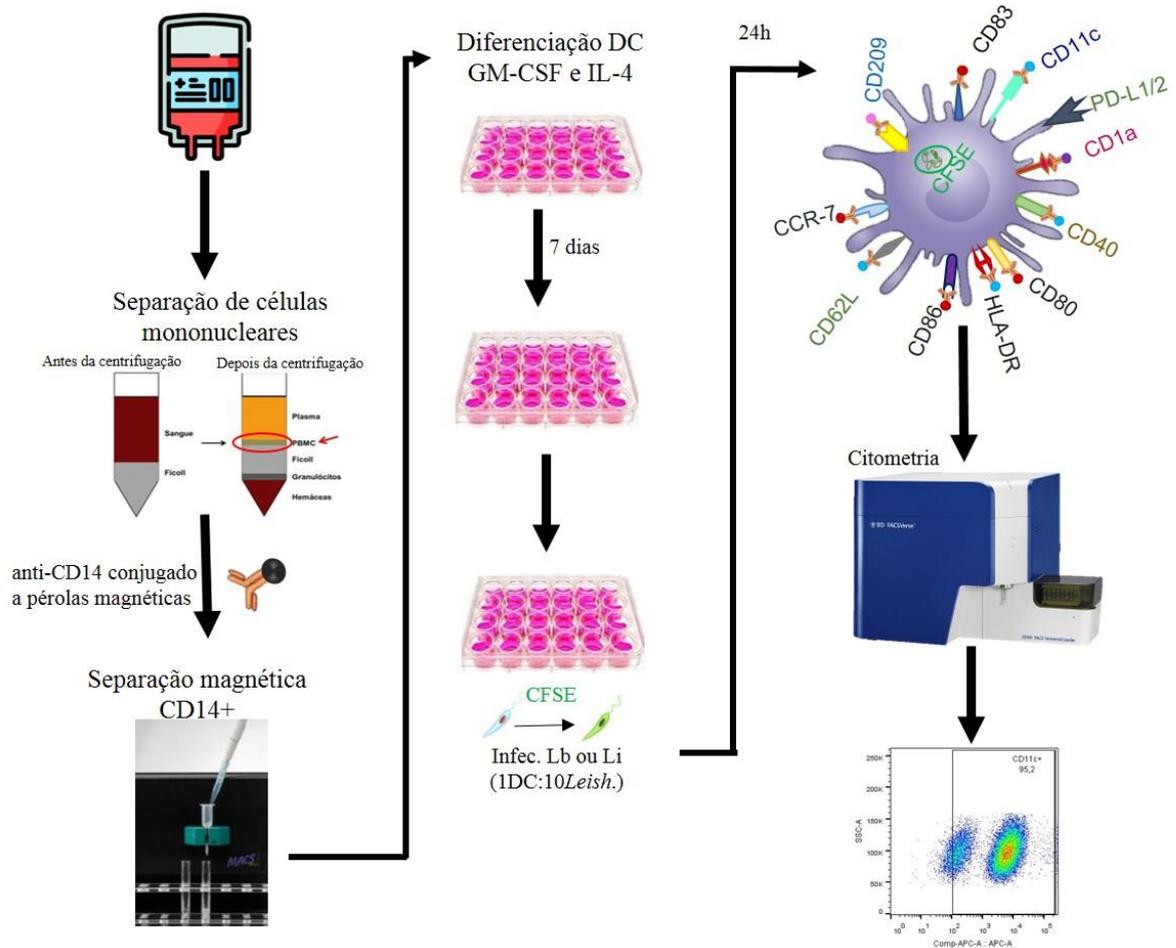


Figura 7. Desenho experimental. As amostras utilizadas foram provenientes de *buffy coats* cedidas pela Fundação Hemocentro de Brasília. Estas amostras então passaram pelo processo de separação de células mononucleadas por diferença de densidade Ficoll, que é possível observar o tubo na direita o sangue acima do ficoll, quando passa pela centrifugação acontece a separação do plasma, logo abaixo a nuvem de células mononucleadas, com o ficoll separando os granulócitos e hemácias. As células mononucleadas foram marcadas com anti-CD14 conjugado a pérola de magnética, e passaram pela separação magnética, através da coluna magnéticas acoplada em um ímã. As células CD14+ foram selecionadas e incubadas em placa de 24 poços com meio suplementado por citocinas GM-CSF e IL-4. Após 7 dias as DCs foram colocadas em co-cultivo com *L. braziliensis* ou *L. infantum*, marcadas previamente com CFSE, na proporção de 10 *Leishmanias* para 1 DC. Depois de 24h moléculas de superfície em DCs: CD1a, CD11c, CD209, CD83, CCR7, CD62L, HLA-DR, CD40, CD86, CD80 e PD-L1, foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforos. Então, DCs marcadas foram adquiridas por citometria de fluxo e analisadas no software Flowjo.

5. Metodologia

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório Biologia do Gene, no Instituto de Biologia, na Universidade de Brasília, *campus* Darcy Ribeiro. Este projeto teve o apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

5.1. Parasito

Foram utilizadas duas espécies de cepas referência, *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) e *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) que foram mantidas no freezer a -80°C. Para a realização dos experimentos, ambas as cepas foram descongeladas, ressuspensas em meio Schneider suplementado com 1% de antibiótico Penicilina-Estreptomicina 100X (Gibco®), 10% de SBF para *L. braziliensis* e 20% para *L. infantum* e cultivadas em tubos falcon de 15mL com meio NNN (Ágar com 0,6% de NaCl, 10% de sangue e 5% de glicose). Os tubos foram então incubados a 25°C. Após 72 horas, o conteúdo líquido foi transferido para uma garrafa de cultura (Kasvi), com meio Schneider suplementado (conforme citado acima) e novamente mantidas em incubação para que ocorresse a expansão em cultura. As *Leishmanias* foram contadas em câmara de Neubauer para acompanhamento do crescimento da cultura e identificação da fase estacionária para utilização no experimento. Os parasitos foram mantidos até a 5ª passagem para realização dos experimentos de infecção.

5.2. Obtenção de células mononucleares humanas de sangue total periférico

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas através de bolsas residuais de concentradas de leucócitos (*“buffy coats”*), em parceria feita com a Fundação Hemocentro de Brasília (termo em Anexo 1). Em seguida, 5mL de sangue foi transferido para os tubos de 15mL e diluído em 5mL de tampão fosfato salina 1X estéril (PBS 1X: 0,8% de NaCl, 0,14% Na_2HPO_4 , 0,02% KCl e 0,20%g KH_2HPO_4). Em outro tubo de 15mL, foi adicionado cuidadosamente 3mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) estéril com o auxílio de seringa e agulha, deixando escorrer lentamente pela parede dos tubos. Em seguida, o sangue diluído foi transferido lentamente e gradualmente para os tubos com Ficoll evitando misturar as fases. Assim, o Ficoll ficava abaixo da camada de sangue diluído. Os tubos foram centrifugados a 600xg a 25°C por 25 minutos sem aceleração e desaceleração. Após a centrifugação, foi possível observar as seguintes fases: as células anucleadas (eritrócitos) e polimorfonucleadas (neutrófilos) no fundo do tubo, em seguida, o Ficoll, logo acima a nuvem leucocitária (linfócitos e monócitos) e, por fim, o plasma sanguíneo. A nuvem foi coletada com o auxílio de uma pipeta graduada de 10mL e transferida para um tubo de 50mL. Para a retirada de Ficoll residual das células, o volume foi completado para 40mL com PBS 1X, as células foram centrifugadas a 600xg a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, foram feitas mais duas lavagens com rotações a 500xg e 400xg. Após as três lavagens, as células foram ressuspensas em 5mL de RPMI (Gibco®) incompleto. As células foram diluídas 1:100 em azul de tripan (Vetec) e contadas com exclusão de viabilidade na câmara de Neubauer.

5.3. Separação de células CD14+ por coluna magnética

Após a obtenção das células mononucleares, foi feita a purificação de monócitos, por separação magnética das células CD14+. As células (PBMC

total) foram lavadas em PBS 1X estéril e centrifugadas a 400xg por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foram ressuspensas em 80µL de tampão MACS (0,5% BSA, 2mM EDTA em PBS 1X, pH 7,2) para cada 10⁷ células. Posteriormente, foi adicionado 10µL para cada 10⁷ células de anticorpo anti-CD14 conjugado às pérolas magnéticas (Miltenyi Biotec) e incubadas por 15 minutos à 4°C. Após a incubação, foi adicionado 1mL de tampão MACS às células que foram centrifugadas a 400xg por 10 minutos a 4°C. Então foi adicionado 500µL de tampão MACS ao *pellet* de células. A coluna de separação (Miltenyi Biotec) foi devidamente encaixada no imã (Miltenyi Biotec) preso a um suporte metálico. Inicialmente, a coluna foi lavada com 500µL de tampão MACS e as células marcadas com as pérolas magnéticas foram transferidas para a mesma. Após a passagem das células pela coluna, a coluna foi lavada três vezes com 500µL cada de tampão MACS. A fração negativa, resultante dessa etapa, foi coletada num tubo de 15 ml, localizado logo abaixo da coluna. Após a última lavagem, foi adicionado 1mL do tampão MACS na coluna que foi desacoplada do imã e as células marcadas com as pérolas magnéticas presas à coluna, fração positiva enriquecida em CD14+, foram retiradas com a pressão de um êmbolo e transferidas para um tubo de 15mL. As células foram centrifugadas a 400xg por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em 5mL de RPMI suplementado com 10% de SBF e 1% antibiótico (RPMI completo). As células foram diluídas 1:10 em azul de tripan e contadas com exclusão de viabilidade na câmara de Neubauer.

5.4. Diferenciação *in vitro* de células dendríticas a partir de monócitos

Após a contagem da fração CD14+, estas foram ajustadas de 3x10⁵ a 5x10⁵ células/mL por poço. As células foram cultivadas em placa de cultura de 24 poços (Greiner Bio-one), com meio RPMI completo suplementado com 800UI/mL de citocina IL-4 (Peprotech) e 50ng/mL do fator de crescimento GM-

CSF (Peprotech) e incubadas na estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 7 dias. Nesse período, o meio foi substituído duas vezes em intervalos de 48h, retirando-se 150µL/poço e adicionando-se 200µL/poço de meio novo suplementado com as citocinas IL-4 e GM-CSF, conforme descrito anteriormente.

5.5. Infecção de células dendríticas com *L. braziliensis* e *L. infantum*

Após 7 dias de diferenciação, as DCs foram coletadas por lavagens sequenciais com PBS estéril, pois são células não aderentes, dos poços e transferidas para um tubo de 50mL. Cada poço foi lavado três vezes com 1mL de PBS 1X homogeneizando cinco vezes cada poço para a recuperação total das células. O volume foi completado para 40mL com PBS 1X estéril e, então, centrifugado a 400xg por 10 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1mL de RPMI completo, diluídas 1:10 com azul de tripan e quantificadas. Posteriormente, as células foram ajustadas e cultivadas em placa de 24 poços (3 a 5x10⁵/mL por poço).

5.5.1. Marcação de *Leishmania* com CFSE e infecção de células dendríticas

Ambas as espécies de *Leishmania* foram contadas e ajustadas na proporção de 10 *Leishmanias* para 1 DC (10:1). As *Leishmanias* (18x10⁷) foram lavadas e centrifugadas a 1.600xg por 10 minutos a 20°C. Em seguida, foram ressuspensas em 2,5mL de PBS 1X estéril e marcadas com concentração final de 20uM de éster de succinimidil carboxifluoresceína (CFSE, eBioscience) para permitir a comparação das células infectadas e não infectadas, mas que tiveram contato com as *Leishmanias* no meio (células *bystander*). Após 30 minutos de incubação a 25°C no escuro, as *Leishmanias* foram centrifugadas a 1.600xg por 10 minutos a 20°C e ressuspensas em

20µL/poço de RPMI incompleto e transferidas para os poços com as células. Como controle positivo, as DCs foram estimuladas com 100ng/mL de LPS (Sigma), o controle negativo foi incubado apenas com o meio sem estímulo ou tratamento. Por fim, as células foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ (5%) por 24h.

5.6. Marcação de moléculas de superfície

Após 24 horas de infecção, os poços foram lavados três vezes com PBS 1X homogeneizando cinco vezes, e transferidas para tubos *ependorfs* de 1,5mL (cerca de 10⁵ células por tubo). As células foram centrifugadas a 400xg por 10 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas a 4°C com 10µL de tampão FACS 1X (1% BSA, 0,01% azida sódica e PBS 1X) para o bloqueio de sítios inespecíficos. Após 10 minutos, foi adicionado 200µL de tampão FACS 1X às células que foram lavadas e centrifugadas a 400xg por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, foi adicionado 20µL dos mixes com anticorpo diluído em tampão FACS 1X (Quadro 1) às células e incubadas a 4°C no escuro. As células foram marcadas com os anticorpos: anti-CD1a conjugado a PerCP-Cy7 (eBioscience), anti-CD83 conjugado a PE (eBioscience), anti-HLA-DR conjugado a APC (eBioscience), anti-CD80 conjugado a PE (eBioscience), anti-CD209 conjugado a PerCP-Cy5.5 (eBioscience), anti-CD11c conjugado a APC (Imuno tools), anti-CD274 (PD-L1) conjugado a PE (BD Pharmagen), anti-CCR-7 conjugado a PE (BD Pharmagen), anti-CD62L conjugado a APC (Imuno tools), anti-CD40 conjugado a APC (Imuno tools) e anti-CD86 conjugado a PE (eBioscience). Após 30 minutos, para a retirada dos anticorpos não aderidos, as células foram lavadas com 200µL de tampão FACS 1X e centrifugadas a 400xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 300uL de tampão FACS 1X. Após a marcação, cerca de vinte mil (20.000) células por condição, foram adquiridas

por citometria de fluxo no citômetro Verse e analisadas no software FlowJo (Flowjo® versão 10).

Quadro 1. Estratégia para marcação fenotípica de células dendríticas.

	Anticorpos, fluorescências e diluições		
MIX1	CD1a-PerCP-CY7 1:50	CD83-PE 1:20	
MIX 2	HLA-DR-APC 1:30	CD209-PerCP-Cy5.5 1:20	CD80 – PE 1:20
MIX 3	CD11c – APC 1:30	PD-L1 PE 1:20	
MIX 4	CCR7 – PE 1:20	CD62L APC 1:10	
MIX 5	CD40 – APC 1:20	CD86 – PE 1:20	

Para a caracterização fenotípica de DCs em todas condições foi utilizado, dividido em cada MIX, enumerados de 1 ao 5. Na linha de cada MIX consta a anticorpos conjugados a fluorescência, e as combinações feitas, bem como as diluições usadas em tampão FACS.

5.7. Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad-Prisma versão 5. Para o teste de normalidade foi utilizado o teste Shapiro-Wilk. Para a análise multivariada comparando todas as condições experimentais com o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. Os resultados obtidos foram demonstrados com a mediana +/- o erro padrão, os valores considerado significantes (*) $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1. Caracterização fenotípica de células dendríticas

Após a diferenciação em DCs e infecção com *L. braziliensis* ou *L. infantum*, as moléculas de superfícies foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados à fluoróforos para a caracterização fenotípica das DCs. Inicialmente, as DCs foram selecionadas por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Em seguida, foi analisada a expressão das moléculas de superfícies, como a molécula CD1a, de acordo com o controle de células não marcadas com anticorpos (apêndice 1), e devidamente compensado para que não houvesse sobreposição de fluorescência (apêndice 2). No qual (controle negativo) CN apresentou 86,1%, DCs infectadas com *L. braziliensis* (Lb) 85,2%, DCs infectadas com *L. infantum* (Li) 84,2% e DCs tratadas com LPS (CP) 82,6%. Essa estratégia de análise representada por CD1a foi feita para as demais moléculas, em todas as condições experimentais, CN, Lb, Li e CP (Figura 8).

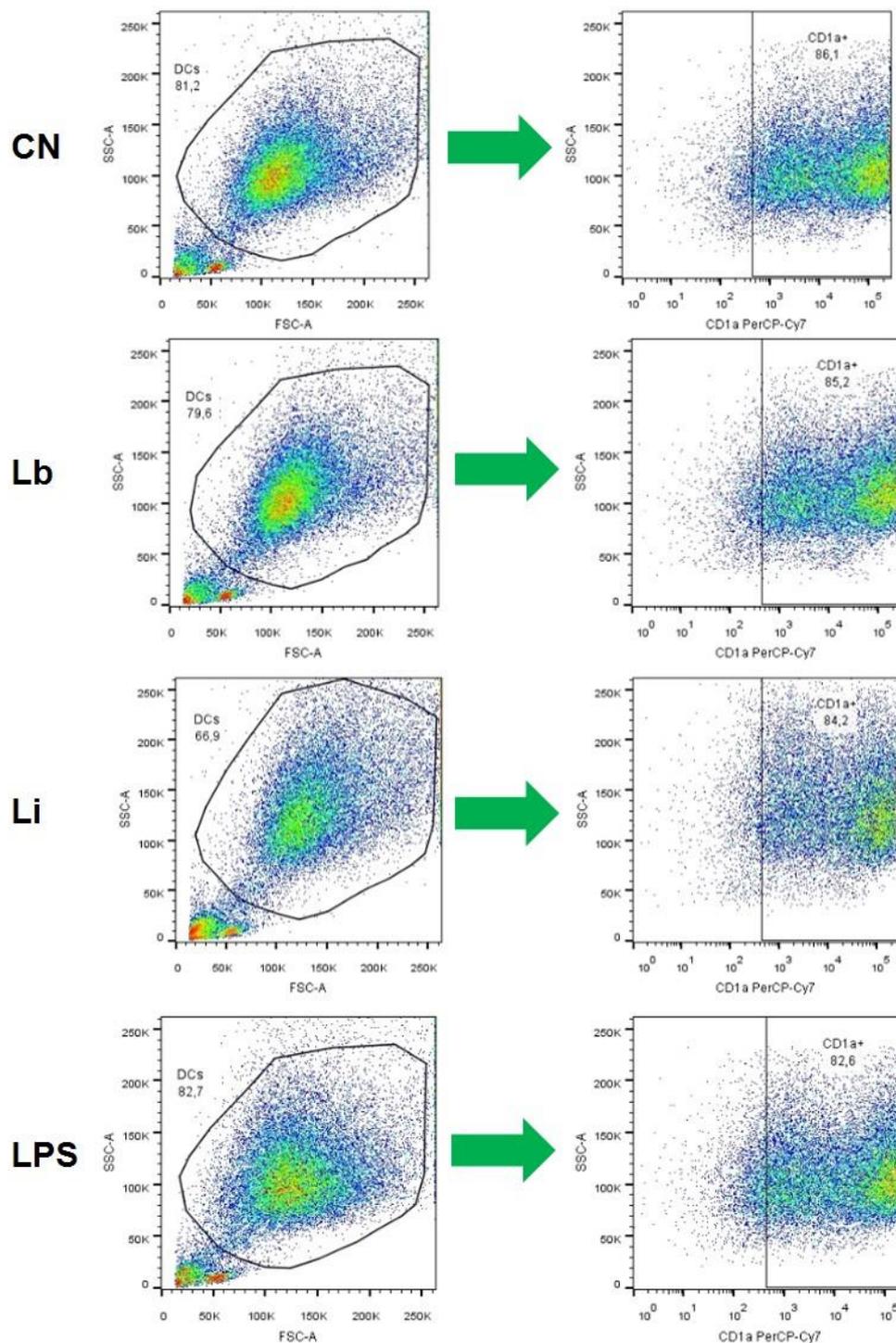


Figura 8. Figura representativa da estratégia de análise para caracterização fenotípica de DCs. DCs derivadas de MO foram infectadas por *L. braziliensis* (Lb) ou *L. infatum* (Li) por 24 horas. DCs foram selecionadas por SSC-A e FSC-A e, em seguida, as células CD1a+ foram selecionadas. Como controle negativo (CN) DCs foram cultivadas apenas em meio e, como controle positivo (CP), DCs foram tratadas com LPS (100ng/mL).

6.2. Caracterização de células dendríticas *bystanders* e infectadas

L. braziliensis ou *L. infantum* foram marcadas com CFSE e depois colocada em co-cultura com DCs. Então DCs foram selecionadas primeiramente por tamanho x granulosidade e depois, aquelas CFSE+ (infectadas) e CFSE- (não infectadas ou “*bystander*”). As DCs em co-cultura com *L. infantum* (66,9%). Sendo as DCs *bystanders* (14,5%), que se caracterizam por ter ficado em co-cultura com a *Leishmania*, mas não foram infectadas. Já as DCs infectadas por *L. infantum*, tiveram expressão de 86,3% de CFSE, esse ponto de corte foi baseado em DCs na condição de controle negativo (apêndice 3). Então foi analisada a expressão da molécula CD83 das DCs *bystander* (39,6%), e também foi observada a expressão da molécula CD83 em DCs infectadas (93,3%) (Figura 9). Vale destacar que análise entre DCs infectadas e *bystander*, foi realizada para as demais moléculas, bem como para as condições de infecção por *L. braziliensis*.

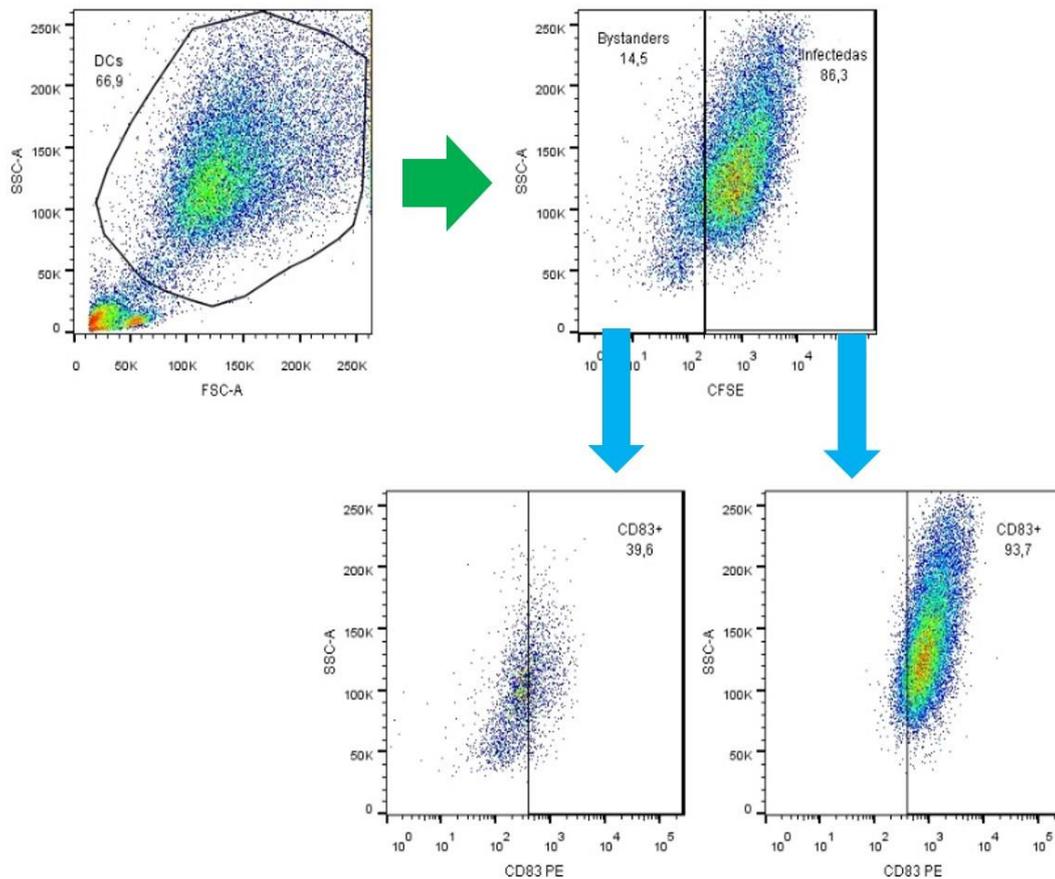


Figura 9. Figura representativa da estratégia de análise para caracterização fenotípica de DCs *bystanders* e infectadas. DCs que ficaram em co-cultura com *L. braziliensis* ou *L. infantum*, foram selecionadas por SSC-A e FSC-A (granulosidade x tamanho), as DCs selecionadas, foi analisada quanto a expressão de CFSE, DCs infectadas (CFSE+) e DCs *bystander* (CFSE-). Então foi observada a expressão da mlécula CD83, em DCs *bystander* (39,6%) e DCs infectadas (93,7%).

6.3. Quantificação da taxa de infecção e carga parasitária em células dendríticas infectadas por *Leishmania* por citometria de fluxo

Na taxa de infecção por citometria de fluxo, foi observada a porcentagem de DCs positivas para CFSE. As DCs infectadas por *L. braziliensis* (50,00%+/- 19,00), que teve uma taxa de infecção significativa comparada a infecção por *L. infantum* (50,00%+/-4,00) (Figura 10 A).

Entretanto a média de intensidade de fluorescência (MFI) de DCs pela emissão de CFSE *Leishmania braziliensis* (1850+/-22,76) e *Leishmania infantum* (3925+/-484,7) que teve um aumento significativo em relação a *L. braziliensis*, (Figura 10 B).

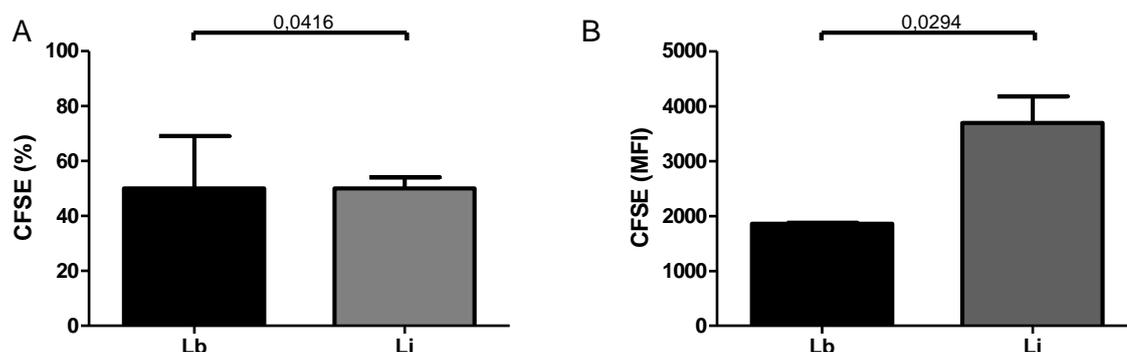


Figura 10. Taxa de infecção por *L. braziliensis* e *L. infantum*. DCs derivadas de MO foram infectadas por *L. braziliensis* (Lb) n= 2 e *L. infantum* (Li) n=4, previamente marcadas com CFSE. Após 24 horas de infecção (A) porcentagem de DCs infectadas pela expressão de CFSE, aplicando o teste exato de Fisher com os valores significante (*p< 0,05). Já (B) a média de intensidade de fluorescência (MFI) DCs que emitiram de CFSE analisada por citometria de fluxo aplicando o teste Mann-Whitney com os valores significante (*p< 0,05).

6.4. Caracterização de diferenciação em células dendríticas após a co-cultura com *Leishmania*.

Para a caracterização fenotípica das DCs inicialmente foram marcadas as moléculas CD1a e CD11c. As DCs cultivadas isoladamente apenas com meio de cultura (CN) expressaram cerca de 74,65%+/-7,071 de CD1a, sem apresentaram diferença significativa entre as demais condições DCs em co-cultura com *L. braziliensis* (51,60%+/-3,00), DCs em co-cultura com *L. infantum* (85,30%+/-5,50) e DCs tratadas com LPS (CP) (63,25%+/-9,303) (Figura 11 A). A expressão da molécula CD11c se manteve alta entre as condições, sendo que CN teve expressão de 99,55%+/- 0,1211, DCs em co-cultura com *L. braziliensis* (92,60%+/-1,700), DCs em co-cultura com *L. infantum* a expressão de CD11c foi de 99,70%+/-0,2250 e CP teve expressão

de 99,40% \pm 1,053 (Figura 11 B), confirmando assim a diferenciação dos MOs em DCs.

Na média de intensidade de fluorescência (MFI) ambas moléculas CD1a e CD11c apresentaram comportamento semelhante. Sendo que o MFI da molécula CD1a, CN apresentou 8665 \pm 3220, em DCs em co-cultura com *L. braziliensis* (23305 \pm 5070), na co-cultura com *L. infantum* (6410 \pm 1150) e no CP (8380 \pm 2926) (Figura 10 C). No MFI da molécula CD11c CN teve a expressão de 6737 \pm 4084, as DCs em co-cultura com *L. braziliensis* (5591 \pm 269,0), as DCs em co-cultura *L. infantum* (11111 \pm 4184) e no CP (7418 \pm 9818) (Figura 11 D).

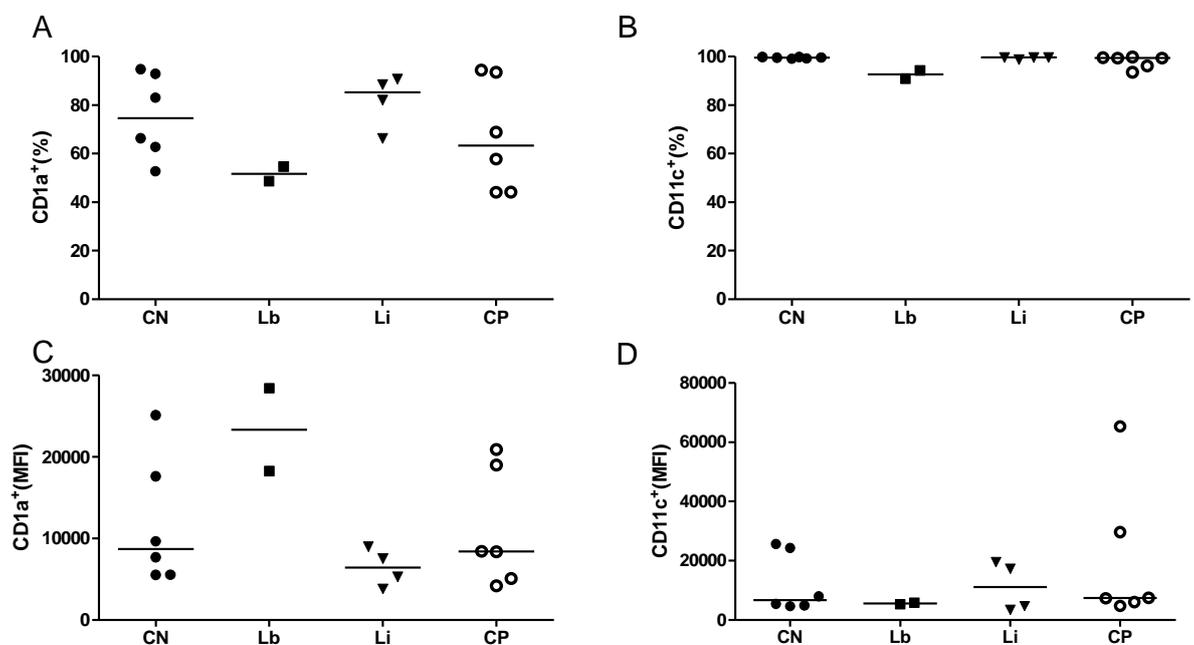


Figura 11. Expressão de CD1a e CD11c na DCs infectadas por *L. braziliensis* e *L. infantum*. (A) porcentagem da expressão de CD1a em DCs e (B) a expressão da molécula de CD11c, nas condições de controle negativo CN, DCs em co-cultura com *L. braziliensis* (Lb), DCs em co-cultura com *L. infantum* (Li) e DCs tratadas com LPS (CP). Na expressão da a média de intensidade de fluorescência (MFI) (C) a molécula CD1a e (D) a expressão da molécula CD11c. Cada ponto representa um doador, apresentando a barra de mediana, teste aplicado foi Kruskal-Wallis e os valores significante (* p < 0,05).

6.5. Caracterização de diferenciação em células dendrítica *bystanders* e infectadas em co-cultura com *Leishmania*

Ao analisar a expressão das moléculas, CD1a e CD11c em DCs, agora discriminando DCs *bystanders* ou infectadas após a interação com *L. braziliensis* ou *L. infantum*. Esta interação demonstrou não afetar os marcadores de diferenciação em DCs, já que CD1a teve a expressão de 83,00% \pm 6,667 em CB, na interação de DCs e *L. braziliensis*, Lb *bystander* (55,60% \pm 3,300) e Lb infectada, a expressão de CD1a na interação com *L. infantum*, a expressão em Li *bystander* foi de 81,15% \pm 5,762 e Li infectada (87,55% \pm 4,959) (Figura 12 A). Comportamento semelhante foi observado na expressão da molécula CD11c, com CN tendo expressão de 99,60% \pm 0,1172 nas condições da DCs em co-cultura com *L. braziliensis*, sendo que Lb *bystander* teve expressão de 88,20% \pm 1,500 e Lb infectada apresentou 94,50% \pm 1,700, na co-cultura com *L. infantum* DCs tiveram a expressão em Li *bystander* de 99,25% \pm 0,2121 e Li infectada apresentou 99,80% \pm 0,3591 na expressão de CD11c (Figura 12 B).

Na avaliação do MFI as moléculas, CD1a e CD11c (Figura 12 C e D), a expressão destas moléculas se comportaram de maneira semelhante, uma vez que observa-se que a molécula CD1a, teve a expressão em CN de 9642 \pm 5554, nas DCs em co-cultura com *L. braziliensis*, Lb *bystander* (26696 \pm 9233) e Lb infectada (21776 \pm 3127), na condições de DCs em co-cultura com *L. infantum*, sendo que em Li *bystander* apresentou 6958 \pm 1142 de expressão de CD1a e Li infectada 6206 \pm 1155 (Figura 11 C). O mesmo pode ser observado quanto à expressão do MFI da molécula CD11c que não apresentou grandes variações nas seguintes condições: CN (8009 \pm 3810), Lb *bystander* (4332 \pm 134,0), Lb infectada (6104 \pm 293,0), Li *bystander* (8871 \pm 3733) e Li infectada (12465 \pm 4764) (Figura 12 D).

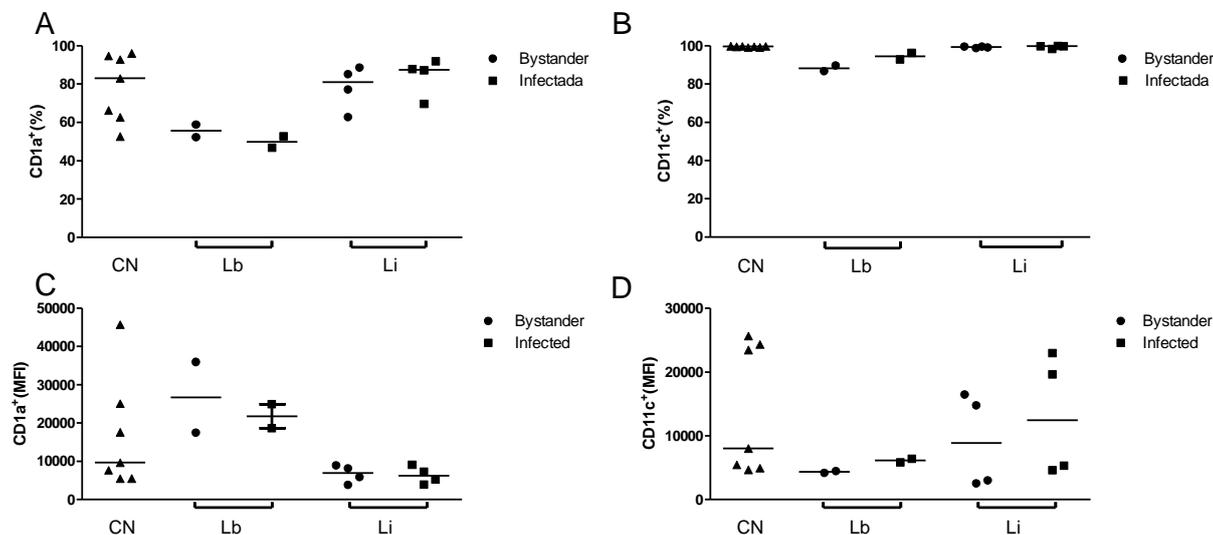


Figura 12. Expressão de CD1a e CD11c em DCs *bystanders* e infectadas. Pode-se observar a porcentagem de DCs que expressam as moléculas (A) CD1a e (B) CD11c, nas condições de controle negativo CN, DCs que interagiram com *L. braziliensis* (Lb *bystander*) e DCs infectadas por *L. braziliensis* (Lb infectada), também DCs que ficaram em co-cultura com *L. infantum* (Li *bystander*) e DCs infectadas por *L. infantum* (Li infectada). Esses grupos também foram analisados quanto à média de intensidade de fluorescência (MFI) para as moléculas, (C) CD1a e (D) CD11c. Cada ponto representa um doador e a barra refere-se a mediana da expressão das moléculas. O teste aplicado foi Kruskal-Wallis e os valores considerados significante (* $p < 0,05$).

6.6. Expressão do receptor DC-SIGN em células dendríticas em co-cultura com *Leishmania*

Visto que *L. braziliensis* e *L. infantum* são capazes de infectar DCs e após a análise de moléculas envolvidas na diferenciação de DCs, as *Leishmanias* demonstraram não modular a expressão destas moléculas. Então avaliou-se a expressão de CD209, molécula relacionada a fagocitose de microrganismos. As DCs tiveram alta expressão do receptor CD209 (Figura 12) como demonstrado em CN (89,70% \pm 7,086), já em co-cultura com *L. braziliensis* apresentou a expressão de 60,65% \pm 20,45, na co-cultura com *L.*

infantum a expressão de CD209 foi de 92,20% \pm 10,23 em DCs, e no controle positivo apresentou 78,05% \pm 8,439 (Figura 13 A).

A molécula CD209 na expressão de MFI no CN (588,0 \pm 190,6), que não houve variação na presença de *L. braziliensis* (409,5 \pm 91,50) e *L. infantum* (651,5 \pm 194,9) e CP (421,0 \pm 154,4) (Figura 13 B).

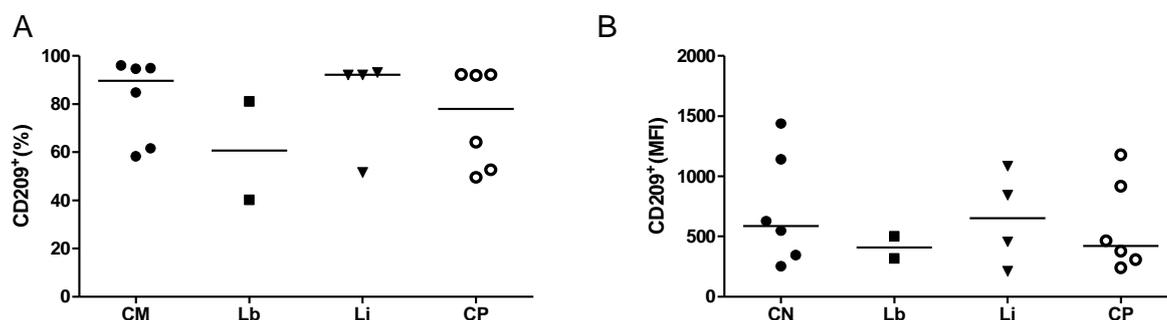


Figura 13. Expressão de CD209 em DCs após co-cultura com *L. braziliensis* e *L. infantum*. (A) A expressão da molécula CD209 em DCs na comparação entre as condições de controle negativo (CN) em relação a DCs em co-cultura com *L. braziliensis* (Lb) e *L. infantum* (Li) e o controle positivo (CP). (B) Trata-se da média de intensidade de fluorescência da molécula CD209. Sendo que cada ponto representa um doador, e barra representa a mediana das condições, tendo em vista o teste Kruskal-Wallis foi aplicado para análise da expressão da molécula e os valores significantes foram de $p < 0,05^*$.

6.7. Expressão do receptor DC-SING em células dendríticas *bystanders* e infectadas em co-cultura com *Leishmania*

Ao diferenciar DCs *bystanders* e DCs infectadas, foi possível avaliar que a infecção por *L. braziliensis* ou *L. infantum*, não alterou a expressão da molécula CD209 em DCs, com o valor de $p = 0,1478$, visto que o CN (94,60% \pm 6,332), na co-cultura com *L. braziliensis* e DCs, Lb *bystander* tiveram expressão de 54,15% \pm 18,85 e Lb infectada (63,55% \pm 21,05), na

interação de DCs com *L. infantum*, Li *bystander* teve expressão de 81,25% \pm 11,63 a expressão de 94,70% \pm 4,309 da molécula CD209, (Figura 14 A)

A média de intensidade de fluorescência mostrou ter comportamento semelhante, valor de $p = 0,6790$, com CN (628,0 \pm 176,6), na interação de DCs com *L. braziliensis*, Lb *bystander* (433,0 \pm 52,00) e Lb infectada (399,0 \pm 108,0), na co-cultura de DCs com *L. infantum*, a molécula CD209 teve MFI de 470,5 \pm 163,6 em Li *bystander* e em Li infectada foi de 746,0 \pm 244,7 (Figura 14 B).

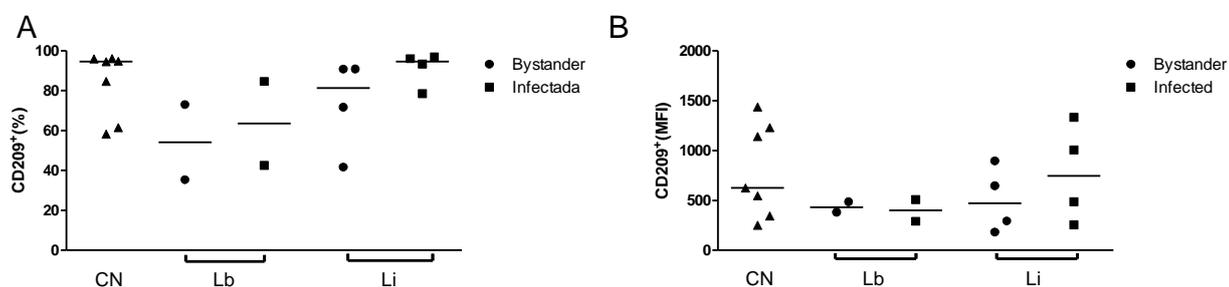


Figura 14. Expressão de CD209 em células dendríticas bystanders e infectadas. (A) Porcentagem de DCs que expressaram CD209, na comparação entre controle negativo (CN), DCs bystander na interação com *L. braziliensis* (Lb bystander), DCs infectadas por *L. braziliensis* (Lb infectada), DCs bystander em co-cultura com *L. infantum* (Li bystander) e DCs infectadas por *L. infantum* (Li infectada). A avaliação da média de intensidade de fluorescência (B) (MFI) da molécula CD209. Comparando as condições pelo teste de Kruskal-Wallis, cada ponto representa um doador, e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significante entre os grupos.

6.8. Expressão de moléculas relacionadas a maturação e a migração de células dendríticas co-cultura com *Leishmania*

Após a fagocitose de microrganismos as DCs passam pelo processo de maturação, marcada pela expressão da molécula CD83, que teve valo de $p = 0,0702$, sendo CN expressou 13,25% \pm 3,136, DCs em co-cocultura com *L. braziliensis* (23,60% \pm 0,4000), DCs em co-cultura com *L. infantum* (28,95% \pm 5,179) e em CP DCs tiveram expressão de 32,10% \pm 5,968 de CD83 (Figura 15 A).

Neste processo DCs são direcionadas para os órgãos linfoides secundários, pela expressão da molécula CCR7, com $p=0,0167$, sendo que DCs na interação com *L. infantum* (14,10% \pm 3,240) teve um aumento significativo da expressão da molécula CCR7 em relação ao CN (2,270% \pm 0,5858), já na interação de DCs com *L. braziliensis* (9,435% \pm 0,7650) e CP (2,080% \pm 0,3807), não apresentaram diferença significativa (Figura 15 B).

No auxílio da motilidade de DCs marcou-se a moléculas de adesão CD62L, que não apresentou diferença na expressão, visto que o valor de $p=0,9176$, já que no grupo CN a expressão foi de 23,10% \pm 5,686, em DCs na co-cultura com *L. braziliensis* (23,10% \pm 5,700) e na interação de DCs com *L. infantum* a expressão de CD62L foi de 27,55% \pm 9,180 e CP (20,05% \pm 3,814) (Figura 15 C).

A média de intensidade de fluorescência (MFI) a molécula CD83 não apresentou diferenças significantes, com $p=0,1588$, e na condição CN (769,5 \pm 65,11), com DCs em co-cultura com *L. braziliensis* teve o MFI de 438,0 \pm 76,50), em DCs na interação com *L. infantum* teve a expressão de 644,0 \pm 90,59) da molécula CD83 e CP (685,5 \pm 67,63) (Figura 15 D)

A molécula CCR7 não demonstrou alteração no MFI em DCs, pelo valor de $p=0,3707$, sendo que DCs apresentaram o MFI de 264,0 \pm 46,03 em CN, na interação de *L. braziliensis* com DCs a expressão de CCR7 foi de 267,0 \pm 16,00, em DCs na presença de *L. infantum* foi de 341,0 \pm 21,27 e CP (285,0 \pm 93,75) (Figura 15 E). Já o MFI da molécula CD62L, se manteve sem grandes variações, sendo o $p=0,1588$, e expressão nas seguintes condições: CN (769,5 \pm 65,11, Lb (514,5 \pm 76,50), Li (644,0 \pm 90,59) e CP (685,5 \pm 67,63) (Figura 15 F).

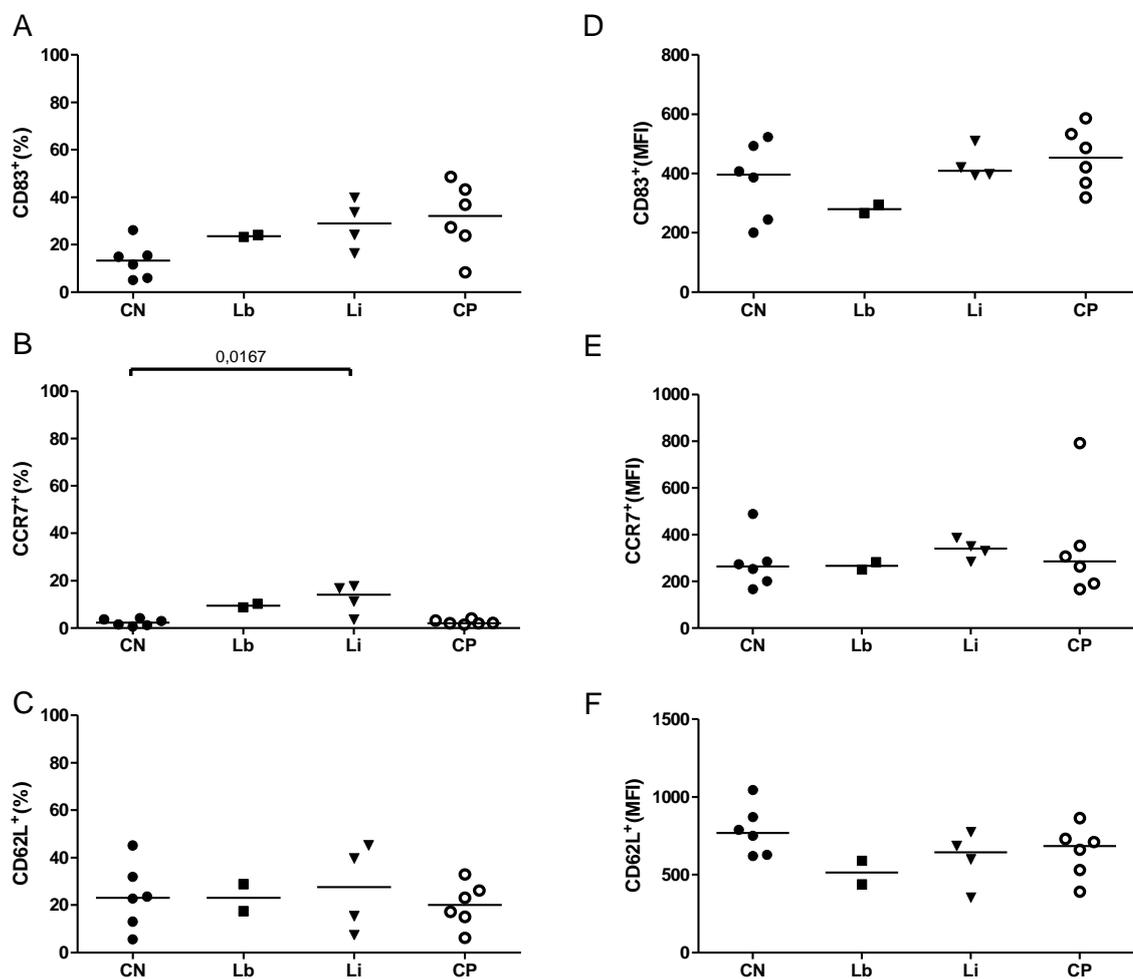


Figura 15. Expressão de moléculas relacionadas com a maturação e a migração de DCs após co-cultura com *L. braziliensis* e *L. infantum*. A expressão das moléculas, (A) CD83, (B) CCR7 e (C) CD62L, em DCs, nas condições, de controle negativo (CN), DCs na presença de *L. braziliensis* (Lb) ou *L. infantum* (Li). Na média de intensidade de fluorescência as moléculas (D) CD83, (E) CCR7 e (F) CD62L nas condições experimentais descritas acima. Sendo que cada ponto representa um doador, a barra apresenta a mediana e a análise entre os grupos foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$ os valores foram considerados significantes.

6.9. Expressão de moléculas relacionadas com a maturação e a migração de células dendríticas *bystanders* e infectadas co-cultura com *Leishmania*

Ao analisar DCs *bystanders* e DCs infectadas. DCs demonstraram adquirir um perfil de células maduras através do valor de $p=0,0317$, sendo que CN apresentou a expressão $11,60\% \pm 2,98$, em DCs na presença de *L. braziliensis*, *Lb bystander* ($16,45\% \pm 0,8500$) e *Lb infectada* ($26,75\% \pm 0,6500$), não apresentaram diferença significativa, em DCs em co-cultura com *L. infantum*, *Li bystander* ($19,90\% \pm 5,083$) também não apresentou diferença significativa, contudo *Li infectada* ($38,25\% \pm 4,686$) teve um aumento significativo da expressão da molécula CD83 em relação ao CN (Figura 16 A).

As DCs embora tenham a expressão da molécula CCR7 com o valor de $p= 0,0173$, não foi possível observar diferença significativa entre as condições estudadas, sendo CN ($1,570\% \pm 0,5873$), a interação de DCs e *L. braziliensis*, *Lb bystander* ($1,210\% \pm 0,01000$) e *Lb infectada* ($12,95\% \pm 0,8500$), igualmente na interação de DCs e *L. infantum*, com *Li bystander* ($1,290\% \pm 0,6204$) e *Li infectada* ($21,95\% \pm 3,613$) (Figura 16 B).

A expressão da molécula CD62L, teve valor de $p= 0,3479$, demonstrando não possuir diferença entre CN ($23,50\% \pm 7,595$), as DCs em co-cultura com *L. braziliensis*, *Lb bystander* ($10,18\% \pm 1,625$) e *Lb infectada* ($28,45\% \pm 7,050$), DCs na presença de *L. infantum*, *Li bystander* ($16,79\% \pm 7,904$) e *Li infectada* ($33,05\% \pm 11,10$) (Figura 16 C).

A média de intensidade de fluorescência da molécula CD83, apresentou o valor de $p= 0,1694$, que pode ser observado em CN ($386,0 \pm 44,93$), DCs na interação com a *L. barziliensis*, *Lb bystander* ($288,0 \pm 3,000$) e *Lb infectada* ($278,5 \pm 17,50$), na interação de DCs com *L. infantum*, *Li byastander* ($423,0 \pm 29,90$), *Li infectada* ($415,0 \pm 39,42$) (Figura 16 D).

O MFI da molécula CCR7, verificou-se o valor de $p=0,1165$ sendo que o CN teve MFI de $266,0 \pm 38,94$, a co-cultura de *L. braziliensis* e DCs, *Lb bystander* foi de $177,0 \pm 13,00$ e *Lb infectada* ($270,5 \pm 17,50$), na presença de *L. infantum* com DCs, *Li bystander* ($257,0 \pm 34,99$) e *Li infectada* ($352,0 \pm 21,94$) (Figura 16 E).

O MFI da molécula CD62L, teve o $p=0,1692$, apresentando a em CN o MFI de $788,0\pm 221,5$, DCs na co-cultura com *L. braziliensis*, sendo Lb *bystander* ($790,5\pm 10,50$) e Lb infectada ($469,5\pm 94,50$), ainda foi observada a expressão de CD62L em DCs na presença de *L. infantum*, Li *bystander* ($654,5\pm 99,39$) e Li infectada ($571,0\pm 126,6$) em (Figura 16 F).

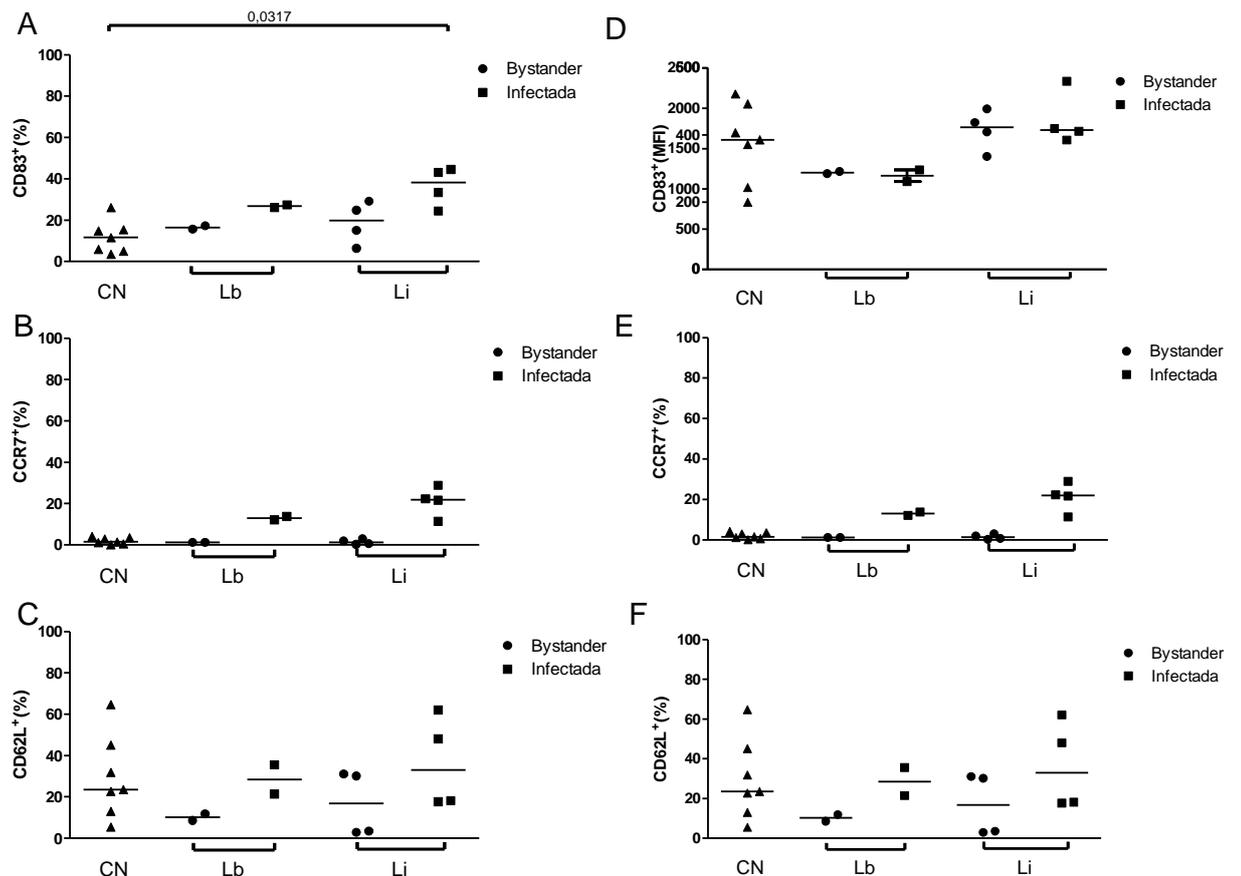


Figura 16. Expressão de moléculas relacionada com a maturação e a migração de células dendríticas bystanders e infectadas. A expressão das moléculas (A) CD83, (B) CCR7 e (C) CD62L, comparando o controle negativo (CN), DCs bystander na co-cultura com *L. braziliensis* (Lb bystander), DCs infectadas por *L. braziliensis* (Lb infectada), além de DCs bystander na presença de *L. infantum* (Li bystander) e DCs infectadas com *L. infantum* (Li infectada). Também foi avaliada a média de intensidade de fluorescência das moléculas, (D) CD83, (E) CCR7 e (F) CD62L. Com a cada ponto representando um doador, sendo a análise multivariada com teste Kruskal-Wallis, e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

6.10. Expressão de moléculas relacionadas à ativação e exaustão de linfócitos em células dendríticas em co-cultura com *Leishmania*

6.10.1. Expressão de HLA-DR em células dendríticas

As DCs como APCs profissionais, apresentam uma alta expressão de HLA-DR (Figura 17 A), e a presença de *L. braziliensis* e *L. infantum* modularam sua expressão, visto que o valor de $p=0,7810$, e CN teve a expressão de $(97,50\% \pm 0,5382)$, DCs na presença de *L. braziliensis* teve expressão de $91,35\% \pm 6,550$ e na co-cultura com *L. infantum* $(6,550\% \pm 1,696)$, além do CP $(96,30\% \pm 3,039)$ (Figura 17 A).

A média de intensidade de fluorescência a expressão de HLA-DR permaneceu estável, com valor de $p=0,7793$, em CN (3866 ± 3272) , semelhante a DCs em co-cultura com *L. braziliensis* $(3967 \pm 163,5)$ e DCs em co-cultura com *L. infantum* (4624 ± 3084) e CP (5690 ± 4022) (Figura 17 F).

6.10.1. Expressão das moléculas co-estimuladoras e inibidora em células dendríticas

As moléculas co-estimuladoras como o CD40 sua expressão constante em DCs entre as condições analisadas, que o valor de $p=0,3799$, a expressão de CN foi de $99,60\% \pm 0,1740$, na presença com *L. braziliensis*, DCs expressaram $(98,60\% \pm 0,5000)$, na interação de *L. infantum* com DCs que expressaram $(99,20\% \pm 0,3403)$ da molécula CD40 e CP $(99,30\% \pm 0,1282)$ (Figura 17 B).

A expressão da molécula CD86, com $p=0,0090$, sendo que a expressão de CN foi de $94,60\% \pm 3,146$, e não teve diferença significativa nas condições de DCs na presença de *L. braziliensis* $(88,10\% \pm 5,500)$ e *L. infantum*

(97,10% \pm 0,3172), no CP apresentou a expressão de CD86 (98,25% \pm 0,2472) (Figura 17 C).

Na expressão da molécula CD80, que teve o valor de $p=0,0101$, com CN (9,805% \pm 2,368), DCs na co-cultura com *L. braziliensis* teve expressão de 18,70% \pm 2,100 e em DCs na presença de *L. infantum* a expressão de CD80 foi de 16,85% \pm 4,604 e no controle positivo (44,05% \pm 7,810) (Figura 17 D).

A molécula inibidora PD-L1 apresentou $p=0,0112$, que em CN foi de 72,00% \pm 4,125, na condições de DCs em co-cultura com *L. braziliensis* que teve expressão de 58,70% \pm 1,400, em DCs na presença de *L. infantum* (74,00% \pm 3,460) e no CP (95,50% \pm 3,393) (Figura 17 E).

Na média de intensidade de fluorescência da molécula CD40 a não houve grandes variações na expressão, com valor de $p=0,4128$, em relação ao CN (6559 \pm 4275), DCs na co-cultura com *L. braziliensis* (4111 \pm 494,5), em DCs na presença de *L. infantum* (8756 \pm 3534) e CP (8571 \pm 6759) (Figura 17 G).

O MFI da molécula CD86 teve o valor de $p=0,6147$, a expressão em CN foi de 2787 \pm 803,7, a co-cultura de *L. braziliensis* com DCs apresentaram a expressão de (2518 \pm 797,5) e DCs com *L. infantum* (3096 \pm 1326), o CP teve o MFI (3523 \pm 1538) (Figura 17 H).

A média de intensidade de fluorescência a molécula CD80, com o valor de $p=0,0323$, porém entre as condições não apresentou diferenças significante entre as condições estudadas, sendo CN (297,5 \pm 46,59), o MFI de DCs em co-cultura de *L. braziliensis* (223,5 \pm 3,500), no MFI de DCs na presença de *L. infantum* (350,0 \pm 5,360) e CP (456,0 \pm 41,13) (Figura 17 I).

O MFI de PD-L1, teve $p=0,0047$, que apresentou o MFI do CN (448,0 \pm 38,42), em DCs na interação com *L. braziliensis* (309,5 \pm 0,5000) e DCs em co-cultura de *L. infantum* (464,0 \pm 27,34), e CP (899,5 \pm 294,4) (Figura 17 J).

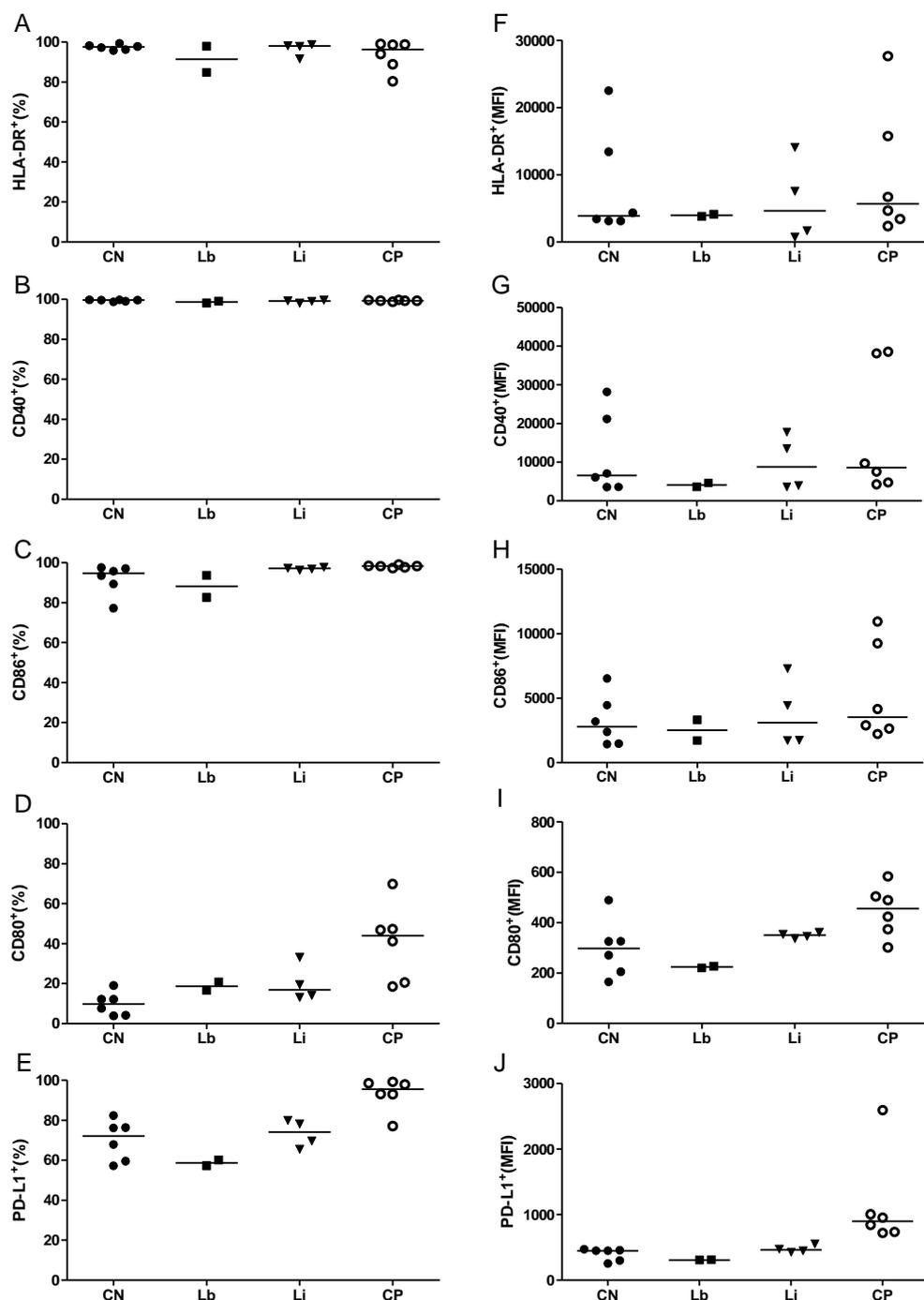


Figura 17. Expressão de HLA-DR e moléculas co-estimuladoras CD40, CD86, CD80 e da molécula inibidora PD-L1 em DCs. A expressão das moléculas, (A) HLA-DR, (B) CD40, (C) CD86, (D) CD80 e (E) PD-L1 pela porcentagem. Além disso, foi verificada a média de intensidade de fluorescência (MFI) das moléculas, (F) HLA-DR, (G) CD40, (H) CD86, (I) CD80 e (J) PD-L1 em DCs. Comparando entre as condições, controle negativo (CN), DCs na presença de *L. braziliensis* (Lb), DCs na interação com *L. infantum* (Li) e tratamento com LPS

(CP), foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. Cada ponto representa um doador e barra a mediana, o $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.11. Expressão de moléculas relacionadas à ativação e exaustão de linfócitos em células dendríticas *bystanders* e infectadas em co-cultura com *Leishmania*.

6.11.1. Expressão de HLA-DR em células dendríticas *bystander* e infectadas

A expressão de molécula HLA-DR em DCs, teve $p = 0,2185$, HLA-DR mostrou uma expressão estável nas condições, CN ($97,80\% \pm 0,4684$), DCs em co-cultura com *L. braziliensis*, em Lb *bystander* ($88,10\% \pm 8,300$) e Lb infectada ($92,90\% \pm 5,600$), que teve comportamento semelhante em DCs na interação com *L. infantum*, Li *bystander* ($89,85\% \pm 2,887$) e Li infectada ($94,20\% \pm 1,628$) (Figura 18 A).

Ao avaliar a média de intensidade de fluorescência da molécula HLA-DR mostrou comportamento semelhante, sendo o MFI em CN (4320 ± 2765), na interação de DCs e *L. braziliensis*, Lb *bystander* ($3543 \pm 705,0$) e Lb infectada ($4150 \pm 59,00$), DCs em co-cultura *L. infantum*, Li *bystander* (4818 ± 3466) e Li infectada (4460 ± 2770) (Figura 18 F).

6.11.2. Expressão das moléculas co-estimuladoras e inibidora em células dendríticas *bystanders* e infectadas

A expressão da molécula CD40, com $p = 0,1192$, sendo que teve expressão de $99,60\% \pm 0,1645$ no CN, sem mostrar alteração nas condições, de DCs com *L. braziliensis*, Lb *bystander* ($97,00\% \pm 0,9000$) e Lb infectada

(99,40% \pm 0,4000), tal como DCs em co-cultura com *L. infantum*, Li *bystander* (98,55% \pm 0,3663) e Li infectada (99,40% \pm 0,4992) (Figura 18 B).

A expressão de CD86, que teve valor $p=0,7035$, e CN teve expressão de 93,50% \pm 3,203, em DCs em co-cultura com *L. braziliensis*, as condições Lb *bystander* (79,55% \pm 11,25) e Lb infectada (91,70% \pm 3,200), na interação de DCs e *L. infantum*, Li *byastander* (93,70% \pm 3,548) e Li infectada teve expressão de 93,40% \pm 1,828 (Figura 18 C).

A expressão da molécula CD80, apresentou um valor de $p=0,0329$, e a expressão de 12,10% \pm 7,696 em CN, as DCs em co-cultura com *L. braziliensis* não apresentou diferença significativa, Lb *bystander* (9,840% \pm 1,060) e Lb infectada (22,75% \pm 3,250), as DCs na presença de *L. infantum* Lb *bystander* teve expressão de 5,240% \pm 0,4861, e na condição de Li infectada (33,15% \pm 3,227), que teve um aumento significativo em relação a Li *bystander* (Figura 18 D).

A molécula inibidora PD-L1 em DCs com valor de $p=0,0777$, a expressão de CN foi de 67,90% \pm 4,695, em DCs que ficou em co-cultura com *L. braziliensis*, Lb *bystander* (49,85% \pm 5,150) e Lb infectada (62,35% \pm 0,05000), na interação de *L. infantum* e DCs, Li *bystander* (64,55% \pm 4,858) e Li infectada (77,85% \pm 3,061) (Figura 18 E).

Na média de intensidade de fluorescência da molécula CD40, com $p=0,6839$, sendo CN (7045 \pm 3647), a expressão em DCs na co-cocultura *L. brazilensis*, em Lb *bystander* (3707 \pm 825,5) e em Lb infectada (4292 \pm 351,0), em DCs na presença de *L. infantum*, a expressão de MFI em Li *bystander* (7662 \pm 3470) e Li infectada (10007 \pm 3733) (Figura 18 G).

No MFI da molécula de CD86, apresentou valor $p=0,8286$, que no controle negativo (2376 \pm 778,2), na interação de *L. braziliensis* com DCs, Lb *bystander* (2497 \pm 881,5), Lb infectada (2520 \pm 766,0), e na co-cultura de DCs com *L. infantum*, Li *bystander* (3875 \pm 1578) e Li infectada (2495 \pm 1117) (Figura 18 H).

No MFI da molécula CD80, valor de $p= 0,0355$, que teve o MFI de $325,0\pm 39,97$ em CN, em DCs na presença de *L. braziliensis*, com MFI em Lb *bystander* ($185,0\pm 16,00$) e Lb infectada ($231,0\pm 3,000$), e na interação de DCs com *L. infantum*, Li *bystander* ($268,5\pm 7,739$) e Li infectada ($357,0\pm 13,55$), (Figura 18 I).

O MFI da molécula PD-L1, apresentou o $p= 0,1826$, sendo que o CN teve o MFI de $448,0\pm 47,29$, sem diferença significativa em DCs em cocultura com *L. braziliensis*, Lb *bystander* ($286,0\pm 27,00$) e Lb infectada ($316,5\pm 9,500$), e na interação entre DCs e *L. infantum*, com o MFI em Li *bystander* de $446,5\pm 20,58$ e Li infectada $483,0\pm 29,30$ (Figura 18 J).

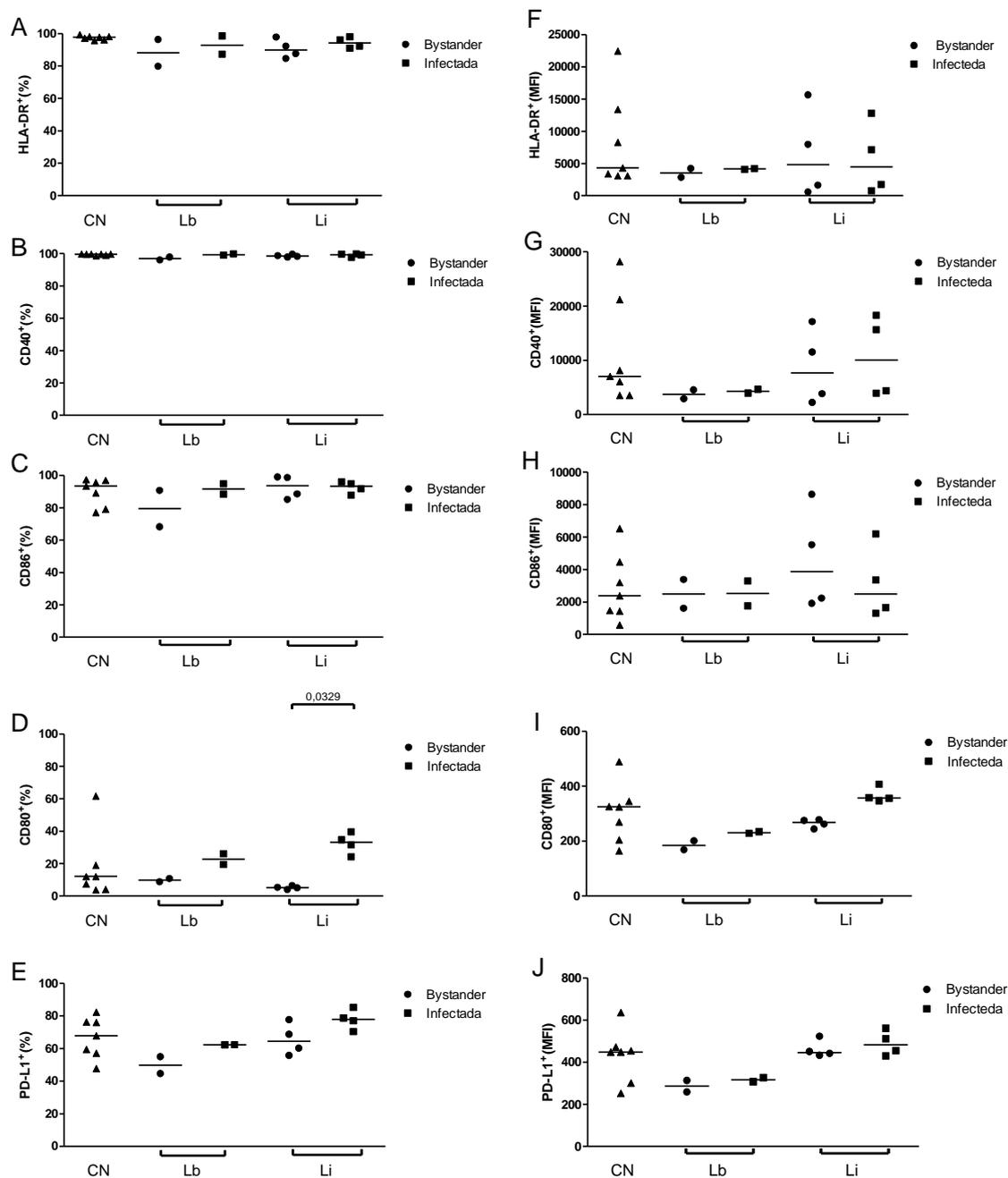


Figura 18. Expressão de HLA-DR e moléculas co-estimuladoras CD40, CD86, CD80 e da molécula inibidora PD-L1 em células dendríticas *bystanders* e infectadas. Expressão das moléculas, (A) HLA-DR, (B) CD40, (C) CD86, (D) CD80 e (E) PD-L1. Além da média de intensidade de fluorescência (MFI) das moléculas, (F) HLA-DR, (G) CD40, (H) CD86, (I) CD80 e (J) PD-L1. Visto que cada ponto representa um doador, utilizando o teste Kruskal-Wallis avaliando entre as condições de controle negativo (CN), DCs *bystander* na co-cultura com *L. braziliensis* (Lb *bystander*), DCs infectadas por *L. braziliensis* (Lb infectada), DCs *bystander*

na interação com *L. infantum* (Li *bystander*) e DCs infectadas com *L. infantum* (Li infectada). Os valores $p < 0,05$ foram considerados significantes.

7. Discussão

As DCs são importantes células do sistema imune que tem função primordial na mediação da resposta imune e na manutenção da homeostase do hospedeiro. Por sua diversidade, atuam como um grupo de sentinelas na imunidade o que propicia o reconhecimento de antígenos microbianos e possibilita a ativação da resposta adaptativa. Isso demonstra a sua relevância no que se refere o estudo da relação parasito hospedeiro(127).

Ao avaliar a taxa de infecção de *Leishmania braziliensis* ou *Leishmania infantum* em DCs, observa-se que ambas espécies têm capacidade de infecção (Figura 10). O mesmo foi observado em trabalho do grupo, no qual ambas as espécies tiveram capacidade de infectar cerca de 40% das moDCs humanas(76). Em estudo realizado com *L. amazonensis* e moDCs também encontraram taxa de infecção análoga ao aqui observado (98). Dados com formas promastigotas e amastigotas de *L. mexicana*, mostram que a mesma é capaz de infectar DCs derivadas da medula de camundongos após 18h(107), bem como as DCs derivadas de monócitos humanos após 3h de infecção(79).

Fato é, que mesmo com a capacidade de infecção, Lb e Li não demonstraram a habilidade de interferir na expressão dos marcadores característicos de diferenciação em DCs, dada a expressão de CD1a, marcador fenotípico de DCs derivadas de monócitos. Já que CD1a tem função de apresentação de antígenos lipídicos, essa apresentação está relacionada à apresentação de antígenos em Células de Langerhans (LC), sendo demonstrado que LC foram capazes ativar linfócitos T específicos através da

apresentação de antígenos não proteicos pela molécula CD1a(132,141,142). Porém, *L. amazonensis* interferiu na diferenciação e desenvolvimento de DCs derivadas de monócitos, quando o parasito foi incubado junto aos monócitos no momento da diferenciação, o que foi possível observar pela diminuição da expressão de CD1a(98).

A molécula CD11c que também é usada como marcação de superfície característica de diferenciação de DCs, não demonstrou diferenças significante na expressão. Já que a importância de DCs CD11c+ na infecção já foi amplamente abordado, no que se trata de uma resposta eficiente diante os patógenos(114). Tendo em vista que, *L. amazonensis* após 24h de infecção se mostrou capaz de modular a expressão de CD11c e CD11b em macrófagos humanos derivados de monócitos (143).

Além disso *L. major* se mostrou capaz de modular o recrutamento de células CD11c positivas, quando reconhecidas pela via do Mincle, um receptor de lectina do tipo C. Porém quando observado com DCs derivada da medula óssea de camundongos *Clec4e-/-*, a expressão de CD11c foi fundamental no controle da infecção por *L. major* além de promover maior ativação de linfócitos Ts e produção de citocinas inflamatórias(144).

Em análise in vivo em camundongos C57BL/6 na infecção por *L. major*, as células mononucleares como perfil CD11+ e, Ly6C+ ou F4/80, sendo que CD11+Ly6C+ seriam denominados de monócitos inflamatórios, mostrou ter função de auxiliar a infecção por *L. major* promovendo a proliferação do parasito. Apesar disso, esse estudo aborda, ainda que tais células tenham um perfil semelhante as moDCs, com alta expressão de CD11c. As moDCs não possuem o mesmo comportamento destas células, pois moDCs promovem a proteção contra o parasito(145).

Importante salientar que as moléculas CD1a e CD11c, são moléculas amplamente usadas para a verificação de diferenciação de monócitos em DCs, então já era esperado que não houvesse modulação destas moléculas mesmo na presença de *L. braziliensis* e *L. infantum* (Figura 11 e 12).

As DCs derivadas de monócitos expressam o receptor CD209 em sua superfície, que pertence ao grupo de receptores de lectina do tipo C, que reconhecem principalmente carboidratos(69) e que *Leishmania* em sua fase estacionária, adquirem as características de promastigotas metacíclicas, que tem com maior concentração de moléculas de LPG e GPI, em sua membrana(52).

Desta forma, a molécula CD209 poderia estar relacionado ao mecanismo de internalização da *Leishmania* por DCs. Como sugerido por Falcão e colaboradores, que observaram que na co-cultura de moDCs humanas por *L. infantum* e *L. braziliensis* diminuiu significativamente a expressão da molécula CD209, sugerindo que poderia ser uma via de internalização da *Leishmania* que ligada ao CD209, diminuído a expressão na superfície(76) O mesmo foi observado na infecção de moDCs por *L. donovani* (146). Isto, nos levou a supor que a diminuição seria pelo fato da DCs ao reconhecerem e no processamento do parasito perdem sua função fagocítica(106), perdendo assim a expressão dos receptores quando maduras.

Porém, em nossos resultados diferiram do estudo anterior do grupo (Figura 13), além disso foi possível observar uma tendência a diminuição da expressão de CD209 em DCs *bystander* (Figura 14), sendo que o trabalho anterior do grupo, não fez a distinção de DCs *bystander* e DCs infectadas.

Entretanto, Colmenares e colaboradores, comprovam que a molécula DC-SIGN é via fundamental para o reconhecimento e internalização de *L. pifanoi* em células K562 quando expressam DC-SIGN, uma vez que o bloqueio com anti-DC-SIGN também reduziu a taxa de infecção, bem como o bloqueio com mananas e EGTA, bloqueador de CLRs(77).

O mesmo foi observado pelo mesmo grupo, no qual ao bloquearem DC-SIGN em DCs derivadas de monócito humanos foi observada menor infecção de DCs por *L. infantum* e *L. pifanoi*, tanto as formas promastigotas e amastigotas. Porém, a internalização em células K562, que expressam DC-

SIGN, e foi observada que apenas *L. infantum* não opsonizada, que mostrou infecção reduzida quando DC-SIGN foi bloqueado, enquanto *L. infantum* não opsonizadas a taxa de infecção não foi afetada(147).

Vale ressaltar que estes trabalhos não apresentam a expressão de DC-SIGN nas células estudar, bem como não constam o número de doadores e não foi feita análise estática, e ainda não apresentam a taxa de infecção por microscopia óptica, com DCs fixadas em lâminas. Já Caparrós e colaboradores demonstram que em células hepáticas endoteliais sinusoidal, as formas amastigotas de *L. pifanoi* e *L. infantum* mostraram capacidade infectá-las quando estas células passaram a expressar de L-SIGN, molécula análoga ao DC-SIGN, situação que foi revertida na infecção por *L. infantum* após o bloqueio da molécula L-SIGN. Neste mesmo estudo foi demonstrado também que células Jurkat, ao expressarem DC-SIGN ou L-SIGN, passaram a internalizar *L. pifanoi* e *L. infantum* nas formas amastigotas, revertendo essa infecção após o bloqueio dos receptores(148).

Dados da literatura mostram que a infecção de moDC por promastigotas e amastigotas, opsonizadas ou não de *L. mexicana* quando comparados a infecção de DCs sem bloqueio de DC-SIGN e com o bloqueio de DC-SIGN, não apresentou diferença na infecção, entretanto quando feita a análise por imagem o bloqueio com anti-DC-SIGN apresentou menor taxa de fagocitose, porém com número de doadores foi baixo(79).

Ao analisar os trabalhos descritos anteriormente, que mostraram o sucesso da infecção de *Leishmania* em células que expressaram DC-SIGN, majoritariamente estas células foram mutadas para expressar apenas o receptor DC-SIGN, portanto expressando apenas um tipo de CLR, que aparenta ser os receptores preferenciais para o reconhecimento do parasito. O que sugere que a *Leishmania* possuem outras vias de reconhecimento e internalização, como mostrado em diferentes vias de reconhecimento e ativação de macrófagos de camundongos por *L. infantum*(66), e na ausência de outros CLRs a *Leishmania* interage com DC-SIGN.

A molécula CD62L, é uma molécula de adesão presente nos progenitores celulares da medula óssea e tem como função promover a migração das células para o tecido de residência. Esta molécula é expressa em diversos leucócitos como linfócitos, monócitos, DCs, mas em sua relação com a infecção por *Leishmania* sua expressão tem sido amplamente descrita em neutrófilos ou PNMs, e quando ativados tem sua expressão diminuída(139). Dados demonstram que após 24h de infecção por *L. braziliensis* em BALB/c havia a migração de neutrófilos, sendo o mesmo observado *in vitro*, onde os parasitos foram capazes de infectar os PNMs, induzindo a ativação e produção de ROS, bem como promovendo a diminuição da expressão de CD62L(149). Assim como em PMNs humanos de pacientes com leishmaniose cutânea e com doadores saudáveis, quando PNMs infectados por *L. braziliensis* houve a diminuição da expressão de CD62L(150). O mesmo foi visto em PNMs de humanos e murinos quando ativados pelo aumento de produção de ROS, esta ativação levou a diminuição da molécula CD62L pela infecção por *L. panamensis*(151), como também a infecção de PNMs humanos por *L. infantum*(152).

Após o reconhecimento e internalização do patógeno as DCs passam pelo processo de maturação marcado pela expressão de CD83 (Figura 16 A) e migração para os órgãos linfoides secundário pela presença de CCR7 (Figura 15 B), que permite a ativação de linfócitos, importante ressaltar que apesar de não ser possível observar o aumento significativo na co-cultura com *Leishmania*, mas observa-se uma tendência da maturação de DCs, principalmente discriminando DCs infectadas e DCs *bystander*, que leva a pensar na relevância biológica destas moléculas.

A literatura mostra que BM-DCs de camundongos B6 e moDCs de humanos tiveram a expressão de CD83 aumentada quando tratadas com lipossoma de SLA de *Leishmania* conjugado a DOTA/DSPC, induzindo a maturação de DCs, porém o mesmo não foi observado em BM-DCS de BALB/c(153).

Na infecção por observado com *L. amazonensis*, houve um aumento da expressão de CD83 em mo-DC maduras após a infecção(98). Porém na infecção de BM-DCs por *L. amazonensis*, a expressão de CD83 se mostrou inalterada, induzindo menor maturação das DCs, menor expressão de IL-12 e IL-6 mesmo estimuladas por LPS e/ou IFN- γ , além de uma maior secreção de IL-10 e menor proliferação de linfócitos T CD4. Isso foi observado com tanto nas formas promastigotas, como de maneira mais acentuada, nas formas amastigotas de *L. amazonensis*(154).

Ao adquirem esse perfil de célula madura, as funções efetora de DCs perpassam pela sua motilidade e migração do sítio de infecção aos órgão linfóide secundários, esse fenômeno é marcado pela presença e expressão da molécula CCR7, que se mostrou fundamental na resposta de DCs(137)(138). Na infecção por *L. major in vitro*, mo-DCs infectadas, tiveram um aumento na expressão de CCR7, que permitiu uma maior migração das DCs. Esse aumento da expressão de CCR7 está associado às vias de ativação das células pela JAKSTAT e à diminuição das vias de morte celular Bcl2, além de estar relacionada ao aumento da produção de IL-12 e IFN- γ (155).

A expressão de CCR7 também demonstrou ter função primordial no controle da infecção por *L. donovani* em camundongos B6 na infecção inicial, mediados pelos seu ligantes CCL19 e CCL21, pois na ausência do receptor CCR7 e seus ligantes, houve a expansão da infecção. Este estudo mostra, ainda, que CCR7 depende de uma resposta inflamatória com TNF- α para estimular sua expressão. Na ausência de TNF- α e presença de IL-10 a expressão de CCR7 e migração de DCs foi reduzida. Além disto, quando BM-DCs foram tratadas com LPS e induzidas a maturação e o aumento da expressão de CCR7, aumentou a proteção contra *L. donovani*(156).

Neste processo de maturação as DCs nos órgãos linfóides, estarão na sua plena função efetora em DCs. Contudo na literatura o comportamento varia de espécie para espécie de *Leishmania* e o modelo de células

empregado. Nesse sentido a infecção de 24h de *L. braziliensis* ou *L. infantum* em DCs derivadas de monócitos humanos mostrou um aumento na expressão de CD86, porém não apresentou variação na expressão de HLA-DR(76). Já em estudo de BM-DC frente a promastigotas de *L. braziliensis*, foi observado um aumento da expressão de CD40 em relação ao controle, e a molécula CD80, não mostrou esse aumento, sendo que nessas condições, *L. braziliensis* também promoveu secreção de IL-12, por conseguinte a ativação de CD4 e polarização para Th1 observando uma maior presença de IFN- γ em relação à IL-10(108).

Em nossos resultados, *L. braziliensis* e *L. infantum* não foram capazes de modular a expressão de HLA-DR (Figura 17 e 18 A). Já a molécula co-estimuladora CD80, teve um aumento significativo na expressão de na condição de Li infectada em relação à Li *bystander* (Figura 17 D). Na expressão da molécula CD86, não foi observado uma diferença significativa como em estudo anterior feito pelo grupo. Isso pode ter acontecido devido ao número pequeno de doadores e ao uso de *buffy coat*, e com as amostras frescas de doadores saudáveis. As *buffy coats* são liberadas pelo hemocentro, apenas aquelas que vão ser descartadas, após 24 horas da coleta, por se tratar do concentrado de leucócitos, possivelmente a morte de algumas células como neutrófilos que possuem vida curta, que liberam citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e prostaglandinas, que poderiam interferir na imunomodulação e na expressão de moléculas em DCs(157).

As moléculas co-estimulatórias, dados da literatura mostram que o lipossoma de SLA de *Leishmania* conjugado a DOTA/DSPC, induziu o aumento significativo da expressão de MHC-II/HLA-DR e CD86, além do aumento porém sem significância de CD40 e CD80, em BM-DCs de BALB/c e moDCs de humanos(153).

As BM-DCs de murinos teve o aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 quando estimuladas por antígeno de *L. infantum*, LiIF, que também induziu a produção de IL-12. As DCs tratadas

com este antígeno quando transferidas para camundongos BALB/c promoveu uma maior proteção na infectado *L. major*, diminuindo a taxa de infecção e lesão causada pelo parasito, sendo um grande potencial para vacina à leishmaniose(158).

Em estudo com *L. mexicana*, mostrou que apenas aquelas selvagens induziam um perfil inflamatório em BM-DCs de camundongos, potencializado por LPG, que teve maior expressão de CD86 e MHC-II, deferente daquelas DCs que foram incubadas com *L. mexicana* com LPG depletado. Também houve secreção de IL-12 quando inoculado com DCs, mesmo na presença de *L. mexicana* sem LPG(159).

Entretanto grande parte de BM-DCs infectadas por amastigota e promastigotas de *L. mexicana* permaneceram imaturas, pois uma pequena porcentagem teve o aumento da expressão de CD86 e MHC, e também foi observado que as DCs imaturas tem menor capacidade de secretar IL-12 do que as DCs maduras(107). A *L. major* regulou uma maior expressão de MHC-II, CD86 e CD40, além de propiciar o aumento de IL-12 dependente de CD40L, porém, *L. donovani* e *L. tropica* não mostraram o mesmo comportamento, além das duas espécies induzirem a secreção de IL-10 e TGF- β regulando negativamente IL-12(160).

Em BM-DCs infectadas por *L. amazonensis* houve o aumento da expressão de CD40, CD86 e MHC-II, enquanto a formas amastigotas regularam negativamente estas moléculas, o que prejudicou a ativação de CD4. Porém as duas formas de *L. amazonensis* induziram menor produção de citocinas pro-inflamatórias, IL-12 e IL-6, com o aumento de IL10, mesmo quando DCs foram estimuladas com IFN- γ ou LPS+IFN- γ . Estes resultados podem estar relacionados a *L. amazonensis* inibir a via STAT, com as formas amastigotas, inibindo a via STAT2 como também a via IRF-1 e 8(154).

Não obstante foafatidilcolina (LPC), metabolito que está presente no organismo humano, aumenta a suscetibilidade BM-DCs de BALB/c à *L. major*, causando uma menor expressão de MHC, CD86 e CD40, sendo a queda

acentuada com a presença de LPC, quando comparada apenas com DCs infectadas por *L. major*, mas tratadas com LPS. O mesmo observado-se na inibição da expressão de TNF- α , IL-6 e até a produção de óxido nítrico, assim *L. major* associada com LPC direcionou o perfil anti-inflamatório de DCs com produção de arginina e IL-10(161).

Ao observar a coinfeção de DCs, derivadas de monócitos, de pacientes com esquistossomose comparado a moDCs de pacientes com leishmaniose cutânea e moDCs de doadores saudáveis. A infecção por *L. braziliensis* a resposta de DCs dos pacientes com esquistossomose, foram direcionadas para uma resposta anti-inflamatória, com secreção de IL-10 e presença de linfócitos Tregs, com alta expressão de CTLA-4. Essa coinfeção teve como consequência a redução da secreção de IL-12, TNF- α no microambiente, induzindo assim uma baixa expressão de HLA-DR, e moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, em DCs e CD28 em linfócitos Ts, interferindo ativação de linfócitos T CD4, sendo que os pacientes com leishmaniose mostraram comportamento contrário, com maior secreção de TNF- α , IL-12 e IFN- γ (102).

Além disso, a co-infecção podem interferir na resposta do hospedeiro. Em experimento de moDCs de doadores saudáveis, que foram co-cultivado com eritrócitos infectados pelo *Plasmodium falciparum*, posteriormente DCs foram incubadas com *L. donovani*. Neste caso, a infecção de DCs por *L. donovani*, sem a co-cultura de eritrócitos infectados pelo *P. falciparum*, inibiu a maturação de DCs causando uma baixa expressão de HLA-DR, CD40, CD86 e CD80, induzida pela secreção de IL-10, além de interferir no estímulo de LPS na ativação de DCs. Por outro lado, quando DCs colocadas em co-cultura com eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum*, não minimizou os efeitos de supressão causada por *L. donovani*, pois esses eritrócitos infectados também interferiram na maturação de DCs(146).

Ao observar a infecção por *L. infantum* em BM-DCs, causando expressão reduzida de CD40 e CD86 em relação às DCs que foram

estimuladas com LPS. A infecção ainda estimulou uma menor expressão do mRNA de IL-12, TNF- α e IL-6 em comparação aos valores de IL-10 que aumentou. *L. infantum* mostrou, ainda, a habilidade ativar DCs pela via de AKT e ERK, uma vez que o bloqueio de AKT causou um o aumento de IL-12, bem como a habilidade de inibir a Nf- κ B. Sendo que a indução do bloqueio de Nf- κ B mostrou uma redução da expressão do mRNA de CD40, CD86, IL-12, TNF- α , IL-6 e ausência da expressão de IL-10(97).

Os BALB/c infectados por *L. amazonensis* apresentou maior gravidade da lesão, com maior carga parasitaria na infecção, com a presença de IL-4 e IL-10, quando comparada ao camundongo C3H/HeJ. Em ambos os casos houve o aumento das moléculas ativadoras MHC-II, CD40 CD86 e CD80 em BM-DCs(165). Tais dados são opostos à um estudo que mostra que a infecção de BM-DCs de murinos por amastigotas e promastigotas opsonizadas de *L. amazonensis* não apresentaram nenhuma mudança no perfil da moléculas MHC-II, CD86, CD80 e CD40, sendo que o estímulo de com BCG induziu o aumento das mesmas(112).

A infecção por *L. amazonensis* foi mais exacerbada do que a infecção por *L. braziliensis* em BALB/c, sendo que a *L. amazonensis* teve uma porcentagem maior de DCs que expressavam MHC-II, CD80 e CD86, na circulação linfática. Porém, *L. braziliensis* teve maior número de linfócitos T CD4 ativados e de memória, enquanto *L. amazonensis* teve maior número de CD8 o que pode explicar a maior gravidade da lesão, na infecção por *L. amazonensis*(99).

O que fica claro que a resposta anti-inflamatória, com a presença de IL10, induzindo a manutenção de DCs em seu estado imaturas, com baixa expressão de MHC-II, CD86, CD80, com a presença de linfócitos Tregs é uma resposta supressora, que permite a persistência do parasito(162)(162).

Uma via de supressão em DCs pode ocorrer pelo aumento da expressão de molécula inibidora PD-L1. Barrosos e colaboradores, mostrou que PBMC de um paciente que teve infecção previa por *L. amazonensis*,

mostrou um aumento na expressão de PD-L1 em monócitos após reestimulação *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), que pode estar associado a diminuição das funções de linfócitos T CD4+, diminuindo a secreção de IFN- γ , e linfócitos T CD8+, na inibição da produção de IFN- γ e Granzima-B(117).

A infecção de BALB/c com *L. amazonensis* causou um aumento da molécula PD-L1 em DCs proveniente do linfonodo do camundongo, e o aumento da expressão do receptor PD-1 em linfócitos T CD4+ e CD8+. Contudo, o bloqueio desta via por anti-PD1, promoveu maior proliferação de linfócitos T e secreção de INF- γ , além de reduzir a secreção de IL-4 e TGF- β e por consequência, uma menor carga parasitaria, porém sem reduzir a lesão causada pela doença(119).

A infecção por *L. major* também propiciou o aumento da expressão de PD-L1 em macrófagos e DCs, derivados de monócitos humanos, e PD-1 em linfócitos T. O bloqueio de PD-1 estimulou um aumento de TNF- α e IFN- γ , bem como o aumento da proliferação de linfócitos T, com maior produção de granzima e perforina(163).

A molécula PD-L1 está relacionada ao sistema de evasão de células neoplásicas, que inibem a atuação de linfócitos T. As DCs tem um papel fundamental nesta evasão, pois células neoplásicas induzem um perfil DCs tolerogênicas ou imaturas, com alta expressão de PD-L1, que por consequência neste ambiente têm maior ativação de Tregs, que possuem outra molécula inibidora CTLA-4, que compete com as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, e impedem ativação de linfócitos. Assim o bloqueio dessas vias inibitórias tem sido extremamente importante na terapia contra neoplasias(164).

Diante disso fica claro que os mecanismos de imunidade contra a *Leishmania* variam de espécie para espécie e dos métodos utilizados, que mostra a evolução do parasito a resposta imune e seus vários mecanismos de evasão que promovem a sua persistência e sobrevivência. Os estudos com

modelos humanos ainda são poucos, comparados aos estudos em modelos animais, sendo que nossos resultados com DCs humanas na interação com *L. braziliensis* e *L. infantum*, são dados preliminares pelo número de amostras apresentados. Com isso é de suma importância que haja mais estudos como este que trate da relação parasito-hospedeiro, com células humanas.

8. Conclusão

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que *L. infantum* e *L. braziliensis* tem capacidade de infectar células dendríticas derivadas de monócito *in vitro*, sem interferir na expressão de moléculas características de diferenciação em DCs.

A co-cultura de *L. infantum* induziu o aumento da expressão da molécula CCR7 em DCs, e a infecção por *L. infantum* mostrou um perfil de maturação de DCs pela expressão de CD83, e o aumento da capacidade de apresentação de antígenos pelo aumento de CD80, porém, induziram alteração na expressão de outras moléculas envolvidas na apresentação de antígenos HLA-DR, CD40 e CD86, nem a molécula inibidora PD-L1.

Já *L. braziliensis* não induziu a alteração da expressão de molécula em células dendríticas.

9. Referência Bibliográfica

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). First report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Heal Organ [Internet]. 2010;1–184. Available from:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/1/9789241564090_eng.pdf
2. WHO | Millennium Development Goals (MDGs) [Internet]. [cited 2020 Jan 11]. Available from:
https://www.who.int/topics/millennium_development_goals/about/en/
3. United Nations. Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável. a/Res/70/1 [Internet]. 2015;1–49. Available from:
http://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E
4. Who. Global report for research on infectious diseases of poverty. 2012;1–184. Available from:
<http://www.cabdirect.org/abstracts/20123249821.html>
5. Federal D. Epidemiológico. 2019;
6. Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE Brasília – DF 2006 [Internet]. Vol. 2009, Ministério da Saúde. 2006. 120 p. Available from:
<http://ci.nii.ac.jp/naid/130001170738>
7. Meira C dos S, Gedamu L. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. *Microorganisms*. 2019;7(12).
8. Ministério da Saúde. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar [Internet]. Ministério da Saúde. 2017. 159 p. Available from:
<http://pesquisa.bvsalud.org/bvsms/resource/pt/mis->

38798#.WmSchsQMGLw.mendeley

9. WHO. Weekly epidemiological record: Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. *World Health Organ Geneva*. 2017;92(38):557–72.
10. WHO | Leishmaniasis [Internet]. [cited 2020 Jan 11]. Available from: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/
11. Leishmaniose visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção [Internet]. [cited 2020 Jan 11]. Available from: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>
12. Organização Pan-Americana Saúde. Leishmanioses: Informe epidemiológico das américas, fevereiro 2018. *World Health Organ*. 2018;7.
13. Leishmaniose Tegumentar (LT): o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção [Internet]. [cited 2020 Jan 11]. Available from: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar>
14. Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2010;1(2):13–32.
15. Poinar G, Poinar R. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist*. 2004;155(3):305–10.
16. Zink AR, Spigelman M, Schraut B, Greenblatt CL, Nerlich AG, Donoghue HD. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper Nubia [10]. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(10):1616–7.
17. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1–10.
18. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of

- Leishmania Parasites and Sandflies. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2016;10(3):1–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
19. Leishman WB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in india. Br Med J. 1903;2(2238):1376–7.
 20. Bhattacharyya AK. Classics in Indian medicine. Natl Med J India. 1993;6(1):48.
 21. Rogers L. Note on the Occurrence of Leishman-Donovan Bodies in “Cachexial Fevers,” Including Kala-Azar. BMJ [Internet]. 1904 May 28;1(2265):1249–51. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.1.2265.1249>
 22. Ross R. FURTHER NOTES ON LEISHMAN’S BODIES. Br Med J. 1903;2(2239):1401.
 23. LAINSON R, SHAW JJ. Leishmaniasis of the New World: Taxonomic Problems. Br Med Bull. 1972;28(1):44–8.
 24. LAINSON, R., Shaw, J.J., Silvera, F.T., Braga RR. American visceral leishmaniasis: on the origin of Leishmania (Leishmania) chagasi. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987;2(2):123–5.
 25. Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the Leishmania donovani complex. Parasitology. 1999;119(3):237–46.
 26. Wright JH. Protozoa in a Case of Tropical Ulcer (Delhi Sore). Am J Med Sci. 1904;127(5):938.
 27. Bray RS, Ashford RW, Bray MA, Box PO, Ababa A. Wellcome Parasitology Unit No . 2 , Institute of Pathobiology , Halle Sellassie I University ,. 1973;67(3):1973.
 28. Ávila-Pires FD de. Zoonoses: Hospedeiros e Reservatórios. Cad Saude Publica. 1989;5(1):82–97.

29. Corredor, A., Gallego, JF., Tesh, RB., PeLáZ, D., Diaz, A., Montilla, M., Paláu M. *Didelphis marsupialis* , an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia , South America. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989;(83):195.
30. Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Júnior G. Experimental infection of the opossum *Didelphis Albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*. Vol. 83, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1988. p. 141.
31. Lainson R, Shaw JJ, Lins ZC. Leishmaniasis in Brazil: IV. The fox, *Cerdocyon thous* (l) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para state, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1969;63(6):741–5.
32. Figueiredo FB, Gremião IDF, Pereira SA, Fedulo LP, Menezes RC, Balthazar DA, et al. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(2):200–1.
33. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol.* 2013;27(2):123–47.
34. LEWIS DJ, YOUNG DG, FAIRCHILD GB, MINTER DM. Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Syst Entomol.* 1977;2(4):319–32.
35. Galvis-ovallos F, Casanova C, Bergamaschi DP, Galati AB. A field study of the survival and dispersal pattern of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. 2018;12(14):e0006333.
36. WARD, RD, SHAW, JJ, LAINSON, R, FRAIHA H. Leishmaniasis in Brazil: VIII. Observations on the Phlebotomine fauna of an area highly endemic for cutaneous leishmaniasis, in the Serra dos Carajas, Pará state. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1973;67(2):174–83.

37. Gomes AC, Galati EA. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7-Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do sistema da Serra do Mar, Região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*. 1989;23(2):136–42.
38. Volf P, Volfova V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecol*. 2011;36(SUPPL.1):1–9.
39. Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF, Andrade CA. Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 E *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), em condições experimentais. I. Aspectos da alimentação de larvas e adultos. Vol. 81, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1986. p. 431–8.
40. De Moraes CGV, Castro Lima AK, Terra R, Dos Santos RF, Da-Silva SAG, Dutra PML. The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
41. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011;9(8):604–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>
42. Brennan CA, Anderson K V. *Drosophila* : The Genetics of Innate Immune Recognition and Response . *Annu Rev Immunol*. 2004;22(1):457–83.
43. Zeidler MP, Bausek N. The *Drosophila* JAK-STAT pathway . *Jak-Stat*. 2013;2(3):e25353.
44. Sacks, D., Kamhawi S. MOLECULAR ASPECTS OF PARASITE-VECTOR AND VECTOR-HOST INTERACTIONS IN LEISHMANIASIS. 2001;*Annu. Rev.*(55):453–83.
45. Boulanger N, Boulanger N, Lowenberger C, Lowenberger C, Volf P, Volf P, et al. Characterization of a Defensin from the Sand Fly. *Microbiology*.

- 2004;72(12):7140–6.
46. Telleria EL, Sant'Anna MRV, Alkurbi MO, Pitaluga AN, Dillon RJ, Traub-Csekö YM. Bacterial feeding, Leishmania infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites and Vectors*. 2013;6(1):2–9.
 47. Telleria EL, Martins-Da-Silva A, Tempone AJ, Traub-Cseko YM. Leishmania, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*. 2018;145(10):1336–53.
 48. Petrosino JF, Meneses C, Kirby JR, Valenzuela JG. The Gut Microbiome of the Vector *Lutzomyia longipalpis* Is Essential for Survival of *Leishmania infantum*. 2017;8(1):1–12.
 49. Alcolea PJ, Alonso A, Molina R, Jiménez M, Myler PJ, Larraga V. Functional genomics in sand fly–derived *Leishmania* promastigotes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(5):1–30.
 50. Walters J. *Leishmania* Differentiation in Natural and Unnatural Sand Fly Hosts. *J Eukaryot Microbiol*. 1993;40(2):196–206.
 51. Killick-Kendrick R. The life-cycle of leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1990;65(SUPPL. 1):37–42.
 52. Sacks DL, Hieny S, Sher A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J Immunol* [Internet]. 1985 Jul [cited 2020 Jan 12];135(1):564–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2582050>
 53. Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Tang Y, Bastien P. Metacyclic promastigotes of *Leishmania* in the salivary glands of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*. 1996;3(1):55–60.
 54. Mendes BP, Da Silva IA, Damata JP, Castro-Gomes T, Vieira LQ,

- Ribeiro-Dias F, et al. Metacyclogenesis of *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*: A comprehensive study of the main transformation features in axenic culture and purification of metacyclic promastigotes by negative selection with *Bauhinia purpurea* lectin. *Parasitology*. 2019;716–27.
55. Sunter J, Gull K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol* [Internet]. 2017 Sep 13;7(9):170165. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.170165>
 56. Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol*. 2007;19(1):3–10.
 57. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007;19(1):24–32.
 58. de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: Possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol*. 2003;33(10):2822–31.
 59. Kavosi G, Ardestani SK, Kariminia A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology*. 2009;136(10):1193–9.
 60. Vargas-Inchaustegui DA, Tai W, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L. Distinct roles for MyD88 and toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infect Immun*. 2009;77(7):2948–56.
 61. Srivastav S, Kar S, Chande AG, Mukhopadhyaya R, Das PK. *Leishmania donovani* Exploits Host Deubiquitinating Enzyme A20, a Negative Regulator of TLR Signaling, To Subvert Host Immune Response . *J Immunol*. 2012;189(2):924–34.
 62. Murray HW, Zhang Y, Zhang Y, Raman VS, Reed SG, Ma X. Regulatory Actions of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 in *Leishmania*

- donovani infection in the liver. *Infect Immun*. 2013;81(7):2318–26.
63. Wilson ME, Pearson RD. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun*. 1988;56(2):363–9.
 64. Akilov OE, Kasuboski RE, Carter CR, McDowell MA. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. *J Leukoc Biol*. 2007;81(5):1188–96.
 65. Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, et al. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med*. 2006;203(1):177–88.
 66. Lefèvre L, Lugo-Villarino G, Meunier E, Valentin A, OLAGNIER D, Authier H, et al. The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to *Leishmania infantum*. *Immunity* [Internet]. 2013 May;38(5):1038–49. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761313001957>
 67. McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: Inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J*. 1995;310(3):807–18.
 68. Bahr V, Stierhof YD, Ilg T, Demar M, Quinten M, Overath P. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;58(1):107–21.
 69. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: Shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(7):465–79.
 70. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002

Feb;2(2):77–84. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri723>

71. Geijtenbeek TBH, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Appelmelk B, et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*. 2003;197(1):7–17.
72. Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, Matsuzawa T, Ishikawa E, Sakuma M, et al. C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(6):1897–902.
73. Cambi A, Gijzen K, de Vries IJM, Torensma R, Joosten B, Adema GJ, et al. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2003;33(2):532–8.
74. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. C-Type Lectin DC-SIGN Modulates Toll-like Receptor Signaling via Raf-1 Kinase-Dependent Acetylation of Transcription Factor NF- κ B. *Immunity*. 2007;26(5):605–16.
75. Appelmelk BJ, van Die I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y. Cutting Edge: Carbohydrate Profiling Identifies New Pathogens That Interact with Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin on Dendritic Cells. *J Immunol*. 2003;170(4):1635–9.
76. Falcão S de AC, Jaramillo TMG, Ferreira LG, Bernardes DM, Santana JM, Favali CBF. *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and similarities to evade the innate immune system. *Front Immunol*. 2016;7(AUG):1–10.
77. Colmenares M, Puig-Kröger A, Pello OM, Corbí AL, Rivas L. Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs,

- is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *J Biol Chem.* 2002;277(39):36766–9.
78. Colmenares M, Corbí AL, Turco SJ, Rivas L. The Dendritic Cell Receptor DC-SIGN Discriminates among Species and Life Cycle Forms of *Leishmania*. *J Immunol* [Internet]. 2004 Jan 15;172(2):1186–90. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.172.2.1186>
 79. Argueta-Donohué, Jesús; Rodríguez-Wilkins, Arturo A.; García-Aguirre, Magdalena; Kobeh-Gutiérrez L. Differential phagocytosis of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes by monocyte-derived dendritic cells. *Microbiol Immunol.* 2016;(February 2015):369–81.
 80. Abdeladhim M, Kamhawi S, Valenzuela JG. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014;28:691–703. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.028>
 81. Lestinova T, Rohousova I, Sima M, de Oliveira CI, Volf P. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(7):1–26.
 82. Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, et al. Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against *Leishmania braziliensis* Infection. *J Immunol* [Internet]. 2009 Dec 15;183(12):8088–98. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0803720>
 83. Oualha R, Barhoumi M, Marzouki S, Harigua-Souiai E, Ahmed M Ben, Guizani I. Infection of human neutrophils with *leishmania infantum* or *leishmania major* strains triggers activation and differential cytokines release. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(MAY):1–16.
 84. Carneiro MBH, Roma EH, Ranson AJ, Doria NA, Debrabant A, Sacks

- DL, et al. NOX2-Derived Reactive Oxygen Species Control Inflammation during *Leishmania amazonensis* Infection by Mediating Infection-Induced Neutrophil Apoptosis . *J Immunol*. 2018;200(1):196–208.
85. McFarlane E, Perez C, Charmoy M, Allenbach C, Carter KC, Alexander J, et al. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun*. 2008;76(2):532–41.
86. Prates DB, Araújo-Santos T, Luz NF, Andrade BB, França-Costa J, Afonso L, et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils . *J Leukoc Biol*. 2011;90(3):575–82.
87. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science* (80-) [Internet]. 2008 Aug 15;321(5891):970–4. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1159194>
88. Hurrell BP, Beaumann M, Heyde S, Regli IB, Müller AJ, Tacchini-Cottier F. Frontline Science: *Leishmania mexicana* amastigotes can replicate within neutrophils . *J Leukoc Biol*. 2017;102(5):1187–98.
89. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-de-Souza MCA, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, et al. Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate *Leishmania major* Infection . *J Immunol*. 2004;172(7):4454–62.
90. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, et al. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major* . *J Immunol*. 2002;169(2):898–905.
91. Laskay T, Van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes -

- Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 2003;11(5):210–4.
92. Ribeiro-Gomes FL, Romano A, Lee S, Roffê E, Peters NC, Debrabant A, et al. Apoptotic cell clearance of *Leishmania major*-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8⁺ T-cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. *Cell Death Dis.* 2015;6(12):1–12.
 93. Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog.* 2012;8(2).
 94. Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med.* 1997;185(12):2061–8.
 95. Lerm M, Holm Å, Seiron Å, Särndahl E, Magnusson KE, Rasmusson B. *Leishmania donovani* requires functional Cdc42 and Rac1 to prevent phagosomal maturation. *Infect Immun.* 2006;74(5):2613–8.
 96. Vinet AF, Fukuda M, Turco SJ, Descoteaux A. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of Synaptotagmin V. *PLoS Pathog.* 2009;5(10).
 97. Neves BM, Silvestre R, Resende M, Ouaiissi A, Cunha J, Tavares J, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/akt and impairment of nuclear factor-κB: Molecular mechanisms behind the arrested maturation/activation state of *leishmania infantum*-infected dendritic cells. *Am J Pathol.* 2010;177(6):2898–911.
 98. Favali C, Tavares N, Clarencio J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2007;82(6):1401–6.
 99. Carvalho AK, Carvalho K, Passero LFD, Sousa MGT, Da Matta VLR, Gomes CMC, et al. Differential Recruitment of Dendritic Cells Subsets

- to Lymph Nodes Correlates with a Protective or Permissive T-Cell Response during *Leishmania (Viannia) Braziliensis* or *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* Infection. *Mediators Inflamm.* 2016;2016.
100. Tuladhar R, Oghumu S, Dong R, Peterson A, Sharpe AH, Satoskar AR. Ox40L-Ox40 pathway plays distinct roles in regulating Th2 responses but does not determine outcome of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*. *Exp Parasitol* [Internet]. 2015;148:49–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.11.002>
 101. Yadav PK, Chandrakar P, Sharma P, Vishwakarma P, Parmar N, Srivastava M, et al. Reciprocal changes in CD11c+CD11b+ and CD11c+CD8 α + dendritic cell subsets determine protective or permissive immune response in murine experimental VL. *Vaccine* [Internet]. 2019;38(2):355–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.004>
 102. Lopes DM, de Almeida TVVS, de Souza R da P, Ribeiro LEV, Page B, Fernandes JDS, et al. Susceptibility of dendritic cells from individuals with schistosomiasis to infection by *Leishmania braziliensis*. *Mol Immunol* [Internet]. 2018 Jan;93:173–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589017305813>
 103. Flohé SB, Bauer C, Flohé S, Moll H. Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*. *Eur J Immunol.* 1998;28(11):3800–11.
 104. Moll H, Blank C, Fuchs H, Rappersberger K, Rollinghoff M. Parasitism of Epidermal Langerhans Cells in Experimental Cutaneous Leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis.* 1993;167(2):418–25.
 105. Henri S, Curtis J, Hochrein H, Vremec D, Shortman K, Handman E. Hierarchy of Susceptibility of Dendritic Cell Subsets to Infection by.

- Immun. 2002;70(7):3874–80.
106. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* [Internet]. 1998 Mar;392(6673):245–52. Available from: <http://www.nature.com/articles/32588>
 107. Bennett CL, Misslitz A, Colledge L, Aebischer T, Clare Blackburn C. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Immunol*. 2001;31(3):876–83.
 108. Vargas-Inchaustegui DA, Xin L, Soong L. *Leishmania braziliensis* Infection Induces Dendritic Cell Activation, ISG15 Transcription, and the Generation of Protective Immune Responses . *J Immunol*. 2008;180(11):7537–45.
 109. Heinzl FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *leishmania major*. *J Exp Med*. 1993;177(5):1505–9.
 110. Kumar R, Singh N, Gautam S, Singh OP, Gidwani K, Rai M, et al. *Leishmania* Specific CD4 T Cells Release IFN γ That Limits Parasite Replication in Patients with Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10).
 111. Cooper AM, Melby PC, Karp CL, Neva F, Sacks DL. T-cell responses to infected autologous monocytes in patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994;1(3):304–9.
 112. Prina E, Abdi SZ, Lebastard M, Perret E, Winter N, Antoine JC. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: The role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J Cell Sci*. 2004;117(2):315–25.
 113. Agallou M, Pantazi E, Tsiftsaki E, Toubanaki DK, Gaitanaki C, Smirlis D, et al. Induction of protective cellular immune responses against experimental visceral leishmaniasis mediated by dendritic cells pulsed

- with the N-terminal domain of *Leishmania infantum* elongation factor-2 and CpG oligodeoxynucleotides. *Mol Immunol* [Internet]. 2018;103(March):7–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.08.004>
114. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):581–92.
 115. Bunn PT, Montes de Oca M, de Labastida Rivera F, Kumar R, Ng SS, Edwards CL, et al. Distinct Roles for CD4 + Foxp3 + Regulatory T Cells and IL-10–Mediated Immunoregulatory Mechanisms during Experimental Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani*. *J Immunol*. 2018;201(11):3362–72.
 116. Morgado FN, De Carvalho LMV, Leite-Silva J, Seba AJ, Pimentel MIF, Fagundes A, et al. Unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and worsen skin infectious diseases - A comparative study of leishmaniasis and sporotrichosis. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–10.
 117. Barroso DH, Falcão SDAC, Motta J de OC da, Sevilha dos Santos L, Takano GHS, Gomes CM, et al. PD-L1 May Mediate T-Cell Exhaustion in a Case of Early Diffuse Leishmaniasis Caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. *Front Immunol* [Internet]. 2018 May 11;9(May):1–7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01021/full>
 118. Gautam S, Kumar R, Singh N, Singh AK, Rai M, Sacks D, et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2014;209(2):290–9.
 119. da Fonseca-Martins AM, Ramos TD, Pratti JES, Firmino-Cruz L, Gomes DCO, Soong L, et al. Immunotherapy using anti-PD-1 and anti-PD-L1 in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice reduce parasite load. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–13.
 120. Steinman RM, Cohn ZA. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE

- IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *J Exp Med* [Internet]. 1973 May 1;137(5):1142–62. Available from: <https://rupress.org/jem/article/137/5/1142/6389/IDENTIFICATION-OF-A-NOVEL-CELL-TYPE-IN-PERIPHERAL>
121. Steinman RM, Moberg CL. Zanzvil Alexander Cohn 1926-1993. *J Exp Med* [Internet]. 1994 Jan 1;179(1):1–30. Available from: <https://rupress.org/jem/article/179/1/1/50634/Zanzvil-Alexander-Cohn-19261993>
 122. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG LH. The mononuclear phagocyte system : a new classification of macrophages , monocytes , and their. *Bull World Heal Organ*. 1972;46(6):845–52.
 123. Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1966;44(3):287–99.
 124. Ichikawa Y, Pluznik DH, Sachs L. In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966;56(2):488–95.
 125. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1992;176(6):1693–702.
 126. Sallusto F, Lanzavecchi A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med*. 1994;179(4):1109–18.
 127. Austyn JM. Dendritic Cells in the Immune System—History, Lineages, Tissues, Tolerance, and Immunity. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016 Dec 1;4(6):1–16. Available from: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.MCHD-0046-2016>

128. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(1):19–30.
129. Fucikova J, Palova-Jelinkova L, Bartunkova J, Spisek R. Induction of tolerance and immunity by dendritic cells: Mechanisms and clinical applications. *Front Immunol*. 2019;10(OCT):1–17.
130. Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):935–47.
131. Calabi F, Jarvis JM, Martin L, Milstein C. Two classes of CD1 genes. *Eur J Immunol*. 1989;19(2):285–92.
132. Peña-Cruz V, Ito S, Dascher CC, Brenner MB, Sugita M. Epidermal Langerhans cells efficiently mediate CD1a-dependent presentation of microbial lipid antigens to T cells. *J Invest Dermatol*. 2003;121(3):517–21.
133. Metlay BYJP, Witmer-pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. Metlay et al., 1990. 1990;171(May).
134. Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev*. 1997;156:25–37.
135. Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, et al. The Tissue Distribution of the B7-2 Costimulator in Mice: Abundant Expression on Dendritic Cells In Situ and During Maturation In Vitro. *J Exp Med*. 1994;180(5):1849–60.
136. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Kooten C Van, Durand I, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 Cross-linking. *J Exp Med*. 1994;180(4):1263–72.
137. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Aït-Yahia S, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med*.

- 1998;188(2):373–86.
138. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*. 1998;28(9):2760–9.
 139. Ivetic A, Green HLH, Hart SJ. L-selectin: A major regulator of leukocyte adhesion, migration and signaling. *Front Immunol*. 2019;10(MAY):1–22.
 140. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med*. 1996;184(4):1413–24.
 141. Hunger RE, Porcelli SA, Modlin RL, Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, et al. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells Find the latest version : Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* [Internet]. 2004;113(5):701–8. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/19655>
 142. Kim JH, Hu Y, Yongqing T, Kim J, Hughes VA, Le Nours J, et al. CD1a on Langerhans cells controls inflammatory skin disease. *Nat Immunol* [Internet]. 2016 Oct 22;17(10):1159–66. Available from: http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms
 143. Costa SS, Fornazim MC, Nowill AE, Giorgio S. *Leishmania amazonensis* induces modulation of costimulatory and surface marker molecules in human macrophages. *Parasite Immunol* [Internet]. 2018 Apr;40(4):e12519. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/pim.12519>
 144. Iborra S, Martínez-López M, Cueto FJ, Conde-Garrosa R, Del Fresno C, Izquierdo HM, et al. *Leishmania* Uses Mincle to Target an Inhibitory ITAM Signaling Pathway in Dendritic Cells that Dampens Adaptive Immunity to Infection. *Immunity*. 2016;45(4):788–801.
 145. Heyde S, Philipsen L, Formaglio P, Fu Y, Baars I, Höbbel G, et al.

- CD11c-expressing Ly6C+CCR2+ monocytes constitute a reservoir for efficient *Leishmania* proliferation and cell-to-cell transmission. *PLoS Pathog.* 2018;14(10):1–30.
146. van den Bogaart E, de Bes HM, Balraadjsing PPS, Mens PF, Adams ER, Grobusch MP, et al. *Leishmania donovani* infection drives the priming of human monocyte-derived dendritic cells during *Plasmodium falciparum* co-infections. *Parasite Immunol.* 2015;37(9):453–69.
 147. Colmenares M, Corbí AL, Turco SJ, Rivas L. The Dendritic Cell Receptor DC-SIGN Discriminates among Species and Life Cycle Forms of *Leishmania*. *J Immunol.* 2004;172(2):1186–90.
 148. Caparrós E, Serrano D, Puig-Kröger A, Riol L, Lasala F, Martinez I, et al. Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. *Immunobiology.* 2005;210(2–4):185–93.
 149. Falcão SAC, Weinkopff T, Hurrell BP, Celes FS, Curvelo RP, Prates DB, et al. Exposure to *Leishmania braziliensis* Triggers Neutrophil Activation and Apoptosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(3):1–19.
 150. Conceição J, Davis R, Carneiro PP, Giudice A, Muniz AC, Wilson ME, et al. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(5):1–19.
 151. Regli IB, Fernández OL, Martínez-Salazar B, Gómez MA, Saravia NG, Tacchini-Cottier F. Resistance of *Leishmania (Viannia) Panamensis* to Meglumine Antimoniate or Miltefosine Modulates Neutrophil Effector Functions. *Front Immunol.* 2018;9(December):3040.
 152. Davis R, Thalhofer C, Wilson M. Infection and Activation of Human Neutrophils with Fluorescent *Leishmania infantum*. *J Immunol Tech Infect Dis* [Internet]. 2016;5(3):139–48. Available from: <http://www.scitechnol.com/peer-review/infection-and-activation-of->

humanneutrophils-with-fluorescentleishmania-infantum-
XCtb.php?article_id=5438

153. Saremi SS, Shahryari M, Ghoorchian R, Eshaghian H, Jalali SA, Nikpoor AR, et al. The role of nanoliposome bilayer composition containing soluble leishmania antigen on maturation and activation of dendritic cells. *Iran J Basic Med Sci.* 2018;21(5):536–45.
154. Xin L, Li K, Soong L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol Immunol.* 2008;45(12):3371–82.
155. Zhao Y, Dang Z, Wei R, Gui W, Zhang Y, Chong S. The effects of CCR7 and related signaling pathways on *Leishmania major* -infected human dendritic cells. *J Cell Physiol.* 2019;234(8):13145–56.
156. Ato M, Stäger S, Engwerda CR, Kaye PM. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol.* 2002;3(12):1185–91.
157. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol [Internet].* 2013;13(3):159–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>
158. Barhoumi M, Koutsoni OS, Dotsika E, Guizani I. *Leishmania infantum* LeIF and its recombinant polypeptides induce the maturation of dendritic cells in vitro: An insight for dendritic cells based vaccine. *Immunol Lett [Internet].* 2019;210(March):20–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.04.001>
159. Aebischer T, Bennett CL, Pelizzola M, Vizzardelli C, Pavelka N, Urbano M, et al. A critical role for lipophosphoglycan in proinflammatory responses of dendritic cells to *Leishmania mexicana*. *Eur J Immunol.* 2005;35(2):476–86.
160. McDowell MA, Marovich M, Lira R, Braun M, Sacks D. *Leishmania* Priming of Human Dendritic Cells for CD40 Ligand-Induced Interleukin-

- 12p70 Secretion Is Strain and Species Dependent. *Infect Immun* [Internet]. 2002 Aug 1;70(8):3994–4001. Available from: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.70.8.3994-4001.2002>
161. Tounsi N, Meghari S, Moser M, Djerdjouri B. Lysophosphatidylcholine exacerbates *Leishmania* major-dendritic cell infection through interleukin-10 and a burst in arginase1 and indoleamine 2,3-dioxygenase activities. *Int Immunopharmacol*. 2015;25(1):1–9.
162. Bhattacharya P, Ghosh S, Ejazi SA, Rahaman M, Pandey K, Ravi Das VN, et al. Induction of IL-10 and TGF β from CD4+CD25+FoxP3+ T Cells Correlates with Parasite Load in Indian Kala-azar Patients Infected with *Leishmania donovani*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2):1–20.
163. Filippis C, Arens K, Nzeteu GAN, Reichmann G, Waibler Z, Crauwels P, et al. Nivolumab enhances In Vitro effector functions of PD-1+ T-Lymphocytes and *Leishmania*-infected human myeloid cells in a host cell-dependent manner. *Front Immunol*. 2017;8(DEC):1–12.
164. DeVito NC, Plebanek MP, Theivanthiran B, Hanks BA. Role of Tumor-Mediated Dendritic Cell Tolerization in Immune Evasion. *Front Immunol*. 2019;10(December):1–14.
165. WHO | Leishmaniasis [Internet]. [cited 2020 Feb 3]. Available from: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/

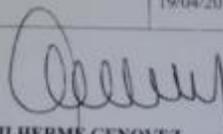
10. Anexo


 MINISTÉRIO DA SAÚDE
 SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
 DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA
 COORDENAÇÃO GERAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS

AUTORIZAÇÃO PARA FORNECIMENTO DE HEMOCOMPONENTES PARA A INDÚSTRIA

Nº Autorização: 008	Data: 24/04/2012
Instituição Favorecida: Fundação Hemocentro de Brasília	
<p>Em atendimento ao Art. 26, § 2º da Portaria nº 1353, de 14/06/2011, a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados foi notificada pela Fundação Hemocentro de Brasília - que estará fornecendo 100 bolsas de concentrado de leucócitos, que serão utilizadas em projetos de pesquisa em imunologia, pelo Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.</p> <p>Destacamos à necessidade de atendimento ao Art. 199, § 4º, da Constituição: "a lei disporá sobre as condições e os requisitos que facilitem a remoção de órgãos, tecidos e substâncias humanas para fins de transplante, pesquisa e tratamento, bem como a coleta, processamento e transfusão de sangue e seus derivados, sendo vedado todo tipo de comercialização."</p>	
<p>Lista de documentos analisados:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cadastro: (X) Sim () Não 2. Alvará da empresa: () 3. Autorização da Anvisa: () 	
Técnico responsável pela análise: Lydia Marcia de Melo França - CGSH/DAE/SAS/MS	Vigência da autorização: 19/04/2012 a 19/04/2013.

Atenciosamente,


GUILHERME GENOVEZ
 Coordenador Geral de Sangue e Hemoderivados

*P. 9 PDA
 para o Lince
 - modo Lince
 27-4-2012*

*Assinatura da Direção
 Fundação Hemocentro de Brasília
 Direção Executiva*

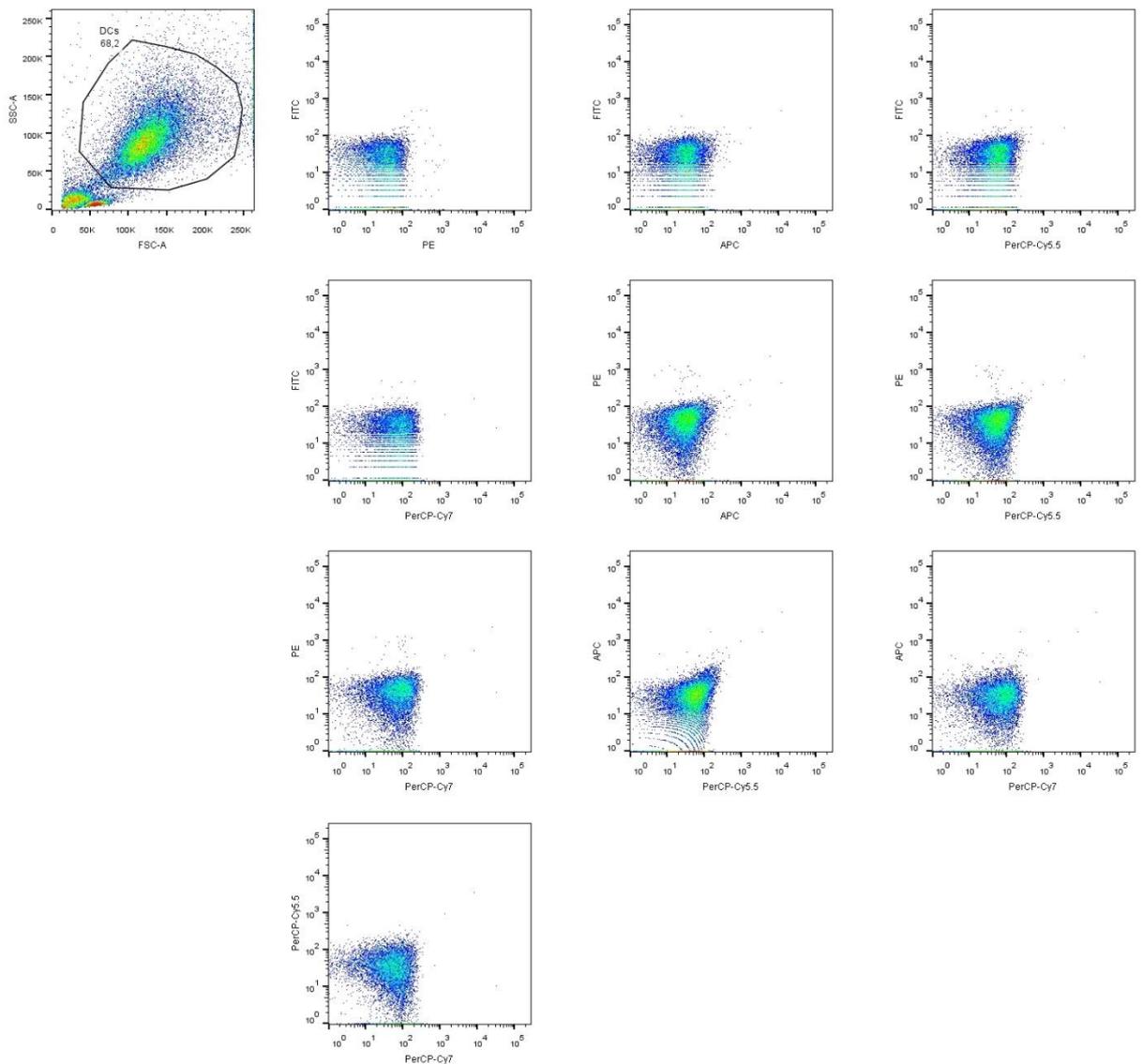
SAÚDE
 Ministério da Saúde, Torre II - Sala 201 CEP: 70750-600 Brasília DF
 Telefone: (61) 3181-4100 e Fax: (61) 3181-4101
 www.saude.gov.br

Data: 27/4/2012 Hora: 14:50
 Nome: *SB* Matr: 1401971
 Assinatura: *Prudência*

11. Apêndice

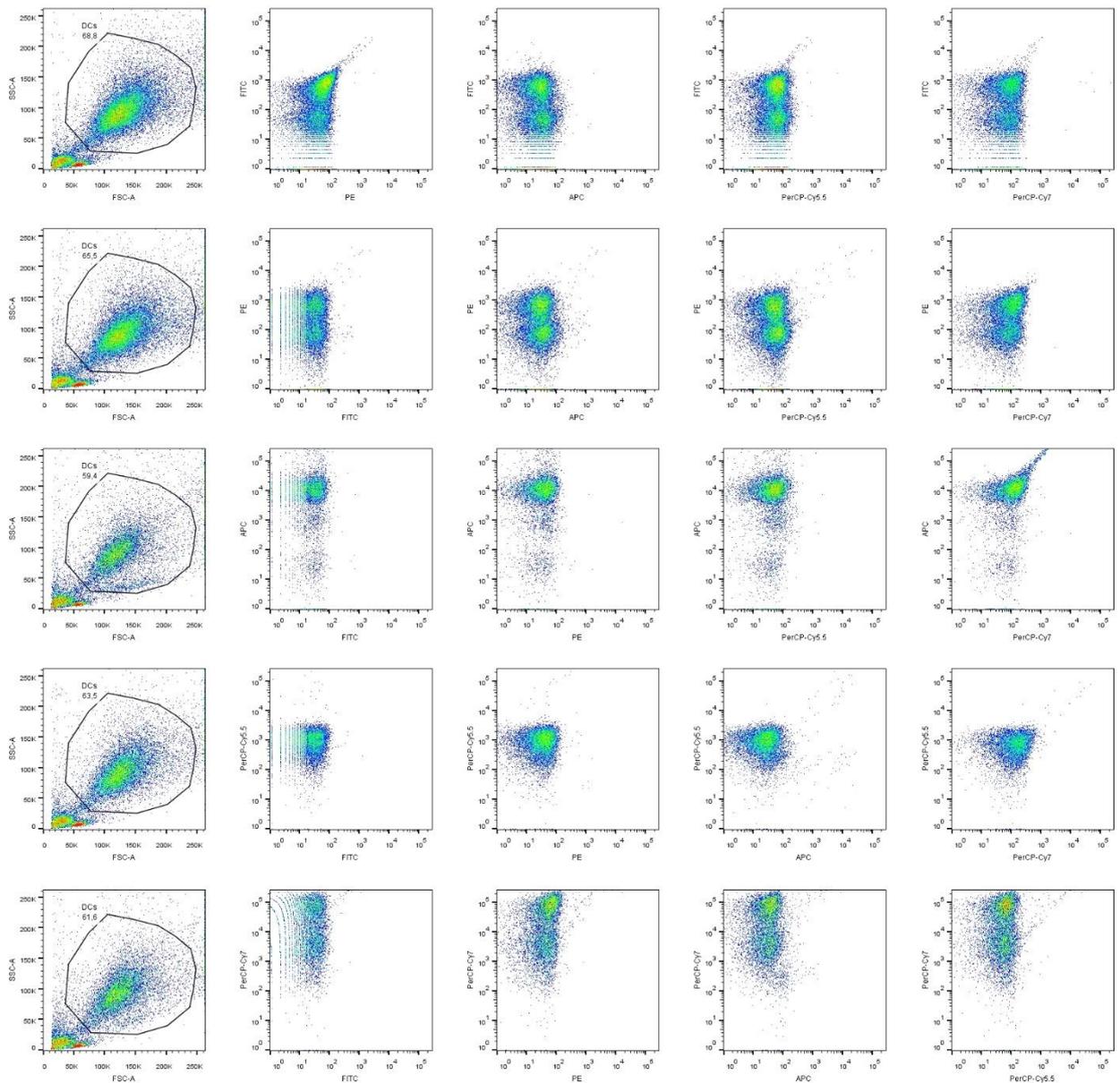
11.1. Apêndice 1

DCs não marcadas para ajuste de voltagem na citometria de fluxo



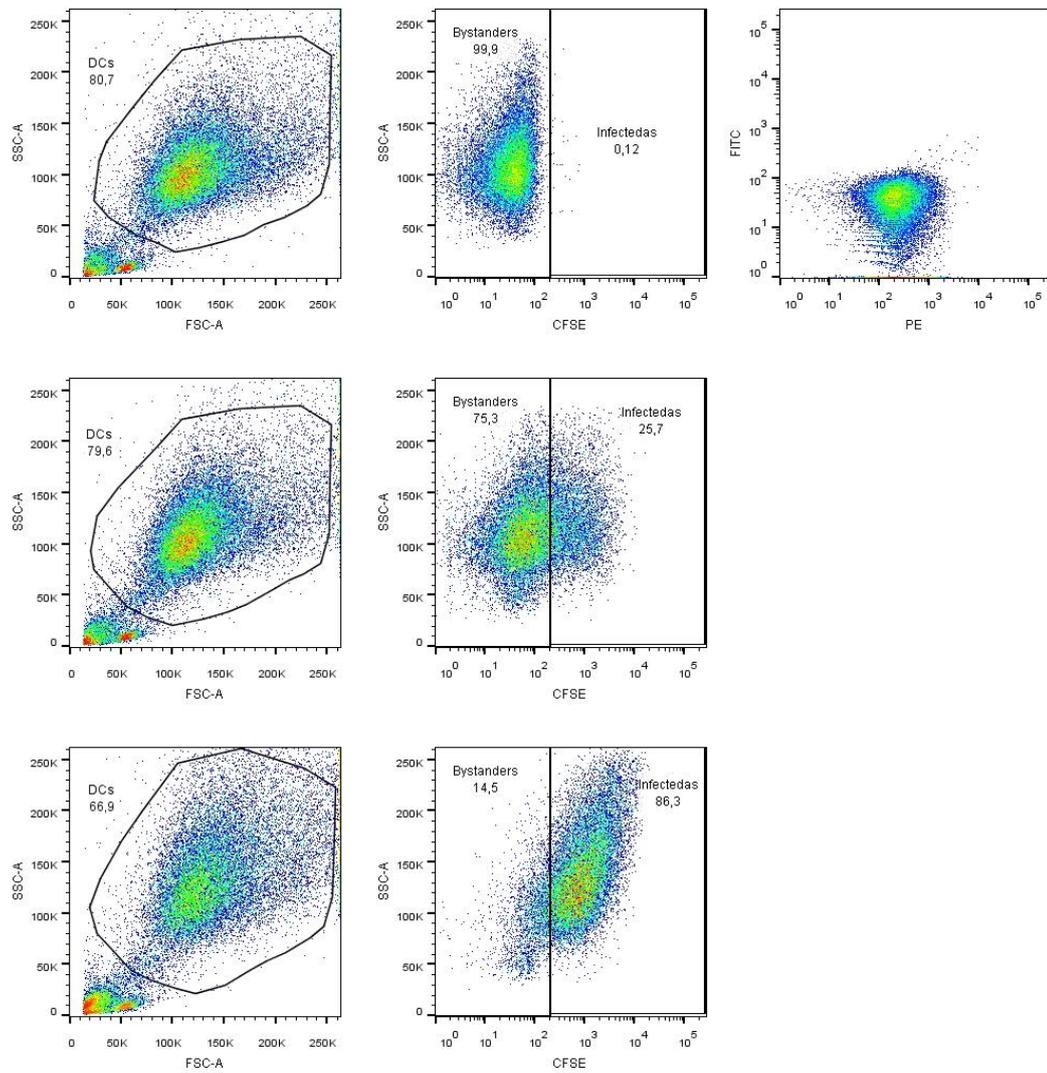
11.2. Apêndice 2

Compensação e ajuste de canal para não haver sobreposição das fluorescências utilizadas no estudo



11.3. Apêndice 3

Controle para ponto de corte de DCs que emitem CFSE+ (DCs infectadas) e as DCs CFSE- (DCs *bystander*)



11.4. Apêndice 4

Original Article

Regulation of Molecule Human Dendritic Cell by *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*

Lucas Caxangá, Elane Maciel, Giulia Lopes, Lívia Mendonça, Sarah Falcão and Cecília Fiuza Favali
Universidade de Brasília – Núcleo de Medicina Tropical

Abstract

Introduction: The leishmaniasis is a neglected tropical disease that has two main clinical forms, Visceral Leishmaniasis (VL) and Leishmaniasis Cutanea (LC). Brazil is a country of high interest because it has a high incidence rate. highlight two main species, *Leishmania infantum*, which causes VL and *Leishmania braziliensis*, which causes LC. They are transmitted by the vector of the family *Phlebotomineae*, where the female at the time of hematophagy inoculates the metacyclic promastigote forms, which are recognized by the cells of the immune system. The parasite tropism cells are those that make up the mononuclear phagocytic system from which we can highlight the dendritic cells (DCs), which are important molecules that connect the innate and adaptive immunity, by the efficient activation of T lymphocytes. DCs are able to direct the host's immune response to a protective or susceptible response. What makes studies of the parasite-host interaction between DCs and *Leishmania* important. Whereas due to the diversity of species and models used in the study, *Leishmania* presents a modulation of the host's immune response according to the species, since one of the evasion strategies of the immune system is the modulation of surface molecules, so the objective of the present work was to analyze the interaction of DCs and *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*, verifying their ability to modulate surface molecules, and differentiating between DC bystander and infected DCs. **Methodology:** Blood samples were collected from buffy coats from Fundação Hemocentro de Brasília, these samples were subjected to the process of separation by Ficoll density gradient, for the collection of mononuclear cells, these cells in turn went through the selection process of CD14 + cells per magnetic column. The CD14 + portion was differentiated for 7 days in medium supplemented with cytokines GM-CSF and IL-4, so already differentiated DCs were co-cultivated with *L. braziliensis* or *L. infantum*, previously stained with CFSE, which allowed differentiating DCs infected and bystander DCs, after 24 h of infection DCs were stained with antibodies to characterize the surface molecules and acquired by flow cytometry. **Results and Conclusion:** The *L. braziliensis* and *L. infantum* were capable of infecting DCs by infection rate by flow cytometry. As *L. braziliensis* and *L. infantum* are not able to modulate the expression of phenotypic characterization molecules in DCs, CD1a and CD11c. However, *L. infantum* induces a profile of migration in DCs by increasing the expression of the CCR7 molecule. In addition, *L. infantum* induced a maturation profile by the expression of the CD83 maturation molecule and the CD80 co-stimulatory molecule, only in infected DCs, but did not significantly alter the expression of other molecules related to the presentation of antigens such as, HLA-DR, CD40 and CD86, as well as the expression of the inhibition molecule PD-L1. *L. braziliensis* did not exhibit the same behavior as *L. infantum*, as it does not alter the significant form of expression of any molecule in DCs. Therefore, the DCs infected by *L. infantum* acquire a migration and maturation profile, but it is not possible to observe the same interaction of DCs and *L. braziliensis*.

Keywords: Dendritic cells, Leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, Neglected Tropical Diseases, Host-parasite relationship.

(NTDs) are diseases that affect tropical and generally developing countries, with poor public health and basic sanitation. According to WHO, there are 17 NTDs, with Leishmaniasis standing out among them. (1)

In 2018, 16,976 cases of VL were reported, with only seven countries accounting for more than 90% of reported cases: Brazil, Ethiopia, India, Kenya, Somalia, Sudan and South Sudan. 257,952 cases reported worldwide, of which about 88% of cases, were reported in 11 countries: Afghanistan, Algeria, Bolivia, Brazil, Colombia, The Islamic Republic of Iran, Iraq, Pakistan, Peru, the Syrian Arab Republic and Tunisia(2). The Brazil presented 96% of VL cases in the Americas, with an increase of 28% in 2017 in relation to 2016(3)

Leishmaniasis is caused by a protozoan of the genus *Leishmania* (4), transmitted by the sand fly of the vector of the family Phlebotomineae of genus *Phlebotomus* and *Lutzomyia*, are the main genus related to *Leishmania* transmission(5). The main clinical forms are Visceral Leishmaniasis (VL) and Cutaneous Leishmaniasis (CL), which have *Leishmania Infantum* as the etiologic agent in *Leishmania brasiliensis*, which cause the visceral and cutaneous form of leishmaniasis, respectively(6).

In VL there is a rapid proliferation of parasites in the liver and later in the spleen, initially the *Leishmania* is inoculated from the dermis, these parasites are phagocyted by cells from specialists in antigen recognition (APCs) of the innate immune response, which leave the site of infection and migrate to organs internal. Where they proliferate associated with decreased levels of cytokines IL-12 and IFN- γ with anti-inflammatory profile. Subsequently, they induce the recruitment of

neutrophils, monocytes, CD4 and CD8 lymphocytes, forming hepatic granulomas, with pro-inflammatory profile that favor the elimination of the parasite(7,8). In the spleen, there is in microenvironment unbalance between pro and anti-inflammatory cytokines that affects the action of APCs in the activation of T cells, as a consequence it leads to intense proliferation of *Leishmania*. In the Americas, LV is related especially in children and immunocompromised (7)(8).

The LT can affect tissues of different parts and mucous membranes, use to triggering a Th1 response with a high presence of lymphocyte T CD8+ , which favors the elimination of the parasite, but with intense tissue damage(9).

An important form of LT is cutaneous localized leishmaniasis (LC), characterized by limited ulcerated lesions on the skin usually in single regions, with well-defined borders, which has the histological characteristic of lower parasitic loads, high levels of Th1 cytokines with decreased production IL-10(8,10).

In this scenario, the APCs play a crucial role in the pathogenesis of the disease, especially Dendritic Cells (DCs), because they have a wide expression of receptors that recognize the parasite and internalize it, especially the DC-SIGN or CD209, calcium-dependent lectin receptor. , which interacts with phosphoglycans (LPG) and glycoproteins (GPI) present in *Leishmania*, important antigens in the activation of the immune response (11)(12). However, *L. donovani* has already demonstrated, through glycocomponents, LPG and GPI, the ability to survive the phagosome when internalized by mononuclear cells, by

delaying the maturation of the phagolysome and inhibiting microbicidal components, creating a favorable environment for its development(13–15).

In addition, *L. infantum* was shown to interfere in the maturation of DC derived from the bone marrow (BM-DCs) of mice, decreasing the expression of CD40 and CD86, still interfering in the pathways of DC maturation and activation, for the protective response, decreasing the production of INF- γ , and despite the increased production of IL-12, it also had the increased of IL-10(16) as well as *Leishmania amazonensis* has been shown to interfere in the differentiation and maturation of DCs from monocytes, consequently interfering in the response of DCs against the parasite (17), but also promotes the persistence of the infection, when in *L. amazonensis* infection it establishes a state of anergy to the Th1 response(18). While *L. mexicana* infecting mouse BM-DCs, it induced IL-12-mediated maturation and response(19). As in the group's work done by Falcão and collaborators, which *L. infantum* and *L. braziliensis* demonstrated not to affect the expression of HLA-DR and induced an increase in the expression of CD86 in human monocyte derived-DCs(20). Thus, it is clear that the parasite of the genus *Leishmania* is capable of modulating the immune response in several ways, so the aim of this work was to analyze the interaction of *L. braziliensis* and *L. infantum* with human dendritic cells, verifying the modulation of molecules on surfaces in DCs, differentiating between infected DCs and bystander DCs.

MATERIALS AND METHODS

Parasite

Two species of reference strains were used, *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) and *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), were thawed, resuspended in Schneider medium supplemented with 1% antibiotic Penicillin-Streptomycin 100X (Gibco®), 10% SBF for Lb and 20% for Li and grown in NNN medium (Agar with 0.6% NaCl, 10% blood and 5% glucose). Incubated at 25°C. After 72 h, transferred to supplemented Schneider medium and for expansion. Then counted to monitor the growth of the culture and identify the stationary phase.

Obtaining human peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained through residual buffy coats ("buffy coats"), in partnership with Fundação Hemocentro de Brasília or healthy voluntary donors, after signing the Free and Informed Consent Form (CEP-FM 072 / 2009). Then 5mL of blood was diluted in 5mL of sterile phosphate buffer 1X saline (PBS 1X: 0.8% NaCl, 0.14% Na₂HPO₄, 0.02% KCl and 0.20% g KH₂HPO₄). In another tube added 3mL of sterile Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) and diluted blood was added, then centrifuged at 600xg at room temperature at 25°C for 25 minutes. The cloud was collected and washed 3 times with PBS 1X and resuspended in 5mL of incomplete RPMI (Gibco®), taken for trypan blue count (Vetec).

Magnetic separation of CD14 + cells

The PBMC was subjected to purification by magnetic separation of CD14⁺ cells in 80µL of MACS buffer (0.5% BSA, 2mM EDTA in PBS 1X, pH 7.2) for each 10⁷ cells and 10µL added for each 10⁷ cells of anti- CD14 conjugated to magnetic beads (Miltenyi Biotec) and incubadas por 15 minutos à 4°C. So 1mL of MACS buffer was added and centrifuged at 400xg for 10 minutes at 4°C. Then 500uL of MACS buffer was added and taken to the separation column (Miltenyi Biotec) attached to a metallic support with a magnetic field. The negative fraction was collected by adding 1mL of MACS buffer to the uncoupled column of the magnet, centrifuged at 400xg for 10 minutes at 4 °C and placed in 5mL of supplemented RPMI and quantified.

***In vitro* differentiation of dendritic cells from monocytes**

After counting and characterizing by flow cytometry the CD14⁺ fraction, they were adjusted to 3x10⁵ to 5x10⁵ cells / mL per well and cultured in a 24-well culture plate (Greiner Bio-one), in complete RPMI medium supplemented with 800UI / mL of IL-4 cytokine (Peprotech) and 50ng / mL of growth factor GM-CSF (Peprotech), incubated in a CO₂ oven (5%) at 37°C for 7 days, with medium change at 48h intervals, removing 150µL / well and adding 200µL / well of supplemented new medium.

Infection of dendritic cells by *L. braziliensis* or *L. infantum*

After differentiation, DCs were collected by sequential washes with sterile PBS,

and washed 1 time, resuspended in 1mL of complete RPMI and quantified and adjusted for cultivation in a 24-well plate (3 to 5x10⁵ / mL per well). Then both Leishmania species were counted and adjusted and adjusted 10 Leishmanias to 1 DC (10: 1), washed and centrifuged at 1,600xg for 10 minutes at 20°C, resuspended in 2.5mL of sterile 1X PBS and marked with concentration end of 20uM succinimidyl ester carboxifluoresceína (CFSE, eBioscience). After 30 minutes of incubation at 25°C protected from light, and centrifuged at 1,600xg for 10 minutes at 20°C and transferred to the wells with the cells and incubated in a CO₂ oven for 24h.

Flow Cytometry and Antibodies

After 24h of infection, the DCs were transferred to 1.5mL eppendorf tubes (about 10⁵ cells per tube). Then labeled with the antibodies: anti-CD1a conjugated to PerCP-Cy7 (eBioscience), anti-CD83 conjugated to PE (eBioscience), anti-HLA-DR conjugated to APC (eBioscience), anti-CD80 conjugated to PE (eBioscience), anti-CD209 conjugated to PerCP-Cy5.5 (eBioscience), anti-CD11c conjugated to APC (Immuno tools), anti-CD274 (PD-L1) conjugated to PE (BD Pharmagen), anti-CCR-7 conjugated to PE (BD Pharmagen), anti-CD62L conjugated to APC (Immuno tools), anti-CD40 conjugated to APC (Immuno tools) and anti-CD86 conjugated to PE (eBioscience). After marking, about twenty thousand (20,000) cells per condition were acquired by flow cytometry on the Verse cytometer and analyzed in the software FlowJo (Flowjo® versão 10).

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using the GraphPad-Prisma software version 5. For the normality test, the Shapiro-Wilk test was used. In the analysis of the infection rates, the exact Fisher test and Mann-Whitney tests, since their distribution was non-parametric. For analysis, between more than two groups, a multivariate analysis was performed comparing all conditions with the Kruskal-Wallis test, with Dunn's post-test for non-parametric samples. The results obtained were demonstrated with the median \pm standard error, the values considered significant (*) $p < 0.05$.

RESULTS

Phenotypic Characterization of Dendritic Cells

After infecting DCs with *L. braziliensis* or *L. infantum*, the

expression of the CD1a molecules was analyzed, in which (negative control) CN showed 86.1%, Lb 85.2%, Li 84.2% and positive control (CP) 82.6%. This analysis strategy represented by CD1a was made for the other molecules, under all conditions (Figure 1).

Quantification of infection rate for cytometry

After 24h of co-culture between DCs and *L. braziliensis* or *L. infantum*, the percentage of DCs positive for CFSE and the mean fluorescence intensity (MFI) emitted by CFSE. The rate of infection by flow cytometry also showed that both species *Leishmania braziliensis* (50,00% \pm 19,00) and *Leishmania infantum* (50,00% \pm 4,00) and the mean fluorescence intensity (MFI), the *L. braziliensis* (1850 \pm 22,76) and *L. infantum* (3925 \pm 484,7) (Figure 2).

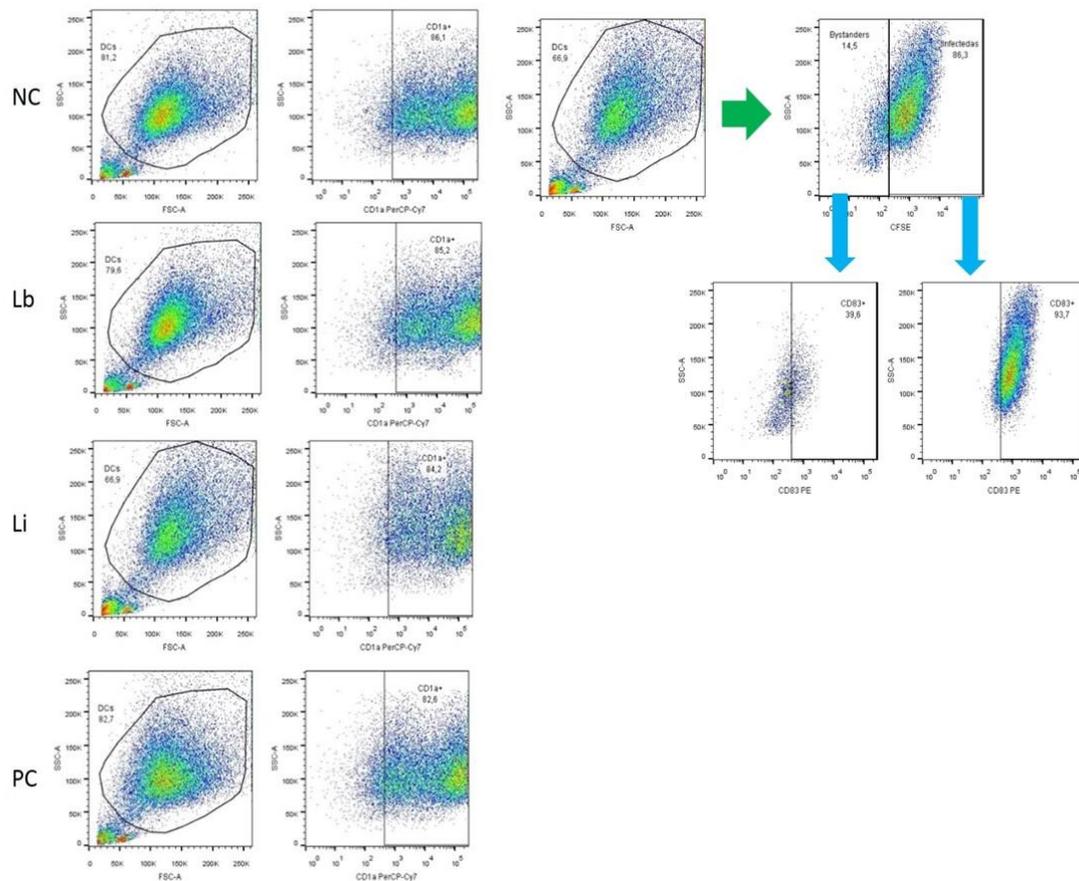


Figure 1. Representative figure of the analysis strategy for phenotypic characterization of DCs and representative figure of the analysis strategy for phenotypic characterization of bystanders and infected DCs. MO-derived DCs were infected by *L. braziliensis* (Lb) or *L. infantum* (Li) for 24 hours. DCs were selected by SSC-A and FSC-A, and then CD1a + cells were selected. As a negative control (CN) DCs were grown only in medium and, as a positive control (CP), DCs were treated with LPS (100ng / mL). DCs infected by *L. braziliensis* or *L. infantum*, were selected by SSC-A and FSC-A, then the DCs were chosen for the expression of CFSE and CD83 +, in the two groups bystander DCs and infected DCs.

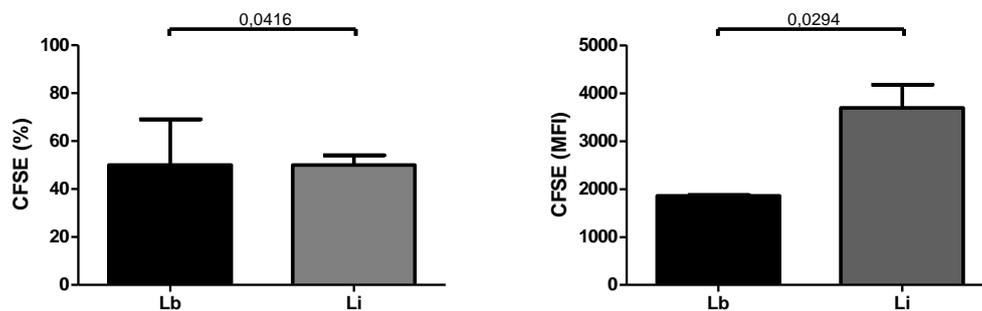


Figure 2. Infection rate by *L. braziliensis* and *L. infantum*. DCs derived from OM were infected by *L. braziliensis* and *L. infantum* previously marked with CFSE. After 24 hours of infection, the percentage of DCs infected with CFSE-labeled *Leishmania* species and the

results were analyzed by flow cytometry the statistical analyses were exact Fisher test, and the mean fluorescence intensity (MFI) DCs that emitted from CFSE analyzed by flow cytometry using the Mann-Whitney test with the significant values (* $p < 0.05$).

Differentiation of dendritic cells from monocytes marked by the expression of CD1a and CD11c

For the phenotypic characterization of DCs, the CD1a and CD11c molecules were initially marked. DCs cultivated alone with only culture medium (NC) expressed about 74.65% \pm 7.071 of CD1a, without showing any significant difference between the other conditions DCs in co-culture with *L. braziliensis* (51.60% \pm 3.00), DCs in co-culture with *L. infantum* (85.30% \pm 5.50) and DCs treated with LPS (PC) (63.25% \pm 9.303) (Figure 3 A). The expression of the CD11c molecule remained high between the conditions, with NC having an expression of 99.55% \pm 0.1211, DCs in co-culture with *L. braziliensis* (92.60% \pm 1.700), DCs in co-culture with *L. infantum* the expression of CD11c was 99.70% \pm 0.2250 and PC had an expression of 99.40% \pm 1.053 (Figure 3 B), thus confirming the differentiation of MOs in DCs. In the mean fluorescence intensity (MFI) both CD1a and CD11c molecules showed similar behavior. Since the MFI of the CD1a molecule, NC showed 8665 \pm 3220, in DCs in co-culture with *L. braziliensis* (23305 \pm 5070), in the co-culture with *L. infantum* (6410 \pm 1150) and in PC (8380 \pm 2926) (Figure 3 C). In the MFI of the CD11c CN molecule it had the expression of 6737 \pm 4084, the DCs in co-culture with *L. braziliensis* (5591 \pm 269.0), the DCs in co-culture *L. infantum* (11111 \pm 4184) and PC (7418 \pm 9818) (Figure D).

When analyzing the expression of the molecules, CD1a and CD11c in DCs bystander or infected after interaction

with *L. braziliensis* or *L. infantum*. This interaction proved not to affect the differentiation markers in DCs, since CD1a had the expression of 83.00% \pm 6.667 in NC, in the interaction of DCs and *L. braziliensis*, Lb bystander (55.60% \pm 3.300) and (49.80% \pm 3.000) infected Lb, the expression of CD1a in the interaction with *L. infantum*, the expression in Li bystander was 81.15% \pm 5.762 and infected Li (87.55% \pm 4.959) (Figure 3 E). Similar behavior was observed in the expression of the CD11c molecule, with CN having an expression of 99.60% \pm 0.1172 under the conditions of DCs in co-culture with *L. braziliensis*, with Lb bystander having an expression of 88.20% \pm 1.500 and infected Lb showed 94.50% \pm 1.700, in the co-culture with *L. infantum* DCs the expression in Li bystander was 99.25% \pm 0.2121 and infected Li showed 99.80% \pm 0.3591 in CD11c expression (Figure 3 F).

In the evaluation of MFI the molecules, CD1a and CD11c (Figure 3 G and H), it were observed that the CD1a molecule, had the expression in CN of 9642 \pm 5554, in DCs in co-culture with *L. braziliensis*, Lb bystander (26696 \pm 9233) and infected Lb (21776 \pm 3127), in the conditions of DCs in co-culture with *L. infantum*, and in Li bystander showed 6958 \pm 1142 expression of CD1a and infected Li 6206 \pm 1155 (Figure 3 G). The same can be observed in MFI expression of the CD11c molecule, which did not show large variations under the following conditions: CN (8009 \pm 3810), Lb bystander (4332 \pm 134.0), infected Lb (6104 \pm 293.0), Li bystander (8871 \pm

3733) and infected Li (12465+/-4764)
(Figure 3 H).

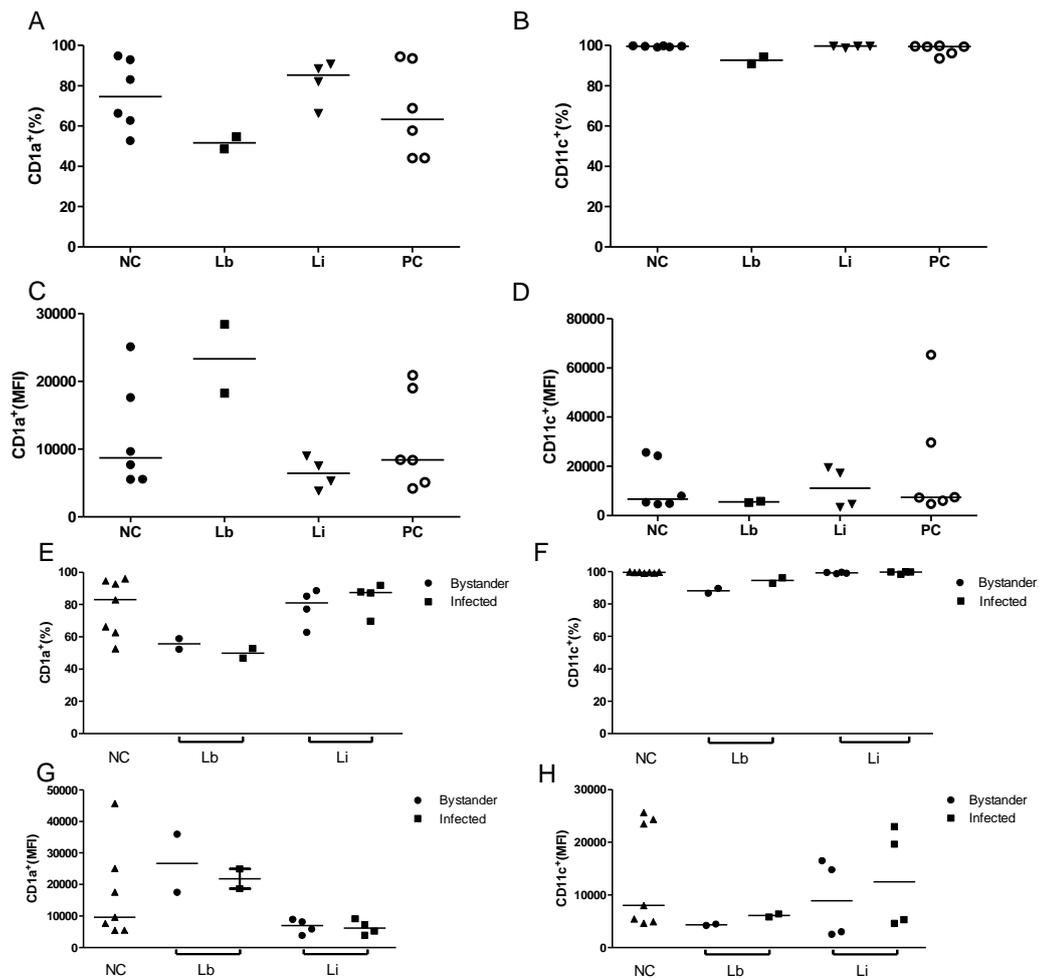


Figure 3. Expression of CD1a and CD11c in DCs infected by *L. braziliensis* or *L. infantum*. (A) percentage of CD1a⁺ and (B) CD11c⁺ DCs, percentage of DCs that presented CD1a and CD11c, respectively, on their surface. MFI of CD1a (C) and (D) CD11c. In the Expression of CD1a and CD11c in bystanders and infected DCs can observe the percentage of DCs that express the molecules (E) CD1a and (F) CD11c, under NC negative control conditions, DCs that interacted with *L. braziliensis* (Lb bystander) and DCs infected by *L. braziliensis* (Lb infected), also DCs that were co-cultured with *L. infantum* (Li bystander) and DCs infected with *L. infantum* (infected Li). These groups were also analyzed for the mean fluorescence intensity (MFI) for the molecules, (G) CD1a and (H) CD11c. Each dot represents

a donor and the bar refers to the median expression of the molecules. The test applied was Kruskal-Wallis and the values considered significant (* $p < 0.05$).

Expression of the DC-SIGN receptor in dendritic cells

Then the expression of CD209, a molecule related to phagocytosis of microorganisms, was evaluated. The DCs showed high expression of the CD209 receptor (Figure 4) as shown in CN (89.70% \pm 7.086), while in co-culture with *L. braziliensis* it showed the expression of 60.65% \pm 20.45, in the co-culture with *L. infantum* the expression of CD209 was 92.20% \pm 10.23 in DCs, and in the positive control it presented 78.05% \pm 8.439 (Figure 4 A). The MFI of CD209 molecule in the NC (588.0 \pm 190.6), that there was not variation in the presence of *L. braziliensis* (409.5 \pm 91.50) and *L. infantum* (651.5 \pm 194.9) and PC (421.0 \pm 154.4) (Figure 4 B).

The bystander DCs and infected DCs, the expression of the CD209 molecule in DCs, with a value of $p = 0.1478$, since the NC (94.60% \pm 6.332), in the co-culture with *L. braziliensis* and DCs, Lb bystander had an expression of 54.15% \pm 18.85 and infected Lb (63.55% \pm 21.05), in the interaction of DCs with *L. infantum*, Li bystander had an expression of 81.25% \pm 11.63 and an expression of 94.70% \pm 4.309 of the CD209 molecule (Figure 4 C). The mean fluorescence intensity showed a similar behavior, with p -value = 0.6790, and NC (628.0 \pm 176.6), in the interaction of DCs with *L. braziliensis*, Lb bystander (433.0 \pm 52.00) and infected Lb (399.0 \pm 108.0), in the co-culture of DCs with *L. infantum*, the CD209 molecule had an MFI of 470.5 \pm 163.6 in Li bystander and in infected Li it was 746.0 \pm 244.7 (Figure 4 D).

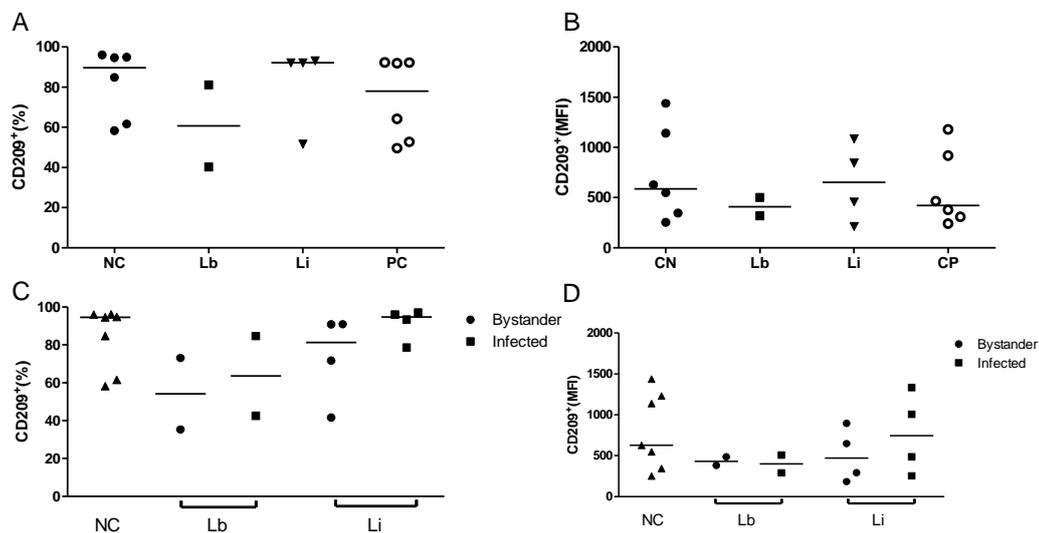


Figure 4. Expression of CD209 in DCs after *L. braziliensis* or *L. infantum* infection. Evaluation of CD209 expression of DCs in the comparison between the negative control groups (NC) in relation to DCs infected by *L. braziliensis* (Lb), infection of DCs by *L. infantum* (Li) and DCs treated with LPS (PC), by percentage of DCs that have (A) CD209 on the surface and expressed by the average fluorescence intensity of the (B) CD209 molecule in DCs. The CD209 expression in bystanders and infected dendritic cells (C)

percentage of DCs that expressed CD209, in the comparison between negative control (CN), DCs bystander in the interaction with *L. braziliensis* (Lb bystander), DCs infected by *L. braziliensis* (Lb infected), DCs bystander in co-culture with *L. infantum* (Li bystander) and DCs infected by *L. infantum* (Li infected). The evaluation of the average fluorescence intensity (D) (MFI) of the CD209 molecule. Comparing the conditions using the Kruskal-Wallis test, each point represents a donor, and p values <0.05 were considered significant between the groups.

Maturation and motility of dendritic cells

After phagocytosis to DCs of microorganisms, the DCs undergo the maturation process, marked by the expression of the CD83 molecule, which had a value of $p = 0.0702$, with NC expressed $13.25\% \pm 3.136$, DCs in co-culture with *L. braziliensis* ($23.60\% \pm 0.4000$), DCs in co-culture with *L. infantum* ($28.95\% \pm 5.179$) and in PC the DCs had an expression of $32.10\% \pm 5.968$ of CD83 (Figure 5 A). In this process DCs are directed to the secondary lymphoid organs, by the expression of the CCR7 molecule, with $p = 0.0167$, and DCs in the interaction with *L. infantum* ($14.10\% \pm 3.240$) had a significant increase in expression of the CCR7 molecule in relation to the CN ($2.270\% \pm 0.5858$), already in the interaction of DCs with *L. braziliensis* ($9.435\% \pm 0.7650$) and PC ($2.080\% \pm 0.3807$), showed not significant difference (Figure 5 B). Also the molecule motility in DC, the CD62L adhesion molecules were marked, which showed no difference in expression, since the value of $p = 0.9176$, since in the CN group the

expression was $23.10\% \pm 5.686$, in DCs in the co-culture with *L. braziliensis* ($23.10\% \pm 5.700$) and in the interaction of DCs with *L. infantum* the expression of CD62L was $27.55\% \pm 9.180$ and PC ($20.05\% \pm 3.814$) (Figure 5 C).

In DCs, bystander or infected. DCs showed to acquire a mature cell profile through the value of $p = 0.0317$, with NC showing the expression $11.60\% \pm 2.98$, in DCs in the presence of *L. braziliensis*, Lb bystander ($16.45\% \pm 0.8500$) and infected Lb ($26.75\% \pm 0.6500$), did not show significant difference, in DCs in co-culture with *L. infantum*, Li bystander ($19.90\% \pm 5.083$) also showed no significant difference, however infected Li ($38.25\% \pm 4.686$) had a significant increase in the expression of the CD83 molecule in relation to the NC (Figure 5 D). Although the DCs have the expression of the CCR7 molecule with the value of $p = 0.0173$, it was not possible to observe a significant difference between the conditions studied, being NC ($1.570\% \pm 0.5873$), the interaction of DCs and *L. braziliensis*, Lb bystander ($1.210\% \pm 0.01000$) and infected Lb ($12.95\% \pm 0.8500$), also in the

interaction of DCs and *L. infantum*, with Li bystander (1,290%±0.6204) and infected Li (21.95% ± 3613) (Figure 5 E).

The expression of the CD62L molecule, had a value of $p = 0.3479$, showing no difference between CN (23.50%±7.595), DCs in co-culture with *L. braziliensis*, Lb bystander (10.18%±1.625) and infected Lb (28.45%±7.050), DCs in the presence of *L. infantum*, Li bystander (16.79%±7.904) and infected Li (33.05%±11.10) (Figure 5 F).

The MFI of the CD83 molecule did not show significant differences, with $p = 0.1588$, and in the CN condition (769,5±65,11), with DCs in co-culture with *L. braziliensis* had the MFI of 438,0±76,50), in DCs in the interaction with *L. infantum* it had the expression of 644,0±90,59) of the molecule CD83 and PC (685.5±67,63) (Figure 5 G). The CCR7 molecule showed no MFI changed in DCs, by the value of $p = 0.3707$, and DCs presented an MFI of 264.0±46.03 in NC, in the interaction of *L. braziliensis* with DCs the expression of CCR7 was 267.0±16.00, in DCs in the presence of *L. infantum* it was 341.0±21.27 and PC (285.0±93.75) (Figure 5 H). The MFI of the CD62L molecule, however, remained

unchanged, with $p = 0.1588$, and expression under the following conditions: NC (769.5 ± 65.11, Lb (514.5 ± 76.50), Li (644.0±90.59) and PC (685.5 ± 67.63) (Figure 5 I).

The mean fluorescence intensity of the CD83 molecule, presented the value of $p = 0.1694$, which can be observed in NC (386.0±44.93), DCs in the interaction with *L. braziliensis*, Lb bystander (288.0 ± 3,000) and infected Lb (278.5 ± 17.50), in the interaction of DCs with *L. infantum*, Li bystander (423.0 ± 29.90), infected Li (415.0±39.42) (Figure 5 J). With the CCR7 molecule, the value of $p = 0.1165$ was verified, whereas the CN had an MFI of 266.0±38.94, the co-culture of *L. braziliensis* and DCs, Lb bystander was 177.0±13.00 and infected Lb (270.5±17.50), in the presence of *L. infantum* with DCs, Li bystander (257.0 ± 34.99) and infected Li (352.0±21.94) (Figure 5 K). The MFI of the CD62L molecule, had $p = 0.1692$, with NC in the MFI of 788.0±221.5, DCs in the co-culture with *L. braziliensis*, with Lb bystander (790.5±10.50) and infected Lb (469.5±94.50), CD62L expression was also observed in DCs in the presence of *L. infantum*, Li bystander (654.5±99.39) and Li infected (571.0±126.6) (Figure 5 L).

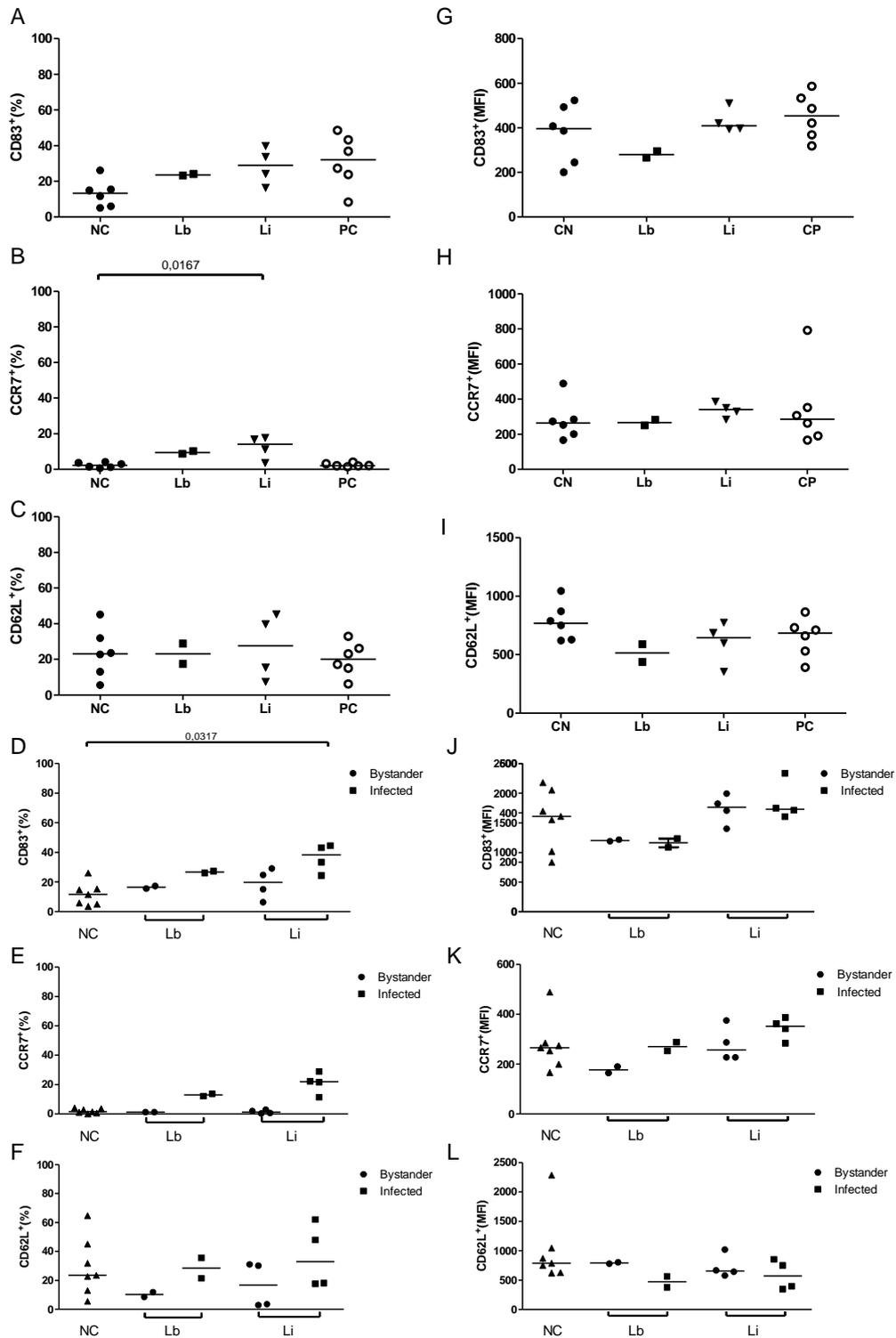


Figure 5. Expression of migration of DCs in infection by *L. braziliensis* and *L. infantum*. Percentage of (A) CD83, (B) CCR7 and (C) CD62L expression, in the negative control (CN), infection by *L. infantum* (Li) or *L. braziliensis* (Lb). MFI of (G) CD83, (H) CCR7 and (I) CD62L molecules. In DCs bystander and infected the expression of the

molecules (A) CD83, (B) CCR7 and (C) CD62L, comparing the negative control (CN), bystander DCs in the co-culture with *L. braziliensis* (Lb bystander), DCs infected by *L. braziliensis* (Lb infected), as well as bystander DCs in the presence of *L. infantum* (Li bystander) and DCs infected with *L. infantum* (infected Li). The mean fluorescence intensity of the molecules, (D) CD83, (E) CCR7 and (F) CD62L, was also evaluated. With each point representing a donor, the multivariate analysis using the Kruskal-Wallis test, and p values <0.05 were considered significant.

Molecules involved in the presentation of antigens and inhibition of lymphocytes in dendritic cells

The DCs, the professional APCs, have a high expression of HLA-DR (Figure 6 A), and the presence of *L. braziliensis* and *L. infantum* modulated their expression, since the value of $p = 0.7810$, and NC had the expression of $(97.50\% \pm 0.5382)$, DCs in the presence of *L. braziliensis* had an expression of $91.35\% \pm 6.550$ and in co-culture with *L. infantum* $(6.550\% \pm 1.696)$, in addition to the PC $(96.30\% \pm 3.039)$ (Figure 6 A). The co-stimulatory molecules as CD40, its constant expression in DCs between the conditions analyzed, that the p value = 0.3799 , the NC expression was $99.60\% \pm 0.1740$, in the presence with *L. braziliensis*, DCs expressed $(98.60\% \pm 0.5000)$, in the interaction of *L. infantum* with DCs that expressed $(99.20\% \pm 0.3403)$ of the molecule CD40 and PC $(99.30\% \pm 0.1282)$ (Figure 6 B). The expression of the CD86 molecule, with $p = 0.0090$, with the NC expression being $94.60\% \pm 3,146$, and there was no significant difference in the conditions of DCs in the presence of *L. braziliensis* $(88.10\% \pm 5,500)$ and *L. infantum* $(97,10\% \pm 0,3172)$, in the PC showed the expression of CD86 $(98,25\% \pm 0,2472)$ (Figure 6 C). In the expression of the CD80 molecule, which had a value of $p = 0.0101$, with CN $(9.805\% \pm 2.368)$, DCs in the co-culture with *L. braziliensis* had an expression of

$18.70\% \pm 2,100$ and in DCs in the presence of *L. infantum* the expression of CD80 was $16.85\% \pm 4.604$ and in the positive control $(44.05\% \pm 7.810)$ (Figure 6 D). The inhibitory molecule PD-L1 showed $p = 0.0112$, which in CN was $72.00\% \pm 4.125$, under DC conditions in co-culture with *L. braziliensis* which had an expression of $58.70\% \pm 1,400$, in DCs in the presence of *L. infantum* $(74.00\% \pm 3,460)$ and in the PC $(95.50\% \pm 3,393)$ (Figure 6 E).

The mean fluorescence intensity HLA-DR expression remained stable, with a p -value of 0.7793 , in CN (3866 ± 3272) , similar to DCs in co-culture with *L. braziliensis* (3967 ± 163.5) and DCs in co-culture with *L. infantum* (4624 ± 3084) and CP (5690 ± 4022) (Figure 16 F). The CD40 molecule, there were no major variations in expression, with a p -value of 0.4128 , in relation to the NC (6559 ± 4275) , DCs in the co-culture with *L. braziliensis* (4111 ± 494.5) , in DCs in the presence of *L. infantum* (8756 ± 3534) and PC (8571 ± 6759) (Figure 6 G). The MFI of the CD86 molecule had a value of $p = 0.6147$, the expression in NC was 2787 ± 803.7 , the co-culture of *L. braziliensis* with DCs showed the expression of (2518 ± 797.5) and DCs with *L. infantum* (3096 ± 1326) , the PC had the MFI (3523 ± 1538) (Figure 6 H). The mean fluorescence intensity of the CD80 molecule, with a p -value of 0.0323 , however between the conditions there was no significant difference between the studied

conditions, being NC (297.5 +/- 46.59), the MFI of DCs in co-culture of *L. braziliensis* (223.5 +/- 3,500), in the MFI of DCs in the presence of *L. infantum* (350.0 +/- 5,360) and CP (456,0 +/- 41,13) (Figure 6 I). And the MFI of PD-

L1 had p = 0.0047, which presented the NC (448.0 +/- 38.42), in DCs in the interaction with *L. braziliensis* (309.5 +/- 0.5000) and DCs in co-culture of *L. infantum* (464.0 +/- 27.34), and PC (899.5 +/- 294.4) (Figure 6 J).

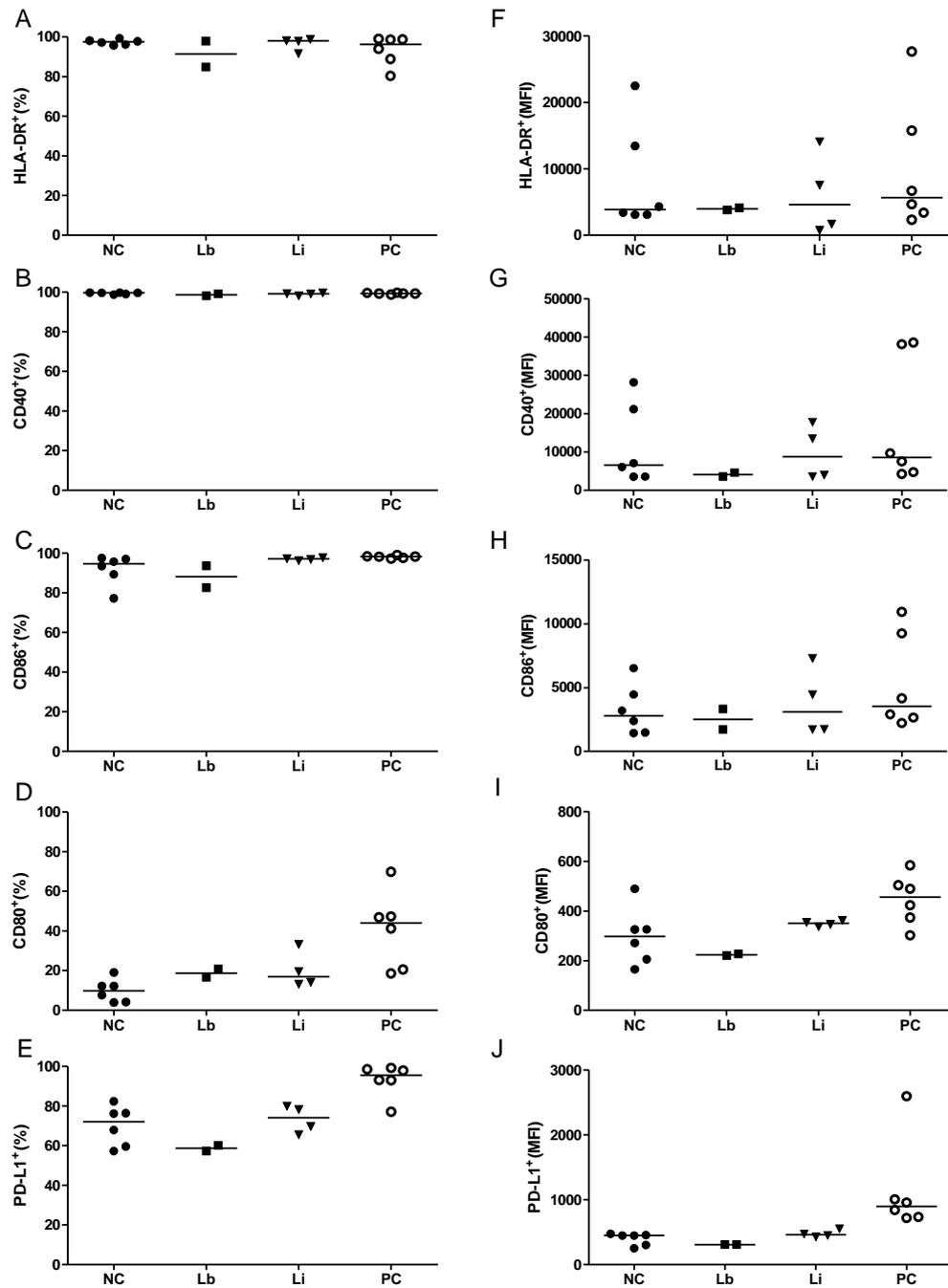


Figure 6. Expression of the percentage of molecules, HLA-DR and CD40, CD86, CD80 and PD-L1. Comparing the negative control groups (CN), infection with *L. braziliensis* (Lb), infection with *L. infantum* (Li) and treatment with LPS (CP), the percentage of the molecule (A) HLA-DR was evaluated, as well such as the co-stimulatory molecules (B) CD40, (C) CD86 and (D) CD80, as well as the percentage of DCs that presented the inhibitory molecules (E) PD-L1. In addition, the expression of these molecules was verified by the average fluorescence intensity (MFI) in DCs expressed by the molecule (F) HLA-DR, (G) CD40, (H) CD86, (I) CD80 and (J) PD -L1. The Kruskal-Wallis test was used. Each point represents a donor and bars the median, $p < 0.05$ was considered significant.

Molecules involved in the presentation of antigens and inhibition of lymphocytes in bystanders and infected dendritic cells

The expression of the HLA-DR molecule in DCs bystander and infected, had $p = 0.2185$, HLA-DR showed a stable expression under the conditions, NC ($97.80\% \pm 0.4684$), DCs in co-culture with *L. braziliensis*, in Lb bystander ($88.10\% \pm 8,300$) and infected Lb ($92,90\% \pm 5,600$), which had a similar behavior in DCs in the interaction with *L. infantum*, Li bystander ($89.85\% \pm 2.887$) and infected Li ($94.20\% \pm 1.628$) (Figure 7 A). The expression of the CD40 molecule, with $p = 0.1192$, with an expression of $99.60\% \pm 0.1645$ in the NC, without showing changes in conditions, in DCs with *L. braziliensis*, Lb bystander ($97.00\% \pm 0.9000$) and infected Lb ($99.40\% \pm 0.4000$), such as DCs in co-culture with *L. infantum*, Li bystander ($98.55\% \pm 0.3663$) and infected Li ($99.40\% \pm 0.4992$) (Figure 7 B). The CD86 expression, which had a p-value of 0.7035, and NC had expression of $93.50\% \pm 3.203$, in DCs in co-culture with *L. braziliensis*, the conditions Lb bystander ($79.55\% \pm 11.25$) and infected Lb ($91.70\% \pm 3,200$), in the interaction of DCs and *L. infantum*, Li byastander ($93.70\% \pm 3.548$) and infected Li had an expression of $93.40\% \pm 1.828$ (Figure 7 C). In the expression of the CD80

molecule, showed a value of $p = 0.0329$, and the expression of $12.10\% \pm 7.696$ in CN, the DCs in co-culture with *L. braziliensis* did not present significant difference, Lb bystander ($9.840\% \pm 1.060$) and infected Lb ($22.75\% \pm 3.250$), the DCs in the presence of *L. infantum* Lb bystander had an expression of $5.240\% \pm 0.4861$, and in the condition of infected Li ($33.15\% \pm 3,227$), which had a significant increase in relation to Li bystander (Figure 17 D). The inhibitory molecule PD-L1 in DCs with a p value of 0.0777, the CN expression was $67.90\% \pm 4,695$, in DCs that were co-cultured with *L. braziliensis*, Lb bystander ($49, 85\% \pm 5,150$) and infected Lb ($62,35\% \pm 0,05000$), in the interaction of *L. infantum* and DCs, Li bystander ($64,55\% \pm 4,858$) and infected Li ($77, 85\% \pm 3.061$) (Figure 7 E).

In the evolution of the mean fluorescence intensity of the HLA-DR molecule, it showed a similar behavior, with MFI in NC (4320 ± 2765), in the interaction of DCs and *L. braziliensis*, Lb bystander (3543 ± 705.0) and infected Lb (4150 ± 59.00), DCs in co-culture *L. infantum*, Li bystander (4818 ± 3466) and infected Li (4460 ± 2770) (Figure 7 F). The MFI of the CD40 molecule, with $p = 0.6839$, being NC (7045 ± 3647), the expression in DCs in the co-coculture *L. braziliensis*, in Lb bystander (3707 ± 825.5) and in infected Lb (4292 ± 351.0), in DCs in

the presence of *L. infantum*, the expression of MFI in Li bystander (7662±3470) and infected Li (10007±3733) (Figure 7 G). The CD86 molecule, it presented $p = 0.8286$, which in the negative control (2376±778.2), in the interaction of *L. braziliensis* with DCs, Lb bystander (2497±881.5), Infected Lb (2520±766.0), and in the co-culture of DCs with *L. infantum*, Li bystander (3875±1578) and Infected Li (2495±1117) (Figure 7 H). In the MFI of the CD80 molecule, p value = 0.0355, which had an MFI of 325.0±39.97 in NC, in DCs in the presence of *L. braziliensis*, with MFI in

Lb bystander (185.0±16.00) and infected Lb (231.0±3.000), and in the interaction of DCs with *L. infantum*, Li bystander (268.5±7.739) and infected Li (357.0±13.55), (Figure 7 I). The MFI of the PD-L1 molecule showed $p = 0.1826$, and the NC had an MFI of 448.0±47.29, with no significant difference in DCs in co-culture with *L. braziliensis*, Lb bystander (286.0±27.00) and infected Lb (316.5±9.500), and in the interaction between DCs and *L. infantum*, with the MFI in Li bystander of 446.5±20.58 and Infected li 483.0±29.30 (Figure 7 J).

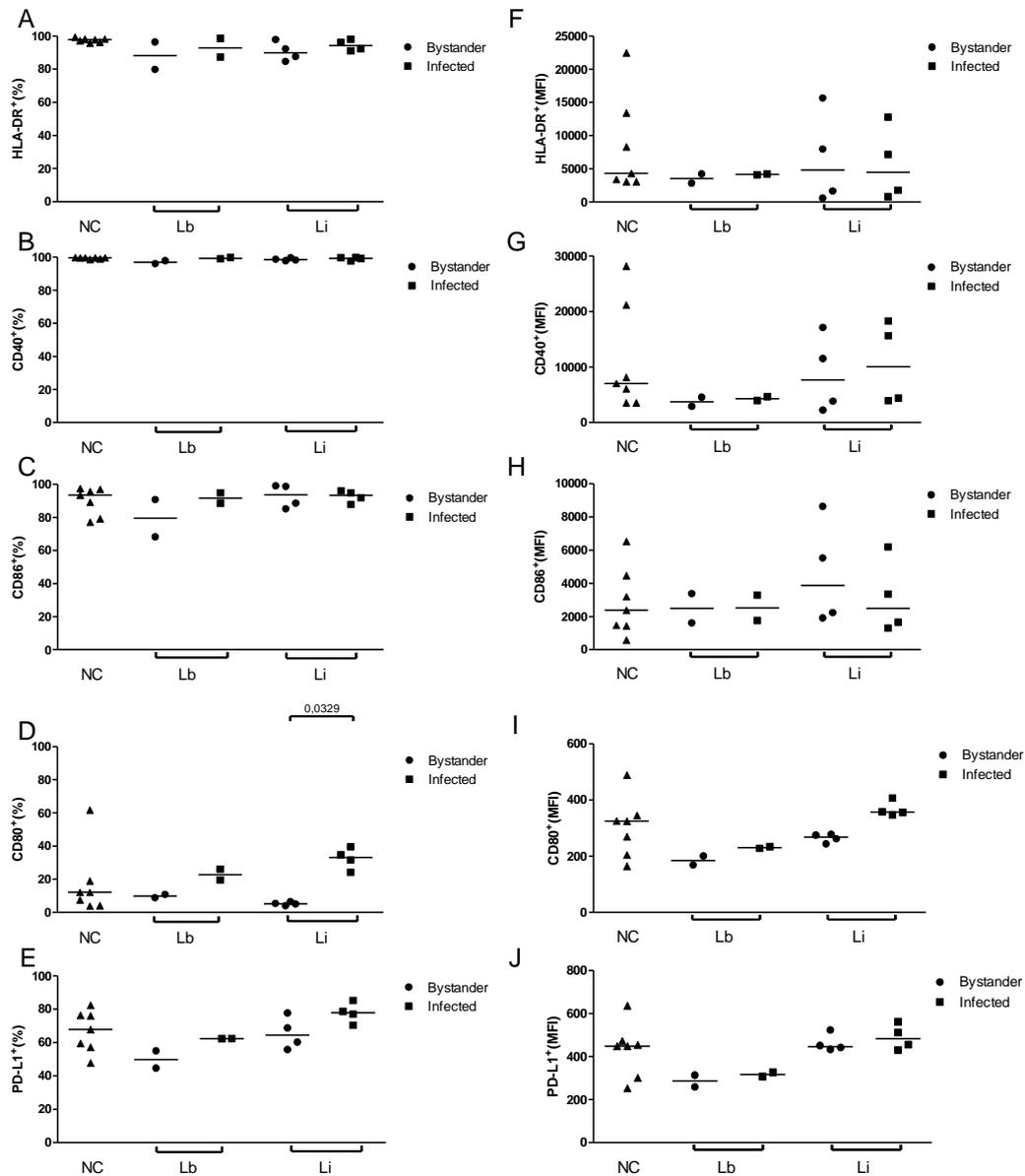


Figure 7. DCs express on their surface molecules capable of activating lymphocytes. (A) HLA-DR, (B) CD40, (C) CD86 and (D) CD80. In addition to the expression of inhibitory molecule (E) PD-L1. In addition, the expression was evaluated by mean fluorescence intensity (MFI), (F) HLA-DR, (G) CD40, (H) CD86 and (I) CD80. Like increasing the expression of (J) PD-L1. Since each point represents a donor, and the evaluations were the comparison was between the groups as negative control (CN), DCs bystander in infection with *L. braziliensis* (Lb bystander), DCs infected by *L. braziliensis* (infected Lb), DCs bystander in infection with *L. infantum* (Li bystander) and finally DCs infected with *L. infantum* (Li infected) finally DCs infected with *L. infantum* (Li infected)

DISCUSSION

When evaluating the infection rates by

Leishmania braziliensis or *Leishmania infantum* in the DCs after 24h of co-culture, it is observed that the species suffer changes in infection. The same was observed as in another study of our group, without the species that has the capacity to infect about 40% of the monocyte-derived DCs(20). A study carried out with *L. amazonensis* also found similar infection rates observed here(17). Data with primary and primary forms of *L. mexicana* showed that it is even capable of infectious DCs derived from the marrow of mice after 18h(19), as well as DCs derived from monocytes after 3h of infection(21). Even with the capacity for infection, Lb and Li did not demonstrate the ability to interfere in the differentiation of DCs. However, *L. amazonensis* interfered in the differentiation and development of monocyte-derived DCs, when the parasite was incubated with the monocytes at the time of differentiation, which was observed by the decrease in CD1a expression (17).

The CD11c molecule is important because DCs CD11c+ in infection has already been widely addressed, as it is an efficient response to pathogens(9). Bearing in mind that, *L. amazonensis*, after 24h of infection, was able to modulate the expression of CD11c and CD11b in monocyte-derived human macrophages(147) in addition, *L. major* was able to modulate the recruitment of positive CD11c cells, when recognized by the Mincle pathway, a type C lectin receptor. However, when observed with DCs derived from Clec4e-/- mice bone marrow, the expression of CD11c was fundamental in controlling *L. major* infection in addition to promoting greater activation of T_s lymphocytes and inflammatory cytokine production(23).

Monocyte-derived DCs express the CD209 receptor on its surface,

belonging to the group of type C lectin receptors that mainly recognize carbohydrates(11). Thus, the parasites could be using the CD209 molecule as an internalization mechanism in DCs. In work of Falcão et al., observed that the infection of moDCs by *L. infantum* and *L. braziliensis* significantly decreased the expression of the CD209 molecule, suggesting that it could be a pathway for the internalization of Leishmania that linked to CD209, decreasing the expression on the surface (20) The same was observed in the infection of mo DCs by *L. donovani*(24). Colmenares and collaborators, on the other hand, prove that the DC-SIGN molecule is a fundamental pathway for the recognition and internalization of *L. pifanoi* in K562 cells when they express DC-SIGN, since blocking with anti-DC-SIGN also reduced the infection rate(25). Although Caparrós and colleagues have also shown that in sinusoidal endothelial liver cells, the amastigote forms of *L. pifanoi* and *L. infantum* have the capacity to infect Jurkat cells, when expressing DC-SIGN or L-SIGN, start to internalize *L. pifanoi* and *L. infantum* in amastigote forms, reversing this infection after blocking receptors(26)

After the recognition and internalization of the pathogen, the DCs undergo the process of maturation and migration to the secondary lymphoid organs to promote the activation of lymphocytes. As can be seen in our results, the *L. infantum* were able to increase the expression of CD83 as CCR7. Since working with BM-DCs from B6 mice and human DCs from humans, they showed increased CD83 expression when treated with *Leishmania* SLA liposome conjugated to DOTA / DSPC, inducing the

maturation of DCs, but the same was not observed in BM-DCs from BALB / c (27). As well as *L. amazonensis* induces increased expression of CD83 in mature mo-DC after infection(17). However, in another study with BM-DCs infected with *L. amazonensis*, the expression of CD83 was unchanged, inducing less DC maturation(28). The CCR7 molecule, which proved to be fundamental in the response generated by DCs(29)(30). Since in the infection by *L. major* mo-DCs there was an increase in the expression of CCR7, this increase in expression was associated with an increase in the production of IL-12 and IFN- γ (31). It has also been shown that CCR7 has a primary role in controlling infection by *L. donovani* in B6 mice in the initial infection, mediated by its ligands CCL19 and CCL21, because in the absence of the CCR7 receptor and its ligands, there was an expansion of the infection(32).

Although the infection by *L. infantum*, there was no modulation of the molecules involved in the presentation of antigen despite the fact that the infection shows to increase the expression of the co-stimulating molecules CD80. This variation of molecules involved in presentation antigen showed seen in the literature. In this sense, the 24h infection of *L. braziliensis* or *L. infantum* in DCs did not show variation in the expression of HLA-DR, however it showed an increase in the expression of CD86(20). In a study of BM-DC infected by *L. braziliensis*, an increase in CD40 expression was observed, however, the CD80 molecule did not show an increase in expression, and under these conditions, *L. braziliensis* also promoted secretion of IL-12, for consequently the activation of CD4 and

polarization to Th1 observing a greater presence of IFN- γ in relation to IL-10(33). Whereas, *Leishmania* SLA liposome conjugated to DOTA / DSPC, induced increased expression of MHC-II/HLA-DR and CD86, BM-DCS of BALB / c and human moDCs(27). As well as murine BM-DCs after stimulation with *L. infantum* antigens, there was an increased expression of the co-stimulatory molecules CD40, CD80 and CD86, which also induced the production of IL-12, which led to greater protection in infection with *L. major*, decreasing the rate of infection and injury caused by the parasite, being a great potential for vaccine against leishmaniasis (34). *L. major* up-regulates the expression of MHC-II, CD86 and CD40 (35). On the other hand, *L. amazonensis* to amastigote forms down-regulated the expression of CD40, CD86 and MHC-II in BM-DCs, which impaired CD4 activation(28)

Another route used as evasion is the inhibitory molecule PD-L1. That Barrosos and collaborators, to the PBMC of a patient who had infection with *L. amazonensis*, when being restimulated with *Leishmania* soluble (SLA) of *L. amazonensis*, there was an increase in the expression of PD-L1 in monocytes(36). In the case of BALB/c infection, *L. amazonensis* caused greater expression of the PD-L1 molecule in DCs, and an increase in its PD-1 receptor in CD4 and CD8 T lymphocytes. However, the PD-1 block, as a consequence, there was greater activation of T lymphocyte proliferation that induced regression of the lesion caused by the parasite(37).

In light of this, it is clear that *Leishmania* has a modulating capacity under the immune system, and that more work like this is needed to elucidate the host parasite interaction.

CONCLUSION

Our results demonstrated that *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* are capable of infecting DCs, and the interaction with *L. infantum* induces a migration profile to secondary lymphoid organs in DCs, as well as *L. infantum* induces the maturation of infected DCs. However, *L. braziliensis* did not show the same behavior.

FUNDING

We thankful to Nucleo de Medicina Tropical. And We thankful with financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

REFERENCES

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). First report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Heal Organ [Internet]. 2010;1–184. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/1/9789241564090_eng.pdf
2. WHO | Leishmaniasis [Internet]. [cited 2020 Jan 11]. Available from: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/
3. WHO | Leishmaniasis [Internet]. [cited 2020 Feb 3]. Available from: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/
4. Poinar G, Poinar R. Paleoleishmania proterus n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. Protist. 2004;155(3):305–10.
5. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. Med Vet Entomol. 2013;27(2):123–47.
6. Federal D. Epidemiológico. 2019;
7. Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE Brasília – DF 2006 [Internet]. Vol. 2009, Ministério da Saúde. 2006. 120 p. Available from: <http://ci.nii.ac.jp/naid/130001170738>
8. Meira C dos S, Gedamu L. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. Microorganisms. 2019;7(12).
9. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. Nat Rev Immunol. 2016;16(9):581–92.
10. Ministério da Saúde. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar [Internet]. Ministério da Saúde. 2017. 159 p. Available from: <http://pesquisa.bvsalud.org/bvsm/resource/pt/mis-38798#.WmSchsQMGLw.mendeleey>

11. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: Shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(7):465–79.
12. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002 Feb;2(2):77–84. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri723>
13. Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med*. 1997;185(12):2061–8.
14. Lerm M, Holm Å, Seiron Å, Särndahl E, Magnusson KE, Rasmusson B. *Leishmania donovani* requires functional Cdc42 and Rac1 to prevent phagosomal maturation. *Infect Immun*. 2006;74(5):2613–8.
15. Vinet AF, Fukuda M, Turco SJ, Descoteaux A. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of Synaptotagmin V. *PLoS Pathog*. 2009;5(10).
16. Neves BM, Silvestre R, Resende M, Ouaiissi A, Cunha J, Tavares J, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/akt and impairment of nuclear factor-κB: Molecular mechanisms behind the arrested maturation/activation state of *leishmania infantum*-infected dendritic cells. *Am J Pathol*. 2010;177(6):2898–911.
17. Favali C, Tavares N, Clarencio J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2007;82(6):1401–6.
18. Carvalho AK, Carvalho K, Passero LFD, Sousa MGT, Da Matta VLR, Gomes CMC, et al. Differential Recruitment of Dendritic Cells Subsets to Lymph Nodes Correlates with a Protective or Permissive T-Cell Response during *Leishmania (Viannia) Braziliensis* or *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* Infection. *Mediators Inflamm*. 2016;2016.
19. Bennett CL, Misslitz A, Colledge L, Aebischer T, Clare Blackburn C. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Immunol*. 2001;31(3):876–83.
20. Falcão S de AC, Jaramillo TMG, Ferreira LG, Bernardes DM, Santana JM, Favali CBF. *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and similarities to evade the innate immune system. *Front Immunol*. 2016;7(AUG):1–10.
21. Argueta-Donohué, Jesús; Rodríguez-Wilkins, Arturo A.; García-Aguirre, Magdalena; Kobeh-Gutiérrez L. Differential phagocytosis of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes by monocyte-derived dendritic cells. *Microbiol Immunol*. 2016;(February 2015):369–81.
22. Costa SS, Fornazim MC, Nowill AE, Giorgio S. *Leishmania amazonensis* induces modulation of costimulatory and surface marker molecules in human macrophages. *Parasite Immunol* [Internet]. 2018

- Apr;40(4):e12519. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/pim.12519>
23. Iborra S, Martínez-López M, Cueto FJ, Conde-Garrosa R, Del Fresno C, Izquierdo HM, et al. Leishmania Uses Mincle to Target an Inhibitory ITAM Signaling Pathway in Dendritic Cells that Dampens Adaptive Immunity to Infection. *Immunity*. 2016;45(4):788–801.
 24. van den Bogaart E, de Bes HM, Balraadjsing PPS, Mens PF, Adams ER, Grobusch MP, et al. Leishmania donovani infection drives the priming of human monocyte-derived dendritic cells during Plasmodium falciparum co-infections. *Parasite Immunol*. 2015;37(9):453–69.
 25. Colmenares M, Puig-Kröger A, Pello OM, Corbí AL, Rivas L. Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for Leishmania amastigotes. *J Biol Chem*. 2002;277(39):36766–9.
 26. Caparrós E, Serrano D, Puig-Kröger A, Riol L, Lasala F, Martínez I, et al. Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in Leishmania interaction with host phagocytes. *Immunobiology*. 2005;210(2–4):185–93.
 27. Saremi SS, Shahryari M, Ghoorchian R, Eshaghian H, Jalali SA, Nikpoor AR, et al. The role of nanoliposome bilayer composition containing soluble leishmania antigen on maturation and activation of dendritic cells. *Iran J Basic Med Sci*. 2018;21(5):536–45.
 28. Xin L, Li K, Soong L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by Leishmania amazonensis amastigotes. *Mol Immunol*. 2008;45(12):3371–82.
 29. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Aït-Yahia S, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med*. 1998;188(2):373–86.
 30. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*. 1998;28(9):2760–9.
 31. Zhao Y, Dang Z, Wei R, Gui W, Zhang Y, Chong S. The effects of CCR7 and related signaling pathways on Leishmania major -infected human dendritic cells. *J Cell Physiol*. 2019;234(8):13145–56.
 32. Ato M, Stäger S, Engwerda CR, Kaye PM. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol*. 2002;3(12):1185–91.
 33. Vargas-Inchaustegui DA, Xin L, Soong L. Leishmania braziliensis Infection Induces Dendritic Cell Activation, ISG15 Transcription, and the Generation of Protective Immune Responses. *J Immunol*. 2008;180(11):7537–45.
 34. Barhoumi M, Koutsoni OS, Dotsika E, Guizani I.

- Leishmania infantum LeIF and its recombinant polypeptides induce the maturation of dendritic cells in vitro: An insight for dendritic cells based vaccine. *Immunol Lett* [Internet]. 2019;210(March):20–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.04.001>
35. McDowell MA, Marovich M, Lira R, Braun M, Sacks D. Leishmania Priming of Human Dendritic Cells for CD40 Ligand-Induced Interleukin-12p70 Secretion Is Strain and Species Dependent. *Infect Immun* [Internet]. 2002 Aug 1;70(8):3994–4001. Available from: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.70.8.3994-4001.2002>
36. Barroso DH, Falcão SDAC, Motta J de OC da, Sevilha dos Santos L, Takano GHS, Gomes CM, et al. PD-L1 May Mediate T-Cell Exhaustion in a Case of Early Diffuse Leishmaniasis Caused by Leishmania (L.) amazonensis. *Front Immunol* [Internet]. 2018 May 11;9(May):1–7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01021/full>
37. da Fonseca-Martins AM, Ramos TD, Pratti JES, Firmino-Cruz L, Gomes DCO, Soong L, et al. Immunotherapy using anti-PD-1 and anti-PD-L1 in Leishmania amazonensis-infected BALB/c mice reduce parasite load. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–13.

