

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

VIA INIBITÓRIA PD-1 PD-L1 NA RESPOSTA IMUNE HUMANA A *LEISHMANIA SPP.*

ELANE PRISCILA MACIEL

BRASÍLIA - DF
2023

ELANE PRISCILA MACIEL

**VIA INIBITÓRIA PD-1 PD-L1 NA RESPOSTA IMUNE HUMANA A
*LEISHMANIA SPP.***

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de título de doutora em Medicina Tropical.

Área de concentração: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

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

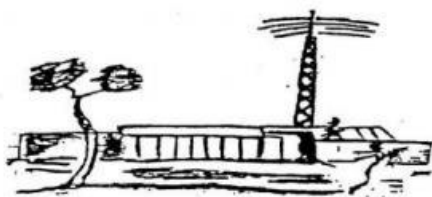
BRASÍLIA -DF,
2023

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

MACIEL, ELANE
MMACIEL VIA INIBITÓRIA PD-1 PD-L1 NA RESPOSTA IMUNE HUMANA A
, P. LEISHMANIA SPP. / ELANE MACIEL; orientador Cecília Beatriz
ELANE Fiuza Favali. -- Brasília, 2023.
M152v 124 p.

Tese (Doutorado em Medicina Tropical) -- Universidade de Brasília, 2023.

1. LEISHMANIA. 2. CÉLULAS DENTRÍTICAS . 3. IMUNIDADE INATA. 4. PD-1 PD-L1. I. Beatriz Fiuza Favali, Cecília , orient. II. Título.



COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Banca Examinadora

Orientadora: Profa. Dr^a Cecília Beatriz Fiuza Favali - Universidade de Brasília
(Presidente)

Membro externo: Profa. Dr^a Clarissa Romero Teixeira – Fiocruz- CE

Membro externo: Profa. Dr^a Natália Machado Tavares

Membro do PPGMT: Prof. Dr Vicente de Paulo Martins – Universidade de
Brasília

Membro suplente: Profa Dr^a Shélida Vasconcelos Braz- UFAM

*“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa. Todos
nós ignoramos alguma coisa. Por isso
aprendemos sempre.”*
Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao universo, por me permitir esta existência com tantas oportunidades de crescimento do meu espírito.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali, que me aceitou, me orientou, e que mais importante ainda, não desistiu de mim em tantas adversidades.

Ao financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio e Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF).

Aos companheiros da madrugada e finais de semana no bloco da citometria, Lucas e Giulia, sem vocês minha vida seria tão sem graça.

A todos os companheiros do laboratório e da universidade.

Professores que bravamente exercem suas funções numa sociedade que infelizmente, cada vez mais desvaloriza-os.

Ao meu companheiro de vida, Leonardo, que alimentava o bloco da citometria e seu apoio incondicional.

São tantas as pessoas que eu gostaria de agradecer aqui, porém não caberiam... Então muito obrigada por todos aqueles que passaram pela minha vida e deixaram sementes de aprendizado...

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição mundial da leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea.	9
Figura 2. Ciclo biológico da Leishmania.	11
Figura 3. Interação entre células dendríticas e células T.	15
Figura 4. Análise da expressão de CD14 após a separação magnética	25
Figura 5. Análise representativa da diferenciação de DCs a partir de monócitos.	26
Figura 6. Microscopia óptica representativa de DCs.	27
Figura 7. Taxa de infecção por <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	28
Figura 8. Taxa de amastigotas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	28
Figura 10. Figura representativa da estratégia de análise para caracterização fenotípica das DCs.	30
Figura 11: representação gráfica da estratégia de análise para caracterização fenotípica de DCs <i>bystanders</i> e infectadas.	31
Figura 12. Expressão de CD1a, CD11c e HLA_DR em DCs <i>bystanders</i> e infectadas	33
Figura 13. Expressão de CD209 e CD83+ em DCs <i>bystanders</i> e infectadas.	35
Figura 14. Expressão de CCR7+ e CD62L em DCs <i>bystanders</i> e infectadas.	37
Figura 15. Expressão de CD40+, CD80+ e CD86 em DCs <i>bystanders</i> e infectadas.	39
Figura 16. Expressão de PDL-1 em DCs <i>bystanders</i> e infectadas.	40
Figura 17: representação gráfica da estratégia de análise para avaliação de citocinas intracelulares e moléculas de degranulação em linfócitos T em co-cultura com DCs infectadas.	43
Figura 18. Análise de linfócitos TCD4+CD107+ após bloqueio de PD-1.	44
Figura 19. Análise de linfócitos TCD8+CD107+ após bloqueio de PD-1.	45
Figura 20. Análise de granzima B em linfócitos TCD4+Granzima+ após bloqueio de PD-1.	46
Figura 21. Análise de granzima B em linfócitos TCD8+Granzima+ após bloqueio de PD-1.	47
Figura 22. Análises de IFN- γ em linfócitos TCD4+IFN+ após bloqueio de PD-1.	47
Figura 23. Análises de IFN- γ em linfócitos TCD8+IFN+ após bloqueio de PD-1.	48
Figura 24. Figura representativa da análise da proliferação de linfócitos TCD4+ e TCD8+ pós bloqueio de PD-1 e co-cultura com DCs infectadas.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Célula apresentadora de antígenos

CCR7: Receptor de quimiocina tipo 7

CD: *Cluster of differentiation*

cDC – Células Dendríticas Clássicas

cDCs: Células dendríticas convencionais

CFSE – Éster de Succinimidil Carboxifluoresceína

CLR: Receptor de lectina tipo C

CLRs – Receptores de Lectina Dependentes de Cálcio

CTL: Linfócito T citotóxico

DC: Célula dendrítica

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

DTN – Doenças Tropical Negligenciadas

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FOXP3: *Forkhead box P*

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de macrófagos e monócitos

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

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

IFN – Interferon

IFN tipo I: Interferon tipo I

IFN α : Interferon alfa

IFN γ : Interferon gama

IL – Interleucina

IL -15: Interleucina 15

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-18: Interleucina 18

IL1 β : Interleucina 1 β

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

LC – Leishmaniose Cutânea

LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa

LCs: Células de Langerhans
LM – Leishmaniose Mucocutânea
LPG – Lipofosfoglicano
LPS: Lipopolissacarídeo
LT – Leishmaniose Tegumentar
LV - Leishmaniose Visceral
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIP-1 α : Proteína inflamatória de macrófago tipo 1 α
MLNS: Nódulos linfáticos mesentéricos
moDCs – Células dendríticas derivadas de monócitos
MyD88: *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NK: *Natural killer*
NM – Novo Mundo
NO: Óxido nítrico
NOS - Espécies reativas de nitrogênio
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAMPs – Padrões Moleculares Associado a Patógenos
PBMC: Células mononucleares do sangue periférico
PBS: Salina Tamponada Fosfatada
pDC – Células Dendríticas Plasmocitóides
pDCs: Células dendríticas plasmocitóides
PE: Ficoeritrina
PNMs – Polimorfonuclear
PPRs: Receptores de reconhecimento padrão
PRRs – Receptores de Reconhecimento Padrão
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SBF: Soro fetal bovino
SLA – Antígeno solúvel
T reg: Linfócitos T reguladores
TCLE: Termo de consentimento livre esclarecido
TGF- β : Fator de crescimento transformante β
Th1: Linfócito T auxiliar 1
Th17: Linfócito T auxiliar 17
Th2: Linfócito T auxiliar 2
TLR: Receptor tipo “*Toll*”

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

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

Toll – *Toll-like* receptor

Órgãos Financiadores

- Fundação de Apoio e Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF)
03/2018 Demanda Espontânea

Sumário

1. Introdução	6
1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas.....	6
1.2. Epidemiologia	6
1.3. Ciclo biológico da <i>Leishmania spp.</i>	10
1.4. Patogênese da <i>Leishmania spp.</i>	12
2. Hipótese	16
3. Justificativa.....	16
4. Objetivos	17
4.1. Objetivo geral.....	17
4.2. Objetivos específicos.....	17
5. Desenho experimental	18
7. Métodos	18
7.1. Geração de células dendríticas a partir de monócitos	18
7.2. Cultura de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	20
7.3. Marcação de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> com CFSE	21
7.4. Infecção de DCs com <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	21
7.5. Caracterização fenotípica das células dendríticas.....	21
7.6. Taxa de infecção por <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	22
7.7. Co-cultivo DCs e linfócitos.....	23
7.9. Proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+	23
7.10. Análise estatística.....	24
8. Resultados	24
8.1. Separação e caracterização da fração CD14+	24
8.2. Caracterização morfológica das células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos.....	25
8.3. Taxa de infecção de <i>Leishmania</i> em Células Dendríticas	26

8.4. Caracterização de DCs obtidas a partir de monócitos após a infecção por <i>Leishmania</i>	29
8.5. Caracterização de DCs infectadas e <i>bystanders</i>	31
8.6. Caracterização de CD1a+CD11c+ e HLA-DR de DCs <i>bystanders</i> após infecção por <i>Leishmania</i>	32
8.7. Expressão de moléculas relacionadas a fagocitose, maturação e migração em DCs <i>bystanders</i> pós infecção por <i>Leishmania</i>	34
8.8. Perfil de moléculas co-estimulatórias, em DCs <i>bystanders</i> pós infecção por <i>Leishmania</i>	38
8.9. Perfil de expressão de molécula inibitória de Linfócitos T, em DCs <i>bystanders</i> e infectados após interação com <i>Leishmania</i>	40
8.10. Avaliação de citocinas intracelulares em linfócitos T pós bloqueio de PD1 em co-cultura com DCs infectadas com <i>Leishmania</i>	41
9. Discussão.....	50
10. Conclusão	58
11. Referências	59
12. Apêndices	68
12.1 Autorização comitê de ética em pesquisas em seres humanos	68
12.2 Artigo científico.....	70

Resumo

Leishmania braziliensis causa uma doença pró inflamatória com lesões localizadas e um possível comprometimento das mucosas. Por outro lado, *Leishmania infantum* está relacionada com a forma visceral, causando uma anergia celular antígeno específica. Dados prévios do nosso grupo mostraram que a expressão de DC-SIGN em moDCs (células dendríticas derivadas de monócitos) estava diminuída após a infecção por *L. braziliensis* e *L. infantum*, possivelmente comprometendo a função de DCs bem como a ativação de células T, sendo um mecanismo de escape do parasito. Além disso, os parasitos podem induzir a expressão de moléculas inibidoras que estão envolvidas com a anergia celular. Esse trabalho teve como objetivo verificar a regulação da via PD1-PDL1 em moDCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum*, estudando a expressão na superfície celular de bem como a ação de anticorpos que bloqueiam a via citada anteriormente. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP/FM/UnB - CAAE 33062720.6.0000.5558). A taxa de infecção foi verificada por microscopia óptica, sendo 76% (± 8.83) para *L. infantum* e 50% (± 10.97) para *L. braziliensis*. Quando a taxa de infecção foi medida por citometria de fluxo, utilizando parasitos marcados com CFSE a taxa foi de 69.05% (± 4.56) para *L. infantum* e 35.25% (± 5.56) para *L. braziliensis*. Observou-se uma diminuição da expressão de DC-SIGN nas DCs "bystanders" (76% (± 8.83) na infecção por *L. infantum*, enquanto para *L. braziliensis* a expressão foi de 50% (± 10.97) (células não infectadas presentes no mesmo poço onde adicionou-se *Leishmania*) para *L. infantum* (64,95% $\pm 9,36$) e *L. braziliensis* (72,4% $\pm 1,71$), quando comparado às DCs controle (84,70% $\pm 5,07$). Nós observamos também um aumento na expressão de PDL1 em DCs infectadas com *L. braziliensis* (99,55% $\pm 19,06$) ou bystanders (86,85% $\pm 22,24$) bem como DC infectadas com *L. infantum* (99,6% $\pm 0,41$) ou bystander DCs (86,40% $\pm 7,96$). Ao utilizarmos o anticorpo anti PDL1, a produção de IFN- γ das células CD4, aumentou de 1,94 ($\pm 0,91$) nas DCs infectadas por *L. braziliensis* para 8,16% ($\pm 4,33$). O mesmo efeito foi observado para *L. infantum* com um aumento de 1,79 % ($\pm 1,18$) para 5,38 ($\pm 3,69$) quando a via PD1-PDL1 foi bloqueada. As células CD8 produtoras de IFN- γ aumentaram de 7,38 ($\pm 2,34$) na infecção por *L. braziliensis* para 21,40 ($\pm 7,47$) quando havia o bloqueio de PD1-PDL1. O mesmo efeito foi observado para a infecção por *L. infantum*, com 5,97 ($\pm 1,66$) CD8+IFN+ e aumentando para 14 ($\pm 4,53$) com o bloqueio de PD1-PDL1. Assim, podemos concluir que a infecção por *L. braziliensis* e *L. infantum*, aumentam a expressão de PD1 em moDCs, impedindo a produção de IFN- γ pelas células T que poderia controlar a disseminação dos parasitos.

Palavras chave: *Leishmania*, células dendríticas, imunidade inata, PD1-PDL-1

Abstract

Leishmania braziliensis causes a proinflammatory disease, with localized lesions and a possible mucosal commitment. On the other hand, *Leishmania infantum* is involved in the visceral form, with a specific cellular response anergy. Previous data from our group showed that DC-SIGN expression in moDCs (monocytes derived Dendritic Cells) was decreased after *L. braziliensis* and *L. infantum* infection, probably compromising DC function and T cell activation, as a parasite scape mechanism. Besides that, parasites can induce inhibitory molecules that also could be involved in T cell anergy. METHODS This research focused the PD1-PDL1 pathway in human moDCs infected with *L. braziliensis* or *L. infantum*, studying cell surface molecules expression as well as antibodies to block PD1-PDL1 pathway. This study was approved by the faculty ethics commission (CEP/FM/UnB - CAAE 33062720.6.0000.5558). RESULTS Infection rate measured with optical microscopy was 76% (± 8.83) for *L. infantum*, while for *L. braziliensis* it was 50% (± 10.97). When determined by flow cytometry, infection rate was 69.05% (± 4.56) for *L. infantum* and 35.25% (± 5.56) for *L. braziliensis*. Was observed a down modulation of DC-SIGN on DCs bystanders (non-infected cells from the same well where *Leishmania* was added) for *L. infantum* (64,95% $\pm 9,36$) and *L. braziliensis* (72,4% $\pm 1,71$), compared to control DCs (84,70% $\pm 5,07$). We also observed an increase on PDL1 in DCs infected with *L. braziliensis* (99,55% $\pm 19,06$) or bystanders (86,85% $\pm 22,24$) as well as for DC infected with *L. infantum* (99,6% $\pm 0,41$) or bystander DCs (86,40% $\pm 7,96$). By blocking cell co-culture with anti-PDL1, IFN-g production from CD4 cells, raised from 1,94 ($\pm 0,91$) in *L. braziliensis* infected DCs to 8,16% ($\pm 4,33$) when anti-PD-1 was used. The same effect was observed for *L. infantum* with an increase from 1,79 % ($\pm 1,18$) to 5,38 ($\pm 3,69$) when PD1-PDL1 pathway was blocked. For CD8 T cells IFN-g raised from 7,38 ($\pm 2,34$) in *L. braziliensis* infection to 21,40 ($\pm 7,47$) by blocking PD1-PDL1. The same effect was also observed for *L. infantum* infection, with 5,97 ($\pm 1,66$) CD8+IFN+ cells and upregulating to 14 ($\pm 4,53$) by blocking PD1-PDL1. CONCLUSIONS *L. braziliensis* and *L. infantum* infection, increased the expression of PD1 on moDCs, probably impairing T cell IFN-g production that could control parasites spread.

Keywords: Leishmania, dendritic cells, innate immunity, PD1-PDL-1

1. Introdução

1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define como doenças tropicais negligenciadas (DTNs), aquelas que ocorrem notadamente em regiões quentes e úmidas nos climas tropicais e subtropicais. Usualmente são áreas carentes e com investimentos precários em saúde, saneamento, bem como, em pesquisas para vacinas e tratamentos (OPAS, 2021). Desde 2007, a OMS juntamente com parcerias globais e o Ministério da Saúde, empenham-se notoriamente no combate as DTNs, o que gerou excelentes resultados no panorama geral, mas que requer ainda muita atenção e investimentos (REGIONAL; MEMBROS, 2022).(OPAS, [s. d.]).

As DTNs formam um grupo diversificado de 17 doenças com características transmissíveis, várias delas com capacidade de expansão rápida e crescente. Afetam mais de um bilhão de pessoas em 149 países e impactam financeiramente a economia destes pelos altos custos em saúde pública (MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2017).

Uma DTN significativa para a saúde pública mundial é a Leishmaniose, por sua distribuição, aumento de casos e ausência de vacina para humanos (OPAS, 2021)

1.2. Epidemiologia

As leishmanioses formam um grupo de doenças zoonóticas, ocasionadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e a transmissão aos seres humanos se dá pela picada da fêmea do flebotomíneo infectada. Apesar da doença estar entre as DTNs de maior relevância da atualidade, sua origem e descoberta data de antes de 1900, com relatos do protozoário em múmias egípcias e fosseis arqueológicos. Mais tarde, o protozoário foi isolado na Índia do baço de um soldado que sofria com febre (LEISHMAN; ROSS, 1903; LYSENKO, 1971; SOOSARAEI *et al.*, 2018).

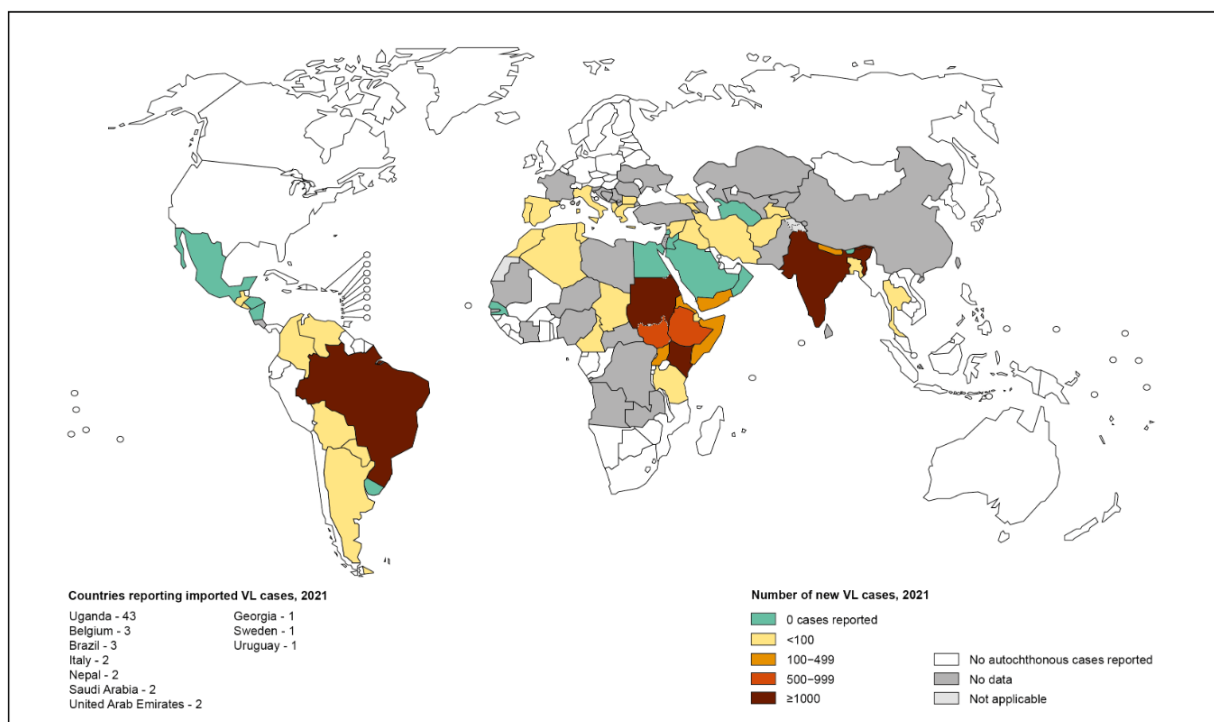
A leishmaniose tem uma enorme relevância histórica, como uma das doenças registradas milhares de anos antes da era comum (STEVERDING, 2017). A partir de análises moleculares de amostras provenientes de antigas múmias egípcias e núbias que datam de 3.500 a 2.800 a.C., foi possível obter uma amplificação bem-sucedida do DNA da *Leishmania donovani*. Durante o período conhecido como Império Médio, o comércio egípcio e as excursões militares envolvendo a Núbia (atual Sudão) foram considerados os responsáveis pela introdução da leishmaniose no Egito, já que testes positivos de DNA de amostras antes desse período não foram detectados. Além disso, algumas fontes especulam que o Sudão foi o foco original da leishmaniose visceral (LV) (ZINK *et al.*, 2006). Manuscritos médicos chamados Ebers Papyrus de 1.500 a.C, descreviam uma condição cutânea que se pensava ser a leishmaniose cutânea (LC), então chamada de "espinha do Nilo". Com essa premissa, uma tentativa inicial de vacinação foi feita em ambos Oriente Médio e Ásia Central. Esse procedimento foi feito a partir da coleta dos exsudatos das lesões ativas e então, inoculando-os nas nádegas de crianças (STEVERDING, 2017). Nos mais de 1000 anos subsequentes, foram relatadas feridas na pele associadas à leishmaniose. A partir de relatos registrados na história do norte do Afeganistão, a doença conhecida como 'ferida de Balkh' possivelmente foi causada pela atual espécie *Leishmania tropica*. Na Ásia e no Oriente Médio, a doença continuou a ser documentada e a condição foi chamada de "Furúnculo de Aleppo", "Furúnculo de Jericó" e "Furúnculo de Bagdá" (MAXFIELD e CRANE, 2022). Atualmente, a leishmaniose tem ampla distribuição mundial de casos (Figura 1).

As principais formas da doença são a leishmaniose visceral (LV), conhecida também como Kalazar, leishmaniose tegumentar (LT) que se subdivide em leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC) e a forma cutânea difusa (LCD), uma forma rara. A forma cutânea é a mais incidente e branda, ao passo que a forma visceral é mais grave e com alta letalidade, quando não tratada (KAYE; SCOTT, 2011; VOLF; VOLFOVA, 2011).

Dados recentes da OMS estimam que anualmente ocorram 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LC ocorram anualmente, embora apenas uma pequena fração dos infectados podem vir a desenvolver a doença (WHO, 2023).

A forma mais comum dessa doença é a LC, que provoca lesões de pele em partes expostas do corpo, podendo deixar cicatrizes permanentes nos indivíduos, como também causar deficiências graves. O Brasil continua entre os países com maior registro de casos, juntamente com a zona andina na Colômbia que registraram um total de 896.790 casos, com destaque para redução nestes últimos 5 anos entre 2017 e 2021. Houve nos últimos 5 anos (2017-2021), a redução dos casos globais de LC e LM de 24% deve-se principalmente à diminuição de 14,3%, 20,5%, 71,2% e 21,6% observados respectivamente no Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (ORGANIZACI; REGIONAL; MIEMBROS, 2022).

Esses dados (Figura 1) mostram que as Américas permanecem em segundo lugar no ranking mundial de casos de LV e LC. O Brasil, continua compondo um grupo de países, que concentram 90% dos casos da doença globalmente (REGIONAL; MEMBROS, 2022).



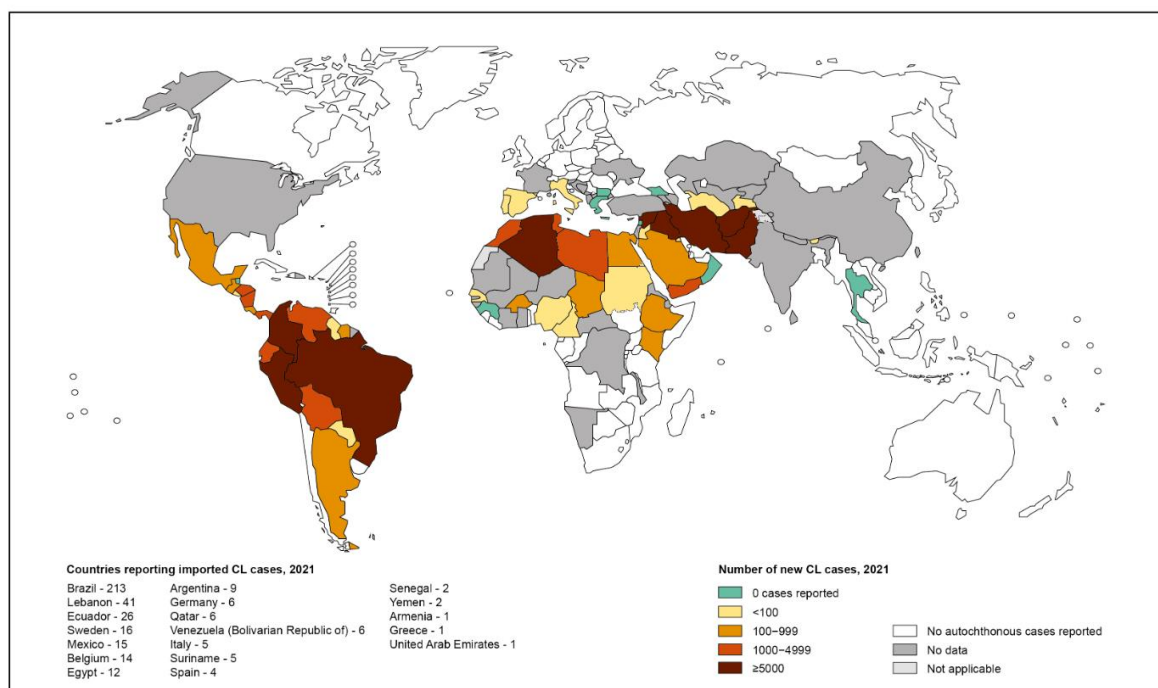


Figura 1. Distribuição mundial da leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea. Adaptado de WHO, 2023.

Entretanto, os últimos dados nas Américas, mostram o menor número de casos de LV em 21 anos, com 1.799 casos em 2021, que representam uma redução de 9,5% face ao ano anterior e 57% em relação aos 4.228 casos de 2017. Apesar da redução, alguns países como a República Bolivariana da Venezuela, Paraguai e Argentina registraram, um aumento significativo no número de casos. A preocupação torna-se evidente em relação aos novos casos de LV em nosso país, uma vez que esta forma clínica, quando não tratada, apresenta letalidade que chega a 90%

Em 2018, o Brasil reportou 3.466 novos casos humanos de LV, concentrados nas regiões do Norte e Nordeste, mas com distribuição também pelo restante do território nacional (PAHO, 2018). O Centro-Oeste notificou 122 casos neste ano. Ainda, os indivíduos portadores do vírus HIV, representam uma população vulnerável a LV e o número de casos também estão em ascensão (LEITE DE SOUSA-GOMES; ROMERO; WERNECK, 2017; VAN GRIENSVEN *et al.*, 2014)

Em média, são registrados cerca de 21.000 casos/ano, com coeficiente de incidência de 8,6 casos/100.000 habitantes nos últimos 5 anos. A região Norte apresenta o maior coeficiente com 46,4 casos/100.000 habitantes, seguida das

regiões Centro-Oeste 17,2 casos/10.000 habitantes e Nordeste 8 casos/100.000 habitantes (ORGANIZACI; REGIONAL; MIEMBROS, 2022). No Distrito Federal os últimos dados mostram que foram detectados 10 casos de LV e 53 casos de LTA (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DISTRITO FEDERAL, 2022).

1.3. Ciclo biológico da *Leishmania spp.*

Os agentes etiológicos das leishmanioses são parasitos intracelulares do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae - ordem Kinetoplastida. O parasito é transmitido pela picada de fêmeas de insetos da ordem Diptera e da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, vetores conhecidos como Flebotomíneos (ANDRADE FILHO; BRAZIL, 2003; KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1996; PRATES *et al.*, 2011). No intestino anterior e faringe do flebotomíneo fêmea, encontram-se as formas promastigotas metacíclicas, que infectam hospedeiros vertebrados, durante o repasto sanguíneo, as formas promastigotas são inoculadas juntamente com a saliva do flebotomíneo. Quando na circulação sanguínea, atinge os órgãos linfóides secundários, preferencialmente baço, fígado e linfonodos. Nestes órgãos invadem células fagocíticas, evoluindo para a forma amastigota, que dividem-se binariamente até irromperem a célula infectada e infectar em novas células, completando seu ciclo evolutivo (Figura 2) (ANJILI *et al.*, 1995; LAINSON; RANGEL, 2005; REVIEW, 2015; SOOSARAEI *et al.*, 2018).

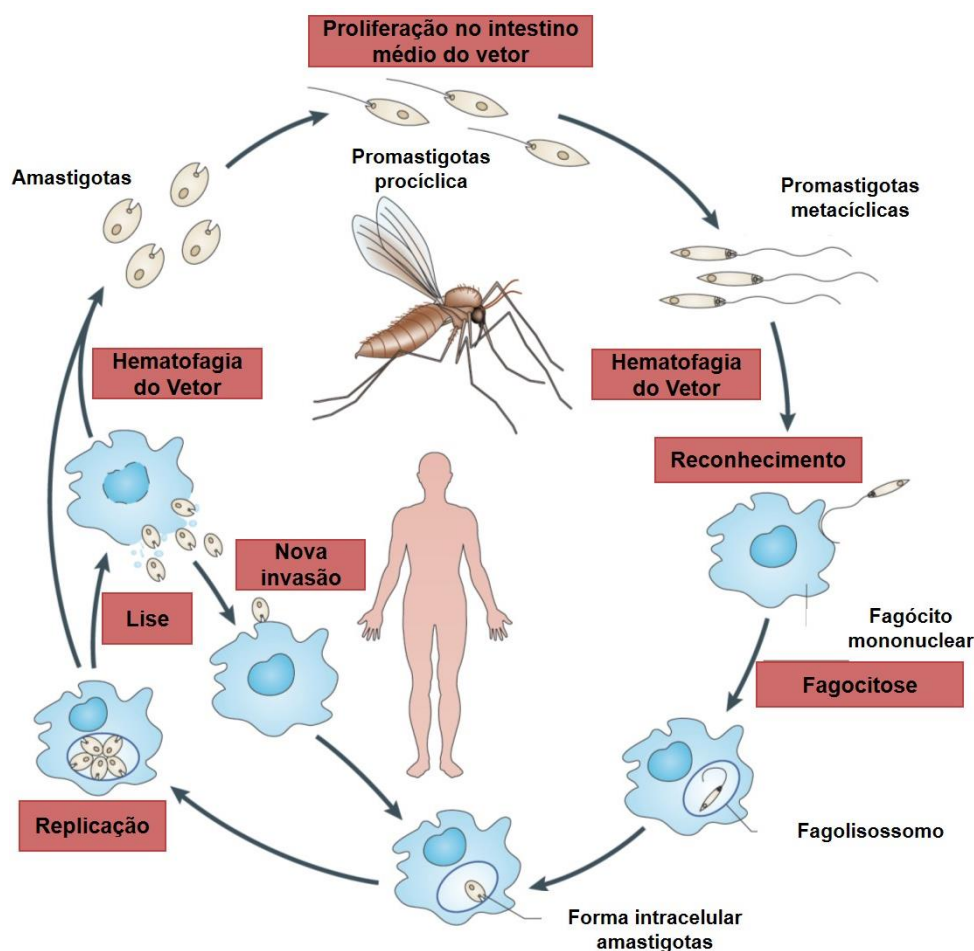


Figura 2. Ciclo biológico da Leishmania. O flebotomo fêmea, transmite as formas promastigotas metacíclicas, presentes em sua saliva, para um hospedeiro vertebrado durante a alimentação. No hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outras células do sistema imunológico, onde se transformam em formas amastigotas, multiplicando-se no interior das células fagocíticas. Adaptado de Kaye & Scott, 2011.

L. infantum está associada a LV humana nas Américas, aumentando sua gravidade em indivíduos imunocomprometidos e crianças (BACELLAR; CARVALHO, 2005). Um comprometimento da resposta imune celular diminui a ativação de macrófagos, que são as células de preferência do parasita, por meio de aumento de produção de IL-10 e de células T regulatórias, o que acarreta na disseminação do parasito para medula óssea e fígado. A LV possui como característica uma significativa diminuição da resposta imune celular ao antígeno de leishmania. Nos indivíduos infectados, o teste de hipersensibilidade tardia (DTH) para o antígeno (teste de Montenegro) é negativo e as células mononucleares do sangue periférico não produzem IL-2, IFN-g e IL-12 quando são estimuladas *in vitro*, com o antígeno de leishmania (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

As espécies de *Leishmania* relacionadas com o tropismo cutâneo causadoras de Leishmaniose cutânea humana no Brasil são: *Leishmania (Viannia.) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania.) amazonensis*. A *L. braziliensis* está relacionada com as formas localizada, mucosa e disseminada da doença. Um fenômeno importante é que cerca de 10% dos habitantes de áreas endêmicas podem apresentar teste de hipersensibilidade tardia (DTH) positivo para *Leishmania*, porém, não evoluem para a doença (ALVAR *et al.*, 2012; KAUFER *et al.*, 2017; REVIEW, 2015).

1.4. Patogênese da *Leishmania spp*

Sendo a *Leishmania* um patógeno intracelular obrigatório, a resposta imune protetora depende de linfócitos T auxiliares do tipo I (Th1) caracterizada pela produção de IFN- γ e, conseqüente ativação dos macrófagos infectados para eliminação do parasito (MEIRA; GEDAMU, 2019). Por outro lado, não havendo regulação adequada, esta resposta pode auxiliar na patogênese da doença, causando lesão tecidual, fato que evidencia a característica peculiar de polaridade da doença. Por sua vez, a forma mucosa é caracterizada por uma intensa resposta inflamatória que faz a contenção do parasito, porém, causa lesão tecidual. Já nas formas disseminada e difusa a resposta é diminuída ou até mesmo ausente, o que acarreta proliferação e disseminação do parasito (KAYE; SCOTT, 2011; MORGADO *et al.*, 2018; SCOTT; NOVAIS, 2016).

As células apresentadoras de antígenos (APCs) são elementos essenciais na ativação da resposta imune inata e adaptativa. Estas células reconhecem os patógenos, processam e apresentam antígenos às células do sistema imune adaptativo. A célula dendrítica (DC) é uma APC profissional que foi descrita inicialmente em camundongos, por Steinman e Cohn, em 1973, e desde então são alvo de diversos estudos em imunologia. As DCs estão presentes em diversos tecidos do corpo que entram em contato com microrganismos e antígenos, realizando o processamento e apresentação destes para os linfócitos (STEINMAN, 2003; STEINMAN, Ralph M, 2007). Os subtipos de DCs podem ser classificados pela expressão de marcadores na superfície das mesmas (GEGINAT *et al.*, 2015).

As DCs têm origem na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes que se diferenciam em duas linhagens: DC mielóides e linfóides. A linhagem mielóide dá origem às chamadas DCs convencionais ou mieloides, enquanto as DCs linfóides ou plasmocitóides possuem morfologia similar à de plasmócitos produtores de anticorpos. Estas células são produtoras de citocinas antivirais, como interferon do tipo I, respondendo as infecções virais (STEINMAN, Ralph M., 2007).

As DCs derivadas de monócitos (moDCs) podem ser obtidas pelo uso de citocinas recombinantes em protocolos *in vitro*. Dados na literatura demonstram que monócitos estimulados com fator estimulador de crescimento de colônia (GM-CSF) e a citocina IL-4 em cultura diferenciaram-se em DCs com total capacidade de apresentação de antígenos, incluindo apresentação cruzada, produção de citocinas inflamatórias e ativação de células T virgens (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). Antes de qualquer estímulo de maturação (contato com molécula antigênica), estas moDCs apresentam fenótipo de DCs imaturas expressando altos níveis de CD11c, CD1a e MHC-II, com baixos níveis de expressão de moléculas, CD40 (co-estimuladoras), CD80 e CD86 (B7-1 e B7-2, co-estimuladoras) e CD83 (maturação) (BOYETTE *et al.*, 2017; FONTENEAU *et al.*, 2003; STEINMAN, Ralph M., 2007).

As DCs imaturas estão em constante movimento pelos tecidos periféricos, cumprindo importante papel de sentinelas do sistema imune, capturando antígenos por reconhecimento de receptores de padrões diferentes. Quando entram em contato com um microrganismo e reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são ativadas, em seguida diminuem a sua capacidade de fagocitose aumentando a expressão de MHC de classe I e II, assim como as moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80, CD83 e CD86 (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; HARRISON *et al.*, 2012). Em seguida, diferentes quimiocinas e citocinas também são produzidas, recrutando células e apresentando um papel essencial na ativação de células T. (AERTS-TOEGAERT *et al.*, 2007; KUHN; YANG; RONCHESE, 2015; SAID; WEINDL, 2015).

No processo de maturação, DCs iniciam a migração para os órgãos linfoides secundários, onde apresentam o antígeno às células T. As DCs expressam uma L-selectina de membrana, a CD62L, uma glicoproteína de

adesão, que permite o rolamento de células ao longo das paredes de vasos sanguíneos até o sítio de infecção e linfonodos (IVETIC; GREEN; HART, 2019).

Em conjunto com as moléculas co-estimuladoras há o aumento de receptores de quimiocinas como CCR5 e CCR7, este último sendo um receptor de quimiocina responsável por seu direcionamento para o linfonodo (DIEU *et al.*, 1998). As DCs chegam maduras aos órgãos linfoides e apresentam antígenos, via moléculas de MHC, para as células T e auxiliam na ativação de células B e células NK (BATISTA; HARWOOD, 2010; FERLAZZO; MORANDI, 2014), conectando imunidade inata e adaptativa.

Sendo a *Leishmania* um protozoário intracelular obrigatório o estudo da interação entre *Leishmania* e DCs é de extrema importância. Um estudo com camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis* demonstrou grande número de células de Langerhans no linfonodo no animal, estimulou a liberação de IL-4 e IL-10 com a consequente anergia da resposta Th1. Entretanto, na infecção por *L. braziliensis* observou-se o aumento de DC dérmica no linfonodo com presença de células T CD4+ efectoras ativadas e de memória, células T CD4+ produtoras de IL-4 e IL-10 e T CD4+ e T CD8+ produtoras de IFN- γ , mostrando assim uma polarização para uma resposta imune do tipo Th1 (BACELLAR; CARVALHO, 2005).

É possível que o parasito regule a biologia de DCs ou moDCs para que possa escapar do sistema imune e se estabelecer mais facilmente no organismo do hospedeiro. Nesse sentido, dados da literatura demonstram que DCs humanas derivadas de monócitos tiveram sua diferenciação impedida por *L. amazonensis*, contribuindo para o sucesso da infecção (FAVALI *et al.*, 2007). Além disso, DCs humanas de doadores saudáveis infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum*, mostraram um aumento da expressão de CD86 e a diminuição da expressão de CD209 (FALCÃO *et al.*, 2016). A molécula CD209 (DC-SIGN), nas DCs, por sua vez, está envolvida no reconhecimento das formas promastigotas e amastigotas axênicas das espécies *L. infantum* e *L. pifanoi* (CAPARRÓS *et al.*, 2005).

Além disso, dados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que *Leishmania* regula positivamente a expressão da proteína 1 de morte celular (PD-1, *programmed death protein-1*) e do ligante à PD-1 (PD-L1 ou CD274), uma molécula inibitória (Figura 3) capaz de levar linfócitos a exaustão ou anergia

(BARROSO *et al.*, 2018; DA FONSECA-MARTINS *et al.*, 2019). Assim, a interação do PD-1 com seus ligantes, em particular o PD-L1, pode permitir que a *Leishmania* escape da eliminação pelo sistema imunológico do hospedeiro e inicie a infecção crônica. Alguns autores relatam infecções persistentes por *Leishmania*, que causam uma resposta disfuncional das células T CD8, o que tem implicação na sobrevivência e replicação do patógeno (COOPER *et al.*, 1994; MORGADO *et al.*, 2018; SCOTT; NOVAIS, 2016).

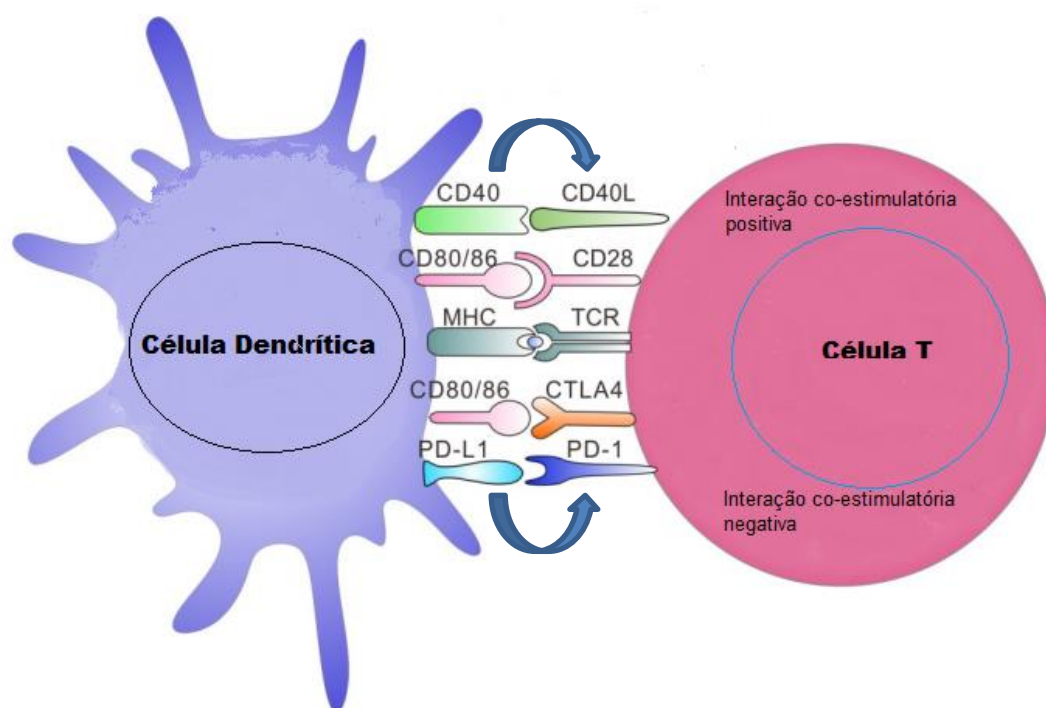


Figura 3. Interação entre células dendríticas e células T. A interação das moléculas CD80/CD86 é um sinal co-estimulatório para células T, enquanto PD-L1/PD-1 exerce função negativa ou regulatória. Adaptado de Wang, 2017.

A interação entre PD-1 e PD-L1 tem o mecanismo bem descrito na evasão de células neoplásicas, onde observa-se a expressão da molécula PDL-1 induzindo ambiente anti-inflamatório, levando as DCs residentes a aumentar a expressão desta molécula e inibindo a atuação de linfócitos T (BARTEE; DRYJA; BARTEE, 2019; CHEN *et al.*, 2019; ERDOGDU, 2019).

O papel deste ligante inibidor (PDL-1) em células tumorais é alvo de vários estudos e vem se tornando opção terapêutica com grande sucesso no prognóstico nos pacientes (FENWICK *et al.*, 2019). Estudos do papel de ligantes co-inibidores como PD-1, entre outros, tem se concentrado na fase crônica de

infecções virais, mas vem aumentando em relação as infecções parasitárias (SHARPE; PAUKEN, 2018).

Considerando a regulação das moléculas inibidoras nas Leishmanioses, Gautam e colaboradores sugerem que as células T CD8 derivadas de aspirado do baço sejam levadas à anergia/ exaustão quando colocadas *in vitro* com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com LV humana, o que afeta sua capacidade de contribuir para respostas imunes protetoras (GAUTAM *et al.*, 2014). Em contrapartida, camundongos BALB/C infectados com *Leishmania amazonensis*, e tratados com anti-PDL1 e anti-PD1, apresentaram um aumento de IFN- γ , além da proliferação de células T CD4 e T CD8, mostrando diminuição da lesão e da carga parasitária (DA FONSECA-MARTINS *et al.*, 2019). Foi observado que em PBMC de um paciente com infecção por *L. amazonensis*, havia um aumento da expressão de PD-L1 em monócitos após reestimulação *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), o que reforça a associação na diminuição das funções efetoras dos linfócitos T CD4 e T CD8, pela diminuição de IFN- γ para ambas células, já em CD8 houve redução de granzimas (BARROSO *et al.*, 2018).

Estes dados sugerem que diferentes espécies de *Leishmania* induziriam um aumento da expressão de moléculas inibidoras nas DCs infectadas, impedindo a ativação de linfócitos. Assim, este trabalho visa esclarecer se há modulação da expressão da molécula inibitória PD-L1 em DCs infectadas por diferentes espécies de *Leishmania* e se essa modulação interfere na ativação dos linfócitos T CD4+ e T CD8+

2. Hipótese

L. infantum e *L. braziliensis* induzem um aumento de moléculas inibitórias em DCs, causando uma anergia em linfócitos T, com consequente ineficiência da resposta imune adaptativa.

3. Justificativa

A leishmaniose acomete números significativos da população mundial e sua importância ganha destaque no Brasil. A doença encontra-se em expansão no Centro-Oeste, sendo um problema central de saúde pública. Além disso, a

compreensão da interação parasito-hospedeiro é essencial para a elucidação dos mecanismos de infecção e patogênese da doença, principalmente nos fatores envolvidos no desenvolvimento das formas graves da leishmaniose. Em trabalho recente do grupo observamos uma diferença importante na regulação da resposta de células dendríticas humanas por *Leishmania braziliensis* ou *L. infantum*, havendo uma possível indução diferenciada de moléculas inibidoras da função linfocitária por esses protozoários.

4. Objetivos

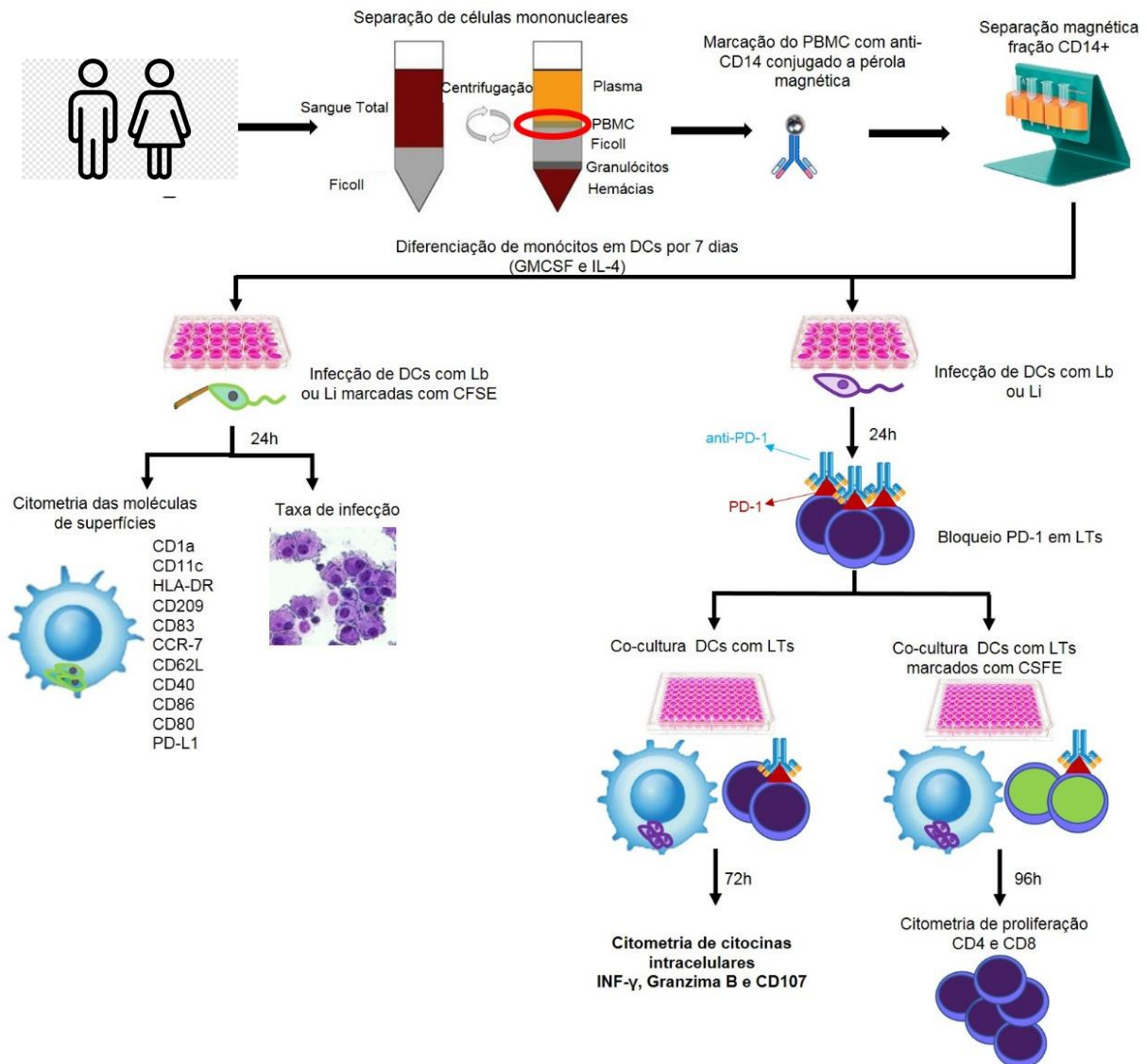
4.1. Objetivo geral

Infectar células dendríticas com *L. infantum* ou *L. braziliensis* e avaliar a modulação da via inibitória PD-L1/PD-1.

4.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar a taxa de infecção e carga parasitária de DCs infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum*;
- ✓ Realizar a caracterização fenotípica das células dendríticas após infecção das células com *L. braziliensis* ou *L. infantum*;
- ✓ Caracterizar a resposta linfocitária após bloqueio da via inibitória com anti-PD-1 em experimentos de co-cultura;
- ✓ Caracterizar a produção de citocinas intracelulares e proliferação de células T CD4+ e T CD8+ após a co-cultura.

5. Desenho experimental



7. Métodos

7.1. Geração de células dendríticas a partir de monócitos

O projeto de doutorado faz parte de um projeto maior do grupo que com registro no CEP FM UnB 072/2009. Os doadores foram selecionados de forma aleatória sendo a condição de entrevista, que estivessem saudáveis no momento da coleta, com nenhum processo infeccioso, tratamentos medicamentosos ou doenças crônicas. Inicialmente foram selecionados 6 doadores, que foram

realizados em diferentes momentos, uma vez que o protocolo é longo. Destes, uma amostra houve contaminação bacteriana e foi descartada, dos 5 doadores restantes também tivemos perda na taxa de infecção. Para obtenção do PBMC o sangue foi diluído em tubo falcon de 15mL 1:1 com PBS (PBS 1X: 0,8% de NaCl, 0,14% Na_2HPO_4 , 0,02% KCl e 0,20%g KH_2HPO_4) e submetido a um gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). 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. Então, 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 das células não viáveis (coradas de azul) na câmara de Neubauer.

Em seguida, foram ressuspensas em 80 μ L de tampão MACS (0,5% BSA, 2mM EDTA em PBS 1X, pH 7,2) para cada 10^7 células. Posteriormente, foi adicionado 10 μ L para cada 10^7 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 500 μ L 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 500 μ L 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.

As células marcadas ficam retidas na coluna magnética fixada a um suporte e, após separação da fração negativa, que foi congelada e utilizada posteriormente, coletou-se a fração rica em células CD14+, aquela que ficou retida na coluna. A fração enriquecida em CD14 (monócitos) foi eluída da coluna lavada e foi cultivada em meio RPMI suplementado com soro bovino fetal (10%) na presença de citocinas IL-4 (800UI/mL) (Peprotech) e GM-CSF (50ng/mL) (Peprotech) seguindo o protocolo de Sallusto e Lanzavechia (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). Após sete dias de cultura, a 37°C e 5% de CO₂, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo quanto a expressão das moléculas CD14, CD1a e CD11c (eBioscience). Foi considerada uma diferenciação satisfatória quando a expressão de CD1a+ e CD11c+ foi superior a 80% e apresentaram negatividade para CD14+. Após a diferenciação e confirmação, as DCs foram infectadas com *L. braziliensis* e *L. infantum*. A fração negativa (linfócitos) foi coletada e criopreservada para posterior utilização.

7.2. Cultura de *L. braziliensis* e *L. infantum*

Duas cepas de referência foram utilizadas, a *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) e *L. infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV), mantidas no freezer -80°C. Para o descongelamento das cepas ressuspendidas 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 e novamente mantidas em incubação para 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. As promastigotas foram obtidas de culturas em fase estacionária (5-7 dias), com menos de cinco passagens *in vitro* e foram utilizadas para infecção das DCs.

7.3. Marcação de *L. braziliensis* e *L. infantum* com CFSE

L. braziliensis e *L. infantum* foram lavadas a 1600xg por 10 minutos e o precipitado com 18×10^7 *Leishmanias*, ressuspensão em 2,5mL de PBS 1X. Em seguida, foi adicionado *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) (eBioscience) na concentração final de 20uM e incubados por 30 minutos a 26°C. Posteriormente, foi adicionado 40mL de PBS 1X, os parasitos foram centrifugados a 1600xg por 10 minutos e a lavagem repetida mais uma vez. Após a marcação dos parasitos com CFSE e confirmação por aquisição de uma alíquota no citômetro de fluxo, as *Leishmanias* foram utilizadas para a infecção das DCs.

7.4. Infecção de DCs com *L. braziliensis* e *L. infantum*

Após a diferenciação, as DCs imaturas coletadas foram infectadas por promastigotas de *L. braziliensis* ou *L. infantum*, marcadas com CFSE, na proporção de 10 parasitos para cada célula. As células foram transferidas para placas de cultura e incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas de infecção, as DCs infectadas, passaram por lavagens sucessivas dos poços com solução salina. As DCs também foram tratadas com anti-CD274 (PD-L1) conjugado a PE (BD Pharmagen), posteriormente, incubadas por 24hs na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Como controle positivo para a maturação das DCs, as mesmas foram tratadas também com LPS (Sigma) (100ng/mL).

7.5. Caracterização fenotípica das células dendríticas

Após a indução da diferenciação dos monócitos em DCs e, posteriormente, a infecção das células com *L. braziliensis* ou *L. infantum*, foram feitas marcações com anticorpos anti-CD1a conjugado a PE-Cy7 (eBioscience), anti-CD11c conjugado a APC (eBioscience), anti-CD83 conjugado a PE

(eBioscience), anti-CD80 conjugado a PE (eBioscience), anti-CD86 conjugado a PE-Cy5 (eBioscience), anti-HLA-DR conjugado a APC (eBioscience), anti-CD40 conjugado a APC (eBioscience), anti-CD44 conjugado a APC (eBioscience), anti-CD62L conjugado a APC (Imuno tools), anti-CCR7 conjugado a PE (BD Pharmagen), anti-CD209 conjugado a PE-Cy7 (eBioscience) e a molécula inibitória anti-PD-L1 conjugado a PE (BD Pharmagen). As porcentagens da expressão dessas moléculas foram obtidas por citometria de fluxo, analisadas no *software flowjo* e a expressão dessas moléculas comparadas entre DCs não infectadas, DCs infectadas e DCs *bystanders*.

Quadro 1. Estratégia para marcação fenotípica em células dendríticas.

	Anticorpos, fluorescências e diluições		
MIX 1	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

7.6. Taxa de infecção por *L. braziliensis* e *L. infantum*

Após as 24 horas de infecção parte das DCs coletadas foram submetidas à citocentrifugação. As lâminas fixadas, coradas com hematoxilina – eosina e, a carga parasitária obtida pela contagem de células infectadas e amastigotas por célula, analisadas de forma randomizada e cega por 2 observadores em

microscópio óptico. A taxa de infecção também foi obtida por citometria de fluxo pelo uso dos parasitos marcados com CFSE.

7.7. Co-cultivo DCs e linfócitos

Após recuperação e contagem das DCs infectadas e controles não infectados e dos linfócitos T autólogos descongelados, foi realizada uma co-cultura. Para tanto utilizou-se a proporção de uma DC para 10 linfócitos do doador autólogo em meio RPMI suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico, em placa de 96 poços de fundo U. A co-cultura foi submetida a incubação a 37°C na estufa com atmosfera úmida e 5% CO_2 por 72 horas para as marcações intracelulares e 96 horas para proliferação celular (detalhado mais adiante no texto). Os sobrenadantes das culturas foram coletados e criopreservados para dosagem de citocinas utilizando a técnica de CBA (Cytokine Bead Array) seguindo as instruções técnicas do fabricante.

7.8. Quantificação de citocinas intracelulares e moléculas de superfície por citometria de fluxo

Após 72 horas de co-cultura de DCs infectadas com as espécies de *Leishmania* com linfócitos T totais, as células foram incubadas por 4 horas a 37°C com brefeldina A. Inicialmente, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD45RA conjugado a APC, anti-CD45RO conjugado a PE-Cy7, anti-CD4 conjugado a PerCP e anti-CD8 conjugado a FITC para marcação de superfície. Posteriormente, as células foram permeabilizadas e, então, as células CD4+ e CD8+ marcadas com o anticorpo IFN-g conjugado a PE e as células CD8+ e marcadas com Granzima B conjugada a PE para marcação de citocina e molécula intracelular.

7.9. Proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+

As células foram marcadas intracelularmente em meio contendo 1uM de CFSE. Em seguida, foi realizado um co-cultivo dos linfócitos do mesmo doador (previamente congelados) com as DCs previamente infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum*. Após 96 horas de incubação a 37°C na estufa de CO₂, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD4 conjugado a PerCP e CD8 conjugado a PE e, posteriormente, fixadas com paraformaldeído 1%. As células foram então adquiridas no citômetro FACSVerse sendo detectada a diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE, resultante da divisão celular (Li & He, 2012).

7.10. Análise estatística

Os dados brutos obtidos em citometria de fluxo, no equipamento FACSVerse (BD Biosciences) foram analisados no *software* Flowjo, para obter as porcentagens das moléculas de interesse. Os resultados então, foram analisados utilizando o programa GraphPad-Prism 5.0, onde utilizamos mediana e erro padrão. Os valores encontrados nos experimentos foram inicialmente testados quanto à normalidade pelo teste Shapiro–Wilk. Para os dados com distribuição anormal (não-paramétricos), os grupos foram analisados com o teste Kruskal-Wallis, pela análise de variância a um critério e pós-teste de Dunnet, comparando todos os grupos com o controle negativo. Aqueles com distribuição normal (paramétrico), os valores foram comparados pelo teste ANOVA, pela análise de variância a um critério e pós-teste de Tukey. Os dados de taxa de infecção foram analisados com teste t comparando as DCs infectadas com *L. braziliensis* e *L. infantum*. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados com diferenças significativas.

8. Resultados

8.1. Separação e caracterização da fração CD14+

Após a separação do PBMC total, as células foram submetidas à separação magnética e a fração positiva marcada com anticorpo anti-CD14-FITC para avaliação da pureza da população de monócitos. Primeiro, as células foram

selecionadas por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), onde foram selecionadas 74,8% (Figura 4) do total de células, deste “gate” 99,1% das células apresentaram a molécula CD14+, confirmando a seleção das células de interesse, os monócitos, com isso seguimos para a cultura e diferenciação em DCs.

As células diferenciadas por sete dias, foram coletadas e classificadas quanto aos marcadores de diferenciação em DCs.

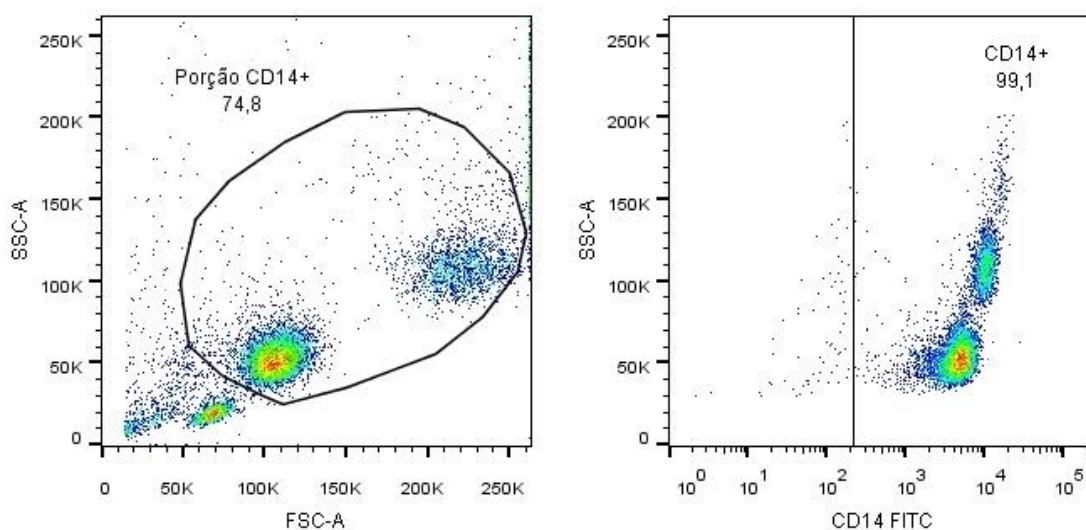


Figura 4. Análise da expressão de CD14 após a separação magnética. Quantificação da população CD14+ por citometria de fluxo após seleção positiva.

8.2. Caracterização morfológica das células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos

Para a avaliação da diferenciação dos monócitos MOs em DCs, células foram ajustadas por tamanho e granulosidade e avaliadas as expressões de CD1a e CD11c. Dessas, 99,3% marcaram duplo positivas, sendo CD1a+CD11c+, ou seja, são DCs (Figura 5).

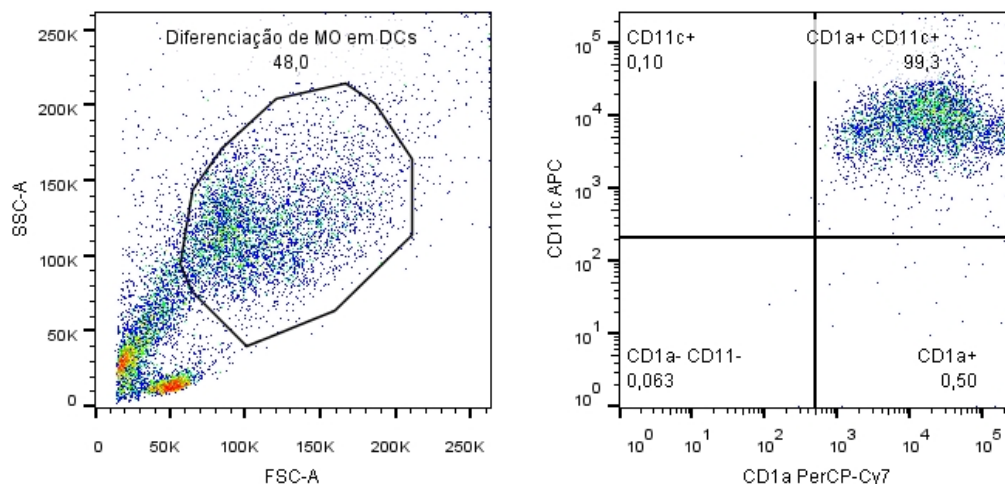


Figura 5. Análise representativa da diferenciação de DCs a partir de monócitos. Expressão de CD1a⁺ e CD11c⁺, em células dendríticas (CD1a⁺CD11c⁺) obtidas a partir de monócitos humanos. n=5

8.3. Taxa de infecção de Leishmania em Células Dendríticas

As DCs foram então quantificadas e distribuídas em placas de 24 poços para realização da infecção com proporção 10:1 leishmania:DCs. Após 24h de infecção, as células foram coletadas por lavagens sucessivas, quantificadas e parte delas foi utilizada para confecção de lâminas e coloração por H&E. Em microscopia óptica no aumento de 100x foram contadas 100 células, agrupadas em infectadas e não infectadas, sendo as amastigotas quantificadas nas células infectadas (Figura 6).

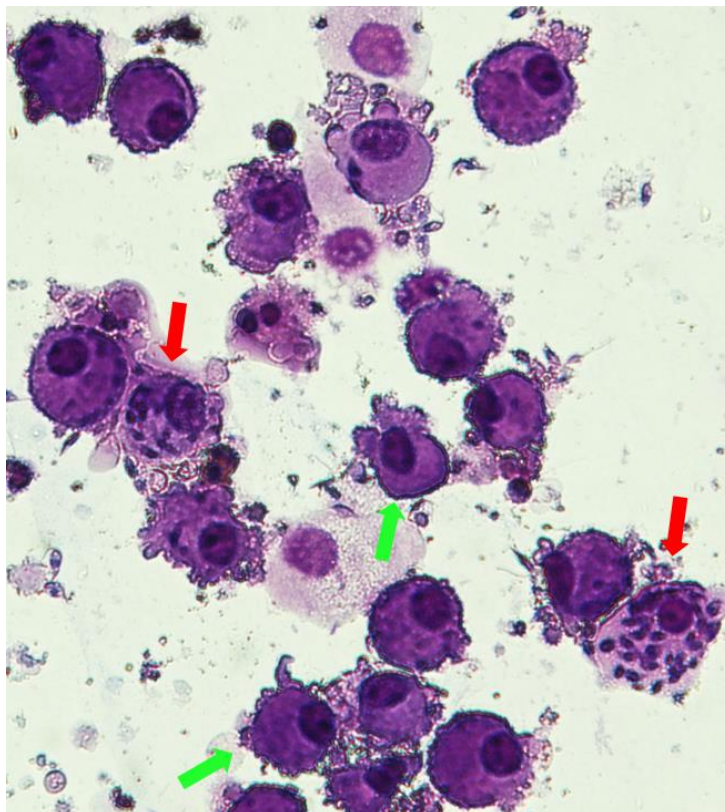


Figura 6. Imagem representativa de DCs infectadas. As DCs foram fixadas nas lâminas por citocentrifugação após 24h de infecção por *Leishmania infantum*. DCs não infectadas sinalizadas pela seta verde e as infectadas pelas setas vermelhas. Aumento de 100x com coloração HE. n=3

A taxa de infecção (Figura 7) por *Leishmania infantum* foi de (76% +/-8,83), sendo maior que a encontrada para *Leishmania braziliensis* (50,00% +/-10,97). Este comportamento repete-se na quantificação de amastigotas (Figura 8). A carga parasitária para *Leishmania infantum* foi de (403,00% +/-164,60) por 100 células, enquanto que para *Leishmania braziliensis* o valor estava reduzido (140,00% +/-213,80). Assim, observou-se que as duas espécies tiveram capacidade de infecção, porém com uma maior carga parasitária para *L.infantum* em comparação à *L. braziliensis* (Figura 8).

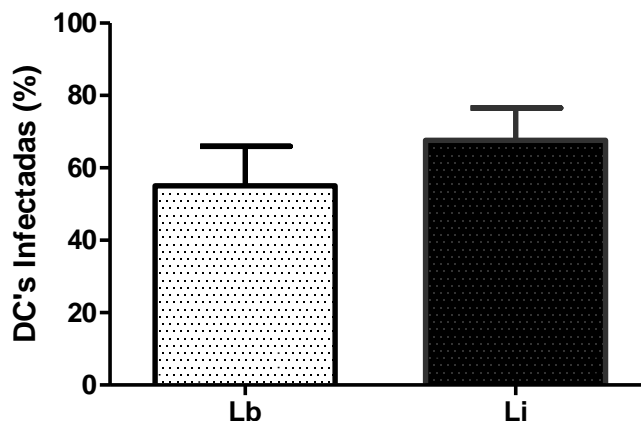


Figura 7. Taxa de infecção em células dendríticas infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum*. DCs derivadas de MO foram infectadas por *L. braziliensis* (Lb) e *L. infantum* (Li) previamente marcadas com CFSE. Após 24 horas de infecção, as lâminas foram coradas com H&E e contadas por dois observadores para determinar a porcentagem de DCs infectadas. n= 3

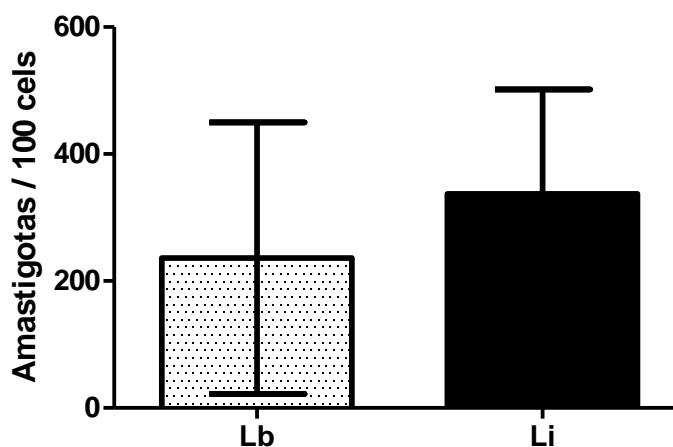


Figura 8. Número de amastigotas em células dendríticas infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum*. Número de amastigotas contadas por dois avaliadores por microscopia óptica, em aumento de 100x, por 100 DCs.

Concomitantemente, foi determinada a taxa de infecção por citometria de fluxo, utilizando as *Leishmanias* previamente coradas com CFSE, e medidas as taxas de infecção por porcentagem de DCs positivas para o marcador. Esta metodologia mostrou uma diferença significativa entre taxas de infecção das espécies *Leishmania infantum* (69,05 +/-4,56) e *Leishmania braziliensis* (38,25% +/-5,56) (Figura 9).

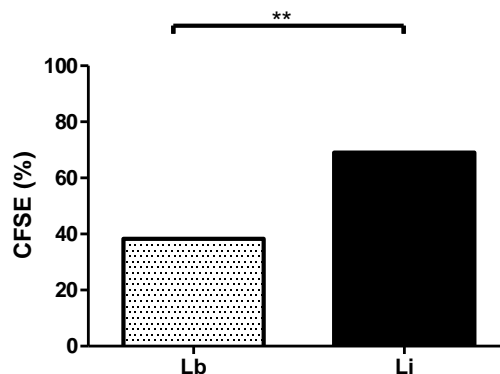


Figura 9. Taxa de infecção em células dendríticas por citometria de fluxo de *L. braziliensis* ou *L. infantum*. DCs foram infectadas com leishmanias previamente marcadas com CFSE. Após 24 de infecção foi avaliada a porcentagem de DCs positivas para CFSE. (**p<0,01) n=3

8.4. Caracterização de DCs obtidas a partir de monócitos após a infecção por *Leishmania*

Após a diferenciação e infecção com as *Leishmanias*, as DCs foram marcadas com anticorpos monoclonais para caracterização fenotípica. Como estratégia de análise, as DCs foram selecionadas por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 10), grupos de células não marcadas utilizadas como controle negativo (CN) e um grupo marcado, para estabelecer a referência e descartar a autofluorescência. Podemos observar que a janela ou *gate* foi definida na população de maior tamanho e dentro dessa população, verificamos expressão de 86,1% CD1a+ no CN, 85,2 % nas células infectadas por *L. braziliensis*, 84,2% nas células infectadas por *L. infantum* e 82,6 no controle positivo (CP). Essa estratégia de análise representada por CD1a foi feita para as demais moléculas, em todas as condições.

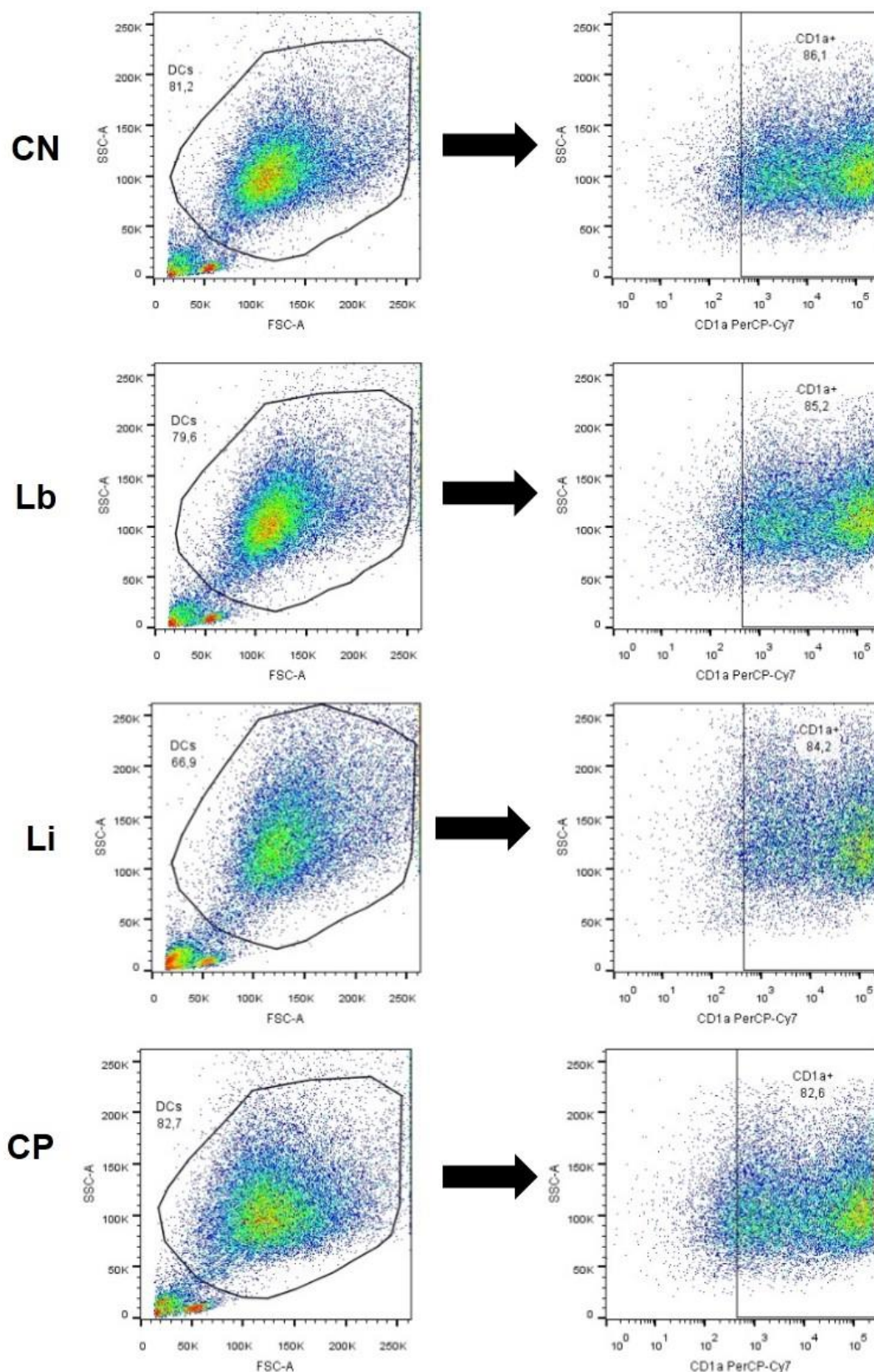


Figura 10. Estratégia de análise para caracterização fenotípica das DCs. As DCs foram selecionadas por granulosidade (SSC-A) e tamanho (FSC-A), então selecionadas as células CD1a+. Como controle negativo (CN), as DCs foram cultivadas somente em meio de cultura, na infecção as DCs foram colocadas em cultura com *L. braziliensis* (Lb) ou *L. infantum* (Li) por 24 horas. como controle positivo (CP), estímulo com LPS (100ng/mL). Dados representativos de um indivíduo/voluntário.

8.5. Caracterização de DCs infectadas e *bystanders*

As leishmanias foram previamente marcadas com CFSE para a realização dos experimentos de co-cultura com DCs. Como estratégia de análise, novamente as DCs foram selecionadas por tamanho x granulosidade e depois, classificadas entre CFSE+ (infectadas) e CFSE- (não infectadas ou “*bystander*”).

Na figura representativa (Figura 11) as DCs (70.8%) em co-cultura com a *leishmania* mostraram que 53.7% foram infectadas e 43.8% não. Então foi analisada a expressão da molécula CD86 das DCs *bystander* (98,4%), e DCs infectadas (99,9%). Destaca-se que esta estratégia foi utilizada para as outras moléculas e condições do experimento.

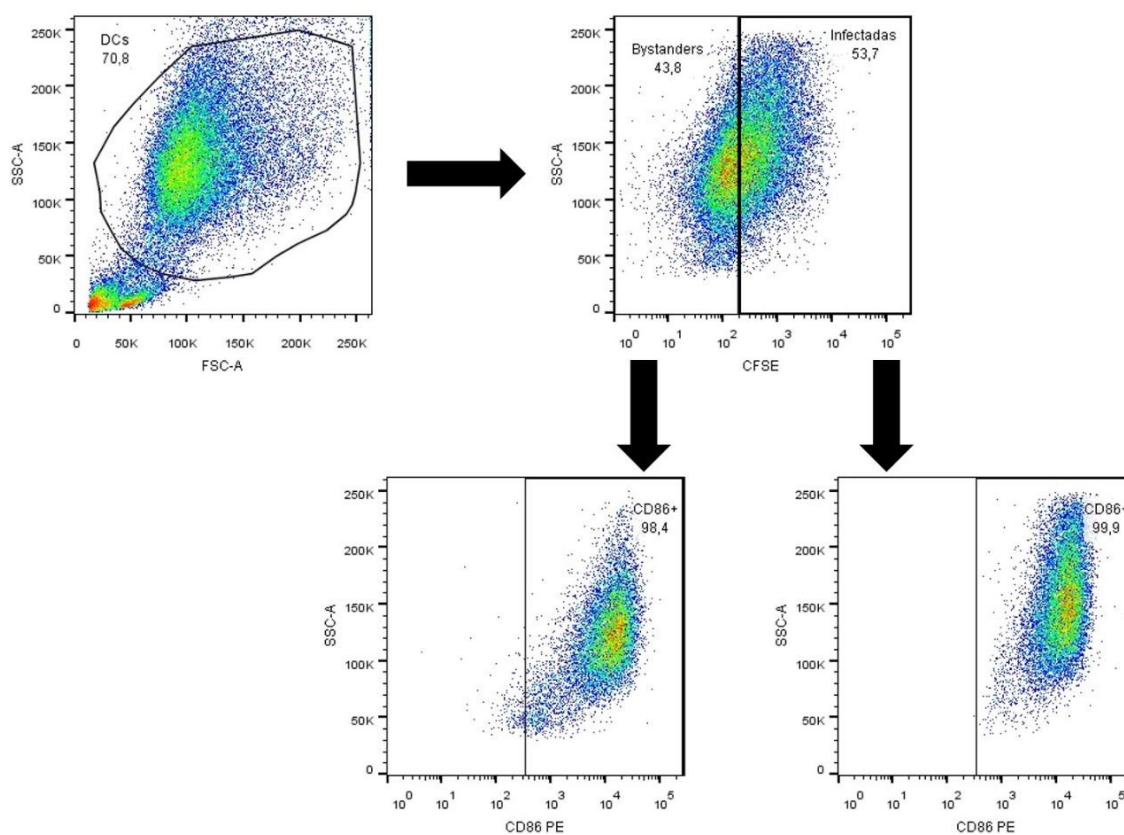


Figura 11: Estratégia de análise para caracterização fenotípica de DCs *bystanders* e infectadas. DCs infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum* previamente marcadas com CFSE, foram selecionadas por tamanho e granulosidade, separadas por expressão de CFSE para DCs infectadas e CD86+ para DCs *bystander*. Dados representativos de um indivíduo/voluntário.

8.6. Caracterização de CD1a+CD11c+ e HLA-DR de DCs *bystanders* após infecção por *Leishmania*.

Após 24 horas de infecção, as células em todas as suas condições experimentais foram marcadas com CD1a+, CD11c e HLA-DR, marcadores característicos da diferenciação de DCs. As leishmanias foram coradas com CFSE e co-cultivadas com as DCs por 24h. Após incubação as DCs foram caracterizadas fenotipicamente com anticorpos conjugados a fluoróforos. Partindo da estratégia de seleção do tamanho e granulidade, as células agora foram separadas em infectadas (com marcação de CFSE) e *bystanders* ou não infectadas (não marcadas com CFSE), a fim de comparar os achados entre as células que foram infectadas pela leishmania e as que permaneceram não infectadas, mesmo com a presença do parasito na cultura.

As medianas de CD1a+ mantiveram-se próximas para todas as condições experimentais, CP 79,6 (+/-6,82), *L. braziliensis bystanders* 81,00 (+/-21,65), *L. braziliensis* infectada 77,00 (+/-16,26), *L. infantum bystanders* 78,95 (+/- 8,56), *L. infantum* infectada 74,70 (+/-14,51) (Figura 12A). A expressão de CD11c+ (Figura 12B) também não mostrou diferenças entre DCs infectadas com Lb 99,85 (+/- 0,04) e com *L. infantum* 99,30 (+/- 0,26), nem nas DCs em contato, *L. braziliensis bystanders* 98,10 (+/- 3,23) e *L. infantum bystanders* 97,80 (+/- 1,22), bem como nas DCs controles 98,75 (+/- 0,18). A alta expressão de HLA-DR, característico de DCs também foi observada, não havendo modulação da mesma. (Figura 12C), pois verifica-se uma mediana de 99,15 (+/- 0,52) para CN, 98,80 (+/- 0,60) nas *L. braziliensis bystanders* 98,80 (+/- 0,60), *L. braziliensis* infectadas 98,85 (+/- 0,16), *L. infantum bystanders* 97,15 (+/- 0,49) e *L. infantum* infectadas 99,80 (+/- 0,17). Com isto, podemos concluir que a expressão das moléculas de superfície relacionadas à apresentação de antígenos permanece inalterada tanto nas células infectadas quanto nas não infectadas.

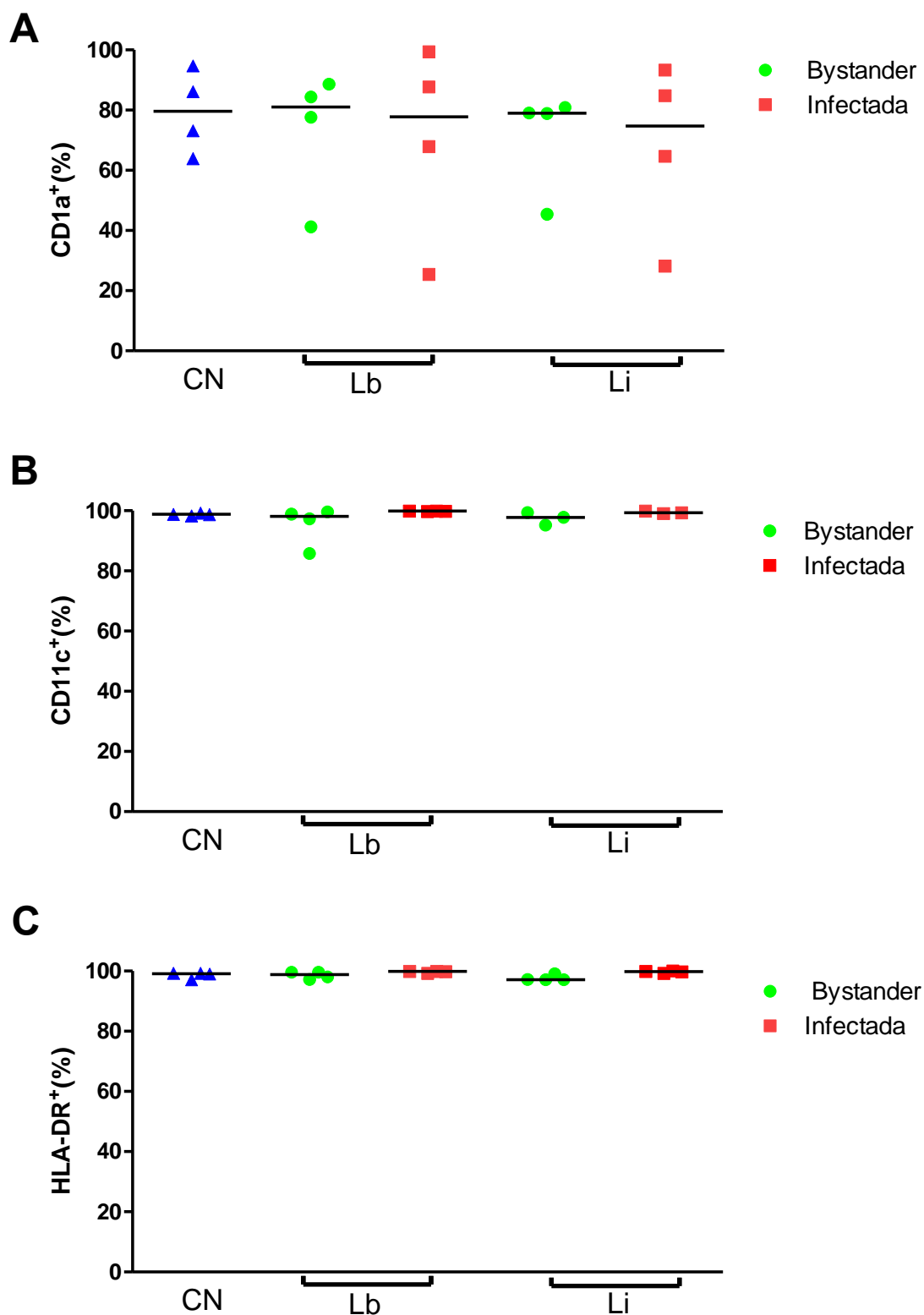


Figura 12. Expressão de CD1a, CD11c e HLA_DR em DCs *bystanders* e infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum*. (A) porcentagem da expressão de CD1a+ em células infectadas e não infectadas. (B) porcentagem da expressão de CD11c+ em células infectadas e não infectadas. (C) porcentagem da expressão de HLA-DR+ em células infectadas e não infectadas,

comparando os grupos controle negativo (CN), DCs bystander na interação com *L. braziliensis* (Lb bystander), DCs infectadas por *L. braziliensis* (Lb infectada), DCs bystander na interação com *L. infantum* (Li bystander) e por fim DCs infectadas com *L. infantum* (Li infectada). n=4

8.7. Expressão de moléculas relacionadas a fagocitose, maturação e migração em DCs *bystanders* pós infecção por *Leishmania*.

Observamos uma diminuição na expressão de CD209 (DC-SIGN), um receptor de superfície provavelmente relacionado ao processo de fagocitose. Ao medirmos a molécula CD209 em DCs, notamos uma menor expressão tanto em *L. braziliensis bystanders* (72,4 +/-1,71) quanto em *L. infantum bystanders* (64,95 +/-9,36) (Figura 13A ao compararmos com as células infectadas, sendo 84,85 +/-4,31 em *L. braziliensis* infectada e 86,20 +/-3,77 em *L. infantum* infectada, ficando o CN com 84,70 +/-5,07).

Quanto ao processo de maturação das DCs, verificamos uma alta expressão de CD83 com medianas de 76,95 +/-12,26 em células infectadas por *L. braziliensis* e 85,20 +/-17,3 em células infectadas por *L. infantum*. A expressão de CD83 foi baixa no CN, sendo 12,90 +/-5,48 e também nas células *bystanders*, com uma expressão de 21,35 +/-6,15 na condição *L. braziliensis bystanders* e 31,70 +/-8,31 em *L. infantum bystanders* (Figura 13B).

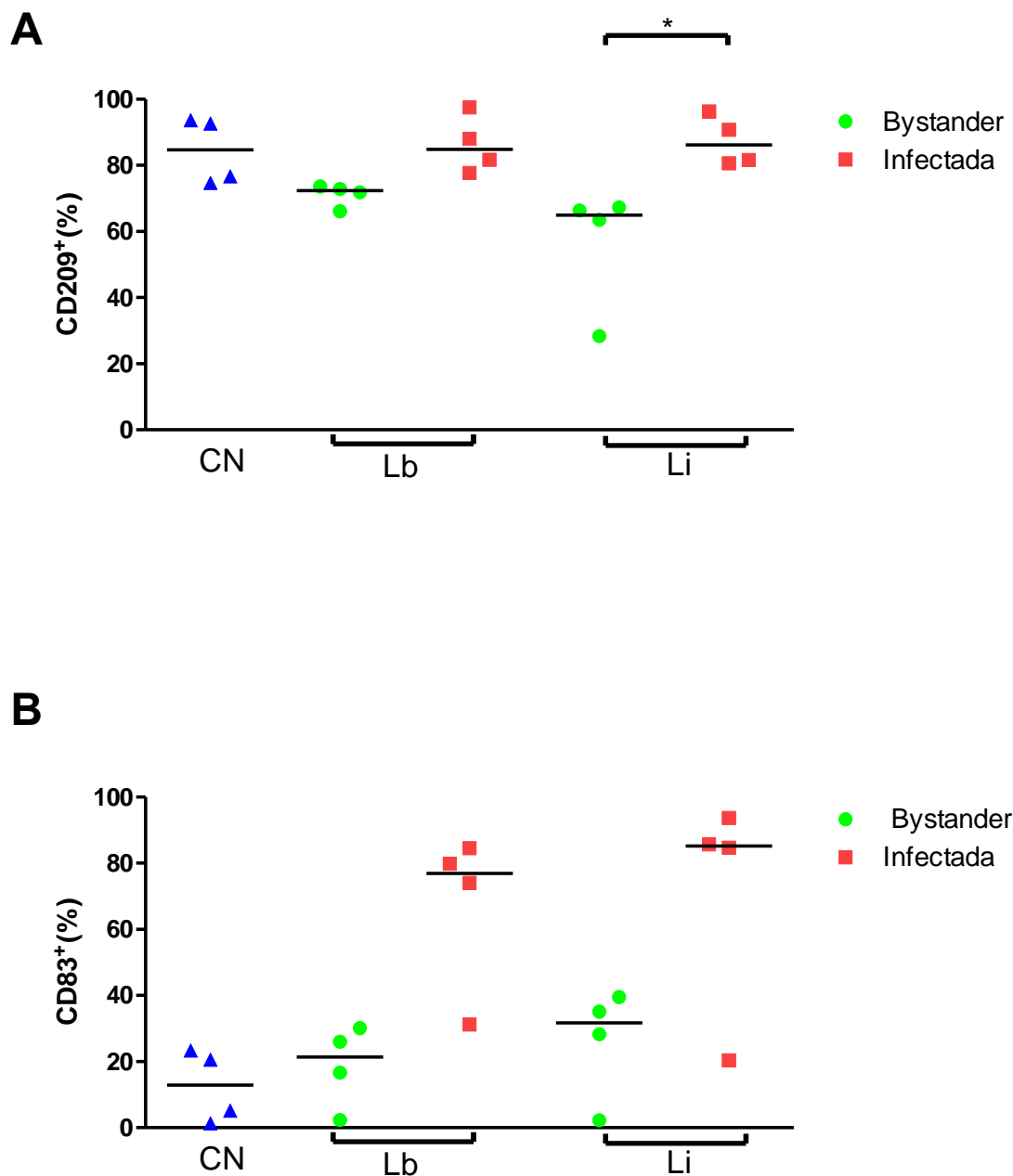


Figura 13. Expressão de CD209 e CD83+ em DCs *bystanders* e infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum*. (A) porcentagem da expressão de CD209 em células infectadas e não infectadas. (B) porcentagem da expressão de CD83+ em células infectadas e não infectadas comparando os grupos controle negativo (CN), DCs bystander na interação com *L. braziliensis* (Lb bystander), DCs infectadas por *L. braziliensis* (Lb infectada), DCs bystander na interação com *L. infantum* (Li bystander) e por fim DCs infectadas com *L. infantum* (Li infectada). (* $p < 0,05$)
. n= 4

Ao avaliarmos a molécula CCR7 relacionada à migração de DCs e direcionamento ao linfonodo, verificamos que a infecção estimulou um aumento na expressão (Figura 14A). A expressão no controle negativo foi de 0,67 (+/- 0,26) enquanto nas células infectadas por *L. braziliensis* foi de 68,85 +/-7,79 e infectadas por *L. infantum* 65,25 +/-12,46. Os valores permaneceram semelhantes ao controle negativo em células *L. braziliensis bystanders* 0,98 (+/- 0,37) e *L. infantum bystanders* 0,97 (+/-2,00). Assim, podemos concluir que a infecção é necessária para induzir a maturação e a potencial migração das DCs nas nossas condições experimentais.

Por sua vez, a expressão de de CD62L foi de 51,85 (+/-17,22) no CN, 27,50 (+/- 14,85) sendo mais baixa em *L. braziliensis bystanders*, 11,96 (+/- 17,86) em *L. infantum bystanders*. A infecção com Lb aumentou a expressão de CD62L para 47,65 (+/-17,10) e com *L. infantum* permaneceu semelhante ao CN com valores de 31,60 (+/-18,35) (Figura 14B).

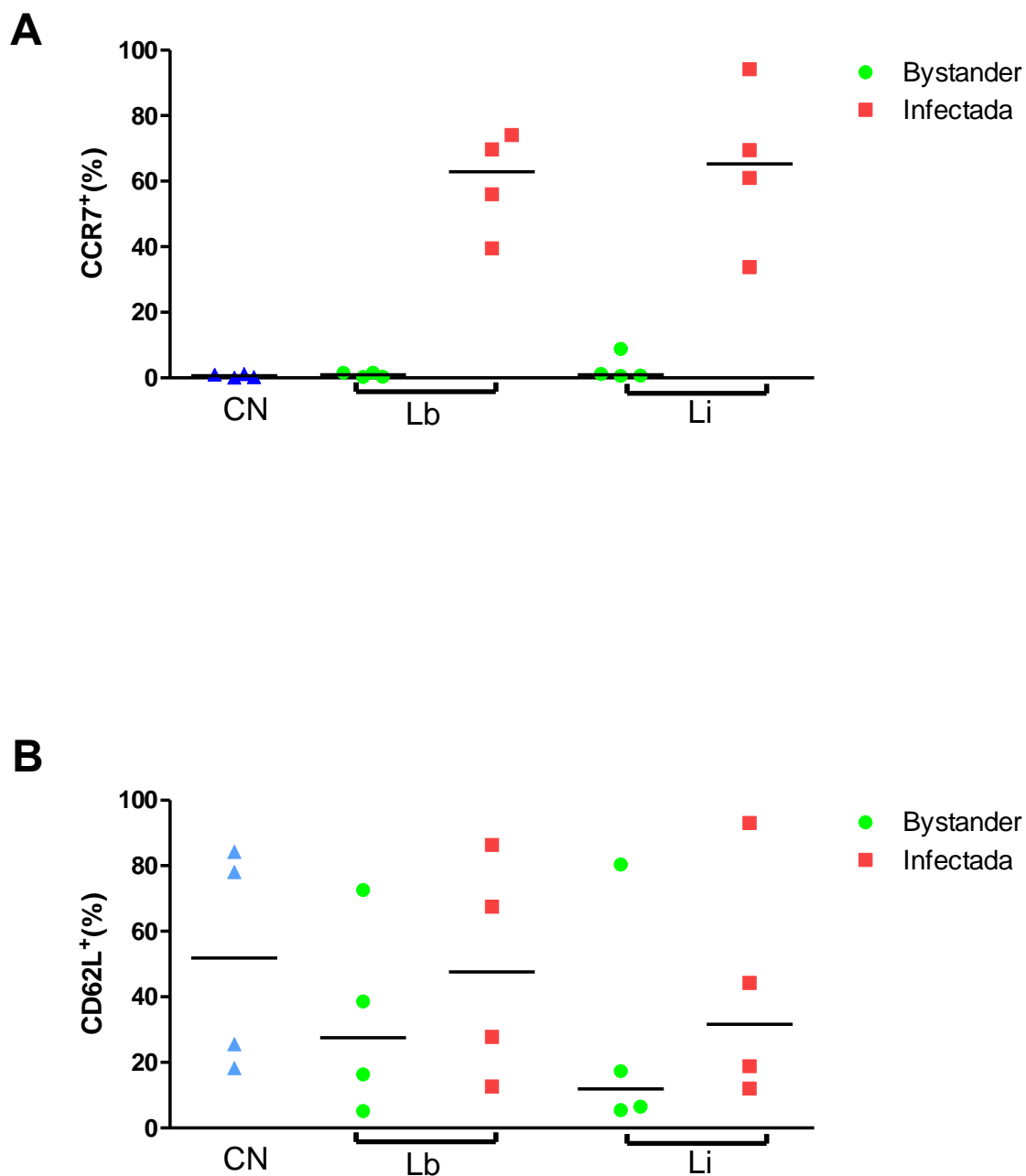


Figura 14. Expressão de CCR7⁺ e CD62L em DCs *bystanders* e infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum*. (A) porcentagem da expressão de CCR7⁺ em células infectadas e não infectadas e (B) porcentagem da expressão de CD62L em células infectadas e não infectadas comparando os grupos controle negativo (CN), DCs *bystander* na interação 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). n= 4

8.8. Perfil de moléculas co-estimulatórias, em DCs *bystanders* pós infecção por *Leishmania*.

Após analisar moléculas relacionada à maturação e migração das DCs, partimos para avaliar moléculas que estão relacionadas à co-estimulação e ativação de linfócitos T.

Ao avaliarmos a expressão de CD40, um ligante de ativação de células T, a expressão mostrou-se constante entre as condições estudadas. Sua expressão no controle negativo foi de 99,15 (+/-0,26), em *L. braziliensis bystanders* 98,55 (+/-0,40), em *L. infantum bystanders* 96,65 (+/-24,18), em células infectadas por Lb 99,85 (+/-0,52) e células infectadas por *L. infantum* 98,20 (+/-24,52) (Figura 15A). Por outro lado, ao avaliarmos a expressão de CD80, verificamos que a infecção parecia aumentar a expressão do mesmo. As células controle negativo apresentaram uma expressão de 16,60 (+/-6,57), bastante semelhante às células *L. braziliensis bystanders* 20,10 (+/-9,81) e *L. infantum bystanders* 24,35 (+/-10,37). Porém, há um aumento em células infectadas por Lb 83,50 (+/-16,46) e células infectadas por *L. infantum* 81,55 (+/-19,59) (Figura 15B).

Por sua vez, a expressão de CD86 permaneceu inalterada nas diferentes condições experimentais. A expressão no controle negativo foi de 94,40 (+/-5,46), em células *L. braziliensis bystanders* 79,95 (+/-10,56), células infectadas por Lb 97,40 (+/-3,47), em células *L. infantum bystanders* 75,40 (+/-11,15) e células infectadas por *L. infantum* 97,40 (+/-3,59) (Figura 15C)..

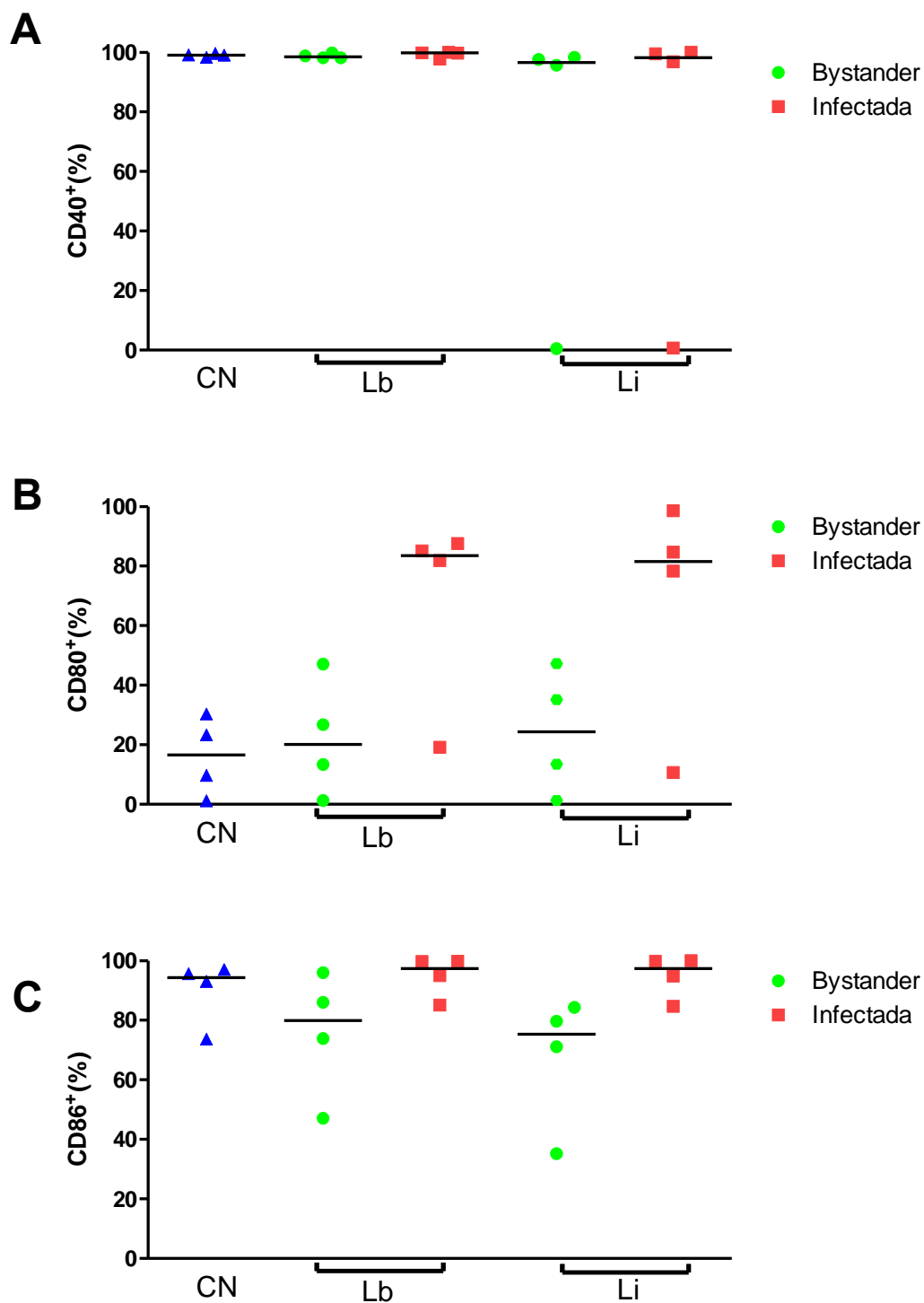


Figura 15. Expressão de CD40+, CD80+ e CD86 em DCs *bysdanters* e infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum*. (A) porcentagem da expressão de CD40+ em células infectadas e não infectadas. (B) porcentagem da expressão de CD80+ em células infectadas e não infectadas. (C) porcentagem da expressão de CD86+ em células infectadas e não infectadas. Comparando os grupos controle negativo (CN), DCs bystander na interação com *L. braziliensis* (Lb bystander), DCs infectadas por *L. braziliensis* (Lb infectada), DCs bystander na interação com *L. infantum* (Li bystander) e por fim DCs infectadas com *L. infantum* (Li infectada). n= 4

8.9. Perfil de expressão de molécula inibitória de Linfócitos T, em DCs *bystanders* e infectados após interação com *Leishmania*.

Uma das vias de inibição da resposta imune mediada por linfócitos T envolve a molécula PD-L1. Esta ao ligar-se em seu receptor PD-1 em linfócitos T, tem como consequência a indução de anergia. Assim, decidimos avaliar a regulação desta via na infecção com leishmania, quantificando a expressão de PD-L1 em DCs. Os resultados mostraram que tanto a células infectadas quanto aquelas *bystander* aumentavam a expressão de PD-L1 (Figura 16). O controle negativo mostrou expressão de 36,79 (+/-22,36), enquanto que nas células infectadas por *L. braziliensis* o valor subiu para 99,55 (+/-19,06). As células infectadas por *L. infantum* também apresentaram um aumento na expressão de PD-L1 99,6 (+/-0,41). As células *bystander* também apresentaram um aumento na expressão de PD-L1, sendo 86,85 (+/-22,24) nas células *L. braziliensis bystander* e 86,40 (+/-7,96) em *L. infantum bystander*. Com isto, mostramos que a infecção por *Leishmania* causou um aumento da expressão de PD-L1. O que nos levou a nossa pergunta deste estudo, se leishmania induz anergia de linfócitos T, pelo aumento da expressão de PD-L1 em DCs.

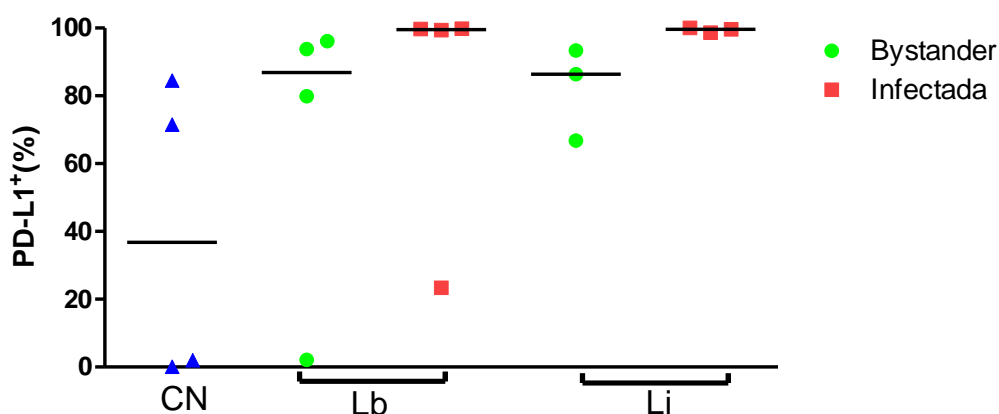
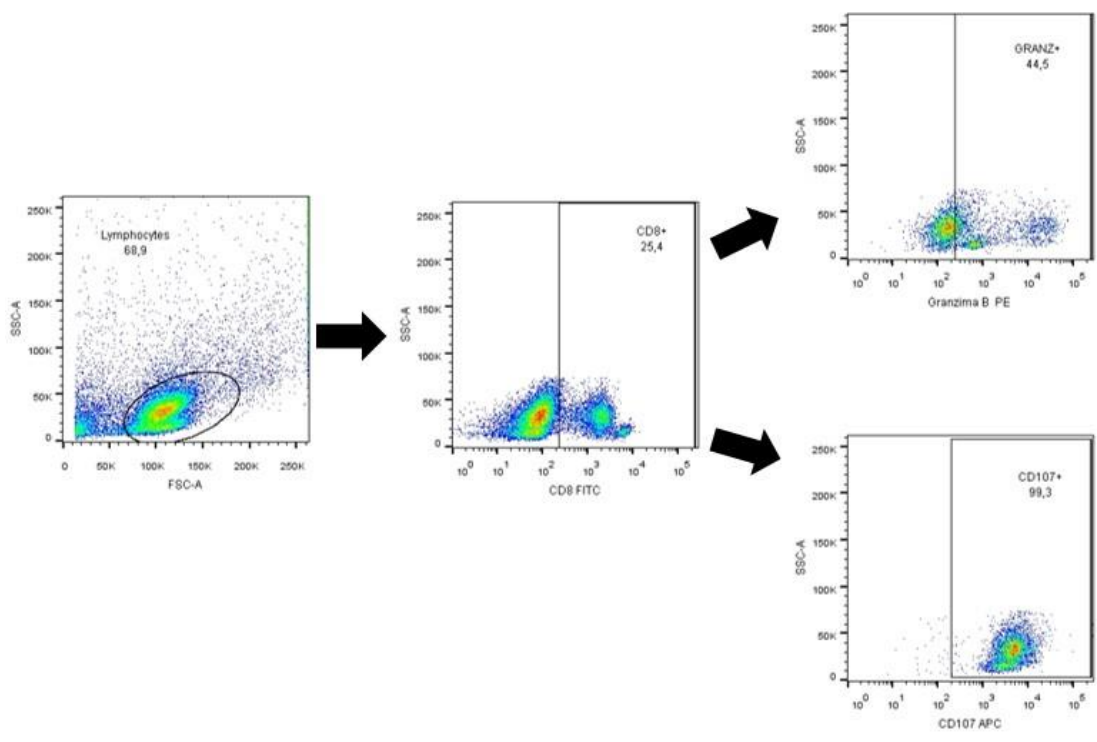
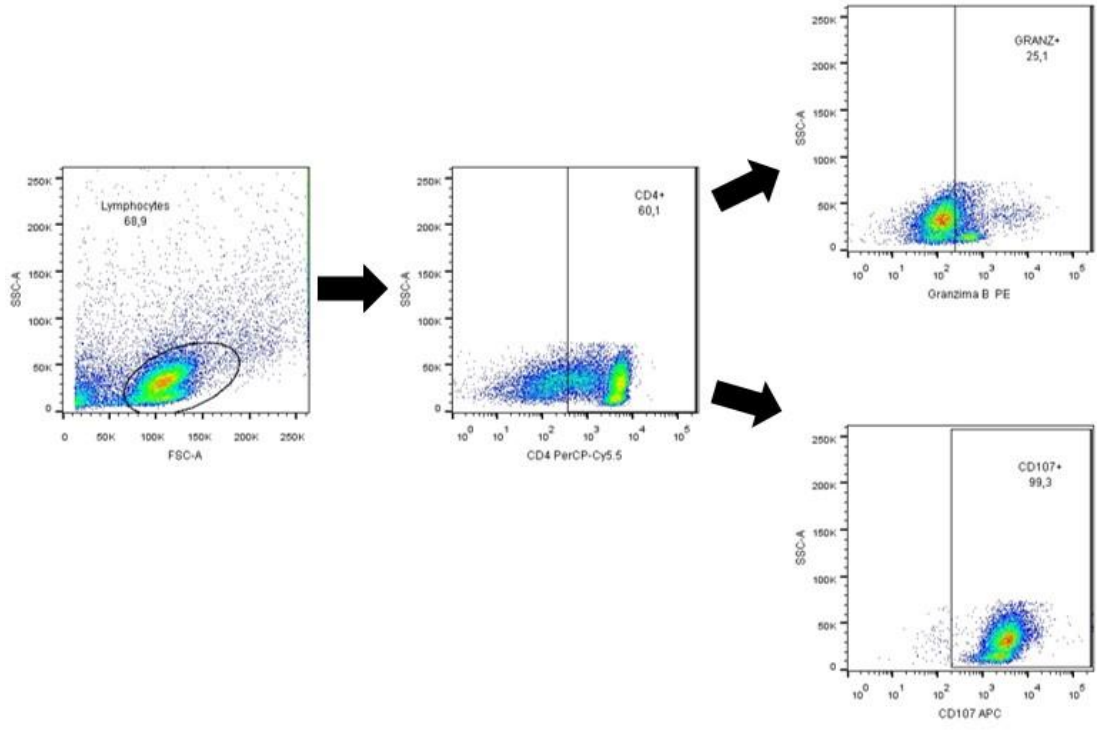


Figura 16. Expressão de PD-L1 em DCs *bystanders* e infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum*. Porcentagem da expressão PD-L1 em células infectadas e não infectadas. Comparando os grupos controle negativo (CN), DCs *bystander* na interação com *L. braziliensis*

(Lb bystander), DCs infectadas por *L. braziliensis* (Lb infectada), DCs bystander na interação com *L. infantum* (Li bystander) e por fim DCs infectadas com *L. infantum* (Li infectada). n= 4

8.10. Avaliação de citocinas intracelulares em linfócitos T pós bloqueio de PD-1 em co-cultura com DCs infectadas com *Leishmania*

Ao avaliar que a *leishmania* induz o aumento da expressão da molécula inibidora PD-L1, após 24h de infecção, as DCs foram co-cultivadas com linfócitos autólogos, por 72 horas para avaliar a produção de citocinas, bem como, avaliar se o bloqueio da via PD-1 em linfócitos teria os mesmos efeitos. Com a estratégia de análise apresentada na figura 17, representativa de um doador com o grupo controle negativo, selecionamos os linfócitos por tamanho e granulosidade, isolados num gate e avaliados quanto a expressão de CD4+ e CD8+. Em seguida, verificou-se a presença de células positivas para granzima B e interferon gama. Esta análise foi feita para todos os doadores e demais condições sendo (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.



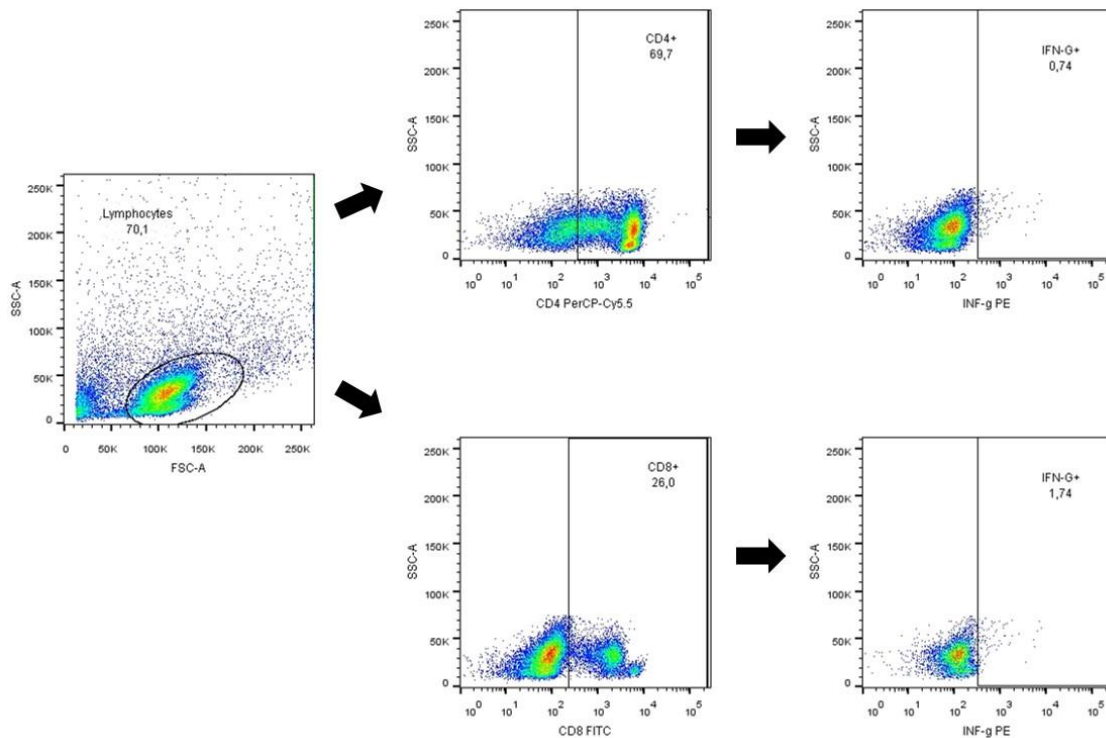


Figura 17: Estratégia de análise para avaliação de citocinas intracelulares e moléculas de degranulação em linfócitos T em co-cultura com DCs infectadas. DCs infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum* foram co-cultivadas com linfócitos autólogos e avaliados quanto à expressão de CD4+ e CD8+, seguido por granzima B, CD107 e interferon gama. Dados representativos de indivíduo/voluntário.

Mediamos linfócitos positivos para CD107 marcador de degranulação, granzima B, que tem importante papel no combate de parasitas intracelulares, e interferon gama citocina inflamatória de indução de resposta perfil Th1, ativando células efetoras do sistema imune. Nas condições realizadas até então, adicionadas a condição de bloqueio de PD-1 em linfócitos T antes da co-cultura. Como controle da ativação de células T foi utilizado concanavalina A (ConA).

Inicialmente, a interação das DCs infectadas com os linfócitos, tendo a via PD1-PDL1 bloqueada ou não, demonstrou manter o número de células CD4+CD107+ (Figura 18), sendo CN 98,10 (+/-25,84), *L. braziliensis* 97,90 (+/-1,68), *L. braziliensis* +anti-PD-1 86,30 (+/-6,48), *L. infantum* 98,00 (+/-2,37), *L. infantum* +anti-PD-1 89,70 (+/-3,59) e ConA 96,00 (+/-3,13). O mesmo comportamento foi observado em linfócitos CD8+CD107+ (Figura 19) sendo o CN 99,30 (+/-1,78), *L. braziliensis* 99,40 (+/-0,13), *L. braziliensis* +anti-PD-1

96,90 (+/-1,21), *L. infantum* 98,80 (+/-0,53), *L. infantum* +anti-PD-1 94,80 (+/-1,81) e ConA 96,80 (+/-0,26).

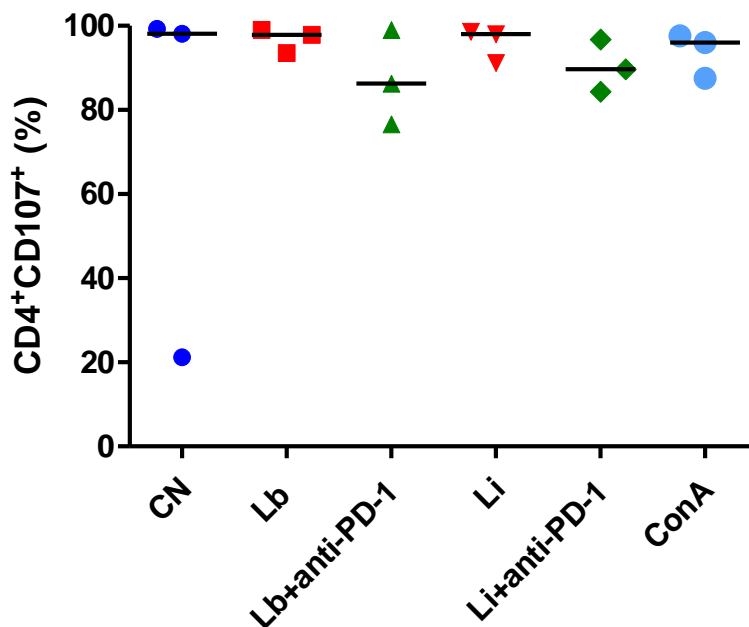


Figura 18. Análise de linfócitos TCD4+CD107+ após bloqueio de PD-1. Avaliação pós cocultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.

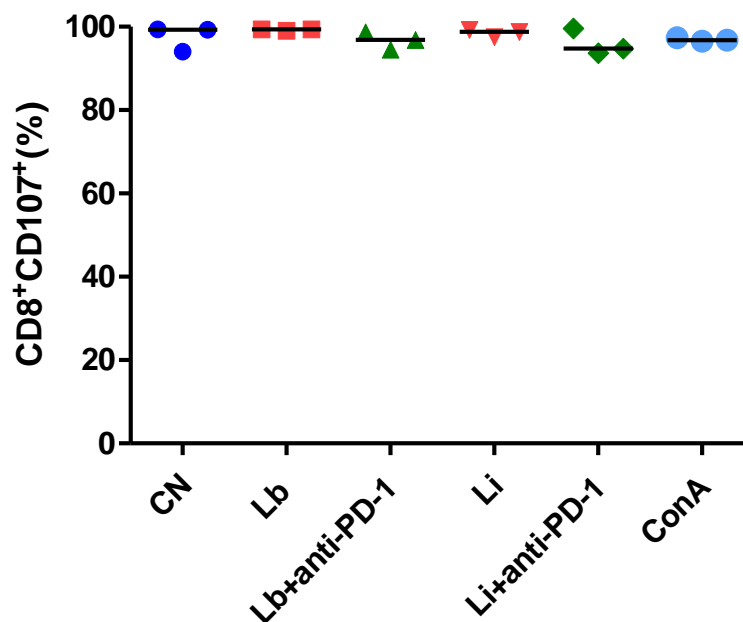


Figura 19. Análise de linfócitos TCD8+CD107+ após bloqueio de PD-1. Avaliação pós cocultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.

Por sua vez, verificou-se haver um aumento da população CD4+Granzima+ em linfócitos T porém sem reversão dos valores quando a via PD1-PDL1 estava bloqueada. Os valores para CN foram 48,65 (+/-17,32), nas células infectadas por *L. braziliensis* 85,30 (+/-12,14), *L. braziliensis* +anti-PD-1 84,90 (+/-15,32), células infectadas por *L. infantum* 87,60 (+/-16,89), *L. infantum* +anti-PD-1 87,10 (+/-17,67) e ConA 80,85 (+/-17,76) (Figura 20). Ao avaliarmos a população de células CD8+ granzima+, observamos não haver grandes alterações. O controle negativo apresentou uma expressão de 88,40 (+/-12,33), as células infectadas por *L. braziliensis* 92,55 (+/-4,18), *L. braziliensis* +anti-PD-1 88,30 (+/-6,30), as células infectadas por *L. infantum* 94,60 (+/-14,88), *L. infantum* +anti-PD-1 92,20 (+/-12,94) e ConA 91,30 (+/-13,92). (Figura 21)

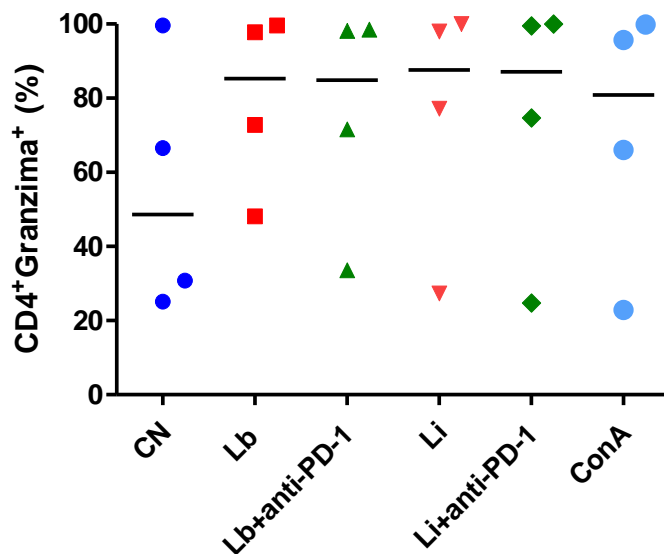


Figura 20. Análise de granzima B em linfócitos TCD4+Granzima+ após bloqueio de PD-1. Avaliação pós co-cultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.

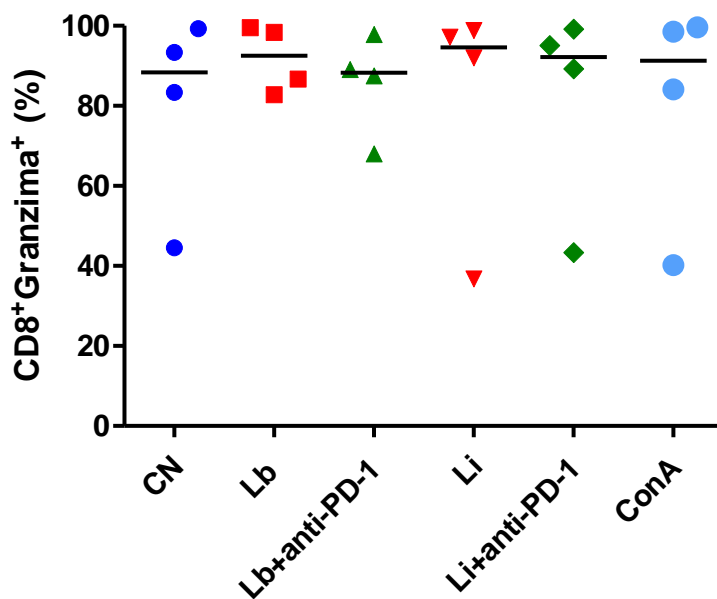


Figura 21. Análise de granzima B em linfócitos TCD8+Granzima+ após bloqueio de PD-1. Avaliação de linfócitos T após co-cultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.

Ao quantificarmos as células T CD4 produtoras de interferon gama, observamos haver valores baixos tanto na condição controle negativo CN 2,65 (+/-2,58) e nas condições infectadas por *L. braziliensis* 1,94 (+/-0,91) e *L. infantum* 1,79 (+/-1,18). Contudo, o bloqueio da via PD-1 PD-L1 mostrou uma recuperação na produção de IFN-g em células T CD4, sendo *L. braziliensis* +anti-PD-1 8,16 (+/-4,33) e *L. infantum* +anti-PD-1 5,38 (+/-3,69). Os valores do controle positivo ficaram em 27,65 (+/-10,25) ,em relação ao bloqueado (Figura 22)

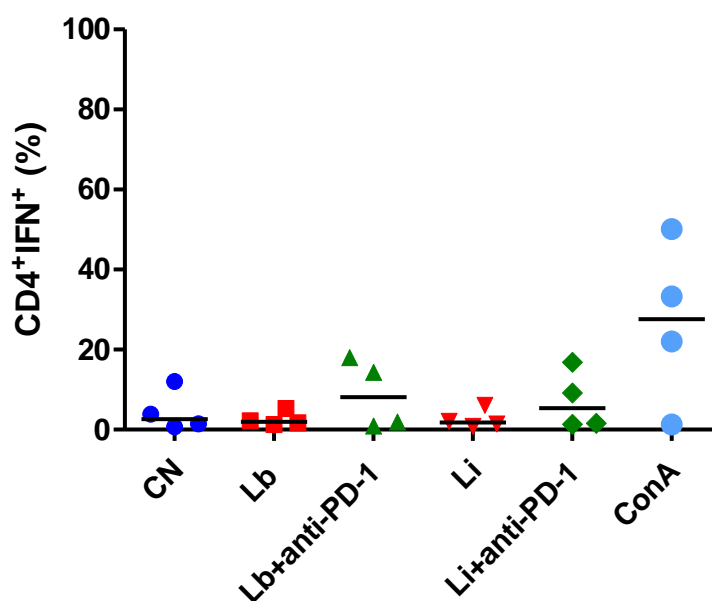


Figura 22. Análises de IFN γ em linfócitos TCD4+INF+ após bloqueio de PD-1. Avaliação pós co-cultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.

A recuperação na produção de IFN-gama também foi observada em células T CD8. Observamos uma baixa expressão em células controle negativo CN 10,46 (+/-7,83) bem como nas células infectadas por Leishmania *L. braziliensis* 7,38 (+/-2,34) e *L. infantum* 5,97 (+/-1,66). Ao bloquearmos a via, observamos haver uma recuperação na produção de IFN-gama em CD8 para ambas as Leishmanias testadas, sendo *L. braziliensis* +anti-PD-1 21,40 (+/-7,47) e *L. infantum* +anti-PD-1 14,00 (+/-4,53). O controle positivo apresentou valores de 46,35 (+/-13,28). (Figura 23)

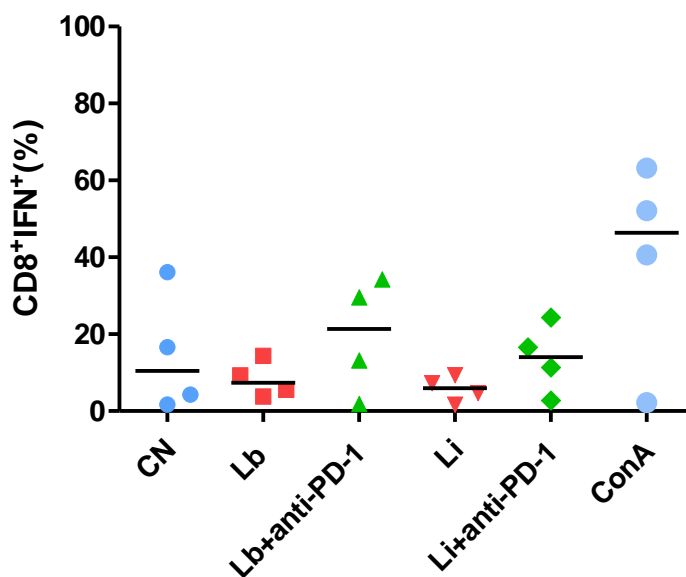


Figura 23. Análises de IFN- γ em linfócitos TCD8+IFN+ após bloqueio de PD-1. Avaliação pós co-cultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.

Proliferação de linfócitos T pós bloqueio de PD-1 em co-cultura com DCs infectadas com leishmania

Após a ativação de linfócitos T, acontece a expansão clonal, para uma resposta mais eficiente, com isso avaliamos o impacto do bloqueio de PD-1 na proliferação de linfócitos CD4+ e CD8+ em contato *in vitro*, com DCs infectadas com leishmanias, utilizando linfócitos marcados com CFSE, vale ressaltar que na proliferação pelo processo de mitose, cada célula “nova” tem metade do corante da célula mãe, em resumo, quanto maior a oscilação da expressão da expressão de CFSE maior a proliferação de linfócitos T. Nossos resultados mostram que o bloqueio de PD-1 recupera a proliferação de linfócitos (Figura 24).

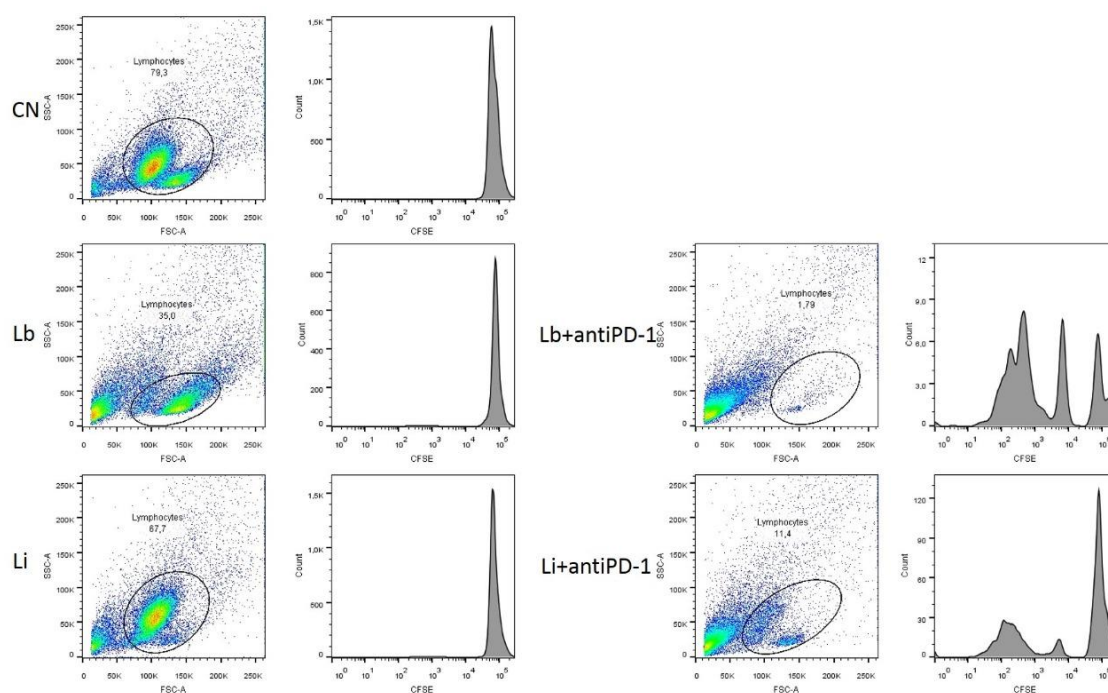


Figura 24. Análise da proliferação de linfócitos TCD4+ e TCD8+ pós bloqueio de PD-1 e cocultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum*. Os linfócitos foram selecionados por granulocidade (SSC-A) e tamanho (FSC-A), e avaliados em histograma quanto a expressão de CFSE nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum*. Dados representativos de um indivíduo/voluntário.

9. Discussão

Células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas (DCs) são essenciais para ativação da resposta inata e direcionamento da resposta imune adaptativa (BOYETTE *et al.*, 2017; STEINMAN; COHN, 1973). Assim, durante o processo de infecção por *Leishmania* bem como no estabelecimento da doença a interação entre parasitos, DCs e linfócitos é de extrema relevância para uma melhor compreensão da patogênese. Além disso, diferentes estudos corroboraram o papel crucial das DCs na resposta imune a diferentes patógenos bem como na possível modulação de sua ação biológica como mecanismo de escape dos mesmos (BALAN; SAXENA; BHARDWAJ, 2019; TIBERIO *et al.*, 2018). No que se refere à resposta imune adaptativa, o linfócito T desempenha um papel fundamental. Nos órgãos linfoides secundários, esses linfócitos reconhecem os antígenos derivados dos patógenos por meio da interação com as células apresentadoras de antígeno (RANDOLPH; ANGELI; SWARTZ, 2005). Posteriormente, passam por um processo adicional de diferenciação, gerando células efetoras ou células de memória. Essas células possuem funções distintas, desde a regulação das respostas imunes a antígenos proteicos até a eliminação de patógenos intracelulares (BUNN *et al.*, 2018).

Inicialmente estudamos a infecção de DCs por *Leishmania* bem como a expressão de algumas moléculas de superfície relevantes à resposta do hospedeiro. Dessa forma, ao analisarmos a taxa de infecção de *Leishmania braziliensis* (Lb) e *Leishmania infantum* (Li) em células dendríticas (DCs) após 24 horas de co-cultura, nota-se que ambas as espécies (Figura 6, 7, 8 e 9) são capazes de infectar DCs. Essa observação está alinhada com os resultados de outras pesquisas conduzidas por nosso grupo, na qual ambas as espécies também demonstraram a capacidade de infectar as DCs derivadas de monócitos, além de diversos trabalhos com outras espécies do parasito (CAMERON *et al.*, 1992; FAVALI *et al.*, 2007; FORMATION *et al.*, 2017; SETH *et al.*, 2011)

De fato, embora possuam a capacidade de infecção, tanto *L. braziliensis* quanto *L. infantum* não exibiram a capacidade de afetar a diferenciação das células dendríticas (DCs), como evidenciado pela expressão constante dos marcadores fenotípicos CD1a e CD83 (Figura 10 e 11), característicos das DCs

derivadas de monócitos. No que se refere ao CD1a vale ressaltar sua função de apresentação de antígenos lipídicos (POMEROY *et al.*, 2015). Logo após a caracterização das DCs fomos avaliar se a infecção interferia nos marcadores de diferenciação celular. As moléculas CD1a e CD11c+ (Figura 12A e 12B) permanecem com valores aproximados, após a infecção em todas as condições, dados similares à trabalho anterior do grupo (FALCÃO *et al.*, 2016)

As DCs em sua fase imatura demonstram uma maior capacidade de realizar fagocitose, enquanto as DCs maduras possuem a capacidade de processar e apresentar antígenos. Esse processo é desencadeado diretamente pelo reconhecimento e subsequente internalização de antígenos (BOYETTE *et al.*, 2017). Isso, por sua vez, estimula a expressão de moléculas de superfície, que aumentam a ativação de linfócitos T (BOYETTE *et al.*, 2017; COUTANT; PIN; MIOSSEC, 2021).

Uma outra característica notável das células dendríticas maduras é a elevada expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e moléculas coestimulatórias. Esse aumento na expressão capacita essas células a uma apresentação mais eficaz de antígenos e também a estimulação das células T virgens, uma vez que estas entram nos linfonodos drenantes (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). No entanto, como uma estratégia de evasão, alguns microrganismos têm a habilidade de inibir a apresentação de antígenos através das moléculas de MHC, como uma forma de escapar do sistema imunológico adaptativo (GOGOI *et al.*, 2018). Foi relatado que o *Trypanosoma cruzi* regula de forma específica a sua infecção por meio de um mecanismo de pós-transcrição ainda não compreendido completamente, o qual suprime a expressão dos elementos da via de MHC classe I em células HeLa (CAMARGO *et al.*, 2014).

O reconhecimento de antígenos por meio do MHC representa o primeiro sinal para a ativação dos linfócitos. No entanto, um segundo sinal é crucial para essa ativação, o qual envolve as moléculas coestimulatórias. Dentre essas moléculas, diversos membros da superfamília B7, como B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), desempenham papéis significativos. Estas moléculas podem tanto estimular quanto inibir a ativação das células T, dependendo da interação com CD28 ou CTLA-4 nas células T, respectivamente (GANNAVARAM *et al.*, 2016; GAUTAM *et al.*, 2014). Nossos resultados mostram alta expressão destas

moléculas. No entanto, as células dendríticas (DCs) derivadas da medula óssea de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* apresentaram uma maior taxa de lesão e infecção, acompanhada pela elevada expressão de IL-4 e IL-10, em comparação com os camundongos C3H/HeJ. Apesar dessas diferenças, em ambos os casos, houve um aumento na expressão das moléculas ativadoras MHC-II, CD40, CD86 e CD80. Por outro lado, ao examinar as BM-DCs de camundongos infectados com formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* opsonizadas com soro de animais imunizados, não foi observada nenhuma alteração no perfil das moléculas MHC-II, CD86, CD80 e CD40. No entanto, a estimulação com BCG induziu um aumento na expressão das moléculas coestimuladoras. (FILIPPIS *et al.*, 2017; PRINA *et al.*, 2004)

Vários genes dos complexos MHC de classe I e classe II do agrupamento de genes do HLA foram identificados como fatores de suscetibilidade genética para a leishmaniose, com variantes que afetam o resultado da doença tanto positiva quanto negativamente. Apesar de descrita essa associação, pouco se sabe ainda sobre os mecanismos que sustentam essas associações (BLACKWELL; FAKIOLA; CASTELLUCCI, 2020; SAMARANAYAKE *et al.*, 2016). Em nosso estudo, verificamos que a expressão das moléculas de superfície relacionadas à apresentação de antígenos permanece inalterada tanto nas células infectadas quanto nas não infectadas (Figura 12B).

Outro marcador analisado em nosso estudo foi o gene CD209 (DC-SIGN) um receptor de superfície de células dendríticas imaturas que está envolvido na adesão celular, na iniciação da resposta imune primária e no reconhecimento de patógenos. Acredita-se também que ele esteja envolvido na sinalização celular para mediar a endocitose de patógenos. Este receptor reconhece uma grande variedade de patógenos evolutivamente divergentes com grande impacto na saúde pública, incluindo micobactérias que causam lepra e a tuberculose, os vírus Ebola, hepatite C, HIV-1 e Dengue e o coronavírus da síndrome respiratória aguda SARS-CoV (ALVAREZ *et al.*, 2002; AMRAEI *et al.*, 2021; BARREIRO *et al.*, 2006; PREZA *et al.*, 2014)

Estudos feitos por Colmenares *et al.* (2002) mostraram que a ligação de amastigotas de *Leishmania* a células dendríticas humanas imaturas e células

transfectadas com CD209 foi inibida por um anticorpo monoclonal bloqueador de função específico desse receptor. Eles observaram que este anticorpo reduziu drasticamente a internalização de formas amastigotas pelas DCs (COLMENARES *et al.*, 2002). Esta foi a primeira descrição de um ligante de patógeno não viral a CD209 e forneceram evidências de um papel relevante desse receptor na ligação e internalização de amastigotas de *Leishmania* por DCs. Partindo dessas observações, levantamos a hipótese que as DCs que não são infectadas, naturalmente teriam uma menor expressão de CD209, portanto, essa molécula poderia ser uma via relevante de internalização da *Leishmania*. Nossos resultados mostram que a expressão de CD209 foi maior em ambas condições experimentais, tanto na infecção por *L. braziliensis* como por *L. infantum* (Figura 13A). Por outro lado, Falcão *et al.* (2016) observaram que ambas as *Leishmania* foram capazes de inibir de forma significativa a expressão desse receptor. Este estudo observou que expressão de CD209 foi $80,09\% \pm 6,8$ nas células controle, enquanto a expressão em células infectadas com *L. infantum* foi $62,17\% \pm 9,88$ e infecção com *L. braziliensis* foi $75,36\% \pm 7,3$. No entanto, são necessários mais estudos, como bloqueio e desafio desta via para confirmação e melhor compreender esse mecanismo de sinalização.

Após o processo de reconhecimento e internalização do patógeno as DCs iniciam seu processo de maturação com expressão de CD83, condizente com nossos resultados que mostram aumento desta molécula na infecção e interação com as duas espécies estudadas. Dados da literatura mostram que BM-DCs de camundongos B6 e moDCs de humanos mostraram ter 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 (RE; CJ; ME, 2016). Dados com outros patógenos intracelulares também corroboram os resultados observados com relação a expressão de CD83 (AERTS-TOEGAERT *et al.*, 2007; HAILESELASSIE *et al.*, 2016).

A ativação de DCs resulta em mudanças altamente orquestradas na expressão de receptores de quimiocinas e, especificamente, a regulação positiva do receptor de quimiocina CCR7. Foi observado que essa regulação aumentada mostrou ser bastante importante para a migração de DCs para o linfonodo, em

particular, na infecção por *L. donovani* e *L. major* (KLING; DARBY; KÖRNER, 2014; OHL *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2019). Verificamos que os níveis de expressão de CCR7 em células infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum* aumentaram de forma bastante significativa comparados com as células não infectadas (Figura 14A). Portanto, nossos resultados mostraram ser condizentes com os descritos na literatura. Assim, podemos concluir que a infecção é necessária para induzir a maturação e a potencial migração das DCs nas nossas condições experimentais.

Embora as DCs expressem a glicoproteína de adesão CD62L em sua superfície, importante para o seu rolamento nas paredes de vasos sanguíneos até chegar no sítio de infecção e linfonodos (IVETIC; GREEN; HART, 2019), nossos resultados mostraram não houve aumento no nível de expressão em células infectadas com Leishmania.

Durante o processo de infecção com micro-organismos e substâncias infecciosas ou inflamatórias, as DC iniciam o processo de maturação que conta com aumento da expressão de moléculas da classe MHCII e dos co-estimuladores CD40, CD80 e CD86 assim como também, uma redução da capacidade fagocitária, aumento significativo da expressão de diferentes receptores de quimocinas e de citocinas. Nossos estudos mostraram que os níveis de CD80 aumentaram expressivamente (Figura 15 B). As DCs derivadas de medula óssea da linhagem de camundongos C57BL/6J infectadas com promastigotas metacíclicas de três espécies de *Leishmania*; *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. major* apresentaram uma redução expressiva de MHCII e CD86, para as três espécies de leishmania (PRINA *et al.*, 2004).

Em contraste, em nosso trabalho verificamos que não houve qualquer alteração expressiva nos níveis de CD86 em células infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* (Figura 15C). No entanto, estudos observaram que a expressão de CD40 foi significativamente maior em DC infectadas com *L. braziliensis* ou *L. major*, quando comparadas a células dendríticas não infectadas. Por outro lado, não houve alteração em células dendríticas infectadas com *L. amazonenses* (FALCÃO *et al.*, 2016). Da mesma forma pudemos verificar que não houve alteração da expressão de CD40 em células infectadas por

ambas as espécies de *Leishmania*; *L. braziliensis* e *L. infantum* (Figura 15A) comparadas com as células controles (DCs bystanders).

A modulação da resposta imune do hospedeiro pela leishmania como mecanismo de escape já é bastante discutida e evidenciada na literatura (DE MORAIS *et al.*, 2015; FALCÃO *et al.*, 2016; STEVERDING, 2017). Seguindo a linha de pesquisa e alguns trabalhos do grupo, bem como dados da literatura, nos chamou a atenção a via de supressão da resposta imune mediada por linfócitos T, induzida pelo aumento da expressão de moléculas inibidoras PD-L1. Assim, nossos resultados mostram aumento da expressão de PD-L1 principalmente nas DCs infectadas, mas também nas DCs em contato com o parasito (Figura 16).

Estudos em modelos murinos com *L. amazonensis*, também descrevem aumento na expressão de PD-1 e PD-L1 em área tecidual, que também aumentou a migração de DCs e linfócitos TCD4+ para os linfonodos drenantes. DCs derivadas da medula óssea, para esta via foram infectadas *in vitro* com promastigotas e amastigotas e também tiveram regulação positiva desta via (GUEDES; FONSECA-MARTINS, 2022). O aumento de PD-1 e PD-L1 em diferentes subconjuntos de monócitos e neutrófilos também foi observado em sangue periférico no diagnóstico de pacientes com LV, bem como o bloqueio da via aumentou produção de IFN- γ , mecanismo este já utilizado como alvo em terapias contra alguns tipos de tumores (DEVITO *et al.*, 2019; GARCIA DE MOURA *et al.*, 2021).

A avaliação de sangue periférico de um paciente infectado com *L. amazonensis*, mostrou um aumento na expressão de PD-L1 em monócitos após reestimulação *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). Tal evento poderia ter relação com a diminuição das funções de linfócitos T CD4, tais como a diminuição da secreção de IFN- γ , e em linfócitos T CD8, na inibição da produção de IFN- γ e Granzima-B (BARROSO *et al.*, 2018). O mesmo comportamento foi observado em macrófagos e DCs, derivados de monócitos humanos, uma vez que o bloqueio de PD-1 estimulou um aumento de TNF- α e IFN- γ bem como aumentou a proliferação de linfócitos T, com a aumento de granzima e perforina (FILIPPIS *et al.*, 2017). A evasão a resposta imune pelo

aumento de PD-L1 com indução de anergia dos linfócitos T ocorre pela competição com as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, impedindo sua ativação pelas DCs. Assim o bloqueio dessas vias inibitórias é bastante interessante para a terapia de neoplasias e também futuros estudos com pacientes não responsivos aos tratamentos para a leishmaniose (DEVITO *et al.*, 2019; GARCIA DE MOURA *et al.*, 2021)

Decidimos então avaliar se o bloqueio de PD-1 interferia na secreção de citocinas intracelulares, ativação e proliferação *in vitro* de linfócitos T autólogos, via de suma importância para resposta imune adaptativa.

A citotoxicidade mediada por liberação de citocinas, perforinas e granzimas é um importante mecanismo de eliminação de patógenos e células tumorais, entretanto o processo de inflamação aumentado acarreta a forma grave da doença mucocutânea com a presença de múltiplas lesões ulceradas. É interessante ressaltar que a carga parasitária nestas lesões é baixa, mostrando que os mecanismos de resposta inflamatória são determinantes nestas lesões, sendo assim, o controle desta citotoxicidade pode ser alvo terapêutico importante para o balanço da resposta imune e eliminação do parasito (MORGADO *et al.*, 2018). Estudos recentes mostram que a ativação do inflamassoma e a liberação de IL-1 β são de fato impulsionadas pela citotoxicidade das células T CD8+, em espécies murinas, a patologia induzida por células T CD8+ dependia do inflamassoma NLRP3 e da sinalização de IL-1 β , mostrando que o inflamassoma NLRP3 é importante para os altos níveis de IL-1 β presentes nas lesões de leishmaniose, ao inibir esta via o estudo mostrou possibilidades de tratamentos para controle da citotoxicidade (CARDOSO *et al.*, 2021; NOVAIS *et al.*, 2017).

Sendo assim, as células T CD4⁺ T CD8⁺ tem função fundamental na resposta Th1, produzindo IFN- γ , TNF- α e outras citocinas Th1 que são eficazes para controlar o crescimento do parasita (DE FREITAS E SILVA; VON STEBUT, 2021; GANNAVARAM *et al.*, 2016). Nossos resultados mostraram que o bloqueio de PD-1 nestes experimentos não interferiu nas expressões de CD107 (Figuras 18 e 19), granzima B nos linfócitos CD4⁺107⁺ e CD8⁺107⁺ que corrobora estes resultados, por outro lado o bloqueio da via PD-1 mostrou regular negativamente (Figura 22 e 23) a secreção de IFN modulando a resposta nas duas populações celulares.

O aumento da população CD4+Granzima+ (Figura 20) está de acordo com a literatura, enquanto em T CD8+ não houve alteração (Figura 21). Os linfócitos T CD4+ são as principais células produtoras de IFN- γ e TNF- α que ativam macrófagos para controle da replicação parasitária no início da infecção, atividades citotóxicas são relatadas em subconjuntos de T CD4+ em pacientes infectados por *L. major* e também em indivíduos assintomáticos para LC (EGUI *et al.*, 2018; NAOUAR *et al.*, 2014).

Por fim, nos perguntamos se o bloqueio *in vitro* de PD-1 interferia na expansão clonal dos linfócitos. Sabemos que este aumento no número de células efetoras é de suma importância para o sucesso do controle da infecção. Nossos dados mostram que o bloqueio aumenta a proliferação das duas populações de linfócitos, enquanto em células não bloqueadas não ocorre a proliferação *in vitro* (Figura 24 e 25).

Estudos com *L. donovani* em murinos mostram que o bloqueio *in vivo* da via PD1/PDL-1 com anticorpos anti-PDL-1 restaurou funções efetoras tanto em CD4⁺ quanto em CD8⁺, diminuindo a carga parasitária (HABIB *et al.*, 2021). As funções de PD-1 um receptor de morte programada são amplamente estudados em modelos de células tumorais (DEVITO *et al.*, 2019; SÁNCHEZ-PAULETE *et al.*, 2016; SHARPE; PAUKEN, 2018), mas requer mais estudos sobre sua relevância na leishmaniose imuno resistente. Um estudo interessante mostrou que *L. amazonensis* induziu expressão de PD-1 em células T CD4+ e CD8+ e PD-L1 de DCs murinas e o bloqueio por anticorpos monoclonais anti-PD-1 e anti-PD-L1 melhorou as respostas imunes, mostrando esta via como uma candidata promissora a imunoterapias (DA FONSECA-MARTINS *et al.*, 2019).

10. Conclusão

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que *L. braziliensis* e *L. infantum* tem capacidade de infectar células dendríticas derivadas de monócito *in vitro*, sem interferir no seu perfil de diferenciação, contudo na infecção as *Leishmanias* induzem o aumento da expressão de moléculas CD83 e CCR7, envolvidas no processo de maturação e migração em DCs, bem como causam uma diminuição na expressão da molécula DC-SIGN.

Conclui-se ainda que a infecção por estas espécies induzem aumento de PD-L1 em DCs podendo ser uma importante via de evasão da resposta imune. Além disso o bloqueio de PD-1 em LT regulou negativamente a expressão de IFN- γ bem como interferiu significativamente no aumento da proliferação *in vitro* destas células o que pode ser um promissor alvo terapêutico, especialmente nas formas anérgicas de Leishmaniose

11. Referências

AERTS-TOEGAERT, C. *et al.* CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 686–695, 2007.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 5, 2012.

ALVAREZ, C. P. *et al.* C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 76, n. 13, p. 6841–6844, 2002.

AMRAEI, R. *et al.* CD209L L-SIGN and CD209 DC-SIGN act as receptors for SARS-CoV-2 amraei. [s. l.], n. 617, 2021.

ANDRADE FILHO, J. D.; BRAZIL, R. P. Relationships of New World Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) Based on Fossil Evidence. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 98, n. SUPPL. 1, p. 145–149, 2003.

ANJILI, C. O. *et al.* The chemotactic effect of Phlebotomus duboscqi (diptera: psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 97–100, 1995. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0001706X9500112R>.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral Immunopathogenesis of Visceral Leishmaniasis. **Gazeta Médica da Bahia**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 24–34, 2005.

BALAN, S.; SAXENA, M.; BHARDWAJ, N. Dendritic cell subsets and locations. **International Review of Cell and Molecular Biology**, [s. l.], v. 348, p. 1–68, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.07.004>.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. [s. l.], v. 392, n. March, p. 245–252, 1998.

BARREIRO, L. B. *et al.* DC-SIGN Interacts with Mycobacterium leprae but Sequence Variation in This Lectin Is Not Associated with Leprosy in the Pakistani Population. **Human Immunology**, [s. l.], v. 67, n. 1–2, p. 102–107, 2006.

BARROSO, D. H. *et al.* PD-L1 May Mediate T-Cell Exhaustion in a Case of Early Diffuse Leishmaniasis Caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, n. MAY, p. 1–7, 2018.

BARTEE, M. Y.; DRYJA, P. C.; BARTEE, E. Chimeric tumor modeling reveals role of partial PDL1 expression in resistance to virally induced immunotherapy. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–8, 2019.

BATISTA, F.; HARWOOD, N. Antigen presentation to B cells. **F1000 Biology Reports**, [s. l.], v. 2, n. December, p. 3–7, 2010. Disponível em: <http://www.f1000.com/reports/b/2/87>.

BLACKWELL, J. M.; FAKIOLA, M.; CASTELLUCCI, L. C. Human genetics of leishmania infections. **Human Genetics**, [s. l.], v. 139, n. 6–7, p. 813–819, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02130-w>.

BOYETTE, L. B. *et al.* Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. **PLoS one**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. e0176460, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28445506>.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DISTRITO FEDERAL [s. l.], v. 52, 2022.

BUNN, P. T. *et al.* Distinct Roles for CD4 + Foxp3 + Regulatory T Cells and IL-10–Mediated Immunoregulatory Mechanisms during Experimental Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 201, n. 11, p. 3362–3372, 2018.

CAMARGO, R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection down-modulates the immunoproteasome biosynthesis and the MHC class I cell surface expression in HeLa cells. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1–12, 2014.

CAMERON, P. U. *et al.* Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. **Science**, [s. l.], v. 257, n. 5068, p. 383–387, 1992.

CAPARRÓS, E. *et al.* Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. **Immunobiology**, [s. l.], v. 210, n. 2–4, p. 185–193, 2005.

CARDOSO, T. M. *et al.* Inflammasome Activation by CD8+ T Cells from Patients

with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in the Immunopathogenesis of the Disease. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 141, n. 1, p. 209-213.e2, 2021.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

CHEN, G. *et al.* Associated with anti-PD-1 Response. [s. l.], v. 560, n. 7718, p. 382–386, 2019.

COLMENARES, M. *et al.* 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*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 39, p. 36766–36769, 2002.

COOPER, A. M. *et al.* T-cell responses to infected autologous monocytes in patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 304–309, 1994.

COUTANT, F.; PIN, J. J.; MIOSSEC, P. Extensive phenotype of human inflammatory monocyte-derived dendritic cells. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 14–19, 2021.

DA FONSECA-MARTINS, A. M. *et al.* Immunotherapy using anti-PD-1 and anti-PD-L1 in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice reduce parasite load. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

DE FREITAS E SILVA, R.; VON STEBUT, E. Unraveling the Role of Immune Checkpoints in Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. March, p. 1–15, 2021.

DE MORAIS, C. G. V. *et al.* The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, 2015.

DEVITO, N. C. *et al.* Role of Tumor-Mediated Dendritic Cell Tolerization in Immune Evasion. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. December, p. 1–14, 2019.

DIEU, M. C. *et al.* Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 188, n. 2, p. 373–386, 1998.

EGUI, A. *et al.* Phenotypic and Functional Profiles of Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells Associated With Infection Control in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. November, p. 1–15, 2018.

ERDOGDU, I. H. MHC class 1 and PDL-1 status of primary tumor and lymph node metastatic tumor tissue in gastric cancers. **Gastroenterology Research and Practice**, [s. l.], v. 2019, 2019.

FALCÃO, S. de A. C. *et al.* Leishmania infantum and Leishmania braziliensis: Differences and similarities to evade the innate immune system. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 7, n. AUG, p. 1–10, 2016.

FAVALI, C. *et al.* Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **Journal of leukocyte biology**, [s. l.], v. 82, n. 6, p. 1401–1406, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17890507>.

FENWICK, C. *et al.* Tumor suppression of novel anti-PD-1 antibodies mediated through CD28 costimulatory pathway. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 216, n. 7, p. 1525–1541, 2019.

FERLAZZO, G.; MORANDI, B. Cross-talks between natural killer cells and distinct subsets of dendritic cells. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 5, n. APR, p. 1–7, 2014.

FILIPPIS, C. *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. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 8, n. DEC, p. 1–12, 2017.

FONTENEAU, J. F. *et al.* Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. **Blood**, [s. l.], v. 102, n. 13, p. 4448–4455, 2003.

FORMATION, B. *et al.* Leishmania amazonensis infection impairs differentiation

and function of human dendritic cells. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1–21, 2017. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1002598>.

GANNAVARAM, S. *et al.* Modulation of innate immune mechanisms to enhance Leishmania vaccine-induced immunity: Role of coinhibitory molecules. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 7, n. MAY, p. 1–10, 2016.

GARCIA DE MOURA, R. *et al.* PD-1 Blockade Modulates Functional Activities of Exhausted-Like T Cell in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. March, p. 1–12, 2021.

GAUTAM, S. *et al.* CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 209, n. 2, p. 290–299, 2014.

GEGINAT, J. *et al.* Immunity to pathogens taught by specialized human dendritic cell subsets. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 6, n. OCT, p. 1–13, 2015.

GOGOI, M. *et al.* Salmonella escapes antigen presentation through K63 ubiquitination mediated endosomal proteolysis of MHC II via modulation of endosomal acidification in dendritic cells. **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 76, n. 2, 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/femspd/article/doi/10.1093/femspd/ftx125/4775126>.

GUEDES, H. L. D. M.; FONSECA-MARTINS, A. M. #,1,2,3 ,. [s. l.], 2022.

HABIB, S. *et al.* Leishmania donovani: Immune response and immune evasion with emphasis on PD-1/PDL-1 pathway and role of autophagy. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 195–208, 2021.

HAILESELASSIE, Y. *et al.* Lactobacillus reuteri and Staphylococcus aureus differentially influence the generation of monocyte-derived dendritic cells and subsequent autologous T cell responses. **Immunity, inflammation and disease**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 315–326, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27621814> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5004286>.

HARRISON, O. J. *et al.* Dendritic Cells : Arbiters of Immunity and Immunological Tolerance Dendritic Cells : Arbiters of Immunity and. [s. l.], 2012.

IVETIC, A.; GREEN, H. L. H.; HART, S. J. L-selectin: A major regulator of leukocyte adhesion, migration and signaling. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. MAY, p. 1–22, 2019.

KAUFER, A. *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–17, 2017.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>.

KILLICK-KENDRICK, R. *et al.* Metacyclic promastigotes of *Leishmania* in the salivary glands of experimentally infected phlebotomine sandflies. **Parasite**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 55–60, 1996.

KLING, J. C.; DARBY, J.; KÖRNER, H. CCR7 facilitates the pro-inflammatory function of dendritic cells in experimental leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 177–185, 2014.

KUHN, S.; YANG, J.; RONCHESE, F. Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Essential for CD8+ T Cell Activation and Antitumor Responses After Local Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 6, n. November, p. 1–14, 2015. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00584/abstract>.

LAINSON, R.; RANGEL, B. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

LEISHMAN, B. Y.; ROSS, B. M. R. 1903.1. [s. l.], 1903.

LEISHMANIOSE VISCERAL: O QUE É, CAUSAS, SINTOMAS, TRATAMENTO, DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 8 ago. 2020.

LEITE DE SOUSA-GOMES, M.; ROMERO, G. A. S.; WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough?. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 1–13, 2017.

LYSENKO, A. J. Distribution of leishmaniasis in the Old World. **Bulletin of the World Health Organization**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 515–520, 1971.

MEIRA, C. dos S.; GEDAMU, L. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. **Microorganisms**, [s. l.], v. 7, n. 12, 2019.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, [s. l.], v. 389, n. 10066, p. 312–325, 2017. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30171-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30171-4).

MORGADO, F. N. *et al.* Unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and worsen skin infectious diseases - A comparative study of leishmaniasis and sporotrichosis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

NAOUAR, I. *et al.* Involvement of different CD4+ T cell subsets producing granzyme B in the immune response to *Leishmania major* antigens. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2014, 2014.

NOVAIS, F. O. *et al.* CD8+T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 1–21, 2017.

OHL, L. *et al.* CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. **Immunity**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 279–288, 2004.

OPAS, O. Situação epidemiológica Leishmaniose cutânea e mucosa. [s. l.], p. 10, 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **OPAS/OMS Brasil - Cooperação entre países para o desenvolvimento da Saúde**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=481:cooperacao-entre-paises-para-o-desenvolvimento-da-saude&Itemid=608.

Acesso em: 26 abr. 2018.

ORGANIZACIÓN; REGIONAL, P.; MIEMBROS, E. Informe epidemiológico de las Américas. [s. l.], p. 1–12, 2022. Disponível em:

https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56833/OPASCDEVT220021_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

PAHO. Leishmanioses: Informe epidemiológico das américas. **Organização Pan-americana da Saúde - OPAS/OMS**, [s. l.], v. 6, p. 7, 2018. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5&isAllowed=y.

POMEROY, B. *et al.* Monocyte-derived dendritic cells from late gestation cows have an impaired ability to mature in response to E. coli stimulation in a receptor and cytokine-mediated fashion. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 167, n. 1–2, p. 22–29, 2015.

PRATES, D. B. *et al.* Lutzomyia longipalpis saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 90, n. 3, p. 575–582, 2011.

PREZA, G. C. *et al.* Antigen-presenting cell candidates for HIV-1 transmission in human distal colonic mucosa defined by CD207 dendritic cells and CD209 macrophages. **AIDS Research and Human Retroviruses**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 241–249, 2014.

PRINA, E. *et al.* 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. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 117, n. 2, p. 315–325, 2004.

RANDOLPH, G. J.; ANGELI, V.; SWARTZ, M. a. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 617–628, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056255>.

RE, D.; CJ, T.; ME, W. Infection and Activation of Human Neutrophils with Fluorescent Leishmania infantum. **Journal of Immunological Techniques in Infectious Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 3, 2016.

REGIONAL, P.; MEMBROS, E. Informe epidemiológico das Américas. [s. l.], p. 1–12, 2022.

REVIEW, S. 3 [4 +1. [s. l.], v. 00, n. 00, p. 2–5, 2015.

SAID, A.; WEINDL, G. Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation. **Journal of Immunology Research**, [s. l.], v. 2015, 2015.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, 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 alpha. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 179, n. 4, p. 1109–1118, 1994.

SAMARANAYAKE, N. *et al.* Association of HLA class I and II genes with cutaneous leishmaniasis: A case control study from Sri Lanka and a systematic review. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1626-8>.

SÁNCHEZ-PAULETE, A. R. *et al.* Cancer immunotherapy with immunomodulatory anti-CD137 and anti-PD-1 monoclonal antibodies requires BATF3-dependent dendritic cells. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 71–79, 2016.

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

SETH, S. *et al.* CCR7 Essentially Contributes to the Homing of Plasmacytoid Dendritic Cells to Lymph Nodes under Steady-State As Well As Inflammatory Conditions. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 186, n. 6, p. 3364–3372, 2011. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1002598>.

SHARPE, A. H.; PAUKEN, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 153–167, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.108>.

SOOSARAEI, M. *et al.* A decade bibliometric analysis of global research on leishmaniasis in Web of Science database. **Annals of Medicine and Surgery**, [s. l.], v. 26, n. November 2017, p. 30–37, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2017.12.014>.

STEINMAN, Ralph M. Dendritic cells : versatile controllers of the immune system. [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1155–1159, 2007.

STEINMAN, Ralph M. Dendritic cells: Understanding immunogenicity. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 37, n. SUPPL. 1, p. 53–60, 2007.

STEINMAN, R. M. The control of immunity and tolerance by dendritic cells. **Pathologie Biologie**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 59–60, 2003.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. a. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 137, n. 5, p. 1142–1162, 1973.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

TIBERIO, L. *et al.* Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration review-article. **Cellular and Molecular Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 4, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-018-0005-3>.

VAN GRIENSVEN, J. *et al.* Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 286–299, 2014.

VOLF, P.; VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology**, [s. l.], v. 36, n. SUPPL.1, p. 1–9, 2011.

ZHAO, Y. *et al.* The effects of CCR7 and related signaling pathways on *Leishmania major* -infected human dendritic cells. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 234, n. 8, p. 13145–13156, 2019.

12. Apêndices

12.1 Autorização comitê de ética em pesquisas em seres humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 072/2009.

Título: “Infecção de células dendríticas humanas por Leishmania Brasiliensis e ativação da resposta de Linfócitos T CD8+”.

Pesquisador Responsável: Cecília Beatriz Fiúza Favali.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 27/08/2009.

Proposição do (a) relato (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 22/09/2009.

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 19/10/2009.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** “*ad referendum*”, conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 22 de Outubro de 2009.


Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UNB

12.2 Artigo científico que será submetido para publicação

Via inibitória PD-1 PD-L1 na resposta imune humana a *Leishmania spp*

Elane Priscila Maciel^{1,2}, Lucas Caxangá^{1,2}, Giulia Lopes^{1,2}, Sarah de Athayde Couto Falcão^{1,2}, Cecília Beatriz Fiuza Favali^{1,2}

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

²Pós Graduação em Medicina Tropical, Núcleo de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

Correspondence

Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

Email: cfavali@unb.br

Abstract

Leishmania braziliensis causes a proinflammatory disease, with localized lesions and a possible mucosal commitment. On the other hand, *Leishmania infantum* is involved in the visceral form, with a specific cellular response anergy. Previous data from our group showed that DC-SIGN expression in moDCs (monocytes derived Dendritic Cells) was decreased after *L. braziliensis* and *L. infantum* infection, probably compromising DC function and T cell activation, as a parasite scape mechanism. Besides that, parasites can induce inhibitory molecules that also could be involved in T cell anergy. METHODS This research focused the PD1-PDL1 pathway in human moDCs infected with *L. braziliensis* or *L. infantum*, studying cell surface molecules expression as well as antibodies to block PD1-PDL1 pathway. This study was approved by the faculty ethics commission (CEP/FM/UnB - CAAE 33062720.6.0000.5558). RESULTS Infection rate measured with optical microscopy was 76% (± 8.83) for *L. infantum*, while for *L. braziliensis* it was 50% (± 10.97). When determined by flow cytometry, infection rate was 69.05% (± 4.56) for *L. infantum* and 35.25% (± 5.56) for *L. braziliensis*. Was observed a down modulation of DC-SIGN on DCs bystanders (non-infected cells from the same well where *Leishmania* was added) for *L. infantum* (64,95% $\pm 9,36$) and *L. braziliensis* (72,4% $\pm 1,71$), compared to control DCs (84,70% $\pm 5,07$). We also observed an increase on PDL1 in DCs infected with *L. braziliensis* (99,55% $\pm 19,06$) or bystanders (86,85% $\pm 22,24$) as well as for DC infected with *L. infantum* (99,6% $\pm 0,41$) or bystander DCs (86,40% $\pm 7,96$). By blocking cell co-culture with anti-PDL1, IFN-g production from CD4 cells, raised from 1,94 ($\pm 0,91$) in *L. braziliensis* infected DCs to 8,16% ($\pm 4,33$) when anti-PD-1 was used. The same effect was observed for *L. infantum* with an increase from 1,79 % ($\pm 1,18$) to 5,38 ($\pm 3,69$) when PD1-PDL1 pathway was blocked. For CD8 T cells IFN-g raised from 7,38 ($\pm 2,34$) in *L. braziliensis* infection to 21,40 ($\pm 7,47$) by blocking PD1-PDL1. The same effect was also observed for *L. infantum* infection, with 5,97 ($\pm 1,66$) CD8+IFN+ cells and upregulating to 14 ($\pm 4,53$) by blocking PD1-PDL1. CONCLUSIONS *L. braziliensis* and *L. infantum* infection, increased the expression of PD1 on moDCs, probably impairing T cell IFN-g production that could control parasites spread.

Keywords: Leishmania, dendritic cells, PD1-PDL-1

1. Introdução

As leishmanioses formam um grupo de doenças zoonóticas, ocasionadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e a transmissão aos seres humanos se dá pela picada da fêmea do flebotomíneo infectada. (LEISHMAN; ROSS, 1903; LYSENKO, 1971; SOOSARAEI *et al.*, 2018). As principais formas da doença são a leishmaniose visceral (LV), leishmaniose tegumentar (LT) que se subdivide em leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC) e a forma cutânea difusa (LCD), uma forma rara. A forma cutânea é a mais incidente e branda, ao passo que a forma visceral é mais grave e com alta letalidade, quando não tratada (KAYE; SCOTT, 2011; VOLFF; VOLFOVA, 2011).

A OMS estima que anualmente ocorram 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LC ocorram anualmente, embora apenas uma pequena fração dos infectados podem vir a desenvolver a doença (WHO, 2023). O Brasil continua entre os países com maior registro de casos, juntamente com a zona andina na Colômbia que registraram um total de 896.790 casos, com destaque para redução nestes últimos 5 anos entre 2017 e 2021. Houve nos últimos 5 anos (2017-2021), a redução dos casos globais de LC e LM de 24% deve-se principalmente à diminuição de 14,3%, 20,5%, 71,2% e 21,6% observados respectivamente no Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (ORGANIZACI; REGIONAL; MIEMBROS, 2022). O Brasil, continua compondo um grupo de países, que concentram 90% dos casos da doença globalmente (REGIONAL; MEMBROS, 2022).

L. infantum está associada a LV humana nas Américas, aumentando sua gravidade em indivíduos imunocomprometidos e crianças (BACELLAR; CARVALHO, 2005). Um comprometimento da resposta imune celular diminui a ativação de macrófagos, por meio de aumento de produção de IL-10 e de células T regulatórias, o que acarreta na disseminação do parasito para medula óssea e fígado. A LV possui como característica uma significativa diminuição da resposta imune celular ao antígeno de leishmania. Nos indivíduos infectados, o teste de hipersensibilidade tardia (DTH) para o antígeno (teste de Montenegro) é negativo e as células mononucleares do sangue periférico não produzem IL-2, IFN- γ e IL-12 quando são estimuladas *in vitro*, com o antígeno de leishmania (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Uma resposta imune protetora depende de linfócitos T auxiliares do tipo I (Th1) caracterizada pela produção de IFN- γ e, conseqüente ativação dos macrófagos infectados para eliminação do parasito (MEIRA; GEDAMU, 2019). Por outro lado, não

havendo regulação adequada, esta resposta pode auxiliar na patogênese da doença, causando lesão tecidual, fato que evidencia a característica peculiar de polaridade da doença. (KAYE; SCOTT, 2011; MORGADO *et al.*, 2018; SCOTT; NOVAIS, 2016).

As células apresentadoras de antígenos (APCs), com destaque para as células dendríticas (DCs), desempenham papel crucial na ativação da resposta imune inata e adaptativa. Originárias da medula óssea, as DCs se diferenciam em linhagens mieloides e linfoides. As DCs convencionais, desempenham papel na resposta a infecções, enquanto as plasmocitóides, produzem citocinas antivirais em resposta a infecções virais. As DCs derivadas de monócitos (moDCs) podem ser obtidas pelo uso de citocinas recombinantes em protocolos *in vitro*. (BOYETTE *et al.*, 2017; FONTENEAU *et al.*, 2003; STEINMAN, Ralph M., 2007).

As DCs imaturas estão em constante movimento pelos tecidos periféricos e quando entram em contato com um microrganismo e reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são ativadas, em seguida diminuem a sua capacidade de fagocitose aumentando a expressão de MHC de classe I e II, assim como as moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80, CD83 e CD86 (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; HARRISON *et al.*, 2012). Em seguida, diferentes quimiocinas e citocinas também são produzidas, recrutando células e apresentando um papel essencial na ativação de células T. (AERTS-TOEGAERT *et al.*, 2007; KUHN; YANG; RONCHESE, 2015; SAID; WEINDL, 2015).

É possível que o parasito regule a biologia de DCs ou moDCs para que possa escapar do sistema imune e se estabelecer mais facilmente no organismo do hospedeiro. Nesse sentido, dados da literatura demonstram que DCs humanas derivadas de monócitos tiveram sua diferenciação impedida por *L. amazonensis*, contribuindo para o sucesso da infecção (FAVALI *et al.*, 2007). Além disso, DCs humanas de doadores saudáveis infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum*, mostraram um aumento da expressão de CD86 e a diminuição da expressão de CD209 (FALCÃO *et al.*, 2016). A molécula CD209 (DC-SIGN), nas DCs, por sua vez, está envolvida no reconhecimento das formas promastigotas e amastigotas axênicas das espécies *L. infantum* e *L. pifanoi* (CAPARRÓS *et al.*, 2005).

Além disso, dados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que *Leishmania* regula positivamente a expressão da proteína 1 de morte celular (PD-1, *programmed death protein-1*) e do ligante à PD-1 (PD-L1 ou CD274), uma molécula inibitória capaz de levar linfócitos a exaustão ou anergia (BARROSO *et al.*, 2018; DA FONSECA-MARTINS *et al.*, 2019). Assim, a interação do PD-1 com seus ligantes, em particular o PD-L1, pode permitir que a *Leishmania* escape da eliminação pelo sistema imunológico do hospedeiro e inicie a infecção crônica. Alguns autores relatam infecções

persistentes por *Leishmania*, que causam uma resposta disfuncional das células T CD8, o que tem implicação na sobrevivência e replicação do patógeno

Estes dados sugerem que diferentes espécies de *Leishmania* induziriam um aumento da expressão de moléculas inibidoras nas DCs infectadas, impedindo a ativação de linfócitos. Assim, este trabalho visa esclarecer se há modulação da expressão da molécula inibitória PD-L1 em DCs infectadas por diferentes espécies de *Leishmania* e se essa modulação interfere na ativação dos linfócitos T CD4+ e T CD8+

2. Resultados e discussão

2.1 Resultados

12.1. Caracterização morfológica e taxa de infecção das células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos

Após os 7 dias de cultura, foi feita a avaliação da diferenciação dos monócitos MOs em DCs, células foram ajustadas por tamanho e granulosidade e avaliadas as expressões de CD1a e CD11c. Dessas, 99,3% marcaram duplo positivas, sendo CD1a+CD11c+, ou seja, são DCs (Figura 1).

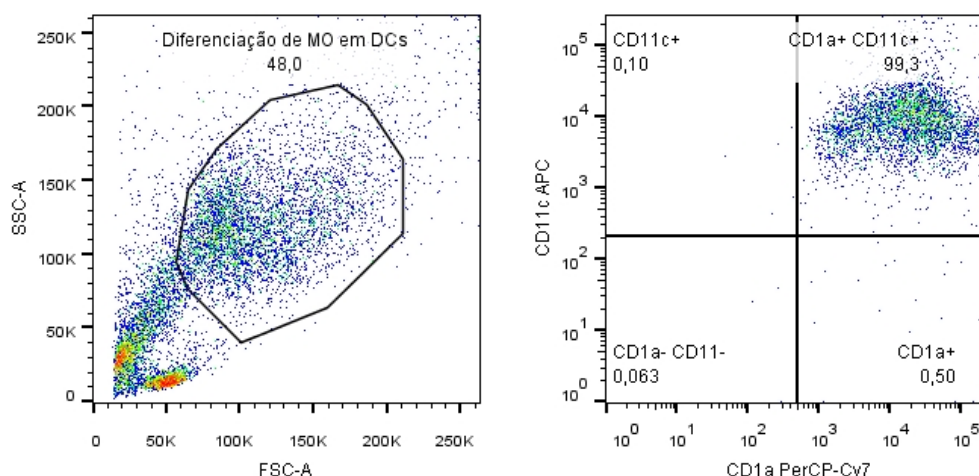


Figura 1. Análise representativa da diferenciação de DCs a partir de monócitos. Expressão de CD1a⁺ e CD11c⁺, em células dendríticas (CD1a⁺CD11c⁺) obtidas a partir de monócitos humanos. n=5

As DCs foram então quantificadas e distribuídas em placas de 24 poços para realização da infecção com proporção 10:1 leishmania:DCs. Após 24h foi avaliado em microscopia óptica (Figura 2).

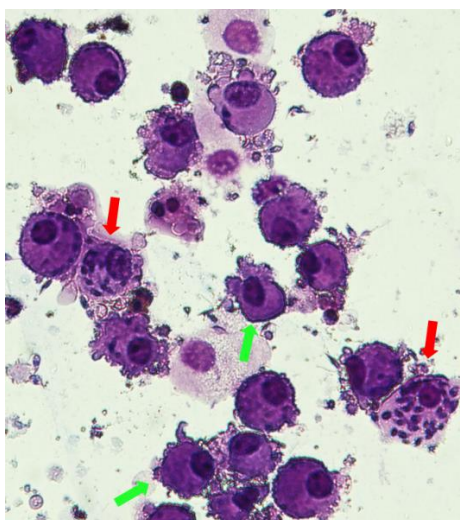


Figura 2. Imagem representativa de DCs infectadas. As DCs foram fixadas nas lâminas por citocentrifugação após 24h de infecção por *Leishmania infantum*. DCs não infectadas sinalizadas pela seta verde e as infectadas pelas setas vermelhas. Aumento de 100x com coloração HE. n=3

A taxa de infecção (Figura 3) por *Leishmania infantum* foi de (76% +/-8,83), sendo maior que a encontrada para *Leishmania braziliensis* (50,00% +/-10,97). Este comportamento repete-se na quantificação de amastigotas (Figura 3). A carga parasitária para *Leishmania infantum* foi de (403,00% +/-164,60) por 100 células, enquanto que para *Leishmania braziliensis* o valor estava reduzido (140,00% +/-213,80). Assim, observou-se que as duas espécies tiveram capacidade de infecção, porém com uma maior carga parasitária para *L.infantum* em comparação à *L. braziliensis* (Figura 4).

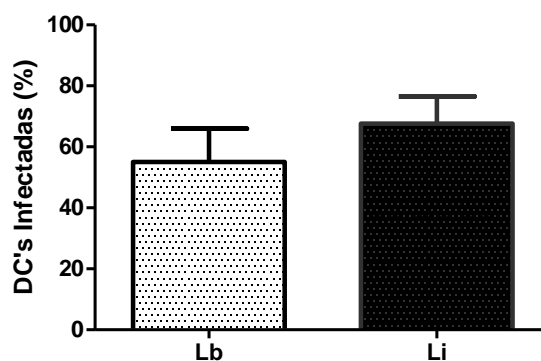


Figura 3. Taxa de infecção em células dendríticas infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum*. DCs derivadas de MO foram infectadas por *L. braziliensis* (Lb) e *L. infantum* (Li)

previamente marcadas com CFSE. Após 24 horas de infecção, as lâminas foram coradas com H&E e contadas por dois observadores para determinar a porcentagem de DCs infectadas. n= 3

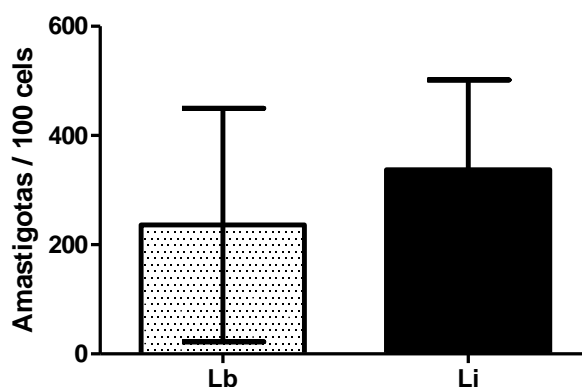


Figura 4. Número de amastigotas em células dendríticas infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum*. Número de amastigotas contadas por dois avaliadores por microscopia óptica, em aumento de 100x, por 100 DCs.

Concomitantemente, foi determinada a taxa de infecção por citometria de fluxo, utilizando as *Leishmanias* previamente coradas com CFSE, e medidas as taxas de infecção por porcentagem de DCs positivas para o marcador. Esta metodologia mostrou uma diferença significativa entre taxas de infecção das espécies *Leishmania infantum* (69,05 +/-4,56) e *Leishmania braziliensis* (38,25% +/-5,56) (Figura 5).

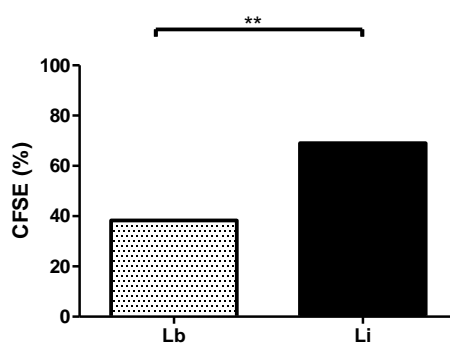


Figura 5. Taxa de infecção em células dendríticas por citometria de fluxo de *L. braziliensis* ou *L. infantum*. DCs foram infectadas com leishmanias previamente marcadas com CFSE. Após 24 de infecção foi avaliada a porcentagem de DCs positivas para CFSE. (**p<0,01) n=3

12.2. Caracterização de DCs infectadas e *bystanders*

As leishmanias foram previamente marcadas com CFSE para a realização dos experimentos de co-cultura com DCs. As DCs foram classificadas entre CFSE+ (infectadas) e CFSE- (não infectadas ou “*bystander*”).

Na figura representativa (Figura 6) as DCs (70,8%) em co-cultura com a *leishmania* mostraram que 53,7% foram infectadas e 43,8% não. Então foi analisada a expressão da molécula CD86 das DCs *bystander* (98,4%), e DCs infectadas (99,9%).

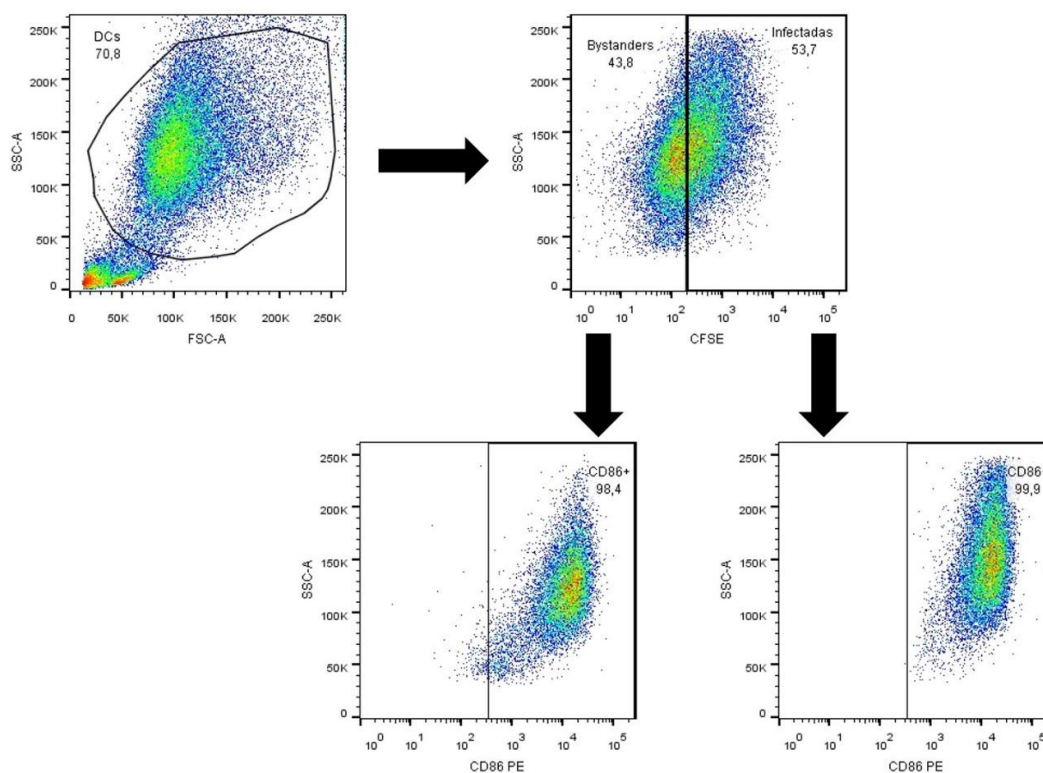


Figura 6: Estratégia de análise para caracterização fenotípica de DCs *bystanders* e infectadas. DCs infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum* previamente marcadas com CFSE, foram selecionadas por tamanho e granulosidade, separadas por expressão de CFSE para DCs infectadas e CD86+ para DCs *bystander*. Dados representativos de um indivíduo/voluntário.

12.3. Caracterização de CD1a+CD11c+ e HLA-DR de DCs *bystanders* após infecção por *Leishmania*.

Partindo da estratégia de seleção do tamanho e granulosidade, as células agora foram separadas em infectadas (com marcação de CFSE) e *bystanders* ou não infectadas (não marcadas com CFSE), a fim de comparar os achados entre as células que foram infectadas pela leishmania e as que permaneceram não infectadas, mesmo com a presença do parasito na cultura. As medianas de CD1a+ mantiveram-se

próximas para todas as condições experimentais, CP 79,6 (+/-6,82), *L. braziliensis bystanders* 81,00 (+/-21,65), *L. braziliensis* infectada 77,00 (+/-16,26), *L. infantum bystanders* 78,95 (+/- 8,56), *L. infantum* infectada 74,70 (+/-14,51) (Figura 7 A). A expressão de CD11c+ (Figura 12B) também não mostrou diferenças entre DCs infectadas com Lb 99,85 (+/- 0,04) e com *L. infantum* 99,30 (+/- 0,26), nem nas DCs em contato, *L. braziliensis bystanders* 98,10 (+/- 3,23) e *L. infantum bystanders* 97,80 (+/- 1,22), bem como nas DCs controles 98,75 (+/- 0,18). A alta expressão de HLA-DR, característico de DCs também foi observada, não havendo modulação da mesma. (Figura 7C), pois verifica-se uma mediana de 99,15 (+/- 0,52) para CN, 98,80 (+/- 0,60) nas *L. braziliensis bystanders* 98,80 (+/- 0,60), *L. braziliensis* infectadas 98,85 (+/- 0,16), *L. infantum bystanders* 97,15 (+/- 0,49) e *L. infantum* infectadas 99,80 (+/- 0,17). Com isto, podemos concluir que a expressão das moléculas de superfície relacionadas à apresentação de antígenos permanece inalterada tanto nas células infectadas quanto nas não infectadas.

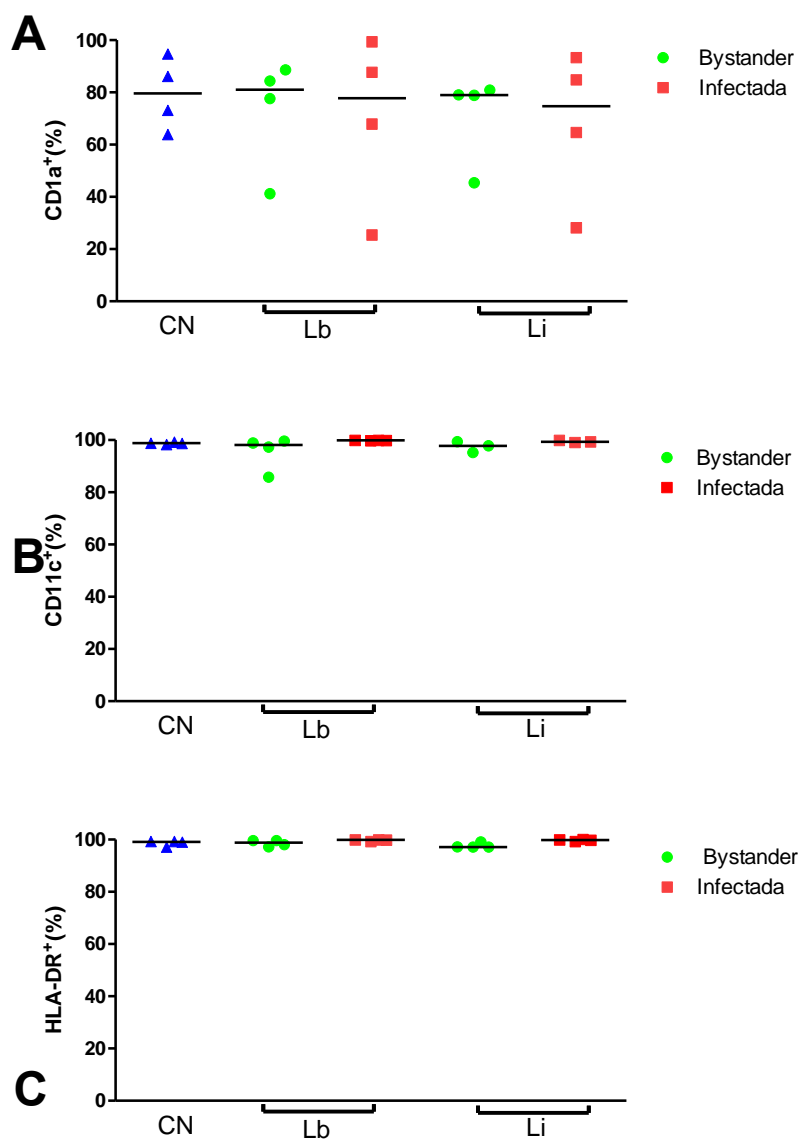


Figura 7. Expressão de CD1a, CD11c e HLA_DR em DCs bystanders e infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum*. (A) porcentagem da expressão de CD1a+ em células infectadas e não infectadas. (B) porcentagem da expressão de CD11c+ em células infectadas e não infectadas. (C) porcentagem da expressão de HLA-DR+ em células infectadas e não infectadas, comparando os grupos controle negativo (CN), DCs bystander na interação com *L. braziliensis* (Lb bystander), DCs infectadas por *L. braziliensis* (Lb infectada), DCs bystander na interação com *L. infantum* (Li bystander) e por fim DCs infectadas com *L. infantum* (Li infectada). n=4

12.4. Expressão de moléculas relacionadas a fagocitose, maturação e migração em DCs bystanders pós infecção por *Leishmania*.

Observamos uma diminuição na expressão de CD209 (DC-SIGN), um receptor de superfície provavelmente relacionado ao processo de fagocitose. Ao medirmos a molécula CD209 em DCs, notamos uma menor expressão tanto em *L. braziliensis bystanders* (72,4 +/-1,71) quanto em *L. infantum bystanders* (64,95 +/-9,36) (Figura 8 A) ao compararmos com as células infectadas, sendo 84,85 (+/-4,31) em *L. braziliensis* infectada e 86,20 (+/-3,77) em *L. infantum* infectada, ficando o CN com 84,70 (+/-5,07).

Quanto ao processo de maturação das DCs, verificamos uma alta expressão de CD83 com medianas de 76,95 (+/-12,26) em células infectadas por *L. braziliensis* e 85,20 (+/-17,3) em células infectadas por *L. infantum*. A expressão de CD83 foi baixa no CN, sendo 12,90 (+/-5,48) e também nas células *bystanders*, com uma expressão de 21,35 (+/-6,15) na condição *L. braziliensis bystanders* e 31,70 (+/-8,31) em *L. infantum bystanders* (Figura 8 B).

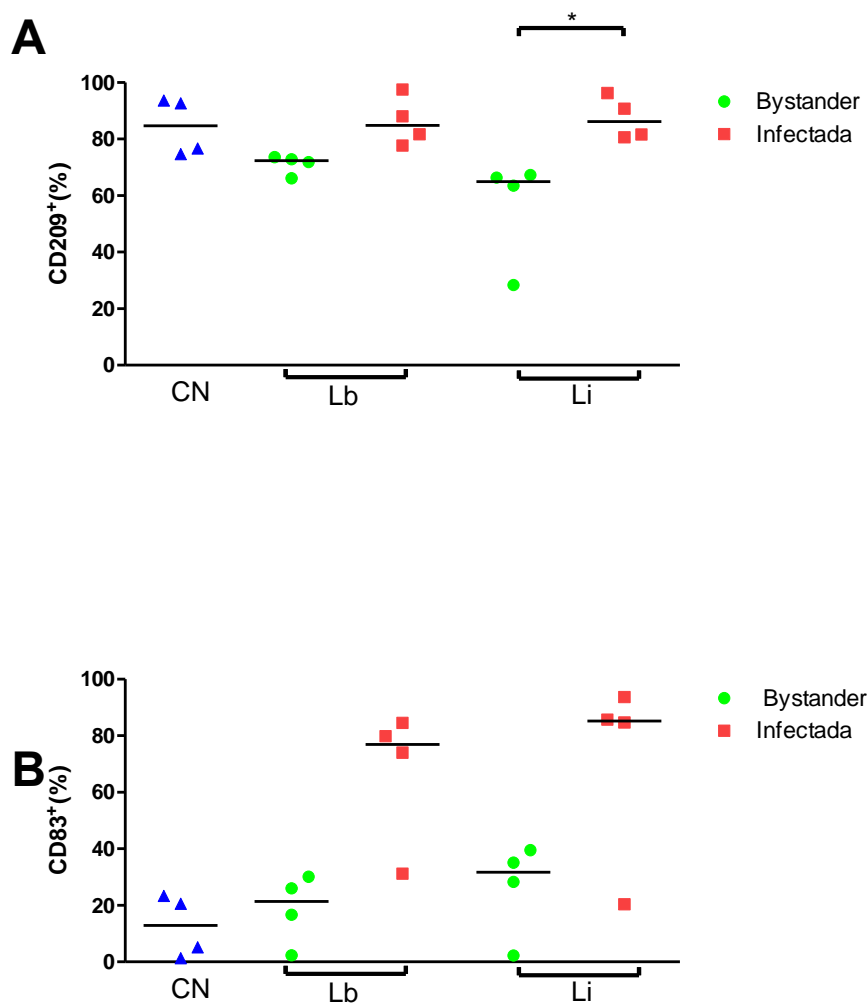


Figura 8. Expressão de CD209 e CD83+ em DCs *bystanders* e infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum*. (A) porcentagem da expressão de CD209 em células infectadas e não

infectadas. (B) porcentagem da expressão de CD83⁺ em células infectadas e não infectadas comparando os grupos controle negativo (CN), DCs bystander na interação com *L. braziliensis* (Lb bystander), DCs infectadas por *L. braziliensis* (Lb infectada), DCs bystander na interação com *L. infantum* (Li bystander) e por fim DCs infectadas com *L. infantum* (Li infectada). (*p<0,05) . n= 4

Para a molécula CCR7 verificamos que a infecção estimulou um aumento na expressão (Figura 9A). A expressão no controle negativo foi de 0,67 (+/-0,26) enquanto nas células infectadas por *L. braziliensis* foi de 68,85 +/-7,79 e infectadas por *L. infantum* 65,25 +/-12,46. Os valores permaneceram semelhantes ao controle negativo em células *L. braziliensis* bystanders 0,98 (+/-0,37) e *L. infantum* bystanders 0,97 (+/-2,00). Assim, podemos concluir que a infecção é necessária para induzir a maturação e a potencial migração das DCs nas nossas condições experimentais.

Por sua vez, a expressão de de CD62L foi de 51,85 (+/-17,22) no CN, 27,50 (+/-14,85) sendo mais baixa em *L. braziliensis* bystanders, 11,96 (+/-17,86) em *L. infantum* bystanders. A infecção com Lb aumentou a expressão de CD62L para 47,65 (+/-17,10) e com *L. infantum* permaneceu semelhante ao CN com valores de 31,60 (+/-18,35) (Figura 9 B).

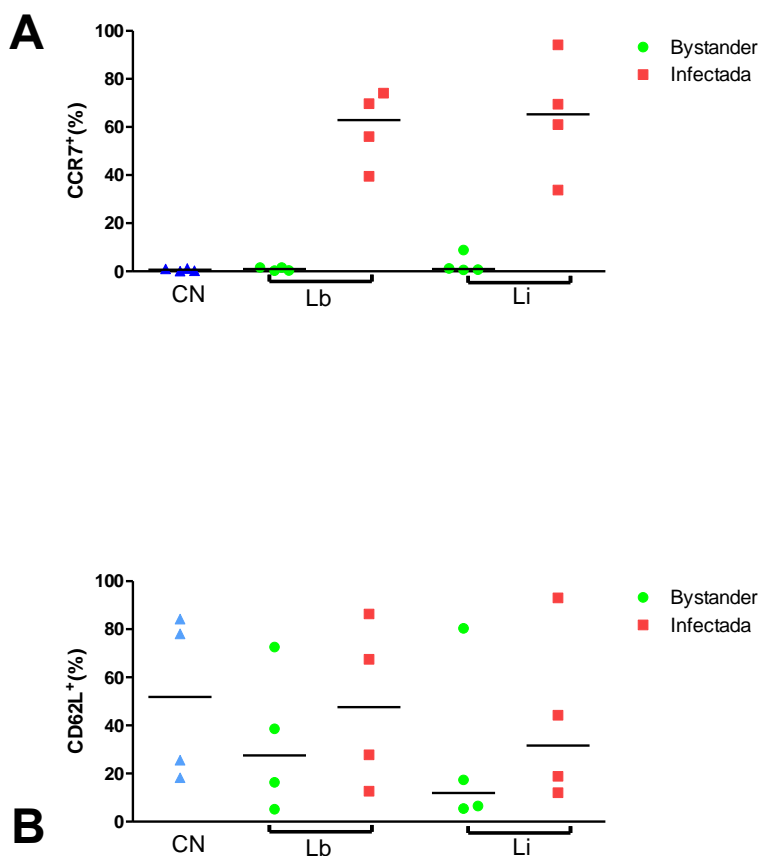


Figura 9. Expressão de CCR7+ e CD62L em DCs bystanders e infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum*. (A) porcentagem da expressão de CCR7+ em células infectadas e não infectadas e (B) porcentagem da expressão de CD62L em células infectadas e não infectadas comparando os grupos controle negativo (CN), DCs bystander na interação 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). n= 4

12.5. Perfil de moléculas co-estimulatórias, em DCs bystanders pós infecção por *Leishmania*.

Ao avaliarmos a expressão de CD40, um ligante de ativação de células T, a expressão mostrou-se constante entre as condições estudadas. Sua expressão no controle negativo foi de 99,15 (+/-0,26), em *L. braziliensis bystanders* 98,55 (+/-0,40), em *L. infantum bystanders* 96,65 (+/-24,18), em células infectadas por Lb 99,85 (+/-0,52) e células infectadas por *L. infantum* 98,20 (+/-24,52) (Figura 10 A). Por outro lado, ao avaliarmos a expressão de CD80, verificamos que a infecção parecia aumentar a expressão do mesmo. As células controle negativo apresentaram uma expressão de 16,60 (+/-6,57), bastante semelhante às células *L. braziliensis bystanders* 20,10 (+/-9,81) e *L. infantum bystanders* 24,35 (+/-10,37). Porém, há um aumento em células infectadas por Lb 83,50 (+/-16,46) e células infectadas por *L. infantum* 81,55 (+/-19,59) (Figura 10 B).

Por sua vez, a expressão de CD86 permaneceu inalterada nas diferentes condições experimentais. A expressão no controle negativo foi de 94,40 (+/-5,46), em células *L. braziliensis bystanders* 79,95 (+/-10,56), células infectadas por Lb 97,40 (+/-3,47), em células *L. infantum bystanders* 75,40 (+/-11,15) e células infectadas por *L. infantum* 97,40 (+/-3,59) (Figura 10 C).

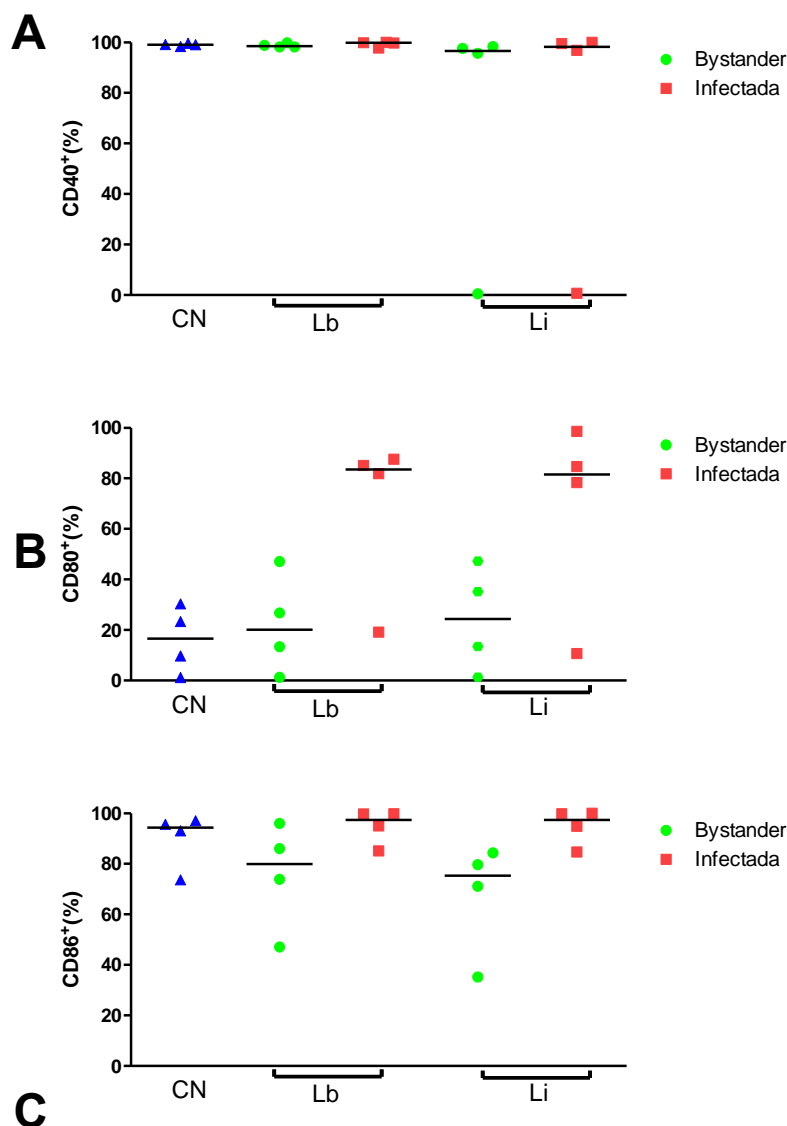


Figura 10. Expressão de CD40+, CD80+ e CD86 em DCs *bystanders* e infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum*. (A) porcentagem da expressão de CD40+ em células infectadas e não infectadas. (B) porcentagem da expressão de CD80+ em células infectadas e não infectadas. (C) porcentagem da expressão de CD86+ em células infectadas e não infectadas. Comparando os grupos controle negativo (CN), DCs bystander na interação com *L. braziliensis* (Lb bystander), DCs infectadas por *L. braziliensis* (Lb infectada), DCs bystander na interação com *L. infantum* (Li bystander) e por fim DCs infectadas com *L. infantum* (Li infectada). n= 4

12.6. Aumento no perfil de expressão de molécula inibitória de Linfócitos T, em DCs *bystanders* e infectados após interação com *Leishmania*.

Uma das vias de inibição da resposta imune mediada por linfócitos T envolve a molécula PD-L1. Esta ao ligar-se em seu receptor PD-1 em linfócitos T, tem como consequência a indução de anergia. Assim, decidimos avaliar a regulação desta via na

infecção com leishmania, quantificando a expressão de PD-L1 em DCs. Os resultados mostraram que tanto as células infectadas quanto aquelas *bystander* aumentavam a expressão de PD-L1 (Figura 11). O controle negativo mostrou expressão de 36,79 (+/-22,36), enquanto que nas células infectadas por *L. braziliensis* o valor subiu para 99,55 (+/-19,06). As células infectadas por *L. infantum* também apresentaram um aumento na expressão de PD-L1 99,6 (+/-0,41). As células *bystander* também apresentaram um aumento na expressão de PD-L1, sendo 86,85 (+/-22,24) nas células *L. braziliensis bystander* e 86,40 (+/-7,96) em *L. infantum bystander*. Com isto, mostramos que a infecção por *Leishmania* causou um aumento da expressão de PD-L1. O que nos levou a nossa pergunta deste estudo, se leishmania induz anergia de linfócitos T, pelo aumento da expressão de PD-L1 em DCs.

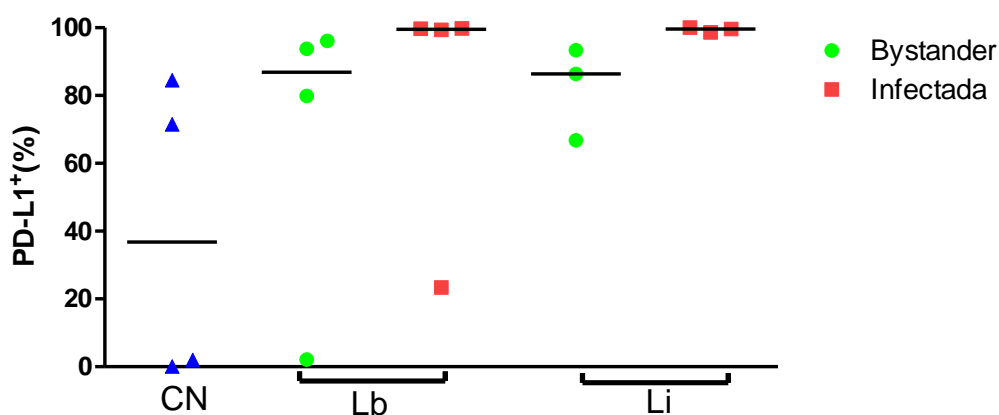
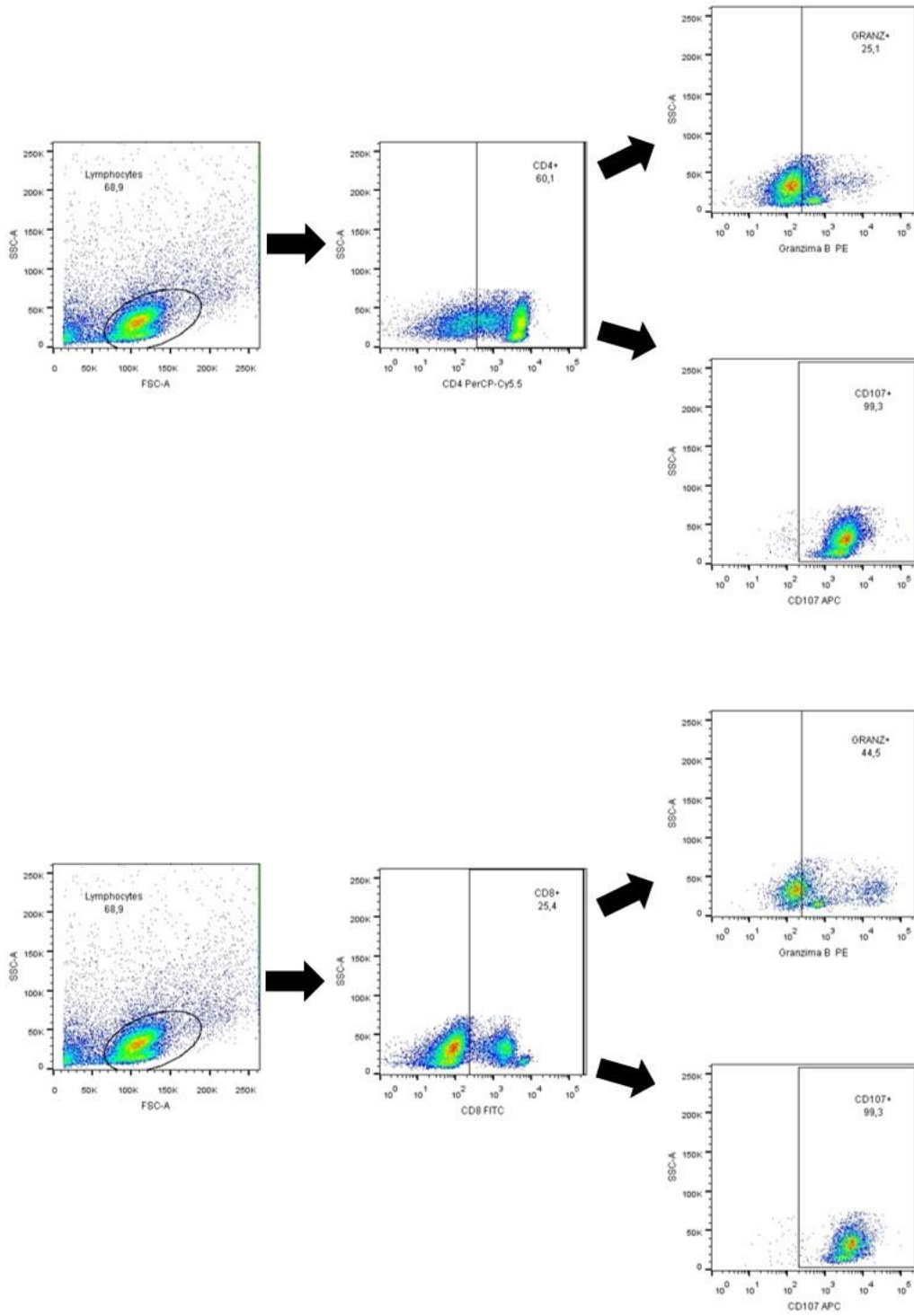


Figura 11. Expressão de PD-L1 em DCs *bystanders* e infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum*. Porcentagem da expressão PD-L1 em células infectadas e não infectadas. Comparando os grupos controle negativo (CN), DCs *bystander* na interação com *L. braziliensis* (Lb *bystander*), DCs infectadas por *L. braziliensis* (Lb infectada), DCs *bystander* na interação com *L. infantum* (Li *bystander*) e por fim DCs infectadas com *L. infantum* (Li infectada). n= 4

12.7. Avaliação de citocinas intracelulares em linfócitos T pós bloqueio de PD-1 em co-cultura com DCs infectadas com *Leishmania*

Após 24h de infecção, as DCs foram co-cultivadas com linfócitos autólogos, por 72 horas para avaliar a produção de citocinas, bem como, avaliar se o bloqueio da via PD-1 em linfócitos teria os mesmos efeitos. Com a estratégia de análise apresentada na figura 12, representativa de um doador com o grupo controle negativo, selecionamos os linfócitos por tamanho e granulosidade, isolados num gate e avaliados quanto a expressão de CD4+ e CD8+. Em seguida, verificou-se a presença de células positivas

para granzima B e interferon gama. Esta análise foi feita para todos os doadores e demais condições sendo (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.



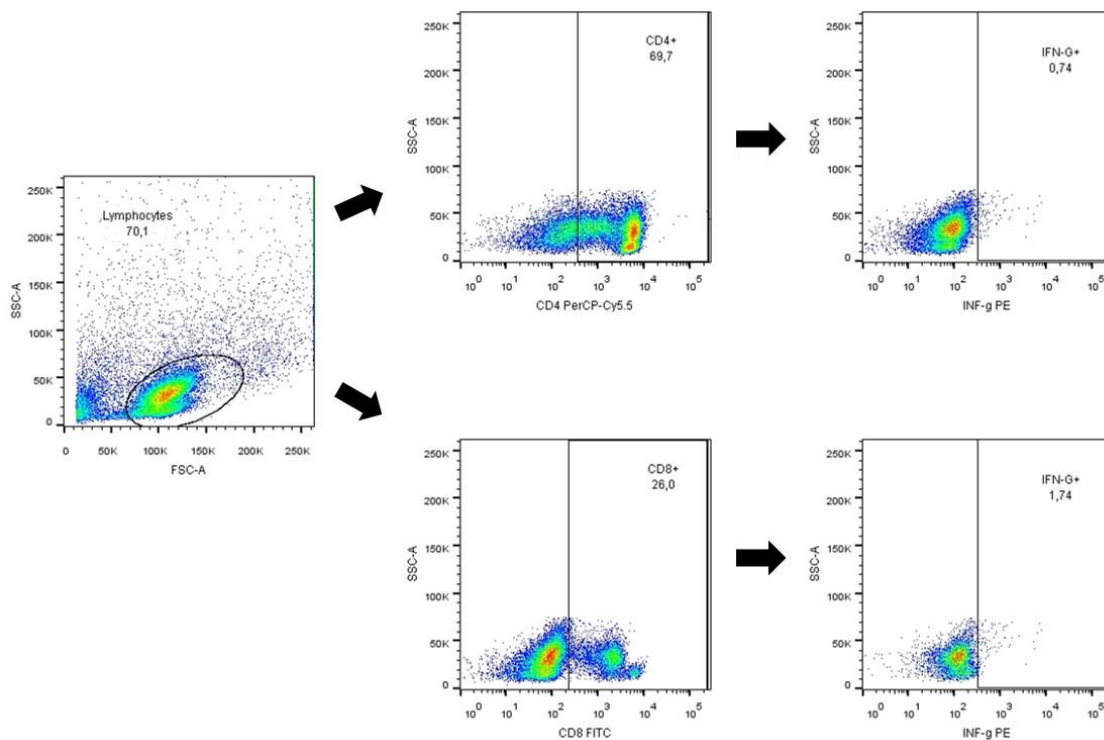


Figura 12: Estratégia de análise para avaliação de citocinas intracelulares e moléculas de degranulação em linfócitos T em co-cultura com DCs infectadas. DCs infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum* foram co-cultivadas com linfócitos autólogos e avaliados quanto à expressão de CD4+ e CD8+, seguido por granzima B, CD107 e interferon gama. Dados representativos de indivíduo/voluntário.

Inicialmente, a interação das DCs infectadas com os linfócitos, tendo a via PD1-PDL1 bloqueada ou não, demonstrou manter o número de células CD4+CD107+ (Figura 13), sendo CN 98,10 (+/-25,84), *L. braziliensis* 97,90 (+/-1,68), *L. braziliensis* +anti-PD-1 86,30 (+/-6,48), *L. infantum* 98,00 (+/-2,37), *L. infantum* +anti-PD-1 89,70 (+/-3,59) e ConA 96,00 (+/-3,13). O mesmo comportamento foi observado em linfócitos CD8+CD107+ (Figura 14) sendo o CN 99,30 (+/-1,78), *L. braziliensis* 99,40 (+/-0,13), *L. braziliensis* +anti-PD-1 96,90 (+/-1,21), *L. infantum* 98,80 (+/-0,53), *L. infantum* +anti-PD-1 94,80 (+/-1,81) e ConA 96,80 (+/-0,26).

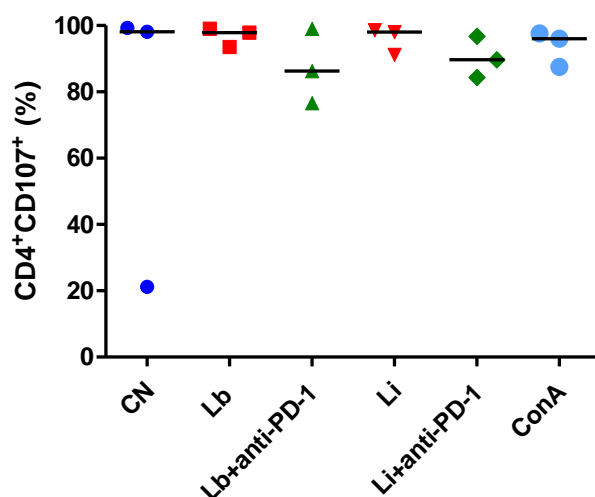


Figura 13. Análise de linfócitos TCD4+CD107+ após bloqueio de PD-1. Avaliação pós co-cultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.

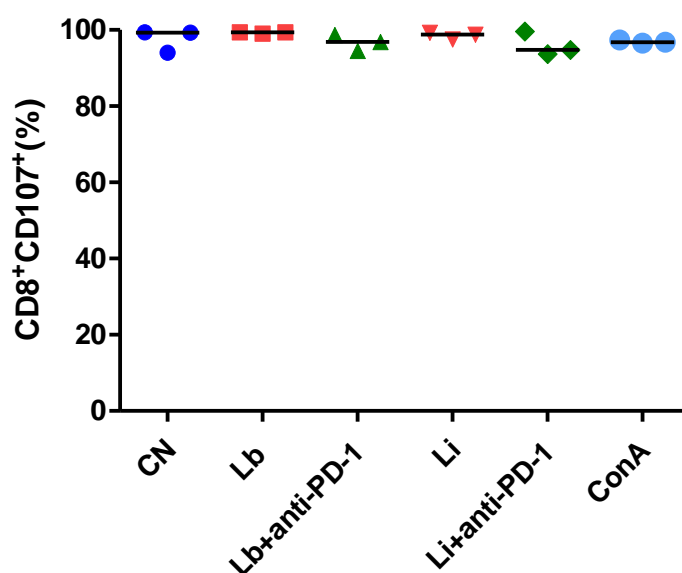


Figura 14. Análise de linfócitos TCD8+CD107+ após bloqueio de PD-1. Avaliação pós co-cultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L.*

infantum, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.

Por sua vez, verificou-se haver um aumento da população CD4+Granzima+ em linfócitos T porém sem reversão dos valores quando a via PD1-PDL1 estava bloqueada. Os valores para CN foram 48,65 (+/-17,32), nas células infectadas por *L. braziliensis* 85,30 (+/-12,14), *L. braziliensis* +anti-PD-1 84,90 (+/-15,32), células infectadas por *L. infantum* 87,60 (+/-16,89), *L. infantum* +anti-PD-1 87,10 (+/-17,67) e ConA 80,85 (+/-17,76) (Figura 15). Ao avaliarmos a população de células CD8+ granzima+, observamos não haver grandes alterações. O controle negativo apresentou uma expressão de 88,40 (+/-12,33), as células infectadas por *L. braziliensis* 92,55 (+/-4,18), *L. braziliensis* +anti-PD-1 88,30 (+/-6,30), as células infectadas por *L. infantum* 94,60 (+/-14,88), *L. infantum* +anti-PD-1 92,20 (+/-12,94) e ConA 91,30 (+/-13,92). (Figura 16)

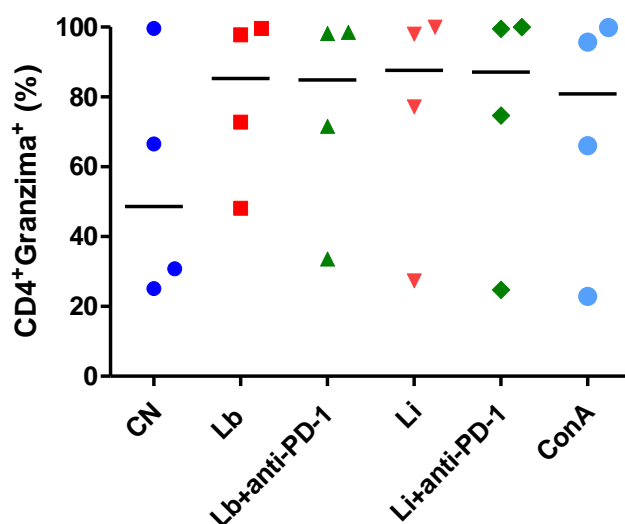


Figura 15. Análise de granzima B em linfócitos TCD4+Granzima+ após bloqueio de PD-1. Avaliação pós co-cultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.

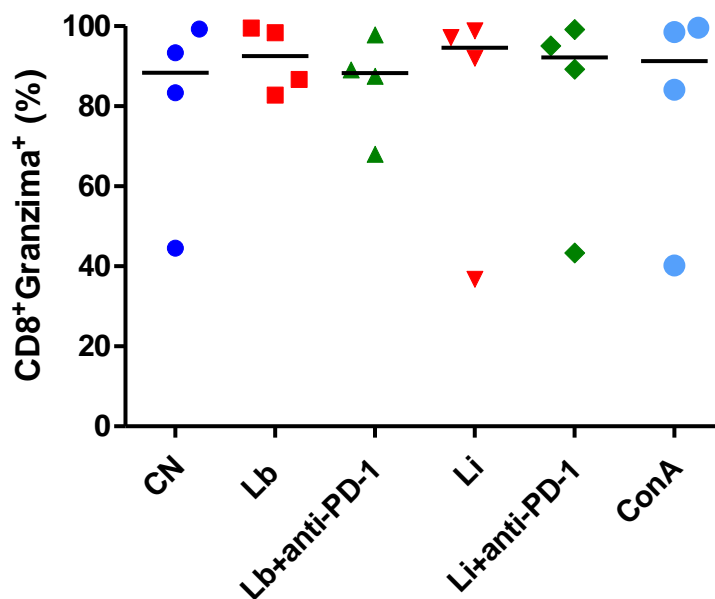


Figura 16. Análise de granzima B em linfócitos TCD8+Granzima+ após bloqueio de PD-1. Avaliação de linfócitos T após co-cultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.

Ao quantificarmos as células T CD4 produtoras de interferon gama, observamos haver valores baixos tanto na condição controle negativo CN 2,65 (+/-2,58) e nas condições infectadas por *L. braziliensis* 1,94 (+/-0,91) e *L. infantum* 1,79 (+/-1,18). Contudo, o bloqueio da via PD-1 PD-L1 mostrou uma recuperação na produção de IFN-g em células T CD4, sendo *L. braziliensis* +anti-PD-1 8,16 (+/-4,33) e *L. infantum* +anti-PD-1 5,38 (+/-3,69). Os valores do controle positivo ficaram em 27,65 (+/-10,25) ,em relação ao bloqueado (Figura 22)

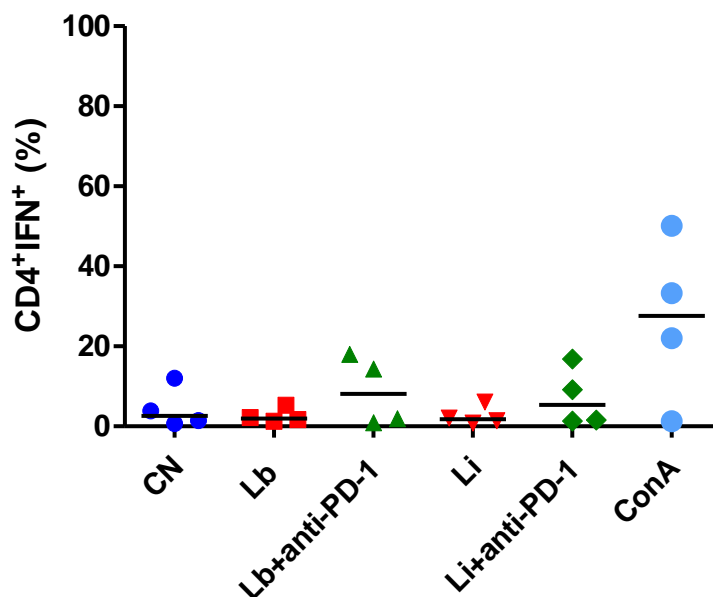


Figura 17. Análises de IFN γ em linfócitos TCD4+IFN+ após bloqueio de PD-1. Avaliação pós co-cultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.

Observamos uma baixa expressão em células controle negativo CN 10,46 (+/- 7,83) bem como nas células infectadas por Leishmania *L. braziliensis* 7,38 (+/- 2,34) e *L. infantum* 5,97 (+/- 1,66). Ao bloquearmos a via, observamos haver uma recuperação na produção de IFN-gama em CD8 para ambas as Leishmanias testadas, sendo *L. braziliensis* +anti-PD-1 21,40 (+/- 7,47) e *L. infantum* +anti-PD-1 14,00 (+/- 4,53). O controle positivo apresentou valores de 46,35 (+/- 13,28). (Figura 18)

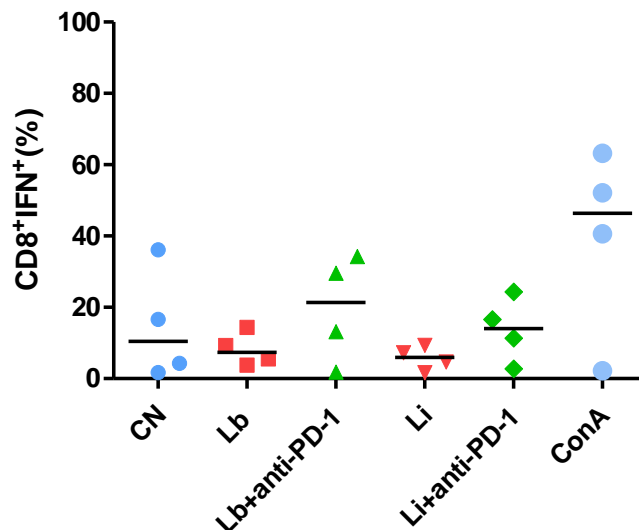


Figura 18. Análises de IFN- γ em linfócitos TCD8⁺IFN⁺ após bloqueio de PD-1. Avaliação pós co-cultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum* e (ConA) controle positivo de ativação de linfócitos.

12.8. Proliferação de linfócitos T pós bloqueio de PD-1 em có-cultura com DCs infectas com leishmania

Após a ativação de linfócitos T, acontece a expansão clonal, para uma resposta mais eficiente, com isso avaliamos o impacto do bloqueio de PD-1 na proliferação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em contato *in vitro*, com DCs infectadas com leishmanias, utilizando linfócitos marcados com CFSE, vale ressaltar que na proliferação pelo processo de mitose, cada célula “nova” tem metade do corante da célula mãe, em resumo, quanto maior a oscilação da expressão da expressão de CFSE maior a proliferação de linfócitos T. Nossos resultados mostram que o bloqueio de PD-1 recupera a proliferação de linfócitos (Figura 19).

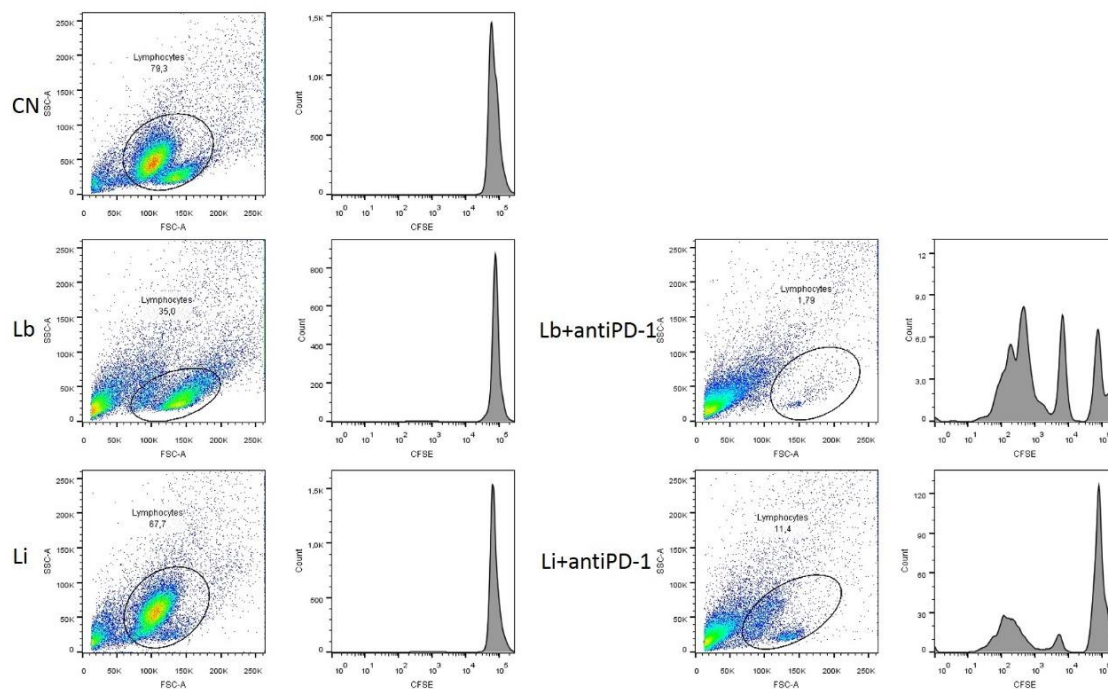


Figura 19. Análise da proliferação de linfócitos TCD4+ e TCD8+ pós bloqueio de PD-1 e cocultura com DCs infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum*. Os linfócitos foram selecionadas por granulocidade (SSC-A) e tamanho (FSC-A), e avaliados em histograma quanto a expressão de CFSE nas condições (CN) controle negativo com linfócitos somente em meio de cultura, (Lb) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Lb+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. braziliensis*, (Li) linfócitos em contato com DCs infectadas com *L. infantum*, (Li+anti-PD-1) linfócitos bloqueados com anti-PD-1 em contato com DCs infectadas com *L. infantum*. Dados representativos de um indivíduo/voluntário.

13. Discussão

Células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas (DCs) são essenciais para ativação da resposta inata e direcionamento da resposta imune adaptativa (BOYETTE *et al.*, 2017; STEINMAN; COHN, 1973). Assim, durante o processo de infecção por *Leishmania* bem como no estabelecimento da doença a interação entre parasitos, DCs e linfócitos é de extrema relevância para uma melhor compreensão da patogênese. Além disso, diferentes estudos corroborarem o papel crucial das DCs na resposta imune a diferentes patógenos bem como na possível modulação de sua ação biológica como mecanismo de escape dos mesmos (BALAN; SAXENA; BHARDWAJ, 2019; TIBERIO *et al.*, 2018). No que se refere à resposta imune

adaptativa, o linfócito T desempenha um papel fundamental. Nos órgãos linfoides secundários, esses linfócitos reconhecem os antígenos derivados dos patógenos por meio da interação com as células apresentadoras de antígeno (RANDOLPH; ANGELI; SWARTZ, 2005). Posteriormente, passam por um processo adicional de diferenciação, gerando células efetoras ou células de memória. Essas células possuem funções distintas, desde a regulação das respostas imunes a antígenos proteicos até a eliminação de patógenos intracelulares (BUNN *et al.*, 2018).

Inicialmente estudamos a infecção de DCs por *Leishmania* bem como a expressão de algumas moléculas de superfície relevantes à resposta do hospedeiro. Dessa forma, ao analisarmos a taxa de infecção de *Leishmania braziliensis* (Lb) e *Leishmania infantum* (Li) em células dendríticas (DCs) após 24 horas de co-cultura, nota-se que ambas as espécies (Figura 6, 7, 8 e 9) são capazes de infectar DCs. Essa observação está alinhada com os resultados de outras pesquisas conduzidas por nosso grupo, na qual ambas as espécies também demonstraram a capacidade de infectar as DCs derivadas de monócitos, além de diversos trabalhos com outras espécies do parasito (CAMERON *et al.*, 1992; FAVALI *et al.*, 2007; FORMATION *et al.*, 2017; SETH *et al.*, 2011)

De fato, embora possuam a capacidade de infecção, tanto *L. braziliensis* quanto *L. infantum* não exibiram a capacidade de afetar a diferenciação das células dendríticas (DCs), como evidenciado pela expressão constante dos marcadores fenotípicos CD1a e CD83 (Figura 10 e 11), característicos das DCs derivadas de monócitos. No que se refere ao CD1a vale ressaltar sua função de apresentação de antígenos lipídicos (POMEROY *et al.*, 2015). Logo após a caracterização das DCs fomos avaliar se a infecção interferia nos marcadores de diferenciação celular. As moléculas CD1a e CD11c+ (Figura 12A e 12B) permanecem com valores aproximados, após a infecção em todas as condições, dados similares à trabalho anterior do grupo (FALCÃO *et al.*, 2016)

As DCs em sua fase imatura demonstram uma maior capacidade de realizar fagocitose, enquanto as DCs maduras possuem a capacidade de processar e apresentar antígenos. Esse processo é desencadeado diretamente pelo reconhecimento e subsequente internalização de antígenos (BOYETTE *et al.*, 2017). Isso, por sua vez, estimula a expressão de moléculas de superfície, que aumentam a ativação de linfócitos T (BOYETTE *et al.*, 2017; COUTANT; PIN; MIOSSEC, 2021).

Uma outra característica notável das células dendríticas maduras é a elevada expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e moléculas coestimulatórias. Esse aumento na expressão capacita essas células a uma apresentação mais eficaz de antígenos e também a estimulação das células T virgens, uma vez que estas entram nos linfonodos drenantes (SALLUSTO; LANZAVECCHIA,

1994). No entanto, como uma estratégia de evasão, alguns microrganismos têm a habilidade de inibir a apresentação de antígenos através das moléculas de MHC, como uma forma de escapar do sistema imunológico adaptativo (GOGOI *et al.*, 2018). Foi relatado que o *Trypanosoma cruzi* regula de forma específica a sua infecção por meio de um mecanismo de pós-transcrição ainda não compreendido completamente, o qual suprime a expressão dos elementos da via de MHC classe I em células HeLa (CAMARGO *et al.*, 2014).

O reconhecimento de antígenos por meio do MHC representa o primeiro sinal para a ativação dos linfócitos. No entanto, um segundo sinal é crucial para essa ativação, o qual envolve as moléculas coestimulatórias. Dentre essas moléculas, diversos membros da superfamília B7, como B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), desempenham papéis significativos. Estas moléculas podem tanto estimular quanto inibir a ativação das células T, dependendo da interação com CD28 ou CTLA-4 nas células T, respectivamente (GANNAVARAM *et al.*, 2016; GAUTAM *et al.*, 2014). Nossos resultados mostram alta expressão destas moléculas. No entanto, as células dendríticas (DCs) derivadas da medula óssea de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* apresentaram uma maior taxa de lesão e infecção, acompanhada pela elevada expressão de IL-4 e IL-10, em comparação com os camundongos C3H/HeJ. Apesar dessas diferenças, em ambos os casos, houve um aumento na expressão das moléculas ativadoras MHC-II, CD40, CD86 e CD80. Por outro lado, ao examinar as BM-DCs de camundongos infectados com formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* opsonizadas com soro de animais imunizados, não foi observada nenhuma alteração no perfil das moléculas MHC-II, CD86, CD80 e CD40. No entanto, a estimulação com BCG induziu um aumento na expressão das moléculas coestimuladoras. (FILIPPIS *et al.*, 2017; PRINA *et al.*, 2004)

Vários genes dos complexos MHC de classe I e classe II do agrupamento de genes do HLA foram identificados como fatores de suscetibilidade genética para a leishmaniose, com variantes que afetam o resultado da doença tanto positiva quanto negativamente. Apesar de descrita essa associação, pouco se sabe ainda sobre os mecanismos que sustentam essas associações (BLACKWELL; FAKIOLA; CASTELLUCCI, 2020; SAMARANAYAKE *et al.*, 2016). Em nosso estudo, verificamos que a expressão das moléculas de superfície relacionadas à apresentação de antígenos permanece inalterada tanto nas células infectadas quanto nas não infectadas (Figura 12B).

Outro marcador analisado em nosso estudo foi o gene CD209 (DC-SIGN) um receptor de superfície de células dendríticas imaturas que está envolvido na adesão celular, na iniciação da resposta imune primária e no reconhecimento de patógenos. Acredita-se também que ele esteja envolvido na sinalização celular para mediar a endocitose de patógenos. Este receptor reconhece uma grande variedade de patógenos evolutivamente divergentes com grande impacto na saúde pública, incluindo micobactérias que causam lepra e a tuberculose, os vírus Ebola, hepatite C, HIV-1 e Dengue e o coronavírus da síndrome respiratória aguda SARS-CoV (ALVAREZ *et al.*, 2002; AMRAEI *et al.*, 2021; BARREIRO *et al.*, 2006; PREZA *et al.*, 2014)

Estudos feitos por Colmenares *et al.* (2002) mostraram que a ligação de amastigotas de *Leishmania* a células dendríticas humanas imaturas e células transfectadas com CD209 foi inibida por um anticorpo monoclonal bloqueador de função específico desse receptor. Eles observaram que este anticorpo reduziu drasticamente a internalização de formas amastigotas pelas DCs (COLMENARES *et al.*, 2002). Esta foi a primeira descrição de um ligante de patógeno não viral a CD209 e forneceram evidências de um papel relevante desse receptor na ligação e internalização de amastigotas de *Leishmania* por DCs. Partindo dessas observações, levantamos a hipótese que as DCs que não são infectadas, naturalmente teriam uma menor expressão de CD209, portanto, essa molécula poderia ser uma via relevante de internalização da *Leishmania*. Nossos resultados mostram que a expressão de CD209 foi maior em ambas condições experimentais, tanto na infecção por *L. braziliensis* como por *L. infantum* (Figura 13A). Por outro lado, Falcão *et al.* (2016) observaram que ambas as *Leishmania* foram capazes de inibir de forma significativa a expressão desse receptor. Este estudo observou que expressão de CD209 foi $80,09\% \pm 6,8$ nas células controle, enquanto a expressão em células infectadas com *L. infantum* foi $62,17\% \pm 9,88$ e infecção com *L. braziliensis* foi $75,36\% \pm 7,3$. No entanto, são necessários mais estudos, como bloqueio e desafio desta via para confirmação e melhor compreender esse mecanismo de sinalização.

Após o processo de reconhecimento e internalização do patógeno as DCs iniciam seu processo de maturação com expressão de CD83, condizente com nossos resultados que mostram aumento desta molécula na infecção e interação com as duas espécies estudadas. Dados da literatura mostram que BM-DCs de camundongos B6 e moDCs de humanos mostraram ter 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 (RE;

CJ; ME, 2016). Dados com outros patógenos intracelulares também corroboram os resultados observados com relação a expressão de CD83 (AERTS-TOEGAERT *et al.*, 2007; HAILESELASSIE *et al.*, 2016).

A ativação de DCs resulta em mudanças altamente orquestradas na expressão de receptores de quimiocinas e, especificamente, a regulação positiva do receptor de quimiocina CCR7. Foi observado que essa regulação aumentada mostrou ser bastante importante para a migração de DCs para o linfonodo, em particular, na infecção por *L. donovani* e *L. major* (KLING; DARBY; KÖRNER, 2014; OHL *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2019). Verificamos que os níveis de expressão de CCR7 em células infectadas por *L. braziliensis* ou *L. infantum* aumentaram de forma bastante significativa comparados com as células não infectadas (Figura 14A). Portanto, nossos resultados mostraram ser condizentes com os descritos na literatura. Assim, podemos concluir que a infecção é necessária para induzir a maturação e a potencial migração das DCs nas nossas condições experimentais.

Embora as DCs expressem a glicoproteína de adesão CD62L em sua superfície, importante para o seu rolamento nas paredes de vasos sanguíneos até chegar no sítio de infecção e linfonodos (IVETIC; GREEN; HART, 2019), nossos resultados mostraram não houve aumento no nível de expressão em células infectadas com *Leishmania*.

Durante o processo de infecção com micro-organismos e substâncias infecciosas ou inflamatórias, as DC iniciam o processo de maturação que conta com aumento da expressão de moléculas da classe MHCII e dos cos-estimuladores CD40, CD80 e CD86 assim como também, uma redução da capacidade fagocitária, aumento significativo da expressão de diferentes receptores de quimiocinas e de citocinas. Nossos estudos mostraram que a os níveis de CD80 aumentaram expressivamente (Figura 15 B). As DCs derivadas de medula óssea da linhagem de camundongos C57BL/6J infectadas com promastigotas metacíclicas de três espécies de *Leishmania*; *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. major* apresentaram uma redução expressiva de MHCII e CD86, para as três espécies de *leishmania* (PRINA *et al.*, 2004).

Em contraste, em nosso trabalho verificamos que não houve qualquer alteração expressiva nos níveis de CD86 em células infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum* (Figura 15C). No entanto, estudos observaram que a expressão de CD40 foi significativamente maior em DC infectadas com *L. braziliensis* ou *L. major*, quando comparadas a células dendríticas não infectadas. Por outro lado, não houve alteração em células dendríticas infectadas com *L. amazonenses* (FALCÃO *et al.*, 2016). Da mesma forma pudemos verificar que não houve alteração da expressão de CD40 em

células infectadas por ambas as espécies de Leishmania; *L. braziliensis* e *L. infantum* (Figura 15A) comparadas com as células controles (DCs bystanders).

A modulação da resposta imune do hospedeiro pela leishmania como mecanismo de escape já é bastante discutida e evidenciada na literatura (DE MORAIS *et al.*, 2015; FALCÃO *et al.*, 2016; STEVERDING, 2017). Seguindo a linha de pesquisa e alguns trabalhos do grupo, bem como dados da literatura, nos chamou a atenção a via de supressão da resposta imune mediada por linfócitos T, induzida pelo aumento da expressão de moléculas inibidoras PD-L1. Assim, nossos resultados mostram aumento da expressão de PD-L1 principalmente nas DCs infectadas, mas também nas DCs em contato com o parasito (Figura 16).

Estudos em modelos murinos com *L. amazonensis*, também descrevem aumento na expressão de PD-1 e PD-L1 em área tecidual, que também aumentou a migração de DCs e linfócitos TCD4+ para os linfonodos drenantes. DCs derivadas da medula óssea, para esta via foram infectadas *in vitro* com promastigotas e amastigotas e também tiveram regulação positiva desta via (GUEDES; FONSECA-MARTINS, 2022). O aumento de PD-1 e PD-L1 em diferentes subconjuntos de monócitos e neutrófilos também foi observado em sangue periférico no diagnóstico de pacientes com LV, bem como o bloqueio da via aumentou produção de IFN- γ , mecanismo este já utilizado como alvo em terapias contra alguns tipos de tumores (DEVITO *et al.*, 2019; GARCIA DE MOURA *et al.*, 2021).

A avaliação de sangue periférico de um paciente infectado com *L. amazonensis*, mostrou um aumento na expressão de PD-L1 em monócitos após reestimulação *in vitro* com antígeno solúvel de Leishmania (SLA). Tal evento poderia ter relação com a diminuição das funções de linfócitos T CD4, tais como a diminuição da secreção de IFN- γ , e em linfócitos T CD8, na inibição da produção de IFN- γ e Granzima-B (BARROSO *et al.*, 2018). O mesmo comportamento foi observado em macrófagos e DCs, derivados de monócitos humanos, uma vez que o bloqueio de PD-1 estimulou um aumento de TNF- α e IFN- γ bem como aumentou a proliferação de linfócitos T, com a aumento de granzima e perforina (FILIPPIS *et al.*, 2017). A evasão a resposta imune pelo aumento de PD-L1 com indução de anergia dos linfócitos T ocorre pela competição com as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, impedindo sua ativação pelas DCs. Assim o bloqueio dessas vias inibitórias é bastante interessante para a terapia de neoplasias e também futuros estudos com pacientes não responsivos aos tratamentos para a leishmaniose (DEVITO *et al.*, 2019; GARCIA DE MOURA *et al.*, 2021)

Decidimos então avaliar se o bloqueio de PD-1 interferia na secreção de citocinas intracelulares, ativação e proliferação *in vitro* de linfócitos T autólogos, via de suma importância para resposta imune adaptativa.

A citotoxicidade mediada por liberação de citocinas, perforinas e granzimas é um importante mecanismo de eliminação de patógenos e células tumorais, entretanto o processo de inflamação aumentado acarreta a forma grave da doença mucocutânea com a presença de múltiplas lesões ulceradas. É interessante ressaltar que a carga parasitária nestas lesões é baixa, mostrando que os mecanismos de resposta inflamatória são determinantes nestas lesões, sendo assim, o controle desta citotoxicidade pode ser alvo terapêutico importante para o balanço da resposta imune e eliminação do parasito (MORGADO *et al.*, 2018). Estudos recentes mostram que a ativação do inflamassoma e a liberação de IL-1 β são de fato impulsionadas pela citotoxicidade das células T CD8+, em espécies murinas, a patologia induzida por células T CD8+ dependia do inflamassoma NLRP3 e da sinalização de IL-1 β , mostrando que o inflamassoma NLRP3 é importante para os altos níveis de IL-1 β presentes nas lesões de leishmaniose, ao inibir esta via o estudo mostrou possibilidades de tratamentos para controle da citotoxicidade (CARDOSO *et al.*, 2021; NOVAIS *et al.*, 2017).

Sendo assim, as células T CD4⁺ T CD8⁺ tem função fundamental na resposta Th1, produzindo IFN- γ , TNF- α e outras citocinas Th1 que são eficazes para controlar o crescimento do parasita (DE FREITAS E SILVA; VON STEBUT, 2021; GANNAVARAM *et al.*, 2016). Nossos resultados mostraram que o bloqueio de PD-1 nestes experimentos não interferiu nas expressões de CD107 (Figuras 18 e 19), granzima B nos linfócitos CD4⁺107⁺ e CD8⁺107⁺ que corrobora estes resultados, por outro lado o bloqueio da via PD-1 mostrou regular negativamente (Figura 22 e 23) a secreção de IFN modulando a resposta nas duas populações celulares.

O aumento da população CD4⁺Granzima⁺ (Figura 20) está de acordo com a literatura, enquanto em T CD8⁺ não houve alteração (Figura 21). Os linfócitos T CD4⁺ são as principais células produtoras de IFN- γ e TNF- α que ativam macrófagos para controle da replicação parasitária no início da infecção, atividades citotóxicas são relatadas em subconjuntos de T CD4⁺ em pacientes infectados por *L. major* e também em indivíduos assintomáticos para LC (EGUI *et al.*, 2018; NAOUAR *et al.*, 2014).

Por fim, nos perguntamos se o bloqueio *in vitro* de PD-1 interferia na expansão clonal dos linfócitos. Sabemos que este aumento no número de células efectoras é de suma importância para o sucesso do controle da infecção. Nossos dados mostram que o bloqueio aumenta a proliferação das duas populações de linfócitos, enquanto em células não bloqueadas não ocorre a proliferação *in vitro* (Figura 24 e 25).

Estudos com *L. donovani* em murinos mostram que o bloqueio *in vivo* da via PD1/PDL-1 com anticorpos anti-PDL-1 restaurou funções efetoras tanto em CD4⁺ quanto em CD8⁺, diminuindo a carga parasitária (HABIB *et al.*, 2021). As funções de PD-1 um receptor de morte programada são amplamente estudados em modelos de células tumorais (DEVITO *et al.*, 2019; SÁNCHEZ-PAULETE *et al.*, 2016; SHARPE; PAUKEN, 2018), mas requer mais estudos sobre sua relevância na leishmaniose imuno resistente. Um estudo interessante mostrou que *L. amazonensis* induziu expressão de PD-1 em células T CD4⁺ e CD8⁺ e PD-L1 de DCs murinas e o bloqueio por anticorpos monoclonais anti-PD-1 e anti-PD-L1 melhorou as respostas imunes, mostrando esta via como uma candidata promissora a imunoterapias (DA FONSECA-MARTINS *et al.*, 2019).

14. Conclusão

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que *L. braziliensis* e *L. infantum* tem capacidade de infectar células dendríticas derivadas de monócito *in vitro*, sem interferir no seu perfil de diferenciação, contudo na infecção as *Leishmanias* induzem o aumento da expressão de moléculas CD83 e CCR7, envolvidas no processo de maturação e migração em DCs, bem como causam uma diminuição na expressão da molécula DC-SIGN.

Conclui-se ainda que a infecção por estas espécies induzem aumento de PD-L1 em DCs podendo ser uma importante via de evasão da resposta imune. Além disso o bloqueio de PD-1 em LT regulou negativamente a expressão de IFN-g bem como interferiu significativamente no aumento da proliferação *in vitro* destas células o que pode ser um promissor alvo terapêutico, especialmente nas formas anérgicas de Leishmaniose

4. Material e métodos

4.1 Geração de células dendríticas a partir de monócitos

O projeto de doutorado faz parte de um projeto maior do grupo que com registro no CEP FM UnB 072/2009. Os doadores foram selecionados de forma aleatória sendo a condição de entrevista, que estivessem saudáveis no momento da coleta, com

nenhum processo infeccioso, tratamentos medicamentosos ou doenças crônicas. Inicialmente foram selecionados 6 doadores, que foram realizados em diferentes momentos, uma vez que o protocolo é longo. Destes, uma amostra houve contaminação bacteriana e foi descartada, dos 5 doadores restantes também tivemos perda na taxa de infecção. Para obtenção do PBMC o sangue foi diluído em tubo falcon de 15mL 1:1 com PBS (PBS 1X: 0,8% de NaCl, 0,14% Na₂HPO₄, 0,02% KCl e 0,20%g KH₂HPO₄) e submetido a um gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). 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. Então, 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 das células não viáveis (coradas de azul) na câmara de Neubauer.

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 500uL 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.

As células marcadas ficam retidas na coluna magnética fixada a um suporte e, após separação da fração negativa, que foi congelada e utilizada posteriormente, coletou-se a fração rica em células CD14+, aquela que ficou retida na coluna. A fração

enriquecida em CD14 (monócitos) foi eluída da coluna lavada e foi cultivada em meio RPMI suplementado com soro bovino fetal (10%) na presença de citocinas IL-4 (800UI/mL) (Peprotech) e GM-CSF (50ng/mL) (Peprotech) seguindo o protocolo de Sallusto e Lanzavechia (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). Após sete dias de cultura, a 37°C e 5% de CO₂, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo quanto a expressão das moléculas CD14, CD1a e CD11c (eBioscience). Foi considerada uma diferenciação satisfatória quando a expressão de CD1a⁺ e CD11c⁺ foi superior a 80% e apresentaram negatividade para CD14⁺. Após a diferenciação e confirmação, as DCs foram infectadas com *L. braziliensis* e *L. infantum*. A fração negativa (linfócitos) foi coletada e criopreservada para posterior utilização.

4.2 Cultura de *L. braziliensis* e *L. infantum*

Duas cepas de referência foram utilizadas, a *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) e *L. infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV), mantidas no freezer -80°C. Para o descongelamento das cepas 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 e novamente mantidas em incubação para 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. As promastigotas foram obtidas de culturas em fase estacionária (5-7 dias), com menos de cinco passagens *in vitro* e foram utilizadas para infecção das DCs.

4.3 Marcação de *L. braziliensis* e *L. infantum* com CFSE

L. braziliensis e *L. infantum* foram lavadas a 1600xg por 10 minutos e o precipitado com 18×10^7 *Leishmanias*, ressuspensas em 2,5mL de PBS 1X. Em seguida, foi adicionado *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) (eBioscience) na concentração final de 20uM e incubados por 30 minutos a 26°C. Posteriormente, foi adicionado 40mL de PBS 1X, os parasitos foram centrifugados a 1600xg por 10 minutos

e a lavagem repetida mais uma vez. Após a marcação dos parasitas com CFSE e confirmação por aquisição de uma alíquota no citômetro de fluxo, as *Leishmanias* foram utilizadas para a infecção das DCs.

4.4 Infecção de DCs com *L. braziliensis* e *L. infantum*

Após a diferenciação, as DCs imaturas coletadas foram infectadas por promastigotas de *L. braziliensis* ou *L. infantum*, marcadas com CFSE, na proporção de 10 parasitas para cada célula. As células foram transferidas para placas de cultura e incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas de infecção, as DCs infectadas, passaram por lavagens sucessivas dos poços com solução salina. As DCs também foram tratadas com anti-CD274 (PD-L1) conjugado a PE (BD Pharmagen), posteriormente, incubadas por 24hs na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Como controle positivo para a maturação das DCs, as mesmas foram tratadas também com LPS (Sigma) (100ng/mL).

4.5 Caracterização fenotípica das células dendríticas

Após a indução da diferenciação dos monócitos em DCs e, posteriormente, a infecção das células com *L. braziliensis* ou *L. infantum*, foram feitas marcações com anticorpos anti-CD1a conjugado a PE-Cy7 (eBioscience), anti-CD11c conjugado a APC (eBioscience), anti-CD83 conjugado a PE (eBioscience), anti-CD80 conjugado a PE (eBioscience), anti-CD86 conjugado a PE-Cy5 (eBioscience), anti-HLA-DR conjugado a APC (eBioscience), anti-CD40 conjugado a APC (eBioscience), anti-CD44 conjugado a APC (eBioscience), anti-CD62L conjugado a APC (Immuno tools), anti-CCR7 conjugado a PE (BD Pharmagen), anti-CD209 conjugado a PE-Cy7 (eBioscience) e a molécula inibitória anti-PD-L1 conjugado a PE (BD Pharmagen). As porcentagens da expressão dessas moléculas foram obtidas por citometria de fluxo, analisadas no *software flowjo* e a expressão dessas moléculas comparadas entre DCs não infectadas, DCs infectadas e DCs *bystanders*.

4.6 Taxa de infecção por *L. braziliensis* e *L. infantum*

Após as 24 horas de infecção parte das DCs coletadas foram submetidas à citocentrifugação. As lâminas fixadas, coradas com hematoxilina – eosina e, a carga parasitária obtida pela contagem de células infectadas e amastigotas por célula, analisadas de forma randomizada e cega por 2 observadores em microscópio óptico. A taxa de infecção também foi obtida por citometria de fluxo pelo uso dos parasitos marcados com CFSE.

4.7 Co-cultivo DCs e linfócitos

Após recuperação e contagem das DCs infectadas e controles não infectados e dos linfócitos T autólogos descongelados, foi realizada uma co-cultura. Para tanto utilizou-se a proporção de uma DC para 10 linfócitos do doador autólogo em meio RPMI suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico, em placa de 96 poços de fundo U. A co-cultura foi submetida a incubação a 37°C na estufa com atmosfera úmida e 5% CO₂ por 72 horas para as marcações intracelulares e 96 horas para proliferação celular (detalhado mais adiante no texto). Os sobrenadantes das culturas foram coletados e criopreservados para dosagem de citocinas utilizando a técnica de CBA (Cytokine Bead Array) seguindo as instruções técnicas do fabricante.

4.8 Quantificação de citocinas intracelulares e moléculas de superfície por citometria de fluxo

Após 72 horas de co-cultura de DCs infectadas com as espécies de *Leishmania* com linfócitos T totais, as células foram incubadas por 4 horas a 37°C com brefeldina A. Inicialmente, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD45RA conjugado a APC, anti-CD45RO conjugado a PE-Cy7, anti-CD4 conjugado a PerCP e anti-CD8 conjugado a FITC para marcação de superfície. Posteriormente, as células foram permeabilizadas e, então, as células CD4+ e CD8+ marcadas com o anticorpo IFN- γ conjugado a PE e as células CD8+ e marcadas com Granzima B conjugada a PE para marcação de citocina e molécula intracelular.

4.9 Proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+

As células foram marcadas intracelularmente em meio contendo 1 μ M de CFSE. Em seguida, foi realizado um co-cultivo dos linfócitos do mesmo doador (previamente

congelados) com as DCs previamente infectadas com *L. braziliensis* ou *L. infantum*. Após 96 horas de incubação a 37°C na estufa de CO₂, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD4 conjugado a PerCP e CD8 conjugado a PE e, posteriormente, fixadas com paraformaldeído 1%. As células foram então adquiridas no citômetro FACSVerse sendo detectada a diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE, resultante da divisão celular (Li & He, 2012).

4.10 Análise estatística

Os dados brutos obtidos em citometria de fluxo, no equipamento FACSVerse (BD Biosciences) foram analisados no *software* Flowjow, para obter as porcentagens das moléculas de interesse. Os resultados então, foram analisados utilizando o programa GraphPad-Prism 5.0, onde utilizamos mediana e erro padrão. Os valores encontrados nos experimentos foram inicialmente testados quanto à normalidade pelo teste Shapiro–Wilk. Para os dados com distribuição anormal (não-paramétricos), os grupos foram analisados com o teste Kruskal-Wallis, pela análise de variância a um critério e pós-teste de Dunnet, comparando todos os grupos com o controle negativo. Aqueles com distribuição normal (paramétrico), os valores foram comparados pelo teste ANOVA, pela análise de variância a um critério e pós-teste de Tukey. Os dados de taxa de infecção foram analisados com teste t comparando as DCs infectadas com *L. braziliensis* e *L. infantum*. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados com diferenças significativas.

15. Referências

AERTS-TOEGAERT, C. *et al.* CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 686–695, 2007.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 5, 2012.

ALVAREZ, C. P. *et al.* C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans . **Journal of Virology**, [s. l.], v. 76, n. 13, p. 6841–6844, 2002.

AMRAEI, R. *et al.* CD209L L-SIGN and CD209 DC-SIGN act as receptors for SARS-

CoV-2 amraei. [s. l.], n. 617, 2021.

ANDRADE FILHO, J. D.; BRAZIL, R. P. Relationships of New World Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) Based on Fossil Evidence. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 98, n. SUPPL. 1, p. 145–149, 2003.

ANJILI, C. O. *et al.* The chemotactic effect of Phlebotomus duboscqi (diptera: psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 97–100, 1995. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0001706X9500112R>.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral Immunopathogenesis of Visceral Leishmaniasis. **Gazeta Médica da Bahia**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 24–34, 2005.

BALAN, S.; SAXENA, M.; BHARDWAJ, N. Dendritic cell subsets and locations. **International Review of Cell and Molecular Biology**, [s. l.], v. 348, p. 1–68, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.07.004>.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. [s. l.], v. 392, n. March, p. 245–252, 1998.

BARREIRO, L. B. *et al.* DC-SIGN Interacts with Mycobacterium leprae but Sequence Variation in This Lectin Is Not Associated with Leprosy in the Pakistani Population. **Human Immunology**, [s. l.], v. 67, n. 1–2, p. 102–107, 2006.

BARROSO, D. H. *et al.* PD-L1 May Mediate T-Cell Exhaustion in a Case of Early Diffuse Leishmaniasis Caused by Leishmania (L.) amazonensis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, n. MAY, p. 1–7, 2018.

BARTEE, M. Y.; DRYJA, P. C.; BARTEE, E. Chimeric tumor modeling reveals role of partial PDL1 expression in resistance to virally induced immunotherapy. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–8, 2019.

BATISTA, F.; HARWOOD, N. Antigen presentation to B cells. **F1000 Biology Reports**, [s. l.], v. 2, n. December, p. 3–7, 2010. Disponível em: <http://www.f1000.com/reports/b/2/87>.

BLACKWELL, J. M.; FAKIOLA, M.; CASTELLUCCI, L. C. Human genetics of leishmania infections. **Human Genetics**, [s. l.], v. 139, n. 6–7, p. 813–819, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02130-w>.

BOYETTE, L. B. *et al.* Phenotype, function, and differentiation potential of human

monocyte subsets. **PloS one**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. e0176460, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28445506>.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DISTRITO FEDERAL [s. l.], v. 52, 2022.

BUNN, P. T. *et al.* Distinct Roles for CD4 + Foxp3 + Regulatory T Cells and IL-10–Mediated Immunoregulatory Mechanisms during Experimental Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 201, n. 11, p. 3362–3372, 2018.

CAMARGO, R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection down-modulates the immunoproteasome biosynthesis and the MHC class I cell surface expression in HeLa cells. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1–12, 2014.

CAMERON, P. U. *et al.* Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. **Science**, [s. l.], v. 257, n. 5068, p. 383–387, 1992.

CAPARRÓS, E. *et al.* Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. **Immunobiology**, [s. l.], v. 210, n. 2–4, p. 185–193, 2005.

CARDOSO, T. M. *et al.* Inflammasome Activation by CD8+ T Cells from Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in the Immunopathogenesis of the Disease. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 141, n. 1, p. 209-213.e2, 2021.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

CHEN, G. *et al.* Associated with anti-PD-1 Response. [s. l.], v. 560, n. 7718, p. 382–386, 2019.

COLMENARES, M. *et al.* 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. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 39, p. 36766–36769, 2002.

COOPER, A. M. *et al.* T-cell responses to infected autologous monocytes in patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 304–309, 1994.

COUTANT, F.; PIN, J. J.; MIOSSEC, P. Extensive phenotype of human inflammatory

monocyte-derived dendritic cells. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 14–19, 2021.

DA FONSECA-MARTINS, A. M. *et al.* Immunotherapy using anti-PD-1 and anti-PD-L1 in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice reduce parasite load. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

DE FREITAS E SILVA, R.; VON STEBUT, E. Unraveling the Role of Immune Checkpoints in Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. March, p. 1–15, 2021.

DE MORAIS, C. G. V. *et al.* The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, 2015.

DEVITO, N. C. *et al.* Role of Tumor-Mediated Dendritic Cell Tolerization in Immune Evasion. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. December, p. 1–14, 2019.

DIEU, M. C. *et al.* Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 188, n. 2, p. 373–386, 1998.

EGUI, A. *et al.* Phenotypic and Functional Profiles of Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells Associated With Infection Control in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. November, p. 1–15, 2018.

ERDOGDU, I. H. MHC class 1 and PDL-1 status of primary tumor and lymph node metastatic tumor tissue in gastric cancers. **Gastroenterology Research and Practice**, [s. l.], v. 2019, 2019.

FALCÃO, S. de A. C. *et al.* *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and similarities to evade the innate immune system. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 7, n. AUG, p. 1–10, 2016.

FAVALI, C. *et al.* *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **Journal of leukocyte biology**, [s. l.], v. 82, n. 6, p. 1401–1406, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17890507>.

FENWICK, C. *et al.* Tumor suppression of novel anti-PD-1 antibodies mediated through CD28 costimulatory pathway. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 216, n. 7, p. 1525–1541, 2019.

FERLAZZO, G.; MORANDI, B. Cross-talks between natural killer cells and distinct

- subsets of dendritic cells. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 5, n. APR, p. 1–7, 2014.
- FILIPPIS, C. *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. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 8, n. DEC, p. 1–12, 2017.
- FONTENEAU, J. F. *et al.* Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. **Blood**, [s. l.], v. 102, n. 13, p. 4448–4455, 2003.
- FORMATION, B. *et al.* Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1–21, 2017. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1002598>.
- GANNAVARAM, S. *et al.* Modulation of innate immune mechanisms to enhance Leishmania vaccine-induced immunity: Role of coinhibitory molecules. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 7, n. MAY, p. 1–10, 2016.
- GARCIA DE MOURA, R. *et al.* PD-1 Blockade Modulates Functional Activities of Exhausted-Like T Cell in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. March, p. 1–12, 2021.
- GAUTAM, S. *et al.* CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 209, n. 2, p. 290–299, 2014.
- GEGINAT, J. *et al.* Immunity to pathogens taught by specialized human dendritic cell subsets. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 6, n. OCT, p. 1–13, 2015.
- GOGOI, M. *et al.* Salmonella escapes antigen presentation through K63 ubiquitination mediated endosomal proteolysis of MHC II via modulation of endosomal acidification in dendritic cells. **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 76, n. 2, 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/femspd/article/doi/10.1093/femspd/ftx125/4775126>.
- GUEDES, H. L. D. M.; FONSECA-MARTINS, A. M. #,1,2,3 ,. [s. l.], 2022.
- HABIB, S. *et al.* Leishmania donovani: Immune response and immune evasion with emphasis on PD-1/PDL-1 pathway and role of autophagy. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 195–208, 2021.
- HAILESELASSIE, Y. *et al.* Lactobacillus reuteri and Staphylococcus aureus differentially influence the generation of monocyte-derived dendritic cells and subsequent autologous T cell responses. **Immunity, inflammation and disease**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 315–326, 2016.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27621814><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5004286>.

HARRISON, O. J. *et al.* Dendritic Cells : Arbiters of Immunity and Immunological Tolerance Dendritic Cells : Arbiters of Immunity and. [s. l.], 2012.

IVETIC, A.; GREEN, H. L. H.; HART, S. J. L-selectin: A major regulator of leukocyte adhesion, migration and signaling. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. MAY, p. 1–22, 2019.

KAUFER, A. *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–17, 2017.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>.

KILLICK-KENDRICK, R. *et al.* Metacyclic promastigotes of *Leishmania* in the salivary glands of experimentally infected phlebotomine sandflies. **Parasite**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 55–60, 1996.

KLING, J. C.; DARBY, J.; KÖRNER, H. CCR7 facilitates the pro-inflammatory function of dendritic cells in experimental leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 177–185, 2014.

KUHN, S.; YANG, J.; RONCHESE, F. Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Essential for CD8+ T Cell Activation and Antitumor Responses After Local Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 6, n. November, p. 1–14, 2015. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00584/abstract>.

LAINSON, R.; RANGEL, B. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

LEISHMAN, B. Y.; ROSS, B. M. R. 1903.1. [s. l.], 1903.

LEISHMANIOSE VISCERAL: O QUE É, CAUSAS, SINTOMAS, TRATAMENTO, DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 8 ago. 2020.

LEITE DE SOUSA-GOMES, M.; ROMERO, G. A. S.; WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough?. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 1–13, 2017.

LYSENKO, A. J. Distribution of leishmaniasis in the Old World. **Bulletin of the World Health Organization**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 515–520, 1971.

MEIRA, C. dos S.; GEDAMU, L. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. **Microorganisms**, [s. l.], v. 7, n. 12, 2019.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, [s. l.], v. 389, n. 10066, p. 312–325, 2017. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30171-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30171-4).

MORGADO, F. N. *et al.* Unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and worsen skin infectious diseases - A comparative study of leishmaniasis and sporotrichosis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

NAOUAR, I. *et al.* Involvement of different CD4+ T cell subsets producing granzyme B in the immune response to *Leishmania major* antigens. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2014, 2014.

NOVAIS, F. O. *et al.* CD8+T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 1–21, 2017.

OHL, L. *et al.* CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. **Immunity**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 279–288, 2004.

OPAS, O. Situação epidemiológica Leishmaniose cutânea e mucosa. [s. l.], p. 10, 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **OPAS/OMS Brasil - Cooperação entre países para o desenvolvimento da Saúde**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=481:cooperacao-entre-paises-para-o-desenvolvimento-da-saude&Itemid=608. Acesso em: 26 abr. 2018.

ORGANIZACIÓN REGIONAL, P.; MIEMBROS, E. Informe epidemiológico de las Américas. [s. l.], p. 1–12, 2022. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56833/OPASCDEV220021_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

PAHO. Leishmanioses: Informe epidemiológico das américas. **Organização Pan-americana da Saúde - OPAS/OMS**, [s. l.], v. 6, p. 7, 2018. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5&isAllowed=y.

POMEROY, B. *et al.* Monocyte-derived dendritic cells from late gestation cows have an impaired ability to mature in response to *E. coli* stimulation in a receptor and cytokine-mediated fashion. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 167, n. 1–2, p. 22–29, 2015.

PRATES, D. B. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 90, n. 3, p. 575–582, 2011.

PREZA, G. C. *et al.* Antigen-presenting cell candidates for HIV-1 transmission in human distal colonic mucosa defined by CD207 dendritic cells and CD209 macrophages. **AIDS Research and Human Retroviruses**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 241–249, 2014.

PRINA, E. *et al.* 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. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 117, n. 2, p. 315–325, 2004.

RANDOLPH, G. J.; ANGELI, V.; SWARTZ, M. a. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 617–628, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056255>.

RE, D.; CJ, T.; ME, W. Infection and Activation of Human Neutrophils with Fluorescent *Leishmania infantum*. **Journal of Immunological Techniques in Infectious Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 3, 2016.

REGIONAL, P.; MEMBROS, E. Informe epidemiológico das Américas. [s. l.], p. 1–12, 2022.

REVIEW, S. 3 [4 +1. [s. l.], v. 00, n. 00, p. 2–5, 2015.

SAID, A.; WEINDL, G. Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation. **Journal of Immunology Research**, [s. l.], v. 2015, 2015.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, 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 alpha. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 179, n. 4, p. 1109–1118, 1994.

SAMARANAYAKE, N. *et al.* Association of HLA class I and II genes with cutaneous leishmaniasis: A case control study from Sri Lanka and a systematic review. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1626-8>.

SÁNCHEZ-PAULETE, A. R. *et al.* Cancer immunotherapy with immunomodulatory anti-CD137 and anti-PD-1 monoclonal antibodies requires BATF3-dependent dendritic cells. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 71–79, 2016.

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

SETH, S. *et al.* CCR7 Essentially Contributes to the Homing of Plasmacytoid Dendritic Cells to Lymph Nodes under Steady-State As Well As Inflammatory Conditions. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 186, n. 6, p. 3364–3372, 2011. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1002598>.

SHARPE, A. H.; PAUKEN, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 153–167, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.108>.

SOOSARAEI, M. *et al.* A decade bibliometric analysis of global research on leishmaniasis in Web of Science database. **Annals of Medicine and Surgery**, [s. l.], v. 26, n. November 2017, p. 30–37, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2017.12.014>.

STEINMAN, Ralph M. Dendritic cells : versatile controllers of the immune system. [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1155–1159, 2007.

STEINMAN, Ralph M. Dendritic cells: Understanding immunogenicity. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 37, n. SUPPL. 1, p. 53–60, 2007.

STEINMAN, R. M. The control of immunity and tolerance by dendritic cells. **Pathologie Biologie**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 59–60, 2003.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. a. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 137, n. 5, p. 1142–1162, 1973.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

TIBERIO, L. *et al.* Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration review-article. **Cellular and Molecular Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 4, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-018-0005-3>.

VAN GRIENSVEN, J. *et al.* Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 286–299, 2014.

VOLF, P.; VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology**, [s. l.], v. 36, n. SUPPL.1, p. 1–9, 2011.

ZHAO, Y. *et al.* The effects of CCR7 and related signaling pathways on Leishmania major -infected human dendritic cells. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 234, n. 8, p. 13145–13156, 2019.

E-mails:

Elane Priscila Maciel elanemaciel33@hotmail.com

Lucas Caxangá lucascaxanga@gmail.com

Giulia Lopes giuliadslopes@gmail.com

Sarah de Athayde Couto Falcão sarahdeathaydecoutofalcao@gmail.com

Cecília Beatriz Fiuza Favali cfavali@unb.br