



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

CAIO LOUREIRO SALGADO

**IMPACTO DO ENVELHECIMENTO NA RESPOSTA IMUNE
DE CAMUNDONGOS BALB/c e C57BL/6 CONTRA A
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Vitória
2019

Caio Loureiro Salgado

Impacto do envelhecimento na resposta imune de camundongos BALB/C e C57BL/6 contra a leishmaniose visceral

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes

Co-Orientador: Dra. Luciana Polaco Covre

Vitória
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

S164i Salgado, Caio Loureiro, 1995 -
Impacto do envelhecimento na resposta imune de camundongos BALB/C
e C57BL/6 contra a leishmaniose visceral / Caio Loureiro Salgado - 2019.
85 f. : il.

Orientador: Daniel Claudio de Oliveira Gomes.
Coorientador: Luciana Polaco Covre.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Leishmania infantum. 2. Linfócitos T. I. Gomes, Daniel Claudio de
Oliveira. II. Covre, Luciana Polaco. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



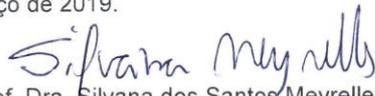
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO

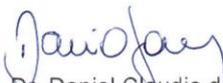
O mestrando Caio Loureiro Salgado apresentou a dissertação intitulada "Impacto do envelhecimento na resposta imune de camundongos BALB/c e C57BL/6 contra a leishmaniose visceral" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a dissertação habilitando o biólogo **Caio Loureiro Salgado** a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 28 de março de 2019.


Prof. Dra. Blima Fux
(Membra Interna)


Prof. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles
(Membra Externa)


Prof. Dr. Daniel Claudio de Oliveira Gomes
(Orientador)

Dedico este trabalho a minha mãe,
Marilia Miranda Avancini Loureiro,
por ter sido meu maior exemplo de
determinação e superação durante todo
meu percurso e me guiado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida que me concedeu, por me guiar e me guardar todos os dias, por me dar condições de lutar e vencer os muitos obstáculos que enfrentei ao longo do caminho para que pudesse chegar até aqui e pelas pessoas especiais que colocou em meu caminho.

A toda minha família que esteve presente em todos os momentos, em especial, a minha mãe, prima, tias e avós, que apoiaram minhas decisões durante este tempo, sempre demonstrando preocupação e carinho apesar de tudo.

Minha mãe, *Marilia Miranda* pelo esforço de uma mãe solteira de criar dois filhos e que lutou, para que eu tivesse a melhor formação possível, que sempre me apoio e acreditou em mim.

Obrigada mamãe pelas orações, por sofrer minhas dores e estar ao meu lado nos momentos mais difíceis, minha vida não teria sentido sem você!

A *Bruno e Renato*, meus irmãos de vida, pelo companheirismo e irmandade onde até nas piores horas estavam presentes.

Aos meus amigos e em especial a toda “Área 42” por todos esses anos de amizade.

A *Carla Baroni* que foi a pessoa que abriu as portas do mundo científica para mim e que me permitiu chegar onde estou e por ter me dado tantos ensinamentos.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Daniel Claudio de Oliveira Gomes*, que me aceitou no laboratório desde a minha graduação, sentou comigo na bancada, me ensinou muito e mesmo ante a todos os meus defeitos me aceitou no mestrado de braços abertos. Agradeço aos conhecimentos passados, à orientação, aos puxões de orelha e por acreditar em mim e no meu potencial. Agradeço à *Marcelle, Estevão, Renan, Emmanoel, Glênia, Bruna, Priscilla, Lorenzo, Divan, Andres, Juliana e Régia* por terem sido companheiros de laboratório e passaram por tantas coisas nesses anos de laboratório.

A *Luciana Covre* por ter me ajudado tanto na citometria, que mesmo puxando minha orelha sobre a organização do meu caderno, nunca se recusou a ajudar quando mais precisava.

A *Thamires Vettorazzi*, nossa secretaria do programa que como um anjo da guarda, salvou meu pescoço inúmeras vezes sempre com a maior gentileza e um sorriso no rosto.

Aos amigos do NDI, sem os quais os dias no laboratório não teriam sido os mesmos.

Agradeço às funcionárias do NDI *Rose, Arianye* pelo carinho.

Agradeço as agências de apoio e financiamento: UFES e Capes

Muito obrigado!

Demore o tempo que for para decidir o que você quer da vida, e depois que decidir não recue ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te dissuadir.

Friedrich Nietzsche

Ser capaz de, a qualquer momento, sacrificar o que você é pelo que se tornará.

Charles Frédéric Dubois

Resumo

Devido à alta prevalência e sua gravidade, a leishmaniose visceral adquiriu grande importância para a vigilância epidemiológica. Embora se trate de uma doença que acomete diferentes faixas etárias, indivíduos velhos são mais prejudicados pela doença, pois o envelhecimento é caracterizado pela redução do sistema imunológico que é intitulado de Imunosenescência. Este termo usado para definir o declínio fisiológico das funções imunológicas resultantes do envelhecimento. Está associada à indução de múltiplas características fenotípicas e disfuncionais no pool de células T e à capacidade prejudicada de montar respostas imunes efetivas contra patógenos e uma resposta vacinal satisfatória. A imunidade à infecção por *Leishmania infantum* requer uma resposta imune específica Th1, responsável por induzir os mecanismos leishmanicidas mediados por macrófagos. No presente estudo, investigamos se as alterações imunes impressas pelo envelhecimento teriam um impacto sobre a leishmaniose visceral. Nós avaliamos a capacidade funcional de células T efetoras, bem como o perfil de diferenciação de memória no *pool* de células T durante a infecção de ambas as cepas BALB/c e C57BL/6. Assim, camundongos jovens (6-8 semanas) e idosos (72 semanas) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. infantum* e eutanasiados durante o pico da infecção. Nossos resultados demonstraram que camundongos C57BL/6 infectados com idade avançada apresentaram maior carga parasitária tanto no baço quanto no fígado, em comparação com os controles. No entanto, camundongos BALB/c de idosos demonstraram uma redução do parasitismo no baço, mas não no fígado, associada a uma maior expressão de marcadores inibitórios (KLRG1 e PD-1) e NKG2D quando comparados a outros grupos. Além disso, camundongos velhos infectados demonstraram aumento do perfil pró-inflamatório caracterizado pela produção de IFN- γ , TNF- α , óxido nítrico (NO) e IL-2, bem como o acúmulo de células T de memória efetoras. Em resumo, nossos resultados demonstram que o envelhecimento resulta em modificações distintas durante a leishmaniose visceral. Camundongos da linhagem BALB/c têm seu perfil de maior parasitismo revertido, enquanto que em camundongos C57BL/6 é o oposto. Esses resultados estão associados à ação reguladora da resposta adaptativa como a ação dos receptores inibitórios e de ativação, aos quais se tornam mais frequentes durante o envelhecimento.

Palavras chave: Imunosenescência, *Leishmania infantum*, Células T de memória

Abstract

Due to its high prevalence and severity, visceral leishmaniasis has acquired great importance for epidemiological surveillance. Although it is a disease that affects different age groups, older individuals are further harmed by the disease, as aging is characterized by the reduction of the immune system which is titled Immunosenescence. This a term used to define the physiological decline of immune functions resulting from aging. It is associated with induction of multiple phenotypic and dysfunctional characteristics in the T cell pool and impaired ability to mount effective immune responses against pathogens and a satisfactory vaccine response. Immunity to *Leishmania infantum* infection requires a specific Th1 immune response, responsible for inducing the leishmanicidal mechanisms mediated by macrophages. In the present study, we investigated whether the immune changes imprinted by aging would have an impact on the fate of visceral. We evaluated the functional capacity of effector T cells as well as the memory differentiation profile in the T cell pool during infection of both BALB/c and C57BL/6 strains. Thus, young (6-8 weeks) and elderly (72 weeks) mice were infected with 10^7 promastigotes of *L. infantum* and euthanized during the peak of infection. Our results demonstrated that old-infected C57BL/6 mice presented higher parasite load in both spleen and liver compared with controls. However, elderly BALB/c mice demonstrated a reduction of parasitism in the spleen, but not in the liver, associated with a higher expression of inhibitory markers (KLRG1 and PD-1) and NKG2D when compared to other groups. In addition, age-infected mice demonstrated increased proinflammatory profile characterized by the production of IFN- γ , TNF- α , nitric oxide (NO) and IL-2, as well as the accumulation of effector memory T cells. In summary, our results demonstrate that aging results in distinct modifications during visceral leishmaniasis BALB/c mice have their profile of greater parasitism reverted, whereas in C57BL/6 mice it is the opposite. These results are associated with the regulatory action of the adaptive response as the action of inhibitory and activation receptors, to which they become more frequent during aging.

Key words: Immunosenescence, *Leishmania infantum*, Memory T cells

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1: Endemicidade de casos relatados de leishmaniose visceral ocorridos ao redor do mundo no ano de 2013.** Adaptado de (WHO, 2015)..... 20
- Figura 2: Ciclo biológico de protozoários do gênero *Leishmania spp.* na natureza .** Adaptado (CDC, 2018) 22
- Figura 3: Estratégia de *gates* para análise de receptores inibitórios e de ativação em linfócitos T.** Os linfócitos foram identificados primeiramente pelo tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), seguido da eliminação de eventos duplos. As populações CD4 positiva (A) e CD8 positiva (B) foram selecionadas. Em seguida, foi realizado a análise para a expressão dos receptores KLRG1, PD1 e NKG2D 40
- Figura 4: Estratégia de *gates* para análise de células T de memória.** Os linfócitos foram identificados primeiramente pelo tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) seguido da eliminação de eventos duplos. As populações CD4 positiva (A) e CD8 positiva (B) foram selecionadas e estratificadas nos subtipos de memória, caracterizadas pela expressão de CD44 e CD62L (Naive-CD44⁻ CD62L⁺; memória central-CD44⁺ CD62L⁺; e memória efetora-CD44⁺ CD62L⁻). As subpopulações de memória foram então analisadas de acordo com a expressão dos receptores KLRG1 e PD1, e pela produção de citocina intracelular IFN- γ e IL-10..... 42
- Figura 5: Avaliação da carga parasitária após a infecção de camundongos jovens e senescentes por *L. infantum*.** Camundongos BALB/c jovens e senescentes foram infectados com 10⁷ promastigotas de *L. infantum*. O número de parasitos/mg de tecido foi medido individualmente no baço e fígado (A) 14 dias após a infecção por método de diluição limitante (LDA). A diferença relativa da carga parasitária do baço e fígado (B) foi normalizadas com o grupo de menor parasitismo. Os resultados representam a média \pm S.D de três experimentos independentes. *p < 0.05, ****p < 0.0001;..... 46
- Figura 6: Análise macroscópica de baços e pesagem de tecidos.** Camundongos BALB/c infectados e não infectados tiveram baço e fígado removido para análise macroscópica do baço (A) e pesagem (B). Os baços de camundongos BALB/c, jovens e senescentes, infectados ou não por *L. infantum* foram analisados macroscopicamente (A) e posteriormente baço e fígado foram pesados para análise de esplenomegalia e hepatomegalia. Fotografia representativa de três experimentos independentes.... 47
- Figura 7: Efeito do envelhecimento na produção de citocinas e óxido nítrico *in situ*.** Baço e fígado de camundongos BALB/c jovens e senescentes foram processados 14 dias após a infecção. A avaliação *in situ* de IFN- γ (A e E), IL-4 (B e F) e IL-10 (C e G) foram realizadas por ELISA. A produção de óxido nítrico (D e H) foi avaliada por método de Griess. O resultado representa a média \pm S.D de três experimentos independentes. *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001. 49
- Figura 8: Análise *ex vivo* da expressão de receptores inibitórios em Linfócitos T durante a infecção por *L. infantum*.** Células T CD4⁺ e T CD8⁺ isolados de esplenócitos de camundongo BALB/c infectados, marcados para expressão de PD1(A e C) e KLRG1 (B e D) analisados por citometria. Resultados acumulativos representados como média \pm S.D de três experimentos independentes. *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001. 50
- Figura 9: Análise das populações de células T de memória durante a infecção por *L. infantum*.** Gráficos de citometria representativa e dados cumulativos da frequência de células T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (C) de memória em camundongos BALB/c, caracterizados pela expressão de CD44 e CD62L (Naive-CD44⁻ CD62L⁺; memória central-CD44⁺ CD62L⁺; e memória efetora-CD44⁺ CD62L⁻). Resultados acumulativos representados como média \pm S.D de três experimentos independentes. *p < 0.05, **p < 0.01; ****p < 0.0001..... 52
- Figura 10: Avaliação da carga parasitária após a infecção de camundongos jovens e senescentes por *L. infantum*.** Camundongos C57BL/6 jovens e senescentes foram infectados com 10⁷ promastigotas de *L. infantum*. Número de parasitos/mg de tecido foi medido individualmente no baço e fígado (A) 28 dias após a infecção por método de diluição limitante (LDA). A diferença relativa

da carga parasitária do baço e fígado (B) foram normalizados com o grupo jovem. Os resultados representam a média \pm S.D de três experimentos independentes. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ 54

Figura 11: Análise macroscópica de baços infectados. Camundongos C57BL/6 infectados e não infectados tiveram baço e fígado removido para análise macroscópica do baço (A) e pesagem (B). Os baços de camundongos C57BL/6 jovens e senescentes, infectados ou não por *L. infantum* foram analisados macroscopicamente (A) e posteriormente baço e fígado foram pesados para análise de esplenomegalia e hepatomegalia. Fotografia representativa de três experimentos independentes. Os resultados representam a média \pm S.D de três experimentos independentes. ** $p < 0.01$; 55

Figura 12: Efeito do envelhecimento na produção de citocinas e óxido nítrico *in situ*. Baço e fígado de camundongos C57BL/6 jovens e senescentes foram processados 28 dias após a infecção. A avaliação *in situ* de TNF- α (A), IL-2 (B), IFN- γ (D), IL-10 (E) foram realizadas por ELISA. A produção de óxido nítrico (C e F) foi avaliada por método de Griess. O resultado representa a média \pm S.D de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ 57

Figura 13: Análise *ex vivo* da expressão de receptores inibitórios em Linfócitos T durante a infecção por *L.infantum*. Células T CD4+ e T CD8+ isolados de esplenócitos de camundongo C57BL/6 infectados foram marcadas para a avaliação da expressão de PD1 (A e D), KLRG1 (B e E) e NKG2D (C e F) e analisados por citometria. Resultados acumulativos representados como média \pm S.D de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ 58

Figura 14: Análise das populações de células T de memória. Gráficos de citometria representativa e dados cumulativos da frequência de células T CD4+ (A) e T CD8+ (B) de memória de camundongos C57BL/6 infectados e não infectados, caracterizados pela expressão de CD44 e CD62L (Naive-CD44⁻CD62L⁺; memória central-CD44⁺CD62L⁺; e memória efetora-CD44⁺CD62L⁻). Resultados acumulativos representados como média \pm S.D de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ 60

Figura 15: Análise de receptores inibitórios e citocinas em células T de memória. Dados cumulativos da frequência de células T memória efetora CD4+ (A) CD8+ (B) e de memória central CD4+ (C) CD8+ (D). Células T isolados de camundongos C57BL/6 caracterizados pela expressão de CD44 e CD62L (memória central-CD44⁺CD62L⁺; e memória efetora-CD44⁺CD62L⁻) e estratificados pela expressão de receptores inibitórios (KLRG1, PD1) e produção de citocina (IFN- γ e IL-10) analisados por citometria. Resultados acumulativos representados como média \pm S.D de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ 63

Figura 16: Análise infecção *in vitro* de macrófagos. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 jovens e senescentes foram infectados *in vitro* com *L. infantum* na proporção de 1:5. A porcentagem de infecção (A), número de parasitos por célula (B) e índice de infecção (C) foram quantificadas em 4 tempos intervalos em 24 horas. A produção de óxido nítrico (D) foi avaliada por método de Griess. Os dados foram apresentados como média \pm S.D. de três experimentos independentes, apresentados * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag – Antígeno

ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

APC – Células apresentadoras de antígenos

B.O.D. – Demanda Bioquímica de Oxigênio

CCL2 – Ligante 2 de quimiocina (motivo CC) (*chemokine (C-C motif) ligand 2*)

CR – Receptor de complemento

CD28 – Receptor co-estimulador de células T

CD44 – Glicoproteína de membrana que liga à ácido hialurônico e medeia a adesão de leucócitos

CD45RB – Proteína tirosina fosfatase receptor tipo C subtipo RB

CD62L – Molécula de adesão celular L-selectina

CD95 – Antígeno de apoptose 1

CD's – Células Dendríticas

Células NK – Células natural killers

Células NKT – Células natural killers T

cm² – Centímetro quadrado

CMV – Citomegalovírus

CO₂ - Dióxido de carbono

CTLA4 – Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos

CXCL1 – Citocina pertencente à família CXC

D-MEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ERK – *Extracellular signal-regulated kinases* / Quinases reguladas por sinal extracelular

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FSC-A - *Foward Scatter*

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

GP63 – Glicoproteína de 63 kDa

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HEPES - Ácido N-2 hidroxietilpiperazina-N'-2 etanosulfônico

HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida

IDO – Indoleamina 2, 3 oxigenase
IFN- γ – Interferon gama
Ig - Imunoglobulina
IL- Interleucina
iNOS- Óxido nítrico sintase induzida
JI – Jovem infectado
JNI – Jovem não infectado
KLRG1 – *killer cell lectin-like receptor G1* / Receptor do tipo lectina de células assassinas G1
L. – *Leishmania*
LaAg – Antígenos brutos de *Leishmania amazonensis*
LiAg – Antígenos brutos de *Leishmania infantum*
LDA – Análise de diluição limitante
LPG – Lipofosfoglicanos
LC – Leishmaniose cutânea
LCD – Leishmaniose cutânea difusa
LM – Leishmaniose mucocutânea
LT – Leishmaniose tegumentar
LV – Leishmaniose visceral
MCP-1 – Proteína 1 quimiotática de monócitos (*monocyte chemoattractant protein 1*)
MC – Memória central
ME – Memória efetora
mg – Miligrama
mL – Mililitro
mM – Milimolar
 μ g – Microgramas
 μ M – Micromolar
 μ L – Microlitro
NALT – tecido linfóide associado à nasofaringe
NKG2D – NKG2-D type II integral membrane protein / Proteína de membrana integral NKG2-D
NO – Óxido nítrico
PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos
PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PD1 – *Programmed cell death protein 1* / Proteína de morte celular 1

PKC – Proteína quinase C

PPG – Proteofosfoglicanos

PTK – Proteínas tirosina quinase

RACKs – Receptores de proteína quinase C ativada

SFB – Soro fetal bovino

SFM – Sistema mononuclear fagocitário

SI – Senescente infectado

SNI – Senescente não infectado

SSC – *Side Scatter*

T CD4+ - Linfócito T auxiliar

T CD8+ - Linfócito T citolítico

Th0 – T helper tipo 0

Th1 – T helper tipo 1

Th2 – T helper tipo 2

T-reg – Linfócito T regulador

TLRs – Receptores tipo Toll

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

OMS – Organização Mundial da Saúde

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 - ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE.....	18
1.2 – RESPOSTA IMUNOLOGICA DE MODELOS MURINOS DURANTE A LEISHMANIOSE VISCERAL	22
1.3 – RESPOSTA IMUNONOLÓGICA DURANTE A LEISHMANIOSE VISCERAL	24
1.4 – SENESCÊNCIA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO	27
2. OBJETIVOS	32
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	33
2.2– OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 – ASPECTOS ÉTICOS E ANIMAIS	35
3.2 – CULTIVO de <i>L. infantum</i>	35
3.3 – INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	35
3.3.1 – GRUPOS EXPERIMENTAIS	36
• BALB/C	36
• C57BL/6.....	36
3.4 – CULTURA DE MACRÓFAGOS E INFECÇÃO COM PROMASTIGOTAS <i>IN VITRO</i>	36
3.5 – OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO BAÇO E FIGADO	37
3.6 – DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA.....	38
3.7 – IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	38
3.7.1 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES INIBITÓRIOS E DE ATIVAÇÃO EM CÉLULAS T <i>EX VIVO</i>	39
3.7.2 – AVALIAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS T DE MEMÓRIA	41
3.8 – DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	42
3.9 – DOSAGEM DE CITOCINAS	43
3.10 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
4. RESULTADOS	44
4.1 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA SENESCÊNCIA NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS BALB/c A INFECÇÃO POR <i>L. infantum</i>	45
4.2 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA SENESCÊNCIA NA RESPOSTA IMUNOLOGICA DE CAMUNDONGOS C57BL/6 A INFECÇÃO POR <i>L. infantum</i>	53
5. DISCUSSÃO	65
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 - ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma terminologia referente a um complexo de doenças clinicamente singulares, causadas por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*. Ela é considerada a quinta doença infecto-parasitária de maior importância em todo mundo, sendo classificada como nível 1 de prioridade pela Organização Mundial da Saúde (HOTEZ et al., 2006; KEDZIERSKI; ZHU; HANDMAN, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

No Brasil a doença é caracterizada primariamente como uma zoonose. Os principais reservatórios do parasito no ambiente silvestre são os mamíferos das famílias Canídea e Didelphidae, enquanto na zona urbana o *Canis familiaris* e o homem são os principais reservatórios do parasito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os principais determinantes para as variações clínicas da doença são, a espécie do parasito e a resposta imunológica específica do hospedeiro. Dessa forma, a doença pode ser classificada em dois grandes grupos: (1) A Leishmaniose Tegumentar (LT), que ainda pode ser subdividida na forma cutânea simples (LC), cutânea difusa (LCD) e mucocutânea (LM) e que se caracterizam por manifestações lesionais na pele e mucosa e (2) A Leishmaniose Visceral (LV), caracterizada como uma infecção sistêmica que pode resultar na morte do hospedeiro, sendo considerada a forma mais grave da doença (MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

Vulgarmente conhecida como calazar ou kala-zar, a LV é causada pelas espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* (WHO, 2010) e acomete órgãos com maior população de células do sistema mononuclear fagocitário (SFM) como o baço, fígado e medula óssea. A elevada densidade de parasitos nestes locais manifestam condições clínicas como esplenomegalia e hepatomegalia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; REIS et al., 2009). Além disso, também se observa febre prolongada associada a calafrios, perda de peso, anemia progressiva, palidez cutânea devido à pancitopenia e hipergamaglobulinemia. A evolução do quadro pode gerar edemas em membros inferiores, hemorragias, desnutrição, ascite e icterícia. O óbito geralmente decorre por infecções bacterianas secundárias, e/ou sangramentos por trombocitopenia em função do comprometimento funcional dos órgãos internos (DAVIDSON, 1998; MINISTÉRIO

DA SAÚDE, 2014; MURRAY et al., 2005) e pode chegar a 90% de fatalidade em casos não tratados (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2017b).

As leishmanioses integram um importante problema de saúde pública mundial. O parasito é encontrado em 5 continentes e 88 países, principalmente, situados nas regiões tropicais e subtropicais. (PIGOTT et al., 2014; WAITE et al., 2015). As estimativas atuais são de que aproximadamente 350 milhões de pessoas estejam em risco de infecção. Além disso, dados apontam para cerca de 400 mil novos casos anuais de LV, onde 90% dos casos se concentram em somente 6 países (Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão). (Figura 1) (ALVAR et al., 2012; PIGOTT et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Os casos mais frequentes são crianças menores de 10 anos do sexo masculino. A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular, o que é agravada pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas. Além disso, associa-se o fato de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Nas Américas 12 países possuem registros de ocorrência da LV, totalizando 52.176 casos no período de 2001 a 2015. Destes, o Brasil lidera o ranking com 95,1% das ocorrências, onde se observa aspectos geográficos, climáticos e de fauna, que favorecerem a extensa distribuição da infecção pelo país. Dentre os estados, no Espírito Santo foram registrados 36 casos da doença no mesmo período. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2017a).

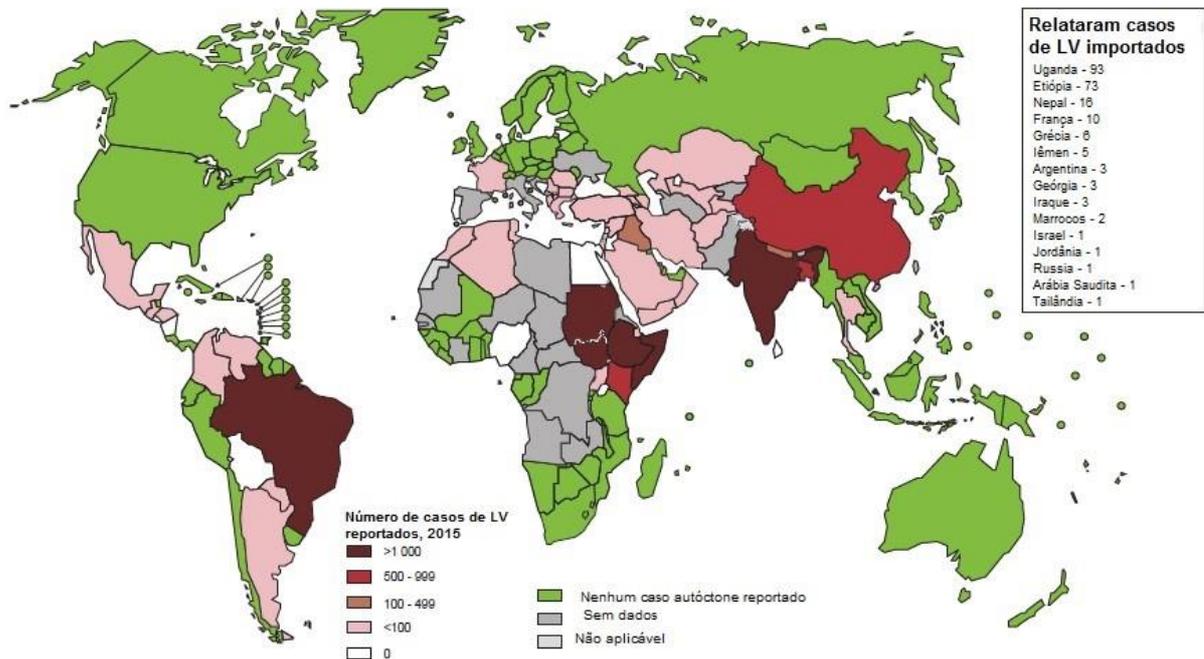


Figura 1: Endemicidade de casos relatados de leishmaniose visceral ocorridos ao redor do mundo no ano de 2013. Adaptado de (WHO, 2015)

A transmissão da doença ocorre através da picada de dípteros fêmeas do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*. Os vetores são também conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros. No Brasil até o momento duas espécies estão relacionadas com a transmissão da doença: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruz* (SARAIVA et al., 2010), que inoculam o parasito na epiderme do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo.

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida do tipo heteroxênico com duas formas morfológicas caracteristicamente diferentes, capazes de se modificar aos diferentes hospedeiros ao qual se encontram. Isto é, no tubo digestivo dos vetores invertebrados encontram-se as formas promastigotas infectantes com formato alongado e flagelado, enquanto que nos hospedeiros vertebrados, os mamíferos, são encontradas as formas amastigotas, intracelulares obrigatórios e de formato arredondado e sem flagelo (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007; L SACKS; V. PERKINS, 1984).

O ciclo de vida do parasito no interior do trato digestivo do vetor é marcado por diferentes transformações morfológicas até o desenvolvimento da forma infectante ao hospedeiro, denominada de promastigota metacíclica. Inicialmente o

inseto vetor ingere macrófago e monócitos infectados com formas amastigotas que se rompem liberando os parasitos, estes permanecem no intestino protegidos pela matriz peritrofica. Posteriormente, cerca de 24 horas após a ingestão, as formas amastigotas sofrem mudanças morfológicas como o achatamento do corpo e desenvolvimento do flagelo se tornando promastigotas pró-cíclica, que se proliferam intensamente até que ocorra a degeneração da matriz, migração e deposição na região anterior do canal alimentar do inseto. Nesta região o parasito sofre outra transformação chamada metaciclogênese dando origem à forma infectante do parasito. A deposição das formas metacíclicas na válvula estomodeal obstruem o canal dificultando a ingestão de sangue pelo inseto, resultando no relaxamento dos músculos responsáveis pela sucção, provocando o refluxo e inoculação dos parasitos durante o repasto sanguíneo. (ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; SACKS, 1989; SARAIVA et al., 1995).

Após a inoculação, as formas promastigotas são internalizadas pelas células do sistema fagocítico do hospedeiro e se multiplicam em seu fagolisossomo sob a forma de amastigotas. Essas formas são resistentes às enzimas lisossomais, sendo capazes de sobreviver dentro do fagolisossomo e de se replicar por divisão binária, o que culminará na ruptura da célula infectada e na liberação das amastigotas (ROMÃO et al., 2007). Quando liberadas, as amastigotas alcançam o fluido intersticial e podem infectar novas células fagocitárias. Além disso, essas células infectadas podem ser ingeridas por um inseto vetor ainda não infectado durante um novo repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo do parasito na natureza (Figura 2) (HANDMAN; T. SPIRA, 1977; HAWKING, 1948)

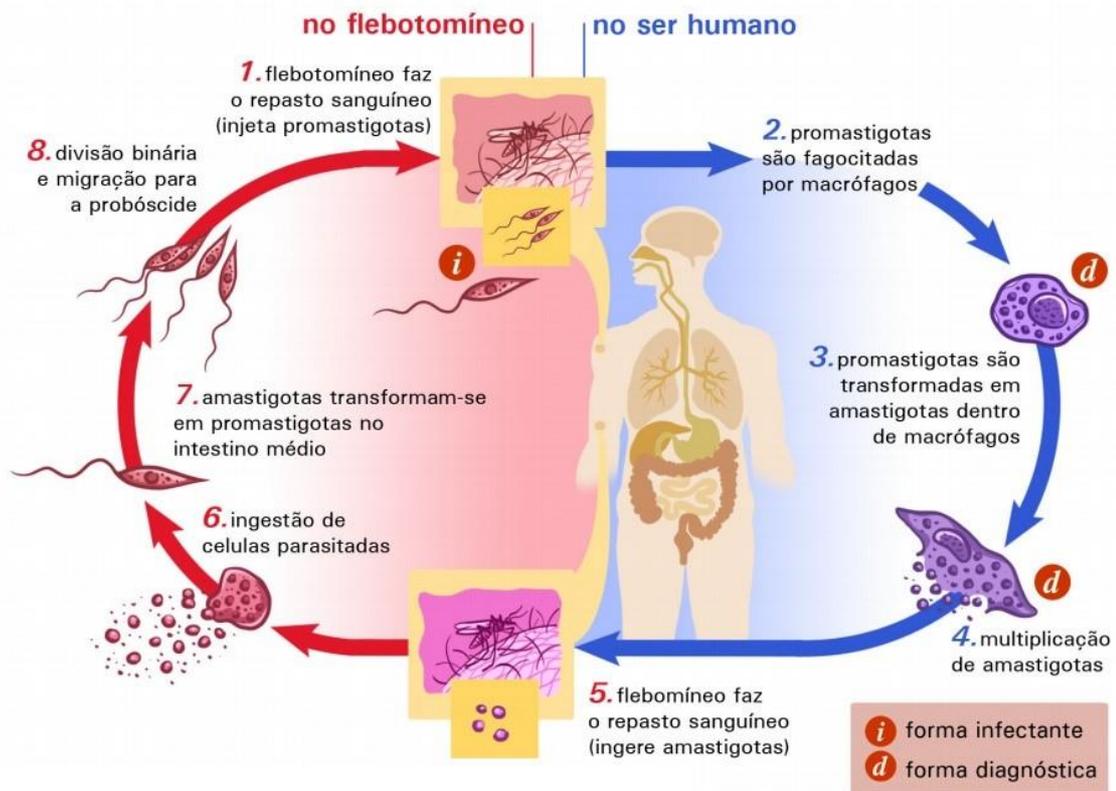


Figura 2: Ciclo biológico de protozoários do gênero *Leishmania* spp. na natureza . Adaptado (CDC, 2018)

1.2 – RESPOSTA IMUNOLOGICA DE MODELOS MURINOS DURANTE A LEISHMANIOSE VISCERAL

A utilização de diferentes linhagens de camundongos em modelos de infecções, como a leishmaniose, é de suma importância para construção dos conhecimentos sobre a imunopatogênese e características imunológicas como fator de resistência e susceptibilidade, para que posteriormente sejam aplicados em estudos de vacina e novos tratamentos (KEDZIERSKI; ZHU; HANDMAN, 2006; NATALE; SEIXAS; ALMEIDA, 2016) .

Desta forma estudos mostram que, em todas as formas de leishmaniose, os fatores genéticos do hospedeiro desempenham um papel importante na determinação tanto da gravidade da doença quanto de sua resolução (SAKTHIANANDESWAREN; FOOTE; HANDMAN, 2009). Entre os modelos mais utilizados, destacam-se aqueles que empregam a infecção por *L. major*

(MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). Neste modelo, a elucidação do paradigma de suscetibilidade representado pelo camundongo BALB/c que desenvolve uma resposta imunológica celular de perfil Th2, que se caracteriza por uma maior produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-13 e IL-10. Citocinas essas que iram inibir a produção de IFN- γ e de óxido nítrico (NO), além de promover a ativação alternativa de macrófagos (GORDON; MARTINEZ, 2010; L SACKS; V. PERKINS, 1984; THOMAS; BUXBAUM, 2008) que desviam o metabolismo da L-arginina para produção de poliaminas e ureia que favorecem o crescimento do parasito (ARTIS; SPITS, 2015; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; MILLS et al., 2000). Enquanto o modelo de resistência a infecção por *L. major* é representado pelo camundongo C57BL/6, com uma polarização de resposta celular de perfil Th1 com alta produção de IFN- γ e NO, sendo o NO responsável pela morte dos parasitos na derme (KUMAR; NYLÉN, 2012; LOCKSLEY et al., 1987; MILLS et al., 2000).

O processo de polarização da resposta das células T auxiliares em subtipos Th1 e Th2, com características pró-inflamatória e anti-inflamatória respectivamente, está intimamente ligado à susceptibilidade ou resistência ao parasito em modelos de leishmaniose tegumentar. No entanto, diferente do que ocorre no modelo clássico de infecção cutânea em camundongos, causada por *L. major*, na LV não é observado diferenças associadas à expansão preferencial de células Th1 ou Th2, havendo então uma resposta mista que não caracteriza um perfil de resistência ou susceptibilidade a infecção, (ANTONELLI et al., 2004; KHALIL et al., 2005)

A infecção através *L. infantum* ou *L. donovani* em modelo murino são importantes para estudos *in vivo* e testes vacinais, entretanto, não reproduz a doença humana. Estes animais conseguem um estado de “auto-cura”, reduzindo assim a carga parasitária após a sexta semana de infecção. Esse controle é mediado pela produção de IFN- γ por células T esplênicas e por um padrão de resposta do tipo Th1, via participação da IL-12, além da ativação de macrófagos (MELBY et al., 2001).

Apesar de suas limitações, o modelo LV têm sido úteis para reproduzir manifestações subclínicas, identificação de genes e vias envolvidas na resposta imune do hospedeiro à infecção e controle de cargas parasitárias (NATALE; SEIXAS; ALMEIDA, 2016; SAKTHIANANDESWAREN; FOOTE; HANDMAN, 2009).

1.3 – RESPOSTA IMUNONOLÓGICA DURANTE A LEISHMANIOSE VISCERAL

A resposta imunológica do hospedeiro começa logo após o repasto sanguíneo, onde ao picar, o flebótomo infectado produz uma resposta inflamatória local devido a lesão e a inoculação de saliva, gerando o recrutamento de células do sistema imunológico como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Com a liberação das promastigotas junto a saliva, são liberados também moléculas vasodilatadoras como a Aspirase e Maxadilan e enzimas imunomoduladoras, como a hialuronidase, que auxiliam no processo infeccioso (LERNER; LUGA; REDDY, 2007; LESTINOVA et al., 2017; VOLFOVA et al., 2008). Concomitantemente as promastigotas induzem macrófagos a secretarem CXCL1 e MCP-1 que atuam como fatores quimiotáticos de neutrófilos e monócitos, respectivamente (ESTHER L; STEPHEN M, 1997). Células essas que depois de infectadas migram pelas vias linfáticas até os linfonodos e posteriormente para as vísceras como fígado e o baço (GANNAVARAM et al., 2016).

Dentro do hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* em sua forma promastigota tem o início de sua fagocitose através da interação de receptores presentes na superfície do parasito, como lipofosfoglicano (LPG), glicoproteína de superfície de 63kDa (GP63) e proteofosfoglicanos (PPG) (NADERER; MCCONVILLE, 2008; YAO; DONELSON; WILSON, 2003), com os receptores de células fagociticas do hospedeiro como os Receptores de Complemento CR1, CR3 (Mac-1), Receptor de Fibronectina e Receptor Manose-Fucose (KANE; MOSSER, 2000).

Após a sua captação, a *Leishmania* precisa evadir-se dos mecanismos efetores imunológicos inatos e adaptativos para desenvolver uma infecção bem-sucedida. É durante o seu desenvolvimento que o parasito sofre modificações morfológicas, bioquímicas e fenotípicas que aumentam sua virulência e permitem sua fuga do sistema imunológico, como a expressão da molécula gp63 responsável pela clivagem da proteína C3b gerando sua forma inativa, iC3b. Este processo de conversão favorece a depuração fagocitária em detrimento a depuração lítica pelo complemento. Além disso, o espessamento do glicocálice composto pelo LPG inibe a Proteína Quinase C (PKC), que juntamente com proteínas Tirosina Quinase (PTK) regulam a ação microbicida do fagolisossomo (COURTENAY et al., 2017; GIORGIONE, 1996; ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012).

Embora os macrófagos sejam as principais células hospedeiras do parasito, os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o local de infecção e iniciam o processo de resposta imediata. Elas atuam como células microbicidas através de mecanismos como produção de NO (CHARMOY et al., 2007) e elastase neutrofílica (NE) (RIBEIRO-GOMES et al., 2007). Entretanto, a *Leishmania* possui mecanismos de sobrevivência como a modulação positiva da fosforilação das quinases ERK1/2 e de moléculas como Bfl-1 e Bcl-2 (SARKAR et al., 2012) resultando na sobrevivência do neutrófilo infectado e permitindo que o parasito infecte outros fagócitos (PETERS et al., 2008; RIBEIRO-GOMES et al., 2012). Portanto, é plausível que os neutrófilos desenvolvam dupla função na leishmaniose, protegendo o hospedeiro através do combate ao parasito e auxiliando no processo infeccioso (CARLSEN et al., 2015).

As células dendríticas (CDs) são outra população celular que participa da resposta contra o parasito, sendo essencial para conexão entre a resposta imune inata e a adaptativa. Sua interação é inicializada através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) como GPI (glicosilfosfatidilinositol) e flagelina (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003), que estão presentes no parasito. Esse reconhecimento é realizado através dos receptores de reconhecimento de PAMPs, como os receptores tipo Toll (TLRs) que estão presentes na CDs. O resultado da interação entre as células dendríticas e a *Leishmania* é dependente da linhagem de célula dendrítica envolvida (SOONG, 2008). Podem ser elas de origem plamocitoídes, que não realizam fagocitose, mas produzem IL-12 através da ativação de TLR9; e as CDs de origem mieloides, que exerce função citotóxica através do estímulo a produção de IFN- γ pelas células NK, além de produzirem IL-12 (SCHLEICHER et al., 2007). Apesar disso, estudos demonstram que a *Leishmania* possuem mecanismos de escape como capacidade de induzir a produção de indoleamina 2, 3 oxigenase (IDO) pelas CDs; inibindo a produção triptofano durante o desenvolvimento policlonal das células T bem como na inibição a produção da IL-12 que compromete a ativação de células NK (DONOVAN et al., 2012).

Dentre os fagócitos que migram para o local da infecção, os macrófagos são as principais células que abrigam ou eliminam a *Leishmania* (NADERER; MCCONVILLE, 2008). Em relação aos mecanismos efetores, observa-se a interação entre a imunidade inata e adaptativa onde a produção de citocinas pró-

inflamatórias pelos linfócitos como, IFNs do tipo 1, IL-1, e TNF- α são capazes de induzir a ativação dos macrófagos (BRONTE; ZANOVELLO, 2005). O IFN- γ é a citocina mais importante para o processo de ativação dos macrófagos, induzindo a produção de óxido nítrico-sintase induzível (iNOS), uma enzima que através da conversão de L-arginina em L-citrulina é capaz de formar óxido nítrico (NO). Essa molécula química altamente citotóxica que provocará a morte do parasito (LIEW, 1990).

Por outro lado, se durante o processo de infecção, ocorrer uma maior produção de citocinas anti-inflamatórias como o TGF- β , IL-4 e IL-10, por linfócitos T, linfócitos B e linfócitos T reguladores (T-reg), os mecanismos efetores dos macrófagos são reduzidos e/ou desativados levando o favorecimento da infecção e replicação do parasito. A presença dessas citocinas também podem atuar como sinais de inibição para a produção das citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, bem como o IFN- γ , resultando na continuidade da infecção (GORDON; MARTINEZ, 2010).

A ação de linfócitos T CD4⁺ Th1 é crítico para a morte do parasito pois através da produção de IFN- γ e TNF- α , induzem a ativação de macrófagos (A. M. COELHO-CASTELO et al., 2009). Da mesma forma, linfócitos T CD8⁺ possuem a capacidade de produzir IFN- γ e são importantes por sua ação citotóxica (FREITAS; PINHEIRO, 2010). Além disso, Stern e colaboradores observaram que camundongos BALB/c que apresentam deficiência na resposta de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ quando infectados com *L. donovani*, são inaptos em controlar a infecção, corroborando a importância da participação dessa população celular para o desfecho da infecção (STERN et al., 1988). A um consenso de que a incapacidade de células T em proliferarem e produzirem IFN- γ resulta no aumento do parasitismo, tanto em modelo murino quanto em humanos. Alguns estudos sugerem que embora haja alta produção de IFN- γ por linfócitos Th1 os mesmos produzem IL-10 simultaneamente, gerando a supressão da resposta e culminando na continuidade da doença (BHATTACHARYA; ALI, 2013).

A resposta também pode variar de acordo com o local da infecção, pois a resposta a LV é órgão dependente. Em camundongos e hamsters, é possível observar que a infecção esplênica permanece crônica após longo período de tempo, enquanto infecções no fígado possuem boa resolução da doença. Está associada à formação de granulomas com células de Kupffer parasitadas que

encontram-se fundidas às células NK e NKT (KHADEM; UZONNA, 2014; STANLEY; ENGWERDA, 2007). No baço, a persistência do parasito resulta em mudanças como o aumento de células T apoptóticas, além de mudanças histológicas como, a redução dos centros germinativos e a perda células dendríticas foliculares (KHADEM; UZONNA, 2014). Isotipos da imunoglobulina antígeno-específica de *Leishmania* (Ig) em níveis elevados de subclasses de IgG, IgM, IgE são observados durante a infecção, ainda com papéis antagônicos associados a resistência e susceptibilidade a infecção (ANAM et al., 1999; ATTA et al., 1998; GHOSH; DASGUPTA; GHOSE, 1995; RYAN et al., 2002). A IgG durante a infecção não apenas falha em fornecer proteção contra o parasito, como contribui para a progressão da doença. Quando ingeridos por macrófagos, os amastigotas opsonizadas por IgG promovem a secreção de IL-10 e inibem a produção de IL-12 (BUXBAUM, 2008; MILES et al., 2005; THOMAS; BUXBAUM, 2008). No entanto, os receptores Fc γ de macrófagos e CDs podem levar a resultados pró ou anti-inflamatórios, dependendo do tipo dos receptores Fc ativados e subclasse de IgG (GALLO; GONC; MOSSER, 2010; GUILLIAMS et al., 2014).

1.4 – SENESCÊNCIA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

A imunosenescência é definida como um estado do sistema imunológico desregulado oriundo do processo do envelhecimento fisiológico (SOLANA; PAWELEC, 1998) ao qual órgãos linfóides e os componentes celulares do sistema imunológico como células T e B são afetados (TIMM; THOMAN, 1999).

Apesar do processo de envelhecimento afetar principalmente células linfocitárias, ocorre também alterações imunológicas complexas na imunidade inata. Este envelhecimento leva a redução no processo de ativação e a apresentação de antígenos por macrófagos, a migração de células dendríticas e a ativação mediada por receptores Toll diminuídas ou desreguladas (C. SHAW et al., 2010). Além disso, o número de CDs mielóides reduzem em decorrência do envelhecimento, juntamente com a sua capacidade de produzirem IL-12. Além disso mecanismos dessa população como macropinocitose, endocitose e resposta a quimiocinas resultantes do processo de ativação quinase-fosfoinotidie-3 encontram-se reduzida (LARBI et al., 2008).

A atividade de macrófagos derivados da medula óssea também demonstra comprometimento durante o envelhecimento. Essas células apresentam reduzida capacidade de responder a ativação por IFN- γ , enquanto em monócitos é observado apenas a alteração na produção de citocinas (HERRERO et al., 2001; SAURWEIN-TEISSL et al., 1998). Em relação as células NK e NKT, observa-se um aumento na frequência destas células, tanto em humanos, como em camundongos velhos. Todavia, a produção de citocinas e quimionas, bem como sua capacidade citolítica apresentam-se reduzidas (SOLANA; PAWELEC; TARAZONA, 2006). Assim, as alterações funcionais, de frequência e de processos de sinalização desses diferentes tipos celulares poderiam contribuir para o aumento da suscetibilidade a infecções em indivíduos idosos.

O efeito do envelhecimento no sistema imunológico pode ser observado principalmente no timo. Este órgão, composto pelas regiões cortical e medular, é o local primário para desenvolvimento de células T e durante o processo de senescência apresenta uma gradativa atrofia e perda de timócitos imaturos. As alterações na capacidade de maturação de células T gera células com repertório limitado, resultando no aumento da susceptibilidade a infecções e ao desenvolvimento de doenças crônicas (TAKEOKA et al., 1996).

O processo de ativação de células T naive requerem uma atuação em conjunto com as células apresentadoras de antígeno (APCs), para que ocorra a sinapse imunológica. Entretanto, Garcia GG e colaboradores, observaram que células T CD4+ naives de camundongos idosos formam sinapses deficitárias, juntamente com a redução de moléculas sinalizadoras de TCR, como Lck, Fyn, LAT e ZAP-70 (GARCIA; MILLER, 2001). Além disso, alterações na superfície celular como a fosforilação de c-Jun N-terminal kinase e rearranjo da proteína Talina do citoesqueleto, resultam em células efetoras ineficientes (GARCIA; MILLER, 2002, 2003; KIRK; FREILICH; MILLER, 1999; MILLER et al., 1997).

O processo de envelhecimento celular também está ligado a alterações fenotípicas de células T. Estas alterações incluem mudanças na expressão de marcadores de membrana como o receptor de adesão CD44, receptores ligados a migração de linfócitos para linfonodos periféricos CD62L e CD45RB que são responsáveis pelo fenótipo de memória das células T CD4+ e CD8+. É descrito um aumento na frequência de linfócitos T CD4+ e CD8+ circulantes com fenótipo de memória efetora (CD44^{hi} CD45RB^{lo} CD62L^{lo}) em animais senescente (ERNST,

WEIGLE, NOONAN, MCQUITTY & HOOBS, 1993; BARRAT; LOUISE, 1995; KURASHIMA; UTSUYAMA, 1997; TIMM; THOMAN, 1999). Potestio e colaboradores propõem que o acúmulo de células de memória se deve ao aumento da expressão de CD95 em células T naive e o aumento de sua sensibilidade a apoptose (POTESTIO et al., 1999). Ademais, a proporção de células T naives (CD44^{lo} CD45RB^{hi} CD62L^{hi}) em camundongos idosos é reduzida, tal fato parece estar associado diretamente com a involução tímica (GINALDI et al., 2000). Além disso, a presença de um maior número de células de memória nos idosos é o resultado do contato do organismo com diferentes antígenos e patógenos no decorrer da vida (GLOBERSON; EFFROS, 2000). Alguns estudos ainda demonstram que a insuficiente produção de IL-2 por linfócitos T senescentes é contrastada pelo aumento da produção de IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ por estas células o que condiz com a maior concentração de linfócitos T ativados nos animais idosos (HOBBS, WEIGLE & ERNST, 1994).

Em relação a proporção de linfócitos T CD4+ totais, camundongos idosos apresentam redução no número dessas células, mas o mesmo não é observado em células T CD8+. Apesar disso, o envelhecimento progressivo afeta as respostas das células T CD8+; embora não esteja claro se as deficiências relatadas na atividade de células T CD8+ são resultante dos efeitos intrínsecos da senescência ou são consequência de células T CD4+ “defeituosas”, incapazes de estabelecer uma comunicação eficaz (ZUGICH; SLIFKA; MESSAOUDI, 2004).

A proliferação celular é um componente chave de uma resposta imune adaptativa eficaz (SURH; SPRENT, 2000). Porém, durante o envelhecimento ocorrem processos que limitam essa capacidade. Hayflick e Moorhead propuseram em 1965 a hipótese da senescência celular ao observarem a limitação da capacidade replicativa de células somáticas em cultura (HAYFLICK, 1965). Posteriormente descobriu-se que durante a replicação e a diferenciação celular ocorrem perdas de fragmentos de DNA em humanos, cerca de 150 - 200 pares de base, no final dos cromossomos intitulados de telômeros (HAYFLICK, 2007). Uma forma de postergar essa perda é a através da ativação da enzima telomerase, adicionando sequências de nucleotídeos ao final do cromossomo a cada divisão celular (GORONZY; FUJII; WEYAND, 2006). Este processo é evidente em tipos de células que dependem fortemente de replicação bem-sucedida e que funcionam na autorrenovação, como células-tronco ou linfócitos ativados, embora sua atividade seja temporária. (GORONZY; FUJII; WEYAND, 2006).

Além do encurtamento do telômero, há outros processos capazes de resultar na senescência celular, como: redução no fornecimento de nutrientes, dano oxidativo, inflamações crônicas, ativação de oncogenes e irradiação ionizantes podem levar a ativação da via de dano no DNA (D'ADDA DI FAGAGNA, 2008). Conforme as células se aproximam da fase de senescência replicativa as mesmas começam a expressar a proteína p53, que interrompem o ciclo celular nas fases G1 e S (MARX, 1994). Estudos ainda sugerem que a sua inativação resulta no aumento da proliferação celular independente do comprimento do telômero (WANG et al., 2015).

Durante a senescência as células do Sistema Imunitário sofrem alterações que não se limitam somente a perda de dos telômeros, ocorrem mudanças a nível genético como a deleção ou surgimento de genes que alteram a sua expressão de superfície, a sua proliferação e a sua resposta a antigênicos (MALAGUARNERA et al., 2001; PAWELEC, 2007). Moléculas como KLRG1, PD-1 e NKG2D vem sendo associados a imunosenescência, desenvolvendo papéis de modulação durante esta condição (ALONSO-ARIAS et al., 2011; LAGES et al., 2011; MELIS et al., 2014). O KLRG1 (killer cell lectin-like receptor G1) é um receptor inibitório que regula a expansão clonal de células T, sendo também expresso em população de células T efetoras de memória terminalmente diferenciadas que embora mantenham sua função efetora, apresentam atividade pró inflamatória exacerbada. Inúmeros estudos vêm associando este marcador para o monitoramento de doenças crônicas como o CMV concomitante ao envelhecimento (SIMPSON, 2011). O PD-1 (Programmed cell death protein 1) é uma proteína membro da família CD28/CTLA4, com importante papel modulatório negativo e desativador (JIN et al., 2010).

Embora seja utilizada como marcadores de células T exauridas em doenças crônicas incluindo autoimunidade e câncer (REN et al., 2018; VIEW et al., 2012), estudos mais recentes tem observado sua presença em células T de memória senescentes (FUKUSHIMA; MINATO; HATTORI, 2018). Além disso, a expressão de receptores de ativação como o NKG2D tem sido observado em células T efetoras durante infecções crônicas, câncer e doenças autoimunes ampliando a resposta inflamatória (WENSVEEN; JELENC, 2018). Em estudos mais recentes observou-se o aumento da frequência deste marcador em células T de indivíduos senescentes (ALONSO-ARIAS et al., 2011).

Portanto, a fim de contribuir com novos dados, este estudo vislumbra identificar fatores imunológicos associados a senescência em modelo murino durante a

leishmaniose visceral. Haja vista que à uma crescente demanda para estudos direcionados a população idosa global cada vez mais numerosa, é essencial o entendimento clínico e experimental dos fatores imunológicos associados a progressão de doenças neste grupo. Desta forma utilizando marcadores extracelulares associados a senescência e a doenças crônicas, buscamos observar o impacto da infecção por *Leishmania infantum* em populações de células T durante a senescência.

2. OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do envelhecimento na resposta imunológica de diferentes linhagens de camundongos durante a leishmaniose visceral.

2.2– OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a resposta imunológica de camundongos BALB/c e C57BL/6 senescentes durante a infecção por *L. infantum*, por meio de:
 - a) Avaliação de aspectos clínicos (Esplenomegalia e Hepatomegalia);
 - b) Quantificação da carga parasitária no fígado e baço;
 - c) Avaliação da produção de citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 e TNF- α) e óxido nítrico (NO) em sobrenadante de baço e fígado;
 - d) Imunofenotipagem de receptores inibitórios (KLRG1 e PD-1) e de ativação (NKG2D) em células T do baço;
 - e) Imunofenotipagem de células T de memória do baço;
 - f) Avaliação da capacidade de fagocitose de macrófagos peritoneais *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – ASPECTOS ÉTICOS E ANIMAIS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) conforme o registro nº33/2016.

Para os experimentos, foram utilizados camundongos fêmeas e machos da linhagem C57BL/6 e BALB/c com idades de 8 (grupo jovem) e 72 (grupo senescente) semanas. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Fluminense e mantidos na unidade de experimentação animal do Laboratório de Imunobiologia - UFES. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em isoladores sob condições apropriadas de temperatura (25°C), umidade e luz, recebendo maravalha previamente autoclavada, água filtrada e ração comercial para roedores *ad libitum* (Purina®).

3.2 – CULTIVO de *L. infantum*

As formas promastigotas de *Leishmania infantum cepa* (MHOM/BR/74/PP75) foram cedidas pelo Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Biofísica da UFRJ. A cepa foi cultivada em meio Grace's Insect Medium (Sigma-Aldrich, EUA) com pH 6,8, acrescido de 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) previamente inativado a 56°C por 30 minutos (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 0,2% de hemina (Sigma-Aldrich), 0,5% (v/v) de estreptomicina/penicilina (Sigma, USA) e 5% (v/v) de urina humana (previamente centrifugada a 1500 rpm/4°C/10 minutos e esterilizada em membrana de 0,22 µm). A cultura foi mantida em frasco de poliestireno de 125 cm² em estufa refrigerada B.O.D a 24°C.

3.3 – INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Ao atingir a fase estacionária de crescimento, a cultura dos parasitos foi centrifugada a 3000 rpm/5°C/10 minutos e lavada com solução de tampão fosfato-salino estéril (PBS) conforme descrito acima. A concentração dos parasitos foi determinada por contagem em hemocitometro e ajustada para 5x10⁷/mL em PBS. Os animais foram inoculados com 200 µl da solução por via endovenosa (veia caudal).

A eutanásia foi realizada no pico do parasitismo, determinado previamente através de ensaio de cinética de infecção em ambas as linhagens de camundongos.

3.3.1 – GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os camundongos foram divididos em 4 grupos descritos abaixo, compostos por 5 animais cada.

- BALB/C

Tabela 1: Grupos de camundongos BALB/c

Grupos	Condições
G1	Jovem Não Infectado (JNI)
G2	Senescente Não Infectado (SNI)
G3	Jovem Infectado (JI)
G4	Senescente Infectado (SI)

- C57BL/6

Tabela 2: Grupos de camundongos C57BL/6

Grupos	Condições
G1	Jovem Não Infectado (JNI)
G2	Senescente Não Infectado (SNI)
G3	Jovem Infectado (JI)
G4	Senescente Infectado (SI)

3.4 – CULTURA DE MACRÓFAGOS E INFECÇÃO COM PROMASTIGOTAS *IN VITRO*

As células obtidas por meio de lavado peritoneal foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 células/mL em placas chamber slides (Thermo Fisher Scientific™) de 12 poços e incubadas a 37°C, com 5% de CO₂ por 4 horas. As células não aderentes foram removidas por lavagem, em seguida infectadas na razão de 1:5 (Células/Parasito) com promastigotas de *L. infantum* durante 4 horas. Os parasitos

extracelulares remanescentes foram removidos por lavagem e a placa incubada em estufa a 37°C em 5% de CO₂. Foi então recolhido o sobrenadante para dosagem de NO e removido os poços das lâminas em 4 tempos após a infecção: 0; 24; 48 e 72 horas, corados com Panótico rápido (Interlab, São Paulo, Brasil) de acordo com as especificações do fabricante. Durante a análise no microscópio óptico foram contados 100 macrófagos (infectados ou não) bem como o número de amastigotas que estavam infectando os mesmos. A porcentagem de macrófagos infectados e índice de infectividade foram obtidas através das equações matemáticas abaixo

- Equação da porcentagem de macrófagos infectados:

$$\left(\frac{N^{\circ} \text{ total de Leishmania por macrófagos}}{N^{\circ} \text{ de macrófagos contados}} \right) \times 100$$

- Equação do índice de infecção:

$$\% \text{ macrófagos infectados} \times N^{\circ} \text{ de leishmanias intracelular}$$

3.5 – OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO BAÇO E FIGADO

Os órgãos foram removidos em condições assépticas e individualmente transferidos para tubos cônicos independentes. Em seguida, os órgãos foram pesados e as células obtidas por dissociação mecânica. A suspensão de células obtidas foi então centrifugada a 1500 rpm/4°C/10 min e o sobrenadante retirado para dosagens de NO e citocinas *in situ*. O precipitado celular contendo os esplenócitos foram então resuspenso com 4 mL de solução de lise de hemácias por 5 min, seguidos de lavagem com 10 ml de PBS e centrifugação a 1500 rpm/4°C/10 min.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 5 mL de DMEM suplementado. As células foram coradas com solução de azul de tripan para análise de viabilidade celular, sendo então realizada a contagem em câmara de Neubauer e ajustadas para 5x10⁶/mL. Posteriormente foram incubadas por 3 dias em estufa a 37°C/5% de CO₂.

3.6 – DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

Os órgãos (baço e do fígado) foram pesados previamente e uma alíquota de 200 µL da suspensão foi transferida em duplicata para o primeiro poço de uma placa de fundo chato de 96 poços (BRANDplates®). O restante dos poços foram preenchidos com 160 µL de Graces e feita uma diluição seriada de 1:5 por 12 poços subsequentes, conforme a técnica de diluição limitante (LDA) (DE OLIVEIRA GOMES et al., 2012). As placas foram então incubadas por 7 dias em estufa a 24°C por 10 dias. Ao final, foi calculado o número de *Leishmania* por órgão tomando como referência a última diluição em que se verificou o crescimento do parasito.

3.7 – IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a imunofenotipagem de linfócitos T, receptores extracelulares e citocinas intracelulares, 200µL de suspensão de células foram centrifugadas a 1400 rpm/4min e o sobrenadante descartado. As células foram então ressuspensas em 25 µL de FACs Buffer (PBS 5% SFB v/v) contendo os anticorpos monoclonais de interesse (Conforme descritos nas tabelas 4 e 5) na proporção de 1:50 e incubados a 4°C por 30 minutos no escuro, seguidos de fixação com 200 µL de PBS/BSA 0,2%/Formaldeído 1%. A segunda etapa da imunofenotipagem é intracelular, realizada para análise da produção de citocinas (Conforme descrito na tabela 5). Desta forma, aos tubos identificados para caracterização das células T memória adicionava-se, 100µL de solução de fixação (eBioscience IC Fixation Buffer). Essas permaneciam incubadas por 30 minutos no escuro, seguida eram lavadas com 100µL de solução de permeabilização BD (eBioscience 10x Permeabilization Buffer). Após permeabilização as células foram centrifugadas a 1400rpm/4min, lavadas com FACs Buffer e ressuspensas em 25 µL de solução de permeabilização BD contendo os anticorpos monoclonais de interesse para detecção intracelular das citocinas. Os anticorpos foram adicionados na proporção de 1:50 e incubados a 4°C por 30 minutos no escuro. A aquisição das células foi realizada no citometro de fluxo (FACSCanto™ II) onde foram adquiridas 200.000 células utilizando o programa BDiv Software. A análise foi feita no programa FlowJo X (TreeStar, Ashland, OR, USA). Para análise dos resultados e determinação da população positiva foi utilizado a técnica de *Fluorescence minus one* (FMO), que consiste em células com a marcação de todos

os anticorpos exceto a marcação de interesse (Conforme descrito nas tabelas abaixo). Essa técnica permite a identificação da positividade para os marcadores específicos e auxilia na distinção de células auto-fluorescentes e que expressam baixa frequência do marcador de interesse.

3.7.1 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES INIBITÓRIOS E DE ATIVAÇÃO EM CÉLULAS T *EX VIVO*

Para a imunofenotipagem dos receptores extracelulares, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos conjugados com os seguintes fluorocromos.

Tabela 3 - Painéis de anticorpos – Receptores inibitórios e de ativação *ex vivo*

Painel	Fluorocromos				
	FITC	PE	PerCPCy5.5	PE/Cy7	APC/Cy7
<i>Ex vivo</i>	CD4	CD8	KLRG1	NKG2D	PD1
FMO KLRG1	CD4	CD8	----	NKG2D	PD1
FMO NKG2D	CD4	CD8	KLRG1	----	PD1
FMO PD1	CD4	CD8	KLRG1	NKG2D	----

A figura 3 ilustra o processo de análise dos receptores inibitórios e de ativação em células T totais de acordo com os parâmetros acima citados.

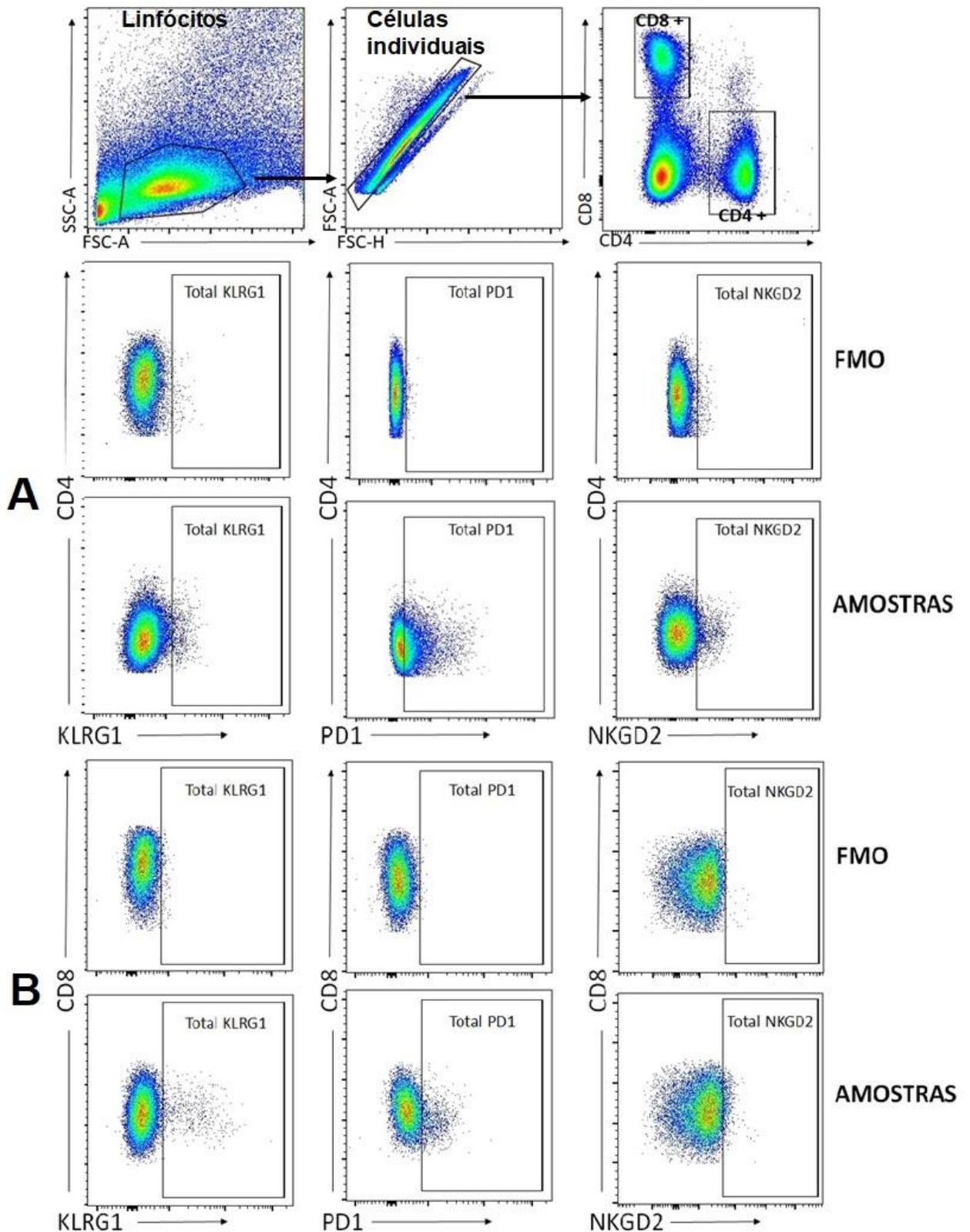


Figura 3: Estratégia de *gates* para análise de receptores inibitórios e de ativação em linfócitos T. Os linfócitos foram identificados primeiramente pelo tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), seguido da eliminação de eventos duplos. As populações CD4 positiva (A) e CD8 positiva (B) foram selecionadas. Em seguida, foi realizada a análise para a expressão dos receptores KLRG1, PD1 e NKG2D

3.7.2 – AVALIAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS T DE MEMÓRIA

Para a imunofenotipagem das células T de memória, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos conjugados com os seguintes fluorocromos.

Tabela 4: Painéis de anticorpos - Imunofenotipagem

Painéis	Fluorocromos					
	FITC	PE	APC	PE/Cy7	PerCPCy5.5	APC/Cy7
1	CD4	CD44	CD62L	IFN- γ	KLRG1	PD1
2	CD4	CD44	CD62L	IL-10	KLRG1	PD1
3	CD8	CD44	CD62L	IFN- γ	KLRG1	PD1
4	CD8	CD44	CD62L	IL-10	KLRG1	PD1
FMO CD44	CD4	----	CD62L	IL-10	KLRG1	PD1
FMO CD62L	CD4	CD44	----	IL-10	KLRG1	PD1

A figura 4 ilustra o processo de análise de células T de memória, receptores inibitórios e citocinas em células do baço de acordo com os parâmetros acima citados.

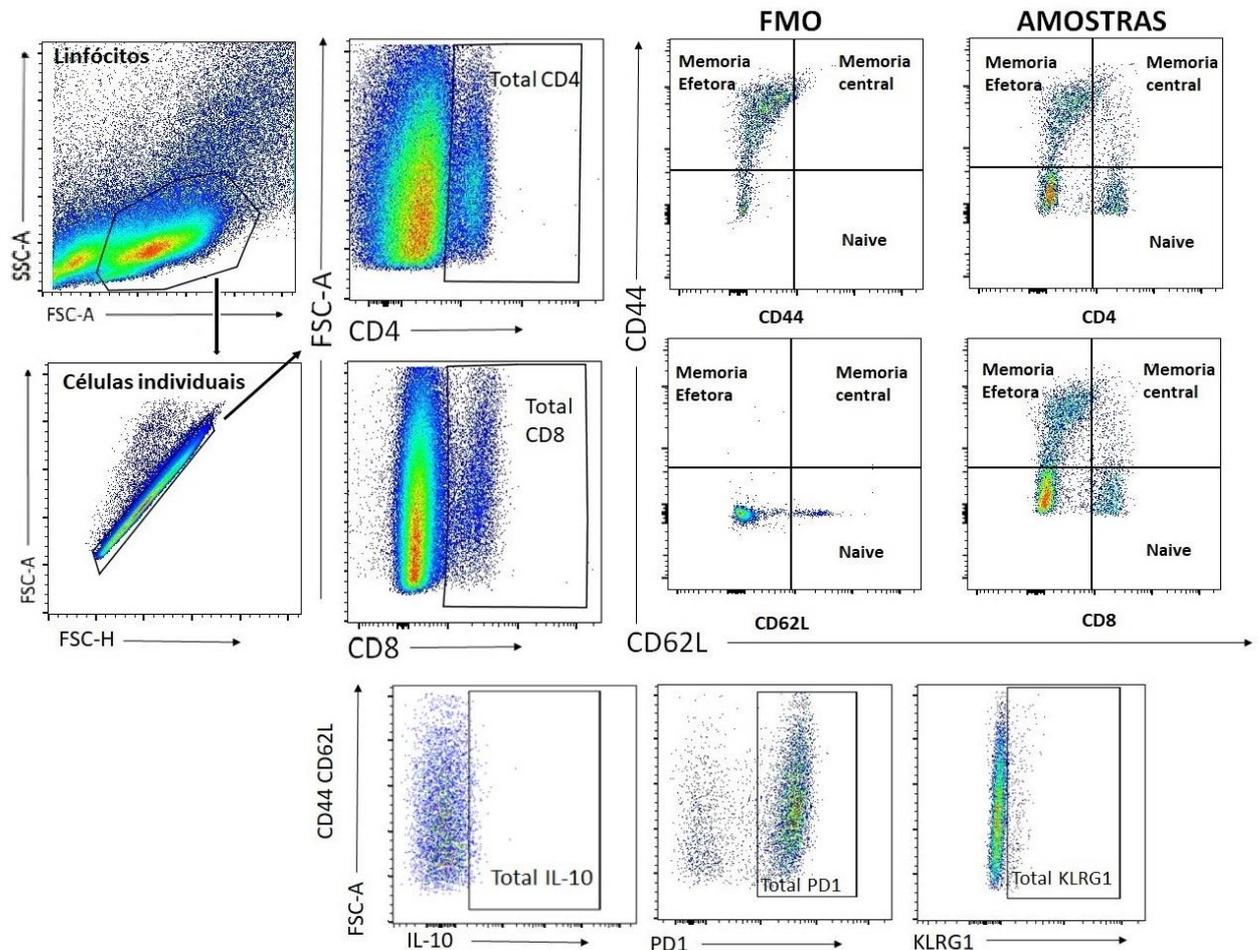


Figura 4: Estratégia de *gates* para análise de células T de memória. Os linfócitos foram identificados primeiramente pelo tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) seguido da eliminação de eventos duplos. As populações CD4 positiva (A) e CD8 positiva (B) foram selecionadas e estratificadas nos subtipos de memória, caracterizadas pela expressão de CD44 e CD62L (Naive-CD44⁻CD62L⁺; memória central-CD44⁺CD62L⁺; e memória efetora-CD44⁺CD62L⁻). As subpopulações de memória foram então analisadas de acordo com a expressão dos receptores KLRG1 e PD1, e pela produção de citocina intracelular IFN- γ e IL-10.

3.8 – DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A concentração de óxido nítrico (NO) foi determinada nos sobrenadantes dos órgãos pelo método de Griess (1879). Foram adicionados, duplicatas de 50 μ L do sobrenadante, em duplicatas em placas de 96 poços. As amostras foram incubadas com igual volume de reagente de Griess, composto de 2,5% (v/v) de ácido ortofosfórico (H₃PO₄), 1% (p/v) de sulfanilamida (Sigma-Aldrich®) e 0,1% (p/v) de α -Naftiletilenoaminohidrocloro (Sigma-Aldrich®). O produto da reação foi detectado após 10 minutos no leitor de placas utilizando o comprimento de onda de 540 nm

(Varioskan Flash - Thermo®). Para determinar a quantidade absoluta de NO formado foi utilizado uma curva padrão com nitrato de sódio a 50 μ M.

3.9 – DOSAGEM DE CITOCINAS

O sobrenadante dos esplenócitos foi retirado para dosagem de citocinas. As concentrações de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 e TNF- α foram mensuradas por meio de ensaios imunoenzimáticos de captura (ELISA-Sandwich). Foram utilizados pares de anticorpos monoclonais de captura e de revelação biotinizados da eBioscience®, seguindo a recomendação do fabricante. Resumindo o processo, placas de absorção (Costar®) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (18 horas/25°C). Em seguida as placas foram lavadas com PBS/Tween 20 (0,05% v/v) e as amostras de interesse foram adicionadas, seguidas de 2h de incubação a 37°C.

As placas foram lavadas novamente e incubadas com o anticorpo biotinizado por 1 hora/37°C. As placas foram lavadas novamente e cada poço recebeu a adição de estreptoavidina marcada com peroxidase (eBioscience®) por 30 min/37°C. A reação foi revelada com a adição de solução de tampão citrato de fosfato com 5% de ABTS e 0,005% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30vol. Após 15 min o aparecimento da cor a reação foi interrompida com dodecil sulfato de sódio (Gibco®) 1% e lida no comprimento de onda de 405 nm (Varioskan Flash - Thermo®).

3.10 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism*® v6.0 levando em consideração a natureza das variáveis estudadas sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Para comparação dos dados, foi utilizado o teste de *One-way ANOVA* (post hoc teste de Tukey).

4. RESULTADOS

4.1 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA SENESCÊNCIA NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS BALB/c A INFECÇÃO POR *L. infantum*

A senescência tem demonstrado impactar na capacidade do hospedeiro em controlar infecções causadas por diferentes microrganismos, incluindo vírus, bactérias ou protozoários (POLAND et al., 2014). Tendo isso como base, neste estudo avaliamos o impacto da senescência na leishmaniose visceral murina, onde camundongos BALB/c jovens e senescentes foram infectados e eutanasiados no pico do parasitismo hepático e esplênico.

Os resultados observados indicam que os camundongos senescentes possuem uma significativa redução do número de parasitos no baço (Figura 5 A e B). No entanto, foi observado um aumento no parasitismo hepático desses animais (Figura 5 A e B). Este dado sugere que os mecanismos de controle da infecção podem ser distintos nestes órgãos. Complementar a carga parasitária, observamos as características macroscópicas do baço quanto ao seu tamanho onde não foram observadas diferenças na esplenomegalia e hepatomegalia entre camundongos jovens e senescentes quando comparados aos animais controles não infectados (Figura 6).

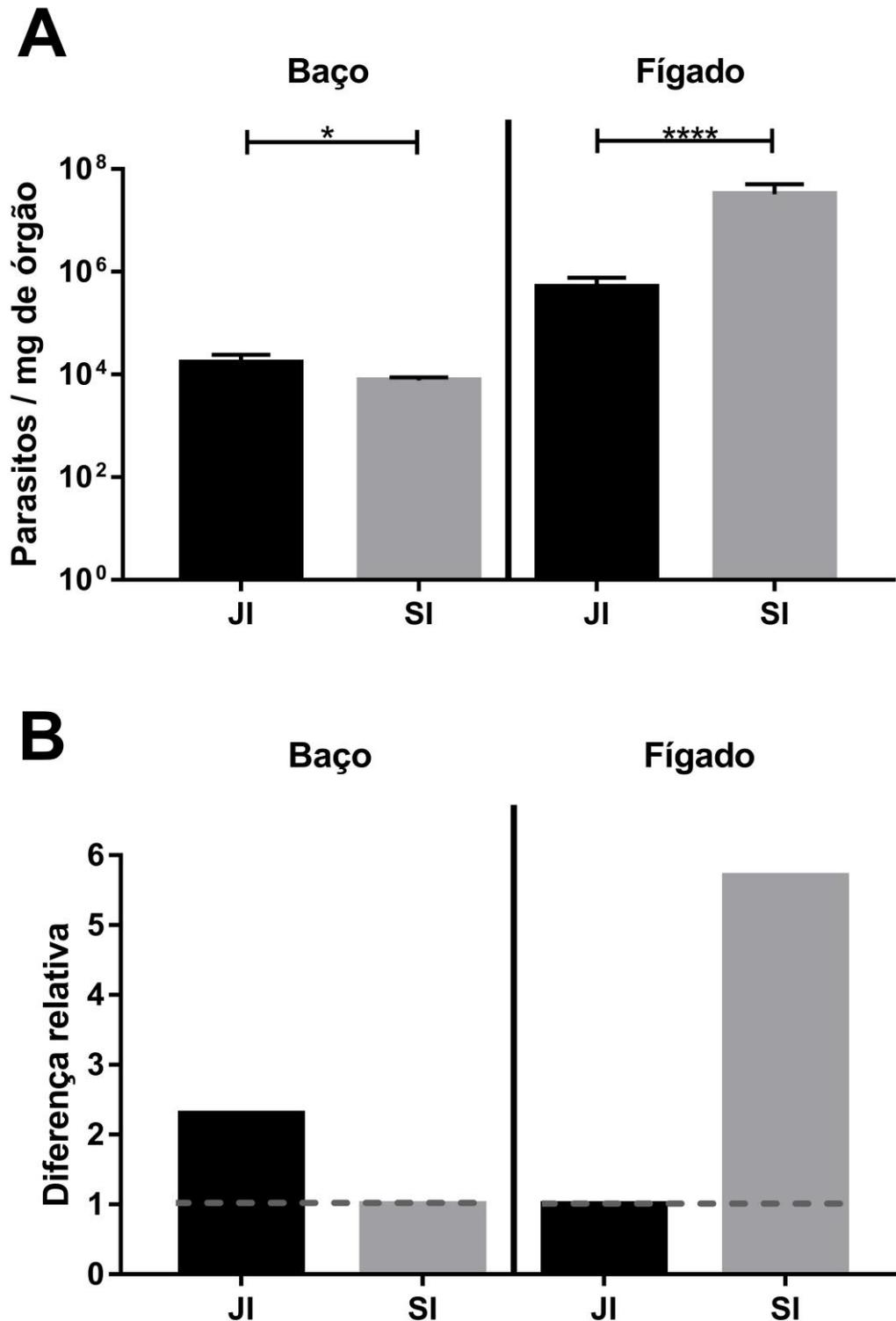


Figura 5: Avaliação da carga parasitária após a infecção de camundongos jovens e senescentes por *L. infantum*. Camundongos BALB/c jovens e senescentes foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. infantum*. O número de parasitos/mg de tecido foi medido individualmente no baço e fígado (A) 14 dias após a infecção por método de diluição limitante (LDA). A diferença relativa da carga parasitária do baço e fígado (B) foi normalizadas com o grupo de menor parasitismo. Os resultados representam a média \pm S.D de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$;

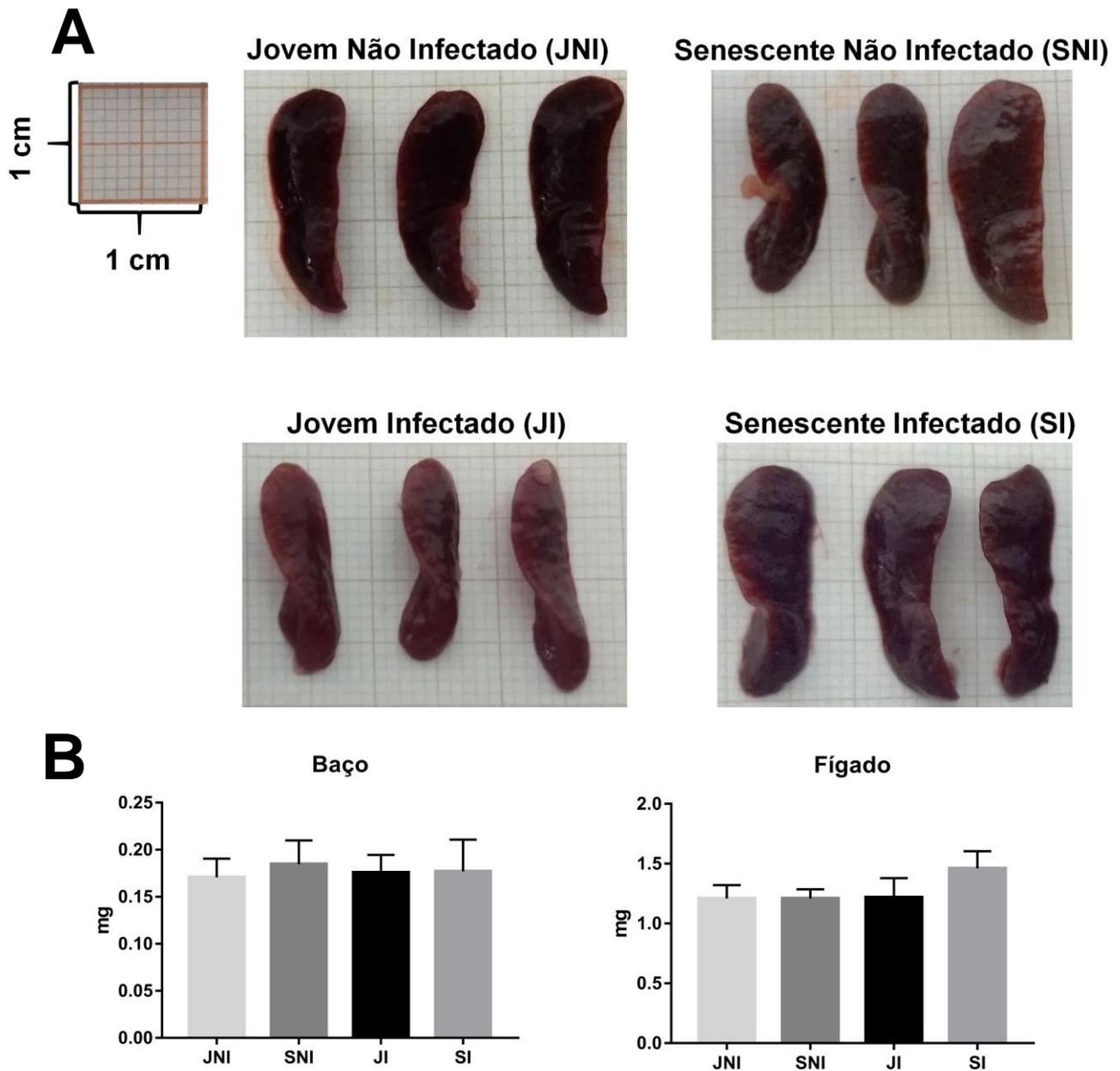


Figura 6: Análise macroscópica de baços e pesagem de tecidos. Camundongos BALB/c infectados e não infectados tiveram baço e fígado removido para análise macroscópica do baço (A) e pesagem (B). Os baços de camundongos BALB/c, jovens e senescentes, infectados ou não por *L. infantum* foram analisados macroscopicamente (A) e posteriormente baço e fígado foram pesados para análise de esplenomegalia e hepatomegalia. Fotografia representativa de três experimentos independentes.

A fim de avaliar parâmetros imunológicos envolvidos com as possíveis diferenças encontradas no parasitismo do baço e fígado, avaliamos a produção *in situ* das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-4, bem como a produção de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes do macerado dos órgãos. Conforme observado na figura 7, camundongos senescentes infectados (SI) apresentaram aumento na produção de IFN- γ quando comparado aos animais jovens infectados (JI) (Figura 7 A). Além disso os animais senescentes infectados produziram significativamente mais IL-10, quando comparados aos animais não infectados (Figura 7 B). De forma diferente o que se observou na produção de IL-4, que camundongos senescentes produziram significativamente mais do que animais jovens (Figura 7 C). Ademais, os animais senescentes infectados produziram significativamente mais óxido nítrico (NO) no baço do que os demais grupos (Figura 7 D).

Quanto ao fígado, foi observado que camundongos jovens infectados apresentaram significativo aumento na produção de IFN- γ quando comparado aos demais grupos (Figura 7 E). De forma diferente, observamos que camundongos senescentes infectados apresentaram significativamente mais IL-10 em comparação aos demais grupos (Figura 7 F). Além disso este mesmo grupo apresentou aumento na produção de IL-4 e NO (Figura 7 G e H) quando comparado aos animais senescentes não infectados.

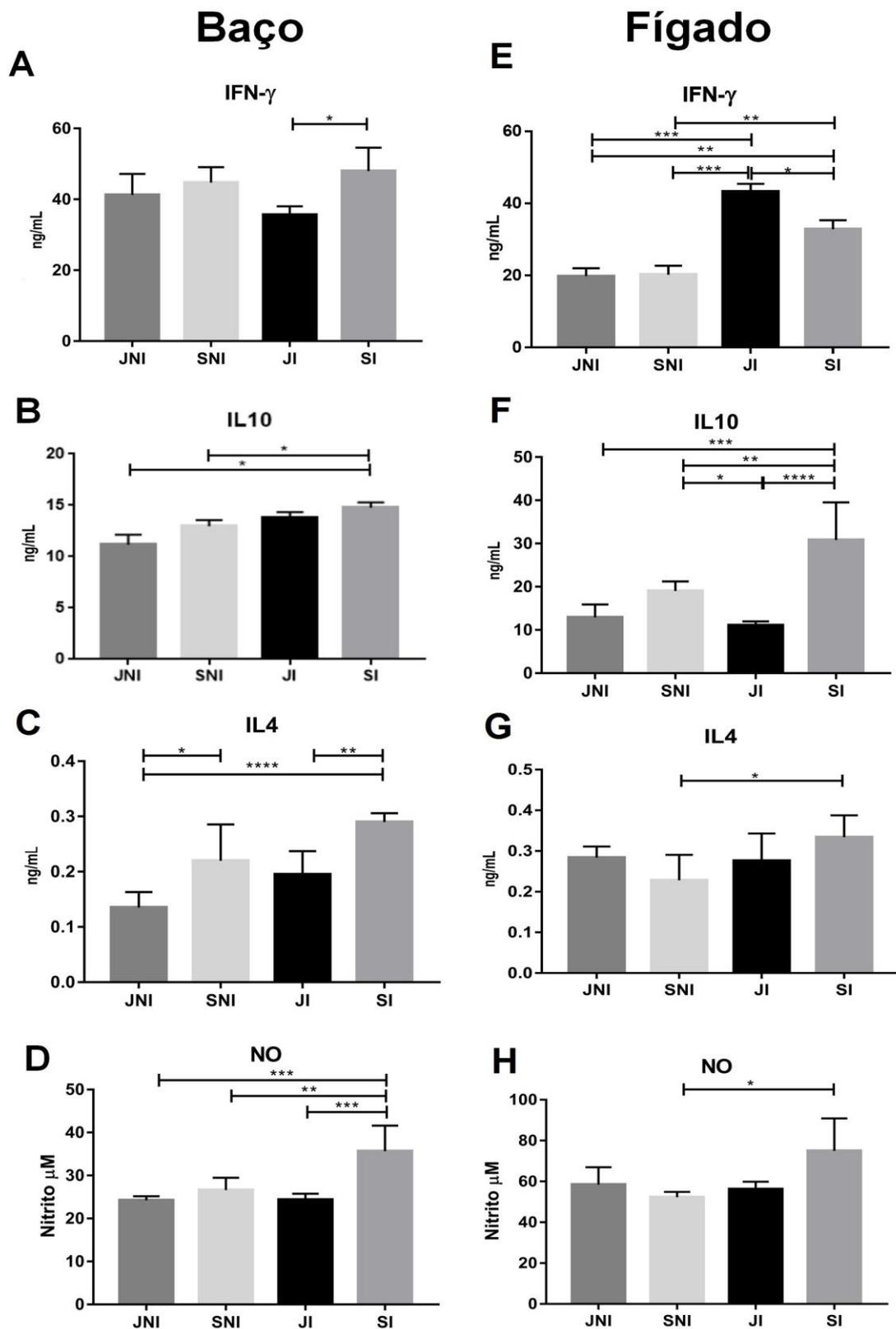
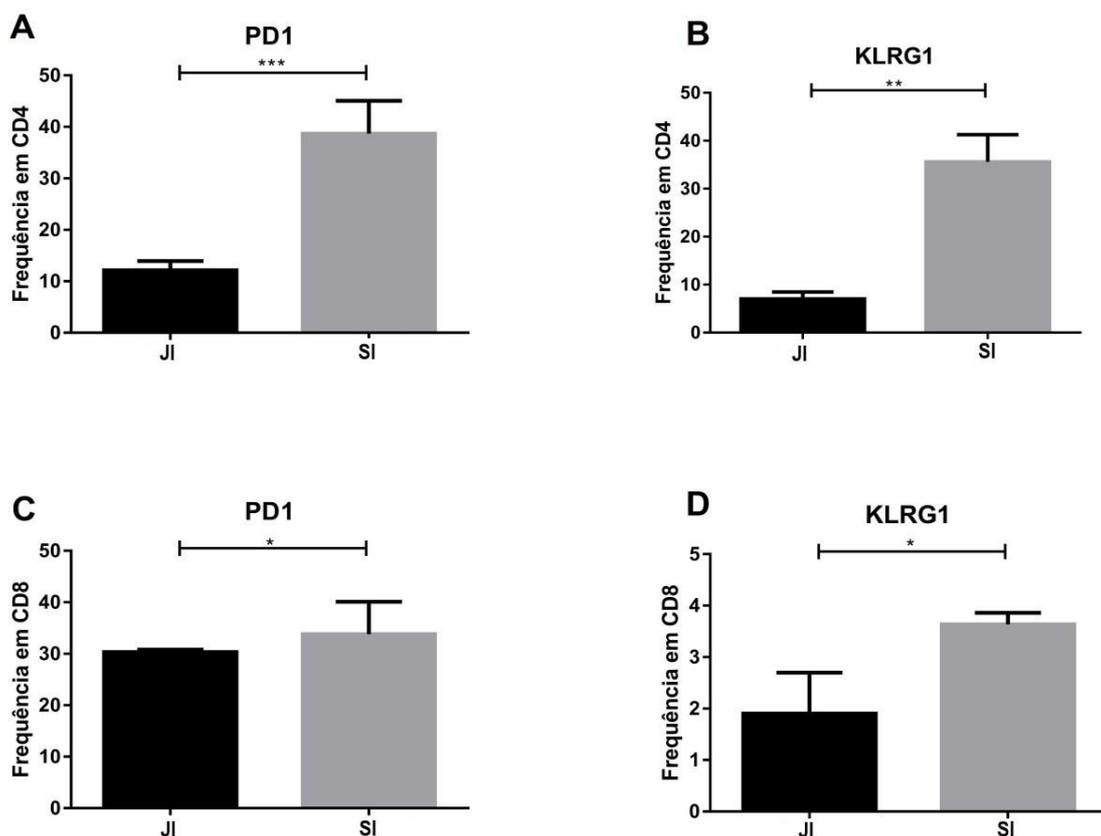


Figura 7: Efeito do envelhecimento na produção de citocinas e óxido nítrico *in situ*. Baço e fígado de camundongos BALB/c jovens e senescentes foram processados 14 dias após a infecção. A avaliação *in situ* de IFN- γ (A e E), IL-4 (B e F) e IL-10 (C e G) foram realizadas por ELISA. A produção de óxido nítrico (D e H) foi avaliada por método de Griess. O resultado representa a média \pm S.D de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Tendo em consideração o impacto da senescência (VICENTE et al., 2016) e infecção por *Leishmania* (CHIKU et al., 2016; STÄGER; RAFATI, 2012) na modulação de receptores de ativação e inibição, avaliamos o perfil celular e expressão dos receptores PD-1 e KLRG1 com o propósito de observar possíveis diferenças entre os grupos estudados.

Assim, camundongos senescentes infectados (SI) apresentaram aumento significativo na expressão de PD-1 e KLRG1 em células T CD4+ (Figura 8 A e B) quando comparado aos animais jovens infectados. O mesmo perfil foi observado na expressão de PD-1 e KLRG1 em células T CD8+ (Figura 8 C e D) de camundongos senescentes infectados (SI), onde as frequências significativamente aumentadas destes receptores foram observadas quando comparado aos animais jovens



infectados.

Figura 8: Análise ex vivo da expressão de receptores inibitórios em Linfócitos T durante a infecção por *L.infantum*. Células T CD4+ e T CD8+ isolados de esplenócitos de camundongo BALB/c infectados, marcados para expressão de PD1(A e C) e KLRG1 (B e D) analisados por citometria. Resultados acumulativos representados como média \pm S.D de três experimentos independentes. *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001.

Além de alterações no perfil de receptores inibitórios, é sabido que as populações de linfócitos T de memória são impactadas durante o envelhecimento e infecções, o que também foi avaliado em nosso estudo com a infecção por *L. infantum*. Conforme observado na figura 9, camundongos senescentes infectados demonstraram um aumento significativo na subpopulação de memória central (MC) (CD44+ CD62L+) e memória efetora (ME) (CD44+ CD62L-) quando comparado aos animais jovens infectados (Figura 9 A). De forma dessemelhante, o compartimento de células CD8+ de animais senescentes infectados demonstram significativo aumento na população de células naive (CD44- CD62L+) e de memória central (MC) (CD44+ CD62L+) quando comparado aos animais jovens infectados (JI) (Figura 9 B).

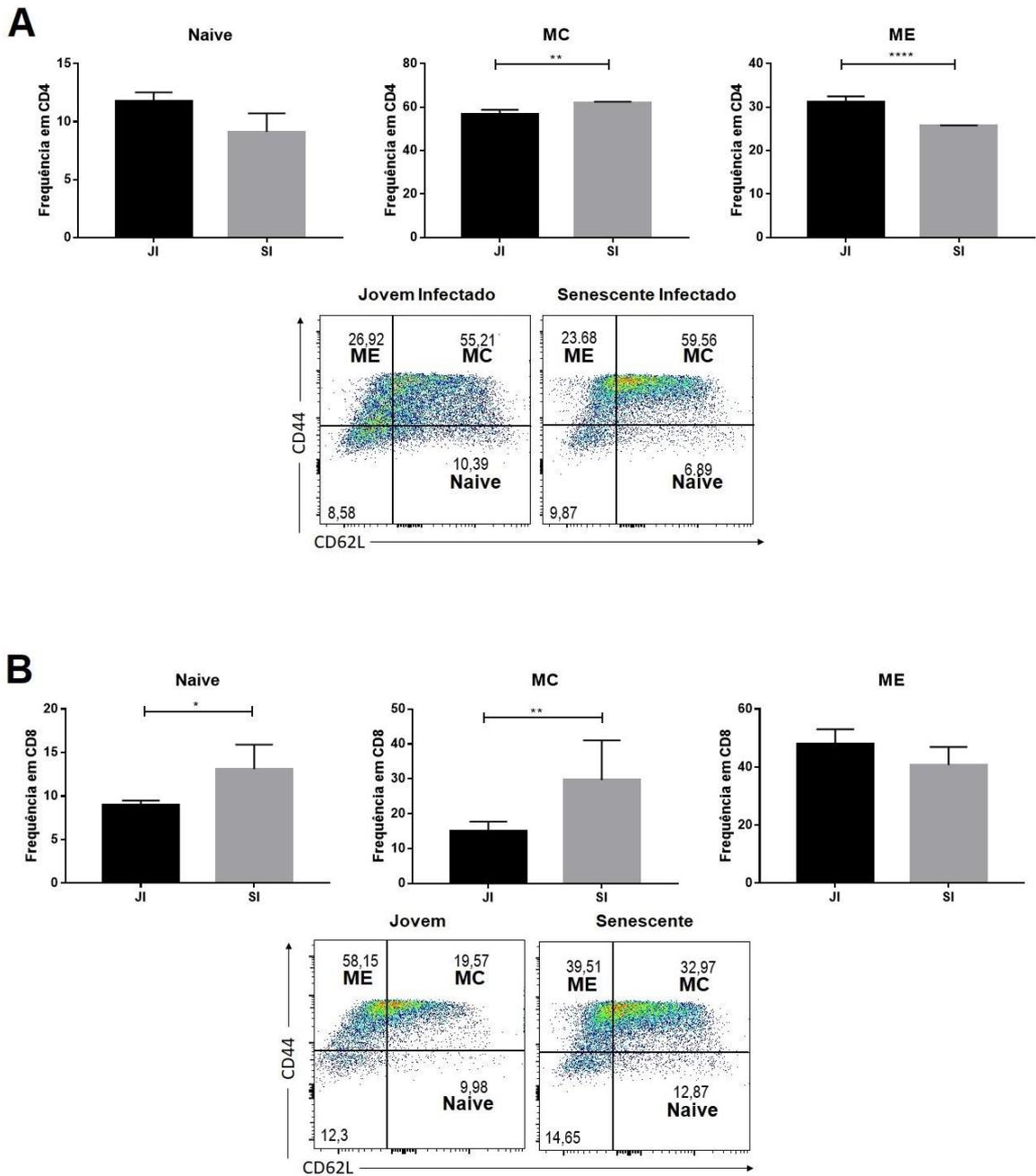


Figura 9: Análise das populações de células T de memória durante a infecção por *L. infantum*. Gráficos de citometria representativa e dados cumulativos da frequência de células T CD4+ (A) e T CD8+ (C) de memória em camundongos BALB/c, caracterizados pela expressão de CD44 e CD62L (Naive-CD44⁻CD62L⁺; memória central-CD44⁺CD62L⁺; e memória efetora-CD44⁺CD62L⁻). Resultados acumulativos representados como média ± S.D de três experimentos independentes. *p < 0.05, **p < 0.01; ****p < 0.0001.

4.2 – AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA SENESCÊNCIA NA RESPOSTA IMUNOLOGICA DE CAMUNDONGOS C57BL/6 A INFECÇÃO POR *L. infantum*.

Objetivando avaliar o impacto do envelhecimento na infecção por *L. infantum*, camundongos C57BL/6 jovens e senescentes foram infectados conforme descrito anteriormente e eutanasiados no pico do parasitismo hepático e esplênico. Nossos dados indicam que os camundongos senescentes possuem um significativo aumento no número de parasitos no baço (Figura 10 A e B) e fígado (Figura 10 A e B) quando comparado aos animais jovens.

Complementar a carga parasitária, observamos as características macroscópicas do baço quanto ao seu tamanho. Como observado na figura 11, camundongos senescentes infectados apresentaram esplenomegalia e hepatomegalia quando comparados aos demais grupos.

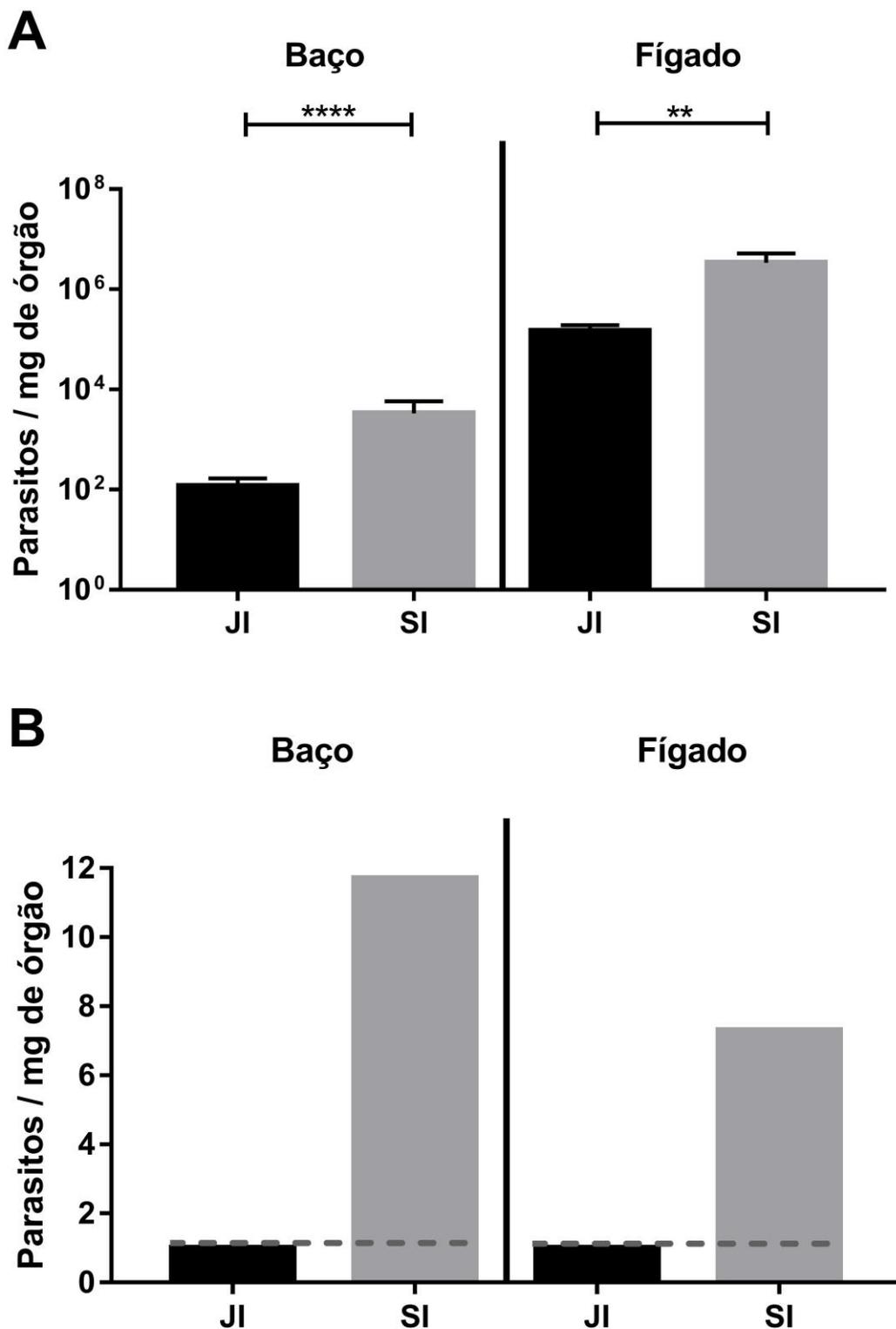


Figura 10: Avaliação da carga parasitária após a infecção de camundongos jovens e senescentes por *L. infantum*. Camundongos C57BL/6 jovens e senescentes foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. infantum*. Número de parasitos/mg de tecido foi medido individualmente no baço e fígado (A) 28 dias após a infecção por método de diluição limitante (LDA). A diferença relativa da carga parasitária do baço e fígado (B) foram normalizados com o grupo jovem. Os resultados representam a média \pm S.D de três experimentos independentes. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

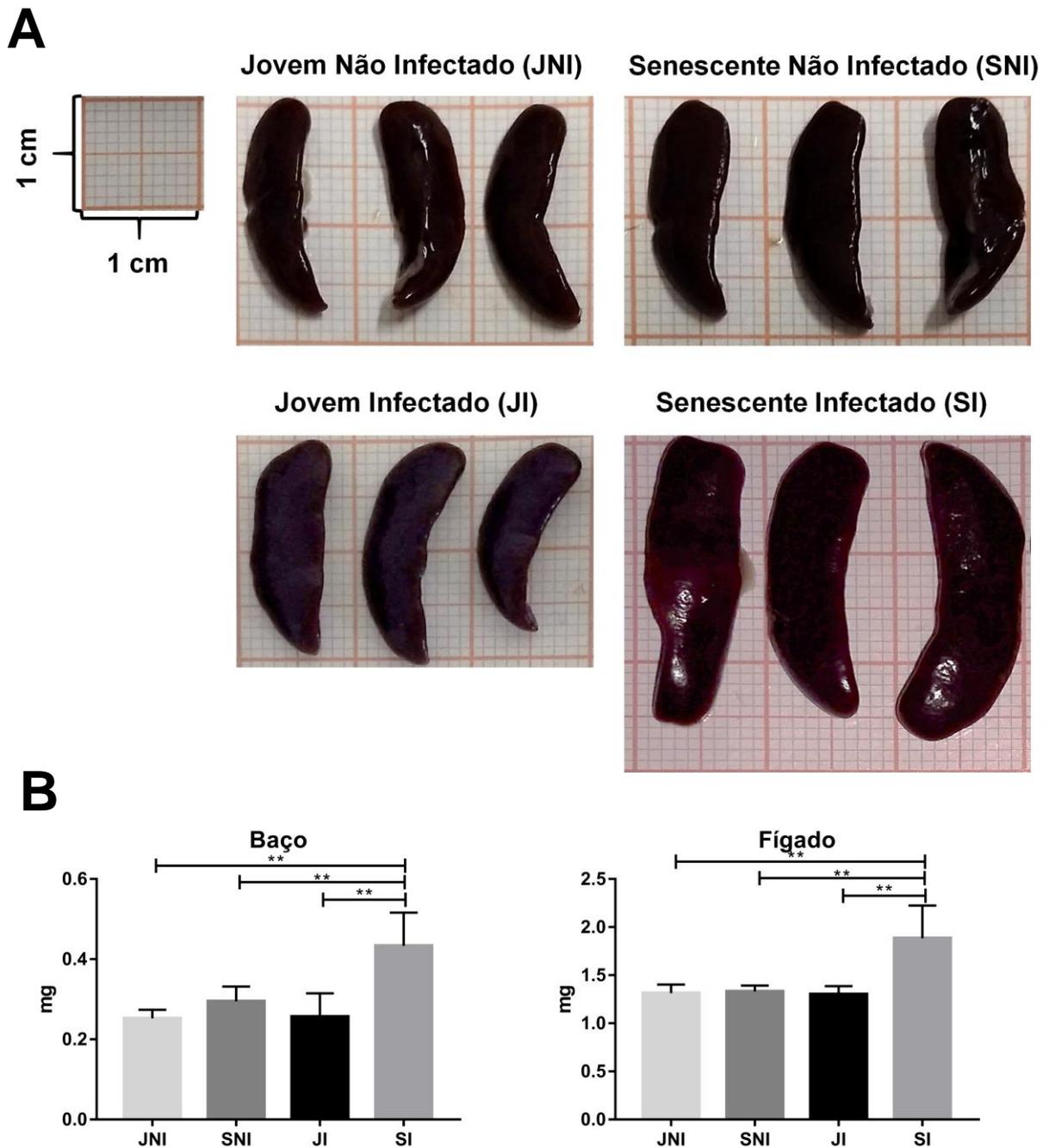


Figura 11: Análise macroscópica de baços infectados. Camundongos C57BL/6 infectados e não infectados tiveram baço e fígado removido para análise macroscópica do baço (A) e pesagem (B). Os baços de camundongos C57BL/6 jovens e senescentes, infectados ou não por *L. infantum* foram analisados macroscopicamente (A) e posteriormente baço e fígado foram pesados para análise de esplenomegalia e hepatomegalia. Fotografia representativa de três experimentos independentes. Os resultados representam a média \pm S.D de três experimentos independentes. ** $p < 0.01$;

De forma semelhante, avaliamos a produção *in situ* das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-10 e TNF- α , bem como a produção de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes do macerado dos órgãos dos animais jovens e senescentes. Conforme observado na figura 12, camundongos senescentes infectados (SI) apresentaram aumento

significativo na produção de TNF- α , IL-2 e óxido nítrico (NO) no baço (Figura 12 A, B e C) quando comparado aos demais grupos.

No fígado, observamos que camundongos jovens não infectados (JNI) apresentaram aumento significativo na produção de IFN- γ e IL-10 (Figura 12 D e E), quando comparado aos demais grupos, enquanto os animais senescentes infectados apresentaram aumento na produção destas citocinas quando comparados aos animais jovens infectados. Além disso, de forma diferente os animais senescentes infectados (SI) apresentaram aumento significativo na produção de óxido nítrico quando comparado aos grupos jovens infectados e senescentes não infectados (Figura 12 F). Não foi observado a produção de IFN- γ e IL-10 no baço dos grupos avaliados (Dados não mostrados).

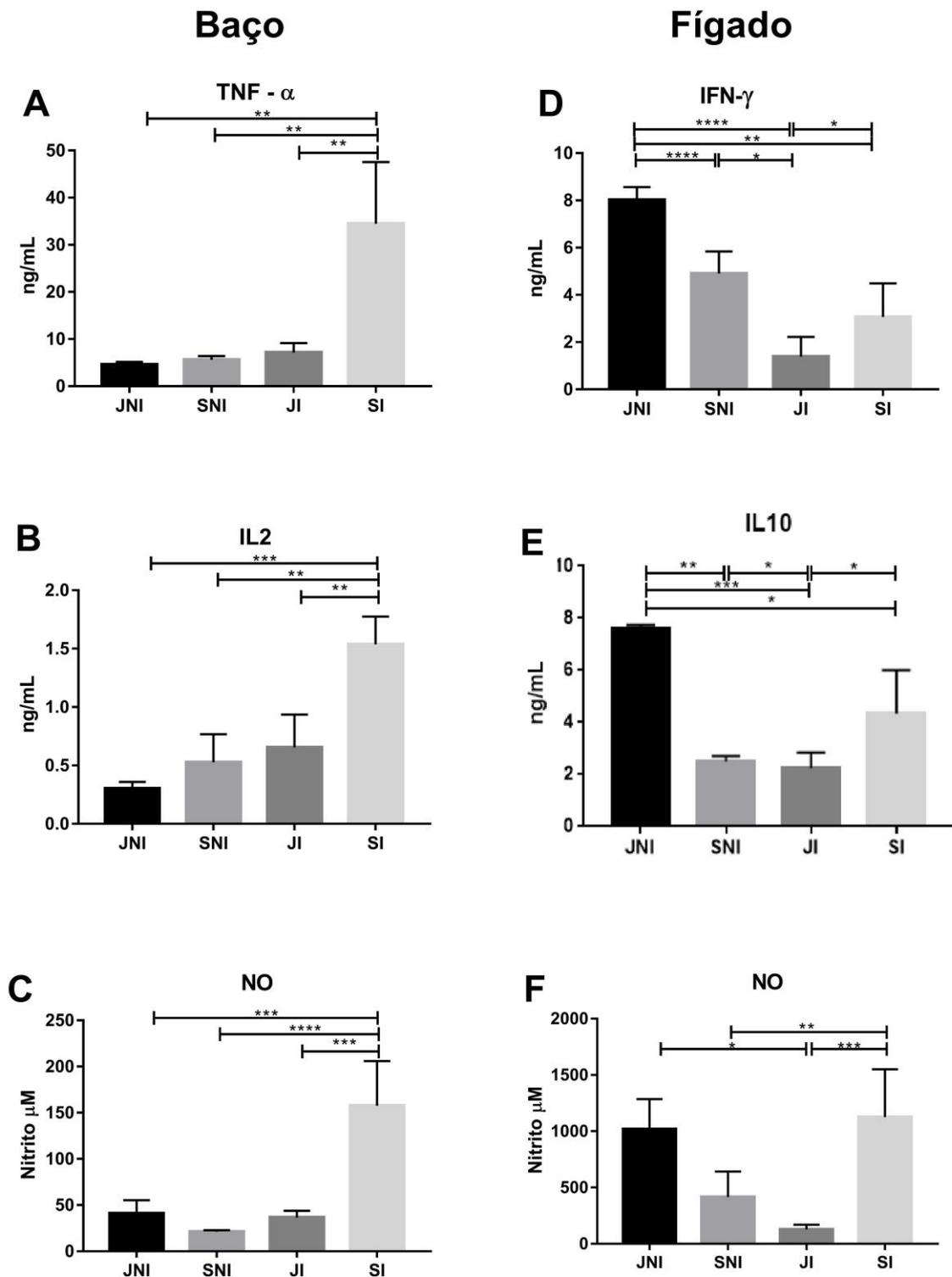


Figura 12: Efeito do envelhecimento na produção de citocinas e óxido nítrico *in situ*. Baço e fígado de camundongos C57BL/6 jovens e senescentes foram processados 28 dias após a infecção. A avaliação *in situ* de TNF- α (A), IL-2 (B), IFN- γ (D), IL-10 (E) foram realizadas por ELISA. A produção de óxido nítrico (C e F) foi avaliada por método de Griess. O resultado representa a média \pm S.D de três experimentos independentes. *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Posteriormente avaliamos o perfil celular de receptores inibitórios e de ativação com o propósito de observar possíveis diferenças na modulação da resposta imune previamente analisada. Conforme observado na figura 13, camundongos senescentes infectados (SI) apresentaram aumento significativo na expressão de KLRG1 e PD-1 em células T CD4+ (Figura 13 A e B) quando comparado aos demais grupos. O mesmo perfil foi observado na expressão de KLRG1, PD-1 e NKG2D em células T CD8+ (Figura 13 D, E e F) de camundongos senescentes infectados (SI), onde frequências significativamente aumentadas destes receptores foram observadas quando comparado aos demais grupos.

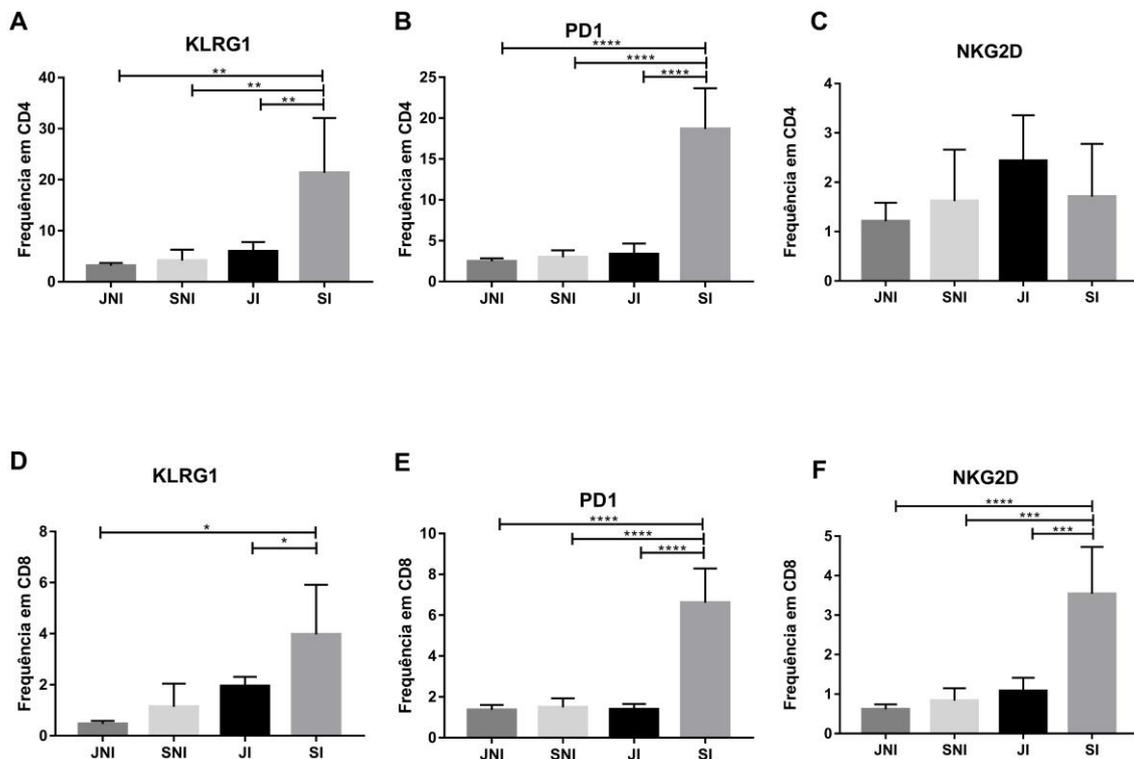


Figura 13: Análise *ex vivo* da expressão de receptores inibitórios em Linfócitos T durante a infecção por *L. infantum*. Células T CD4+ e T CD8+ isolados de splenócitos de camundongo C57BL/6 infectados foram marcadas para a avaliação da expressão de PD1 (A e D), KLRG1 (B e E) e NKG2D (C e F) e analisados por citometria. Resultados acumulativos representados como média \pm S.D de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

De forma semelhante ao realizado anteriormente, avaliamos o impacto da senescência no *pool* de células T de memória de camundongos C57BL/6.

Camundongos senescentes infectados demonstraram uma redução significativa de células CD4⁺ naive (CD44⁻ CD62L⁺) quando comparado aos demais grupos. Além disso, foi observado um aumento significativo na subpopulação de memória central (MC) (CD44⁺ CD62L⁺) e memória efetora (ME) (CD44⁺ CD62L⁻) deste mesmo grupo (Figura 14 A). De forma semelhante, o compartimento de células CD8⁺ animais senescentes infectados demonstram significativa redução na população de células naive (CD44⁻ CD62L⁺) e aumento da subpopulação de memória central (MC) (CD44⁺ CD62L⁺) e efetora (ME) (CD44⁺ CD62L⁻) (Figura 14 B).

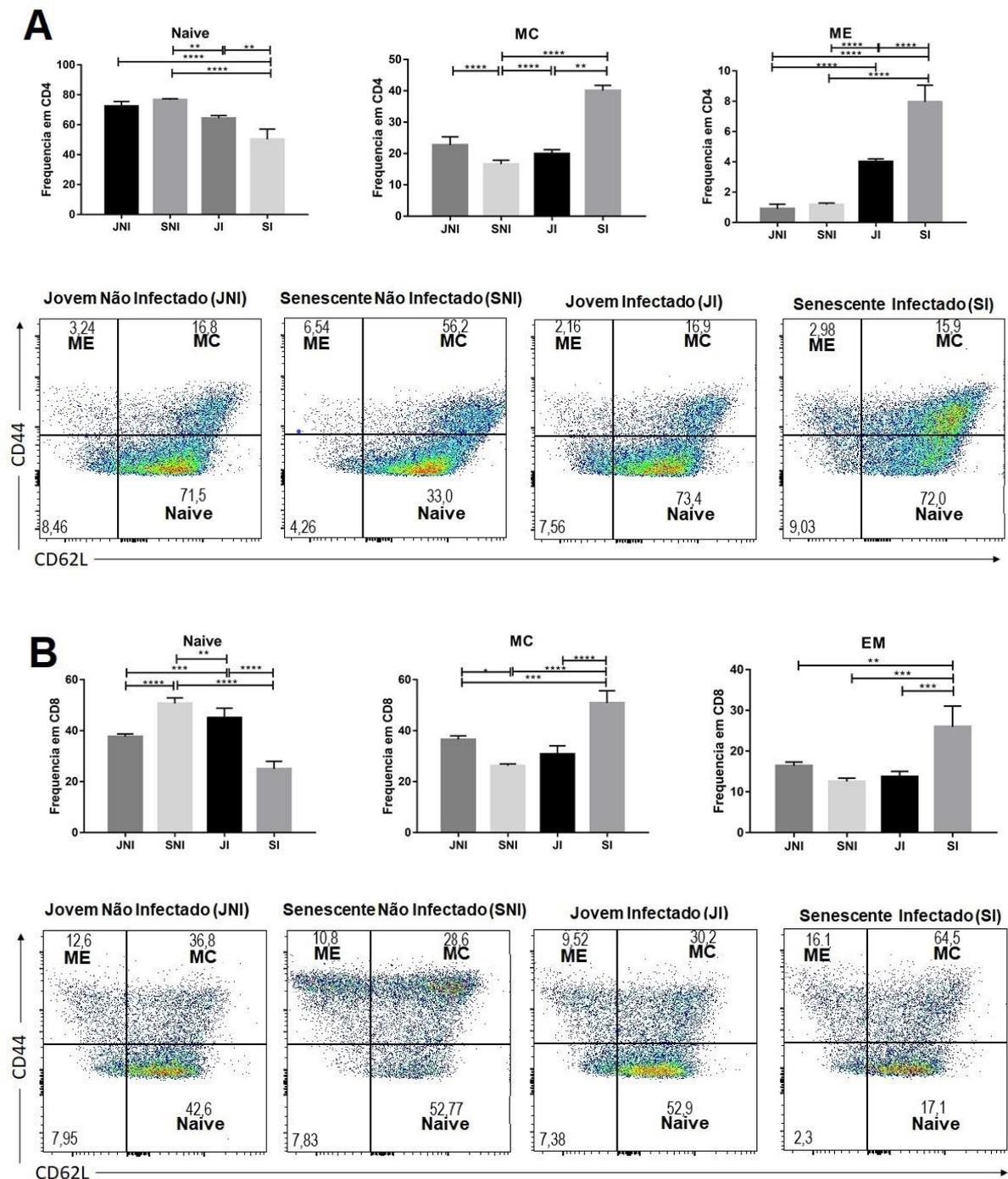
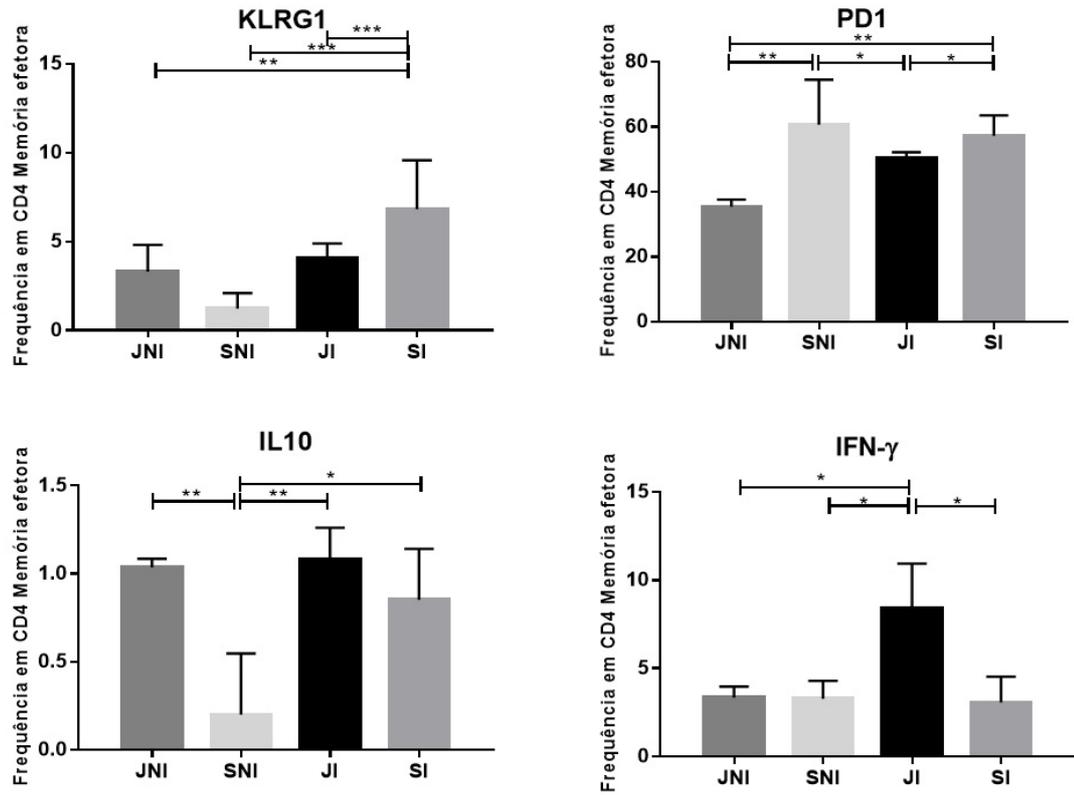
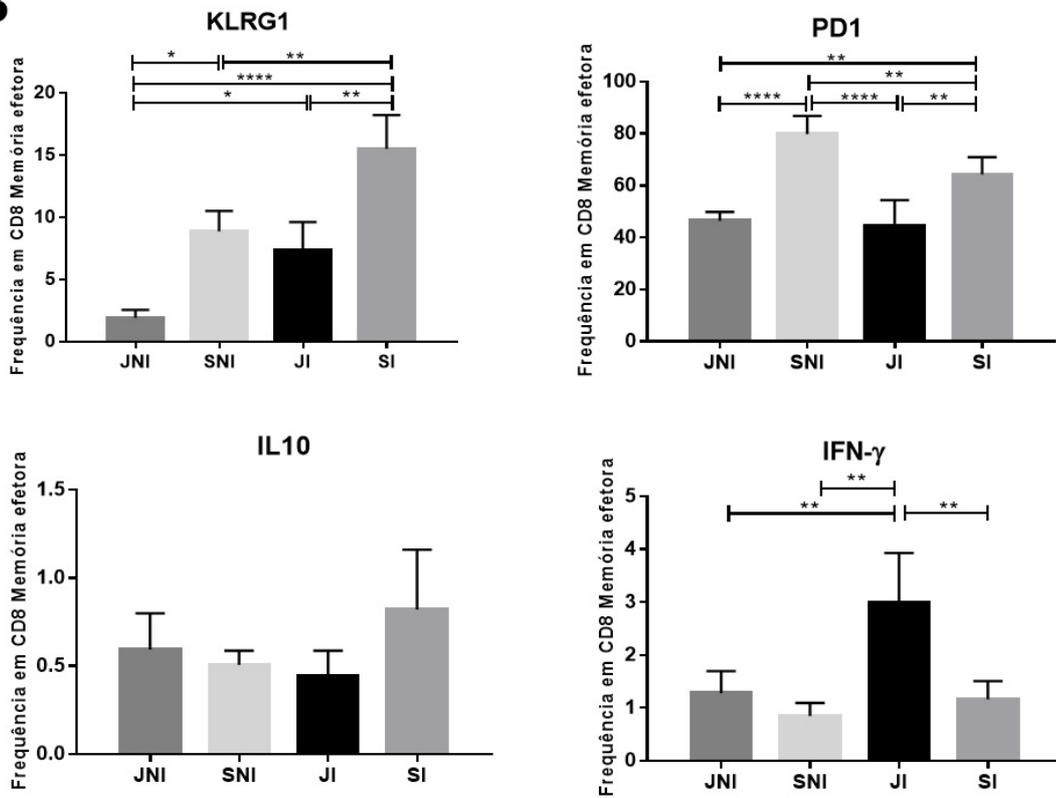


Figura 14: Análise das populações de células T de memória. Gráficos de citometria representativa e dados cumulativos da frequência de células T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B) de memória de camundongos C57BL/6 infectados e não infectados, caracterizados pela expressão de CD44 e CD62L (Naive-CD44⁺CD62L⁻; memória central-CD44⁺CD62L⁺; e memória efetora-CD44⁺CD62L⁻). Resultados acumulativos representados como média ± S.D de três experimentos independentes. *p < 0.05, **p < 0.01; ****p < 0.0001.

Avaliamos também a expressão de citocinas IFN- γ e IL-10 e o perfil de receptores inibitórios KLRG1 e PD-1 nos subconjuntos de memória. Assim, conforme observado na figura 15, nas populações de memória efetora (Figura 15 A e B) T CD4⁺

e T CD8+, camundongos senescentes (SNI e SI) demonstraram o aumento significativo na expressão de KLRG1 e PD-1, quando comparado aos demais grupos. Além disso na análise destas mesmas populações houve o aumento na produção de IFN- γ e IL-10 em camundongos jovens infectados.

De forma diferente, nas populações de memória central (Figura 15 C e D) T CD4+ e T CD8+ camundongos senescentes infectados apresentaram redução na expressão de KLRG1 e PD-1 quando comparado aos demais grupos. Além disso, na análise destas mesmas populações houve o aumento na expressão de IFN- γ e IL-10 em camundongos jovens infectados.

A**B**

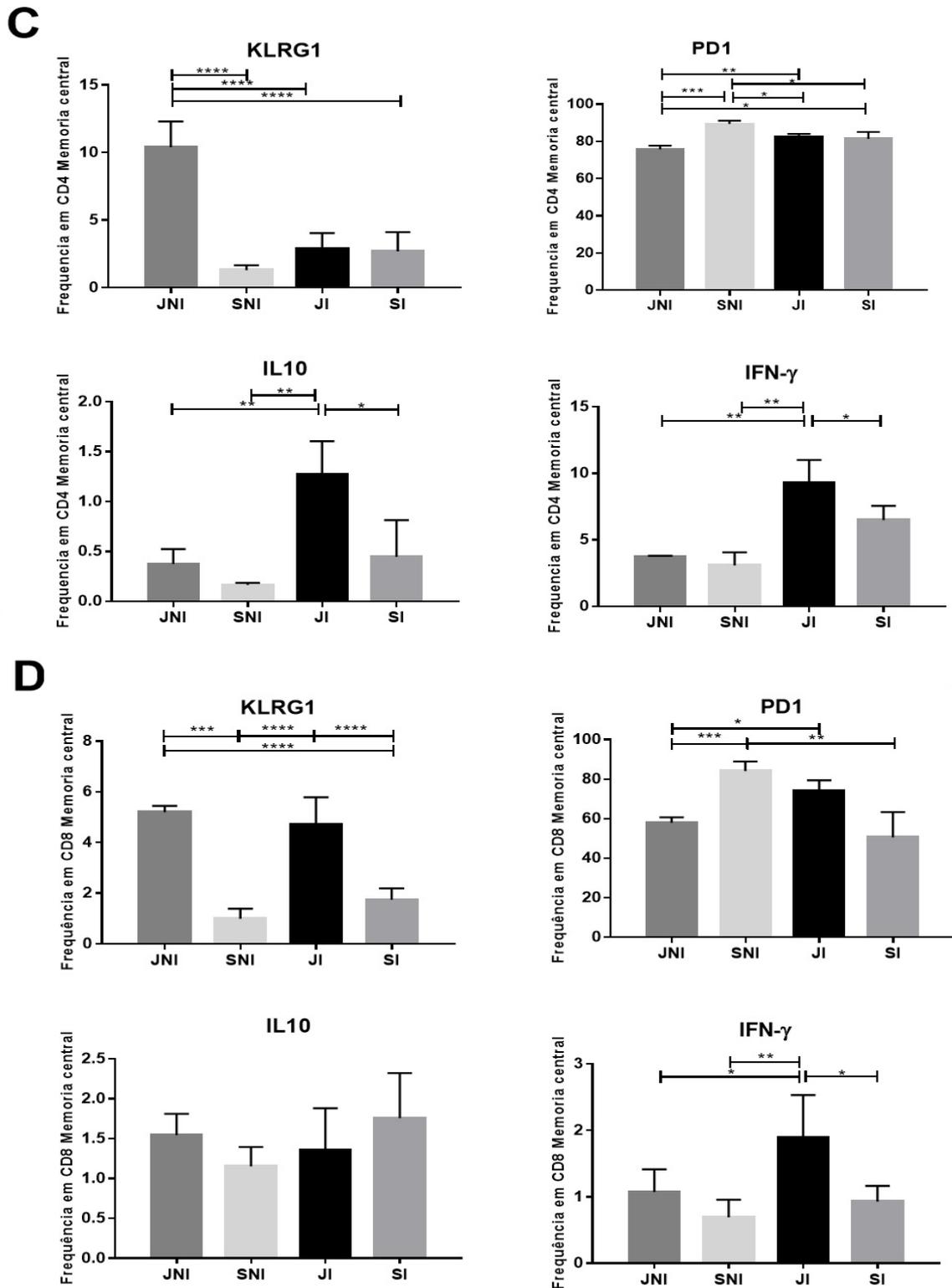


Figura 15: Análise de receptores inibitórios e citocinas em células T de memória. Dados cumulativos da frequência de células T memória efetora CD4+ (A) CD8+ (B) e de memória central CD4+ (C) CD8+ (D). Células T isolados de camundongos C57BL/6 caracterizados pela expressão de CD44 e CD62L (memória central-CD44⁺ CD62L⁺; e memória efetora-CD44⁺ CD62L⁻) e estratificados pela expressão de receptores inibitórios (KLRG1, PD1) e produção de citocina (IFN- γ e IL-10) analisados por citometria. Resultados acumulativos representados como média \pm S.D de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

Além da resposta imune adaptativa, a imunossenescência tem demonstrado afetar a capacidade de células inatas. Deste modo, utilizando macrófagos peritoniais de camundongos C57BL/6 foi realizada análise de fagocitose *in vitro*, onde foi quantificada a porcentagem de macrófagos infectados, número de parasitos por macrófagos, índice de infecção e a produção de óxido nítrico durante os tempos 0, 24, 48 e 72 horas após a infecção.

De modo esperado, camundongos senescentes apresentaram maiores porcentagens de macrófagos infectados (Figura 16 A) e parasitos por célula (Figura 16 B), resultando no aumento significativo do índice de infecção (Figura 16 C). Ademais, observou-se nos camundongos senescentes menor produção de óxido nítrico (NO) (Figura 16 D) justificando o índice de infecção observado nos diferentes tempos.

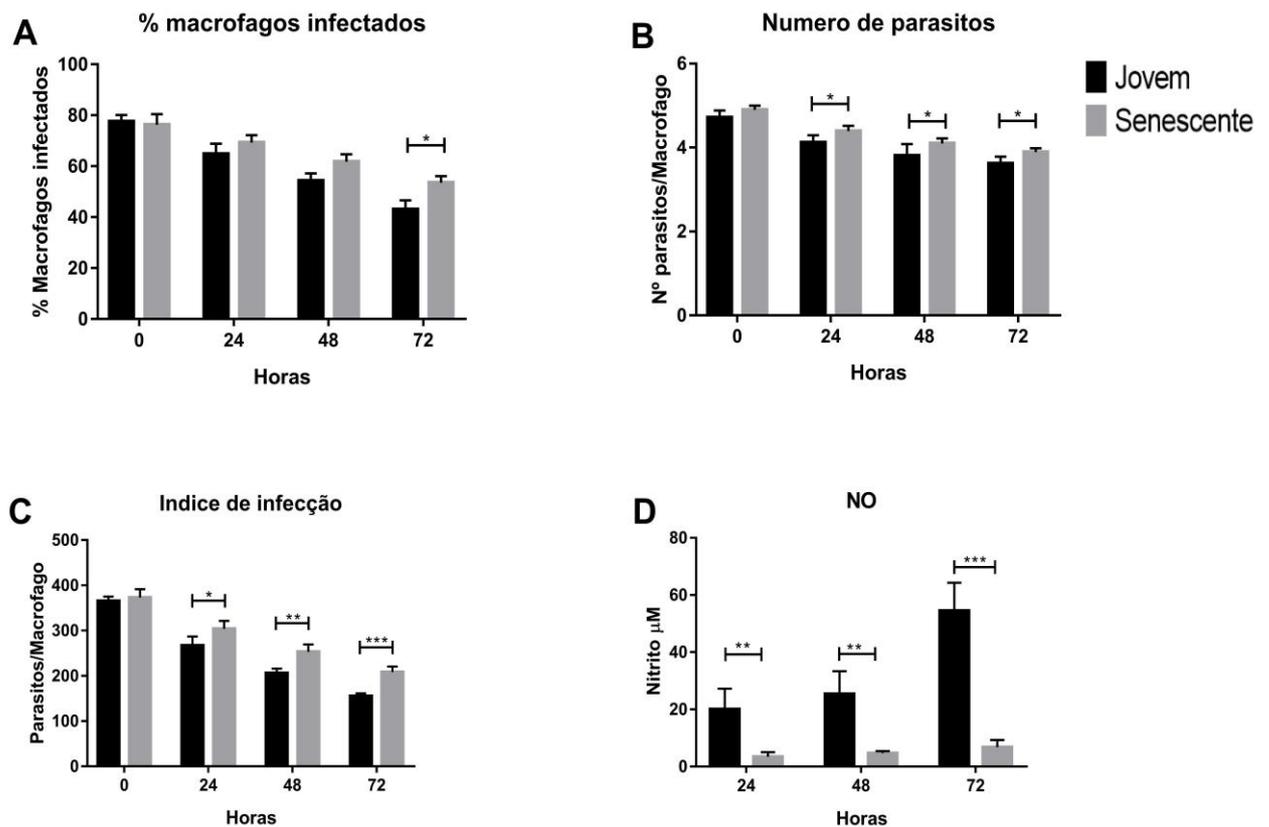


Figura 16: Análise infecção *in vitro* de macrófagos. Macrófagos peritoniais de camundongos C57BL/6 jovens e senescentes foram infectados *in vitro* com *L. infantum* na proporção de 1:5. A porcentagem de infecção (A), número de parasitos por célula (B) e índice de infecção (C) foram quantificadas em 4 tempos intervalos em 24 horas. A produção de óxido nítrico (D) foi avaliada por método de Griess. Os dados foram apresentados como média \pm S.D. de três experimentos independentes, apresentados * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

5. DISCUSSÃO

O processo de envelhecimento está associado ao declínio morfofuncional progressivo de todos os sistemas fisiológicos, incluindo o sistema imunológico. Este processo é denominado imunosenescência e está associado à incapacidade do hospedeiro em responder a estímulos antigênicos como vacinas, ou mesmo eliminar infecções causadas por diversos patógenos (GUPTA; KANUNGO, 2013; M. CAVANAGH; M. WEYAND; J. GORONZY, 2012; PAWELEC, 2007; PAWELEC et al., 2002), incluindo em infecções ocasionadas por protozoários causadores da malária, doença de chagas e toxoplasmose (FELIZARDO et al., 2018; SPEZIALI et al., 2010).

Neste trabalho avaliamos a influência da senescência sob a capacidade imunitária das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 contra a infecção causada pela *L. infantum*. Neste sentido, o processo de infecção por *Leishmania* apresenta alterações significativas em decorrência da idade como atesta Jan Ehrchen e colaboradores, que observaram camundongos BALB/c senescentes são mais eficientes que camundongos jovens em gerar uma resposta imune capaz de eliminar a infecção por *Leishmania major* no baço, mas não no fígado (EHRCHEN et al., 2004). Em concordância com esse estudo, observamos o mesmo perfil de parasitismo em camundongos BALB/c.

A produção de citocinas já foi demonstrada ser um importante fator associado ao controle ou continuidade da infecção (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). Em nossos experimentos, camundongos senescentes C57BL/6 apresentaram maior parasitismo em ambos os órgãos, embora tenham produzido elevados níveis de citocinas Th1 e de óxido nítrico no baço e fígado. É estabelecido que a senescência imprime a aquisição de um perfil pró-inflamatório com elevada produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-6, além de quimiocinas como o CXCL-1 durante infecções crônicas que impedem que o organismo gere uma resposta eficaz em combater a infecção (KIRKLAND, 2013).

Durante a leishmaniose visceral a resposta imune e a composição celular variam entre os órgãos afetados (KHADEM; UZONNA, 2014). Deste modo, nossos resultados mostram diferentes perfis na produção de citocinas entre o baço e o fígado dos animais utilizados no trabalho. No microambiente esplênico de camundongos BALB/c senescentes encontramos valores elevados de IFN- γ característicos de uma resposta Th1, o que tem sido associado à eliminação da infecção por *Leishmania infantum*, (MULI MUTISO et al., 2013; ZWINGENBERGER et al., 1990). Além disso, estes mesmos animais tiveram maior produção de IL-4, onde estudos demonstraram

que a produção dessa citocina em estágios iniciais de infecção auxiliam no desenvolvimento de respostas do tipo Th1 capaz de combater o parasito (STÄGER et al., 2003).

Ademais, em nossos experimentos com camundongos C57BL/6 senescentes apresentaram elevada produção de IL-2, antagônico a achados prévios que demonstram significativa redução da sua produção em decorrência do envelhecimento (PAWELEC et al., 2002). Além disso, a produção elevada de TNF- α está ligada ao desenvolvimento de uma resposta efetiva contra *Leishmania* através do estímulo a produção de óxido nítrico em macrófagos (COELHO-CASTELO et al., 2009), embora observada em altas quantidades em animais senescentes infectados, não houve redução do parasitismo, o que sugere que o mecanismo dependente do óxido nítrico não foi suficiente para controlar a infecção. Durante a leishmaniose visceral ocorre a indução de outros compostos, como espécies reativas de oxigênio (EROs), desempenham um papel importante contra o patógeno (BLOS et al., 2003; ROMA et al., 2016) contudo durante a senescência a produção de EROs é naturalmente elevada além de associada a danos teciduais e celulares que favorecem a continuidade de doenças parasitárias. (DAVALLI et al., 2016). Entretanto, não houve a avaliação destas substâncias durante nossos experimentos.

O processo de estimulação antigênica persistente em decorrência de doenças crônicas pode resultar em alterações funcionais e fenotípicas, como a expressão de receptores inibitórios capazes de reduzir a montagem de uma resposta imune eficaz contra patógenos (AKBAR; HENSON; LANNA, 2016; MELIS et al., 2014; NIKOLICH-ZUGICH, 2008). Receptores inibitórios como, PD-1 e KLRG1 tem sido amplamente associados a persistência de doenças causadas por CMV, HIV e *Leishmania* desenvolvendo papéis regulatórios culminando na persistência da doença (BANKOTI; ST, 2012; THIMME et al., 2005). Além disso, estes mesmos receptores têm sido associados a senescência celular, onde tem se demonstrado a presença destes receptores em populações de células T ativadas e terminalmente diferenciadas de indivíduos velhos que expressam perfis senescentes, resultando no impactado negativo durante infecções (HENSON; AKBAR, 2009; MELIS et al., 2014). Em nosso trabalho utilizamos a leishmaniose visceral, uma doença que possui um perfil de cronicidade que vem sendo associada ao aumento da expressão PD-1 e KLRG1 em células T durante a infecção (CHIKU et al., 2016; ESCH et al., 2013; FALEIRO et al., 2016) e que junto com a senescência, onde também tem se observa a expressão

acentuada destes receptores (FELIZARDO et al., 2018), resultam na montagem de um resposta ineficaz através da supressão de células T efetoras e o favorecimento do processo de apoptose celular, resultando na persistência da infecção (QUINN et al., 2018).

Características estas que puderam ser parcialmente observadas durante nossos experimentos, pois embora os camundongos BALB/c velhos tenham o aumento da expressão destes receptores os mesmos foram mais eficientes em eliminar o parasito, enquanto camundongos C57BL/6 tiveram uma piora no parasitismo. A diferença observadas no parasitismo dentre as linhagens distintas podem estar associado ao favorecimento de uma resposta inflamatória durante o envelhecimento independente do *background* genético (EHRCHEN et al., 2004; SCHULTE; SUKHOVA; LIBBY, 2008). Estudos recentes ainda sugerem que o bloqueio de PD-1 em camundongos C57BL/6 senescentes é capaz de restaurar parcialmente a capacidade funcional de células T (LAGES et al., 2011).

A expressão do receptor NKG2D atua como um sensor molecular para as células comprometidas por infecções ou senescentes (RAULET et al., 2013). A expressão deste receptor é significativamente aumentada em células T CD8+ de camundongos infectados. Conforme descrito por Crosby e colaboradores observaram na leishmaniose murina está associada a alta expressão desse receptor em células T CD8+, aumentando sua atividade citotóxica resultando na queda do parasitismo, condição diferente por nós observado. Embora o aumento destes receptores nos animais infectados, houve aumento significativo em animais senescentes, sugerindo que a atividade deste receptor está mais associada a senescência celular, conforme é descrito na literatura ao se observar a expressão deste receptor como marcador para regulação negativa (CROSBY et al., 2014; SAGIV et al., 2016).

A memória imunológica é composta por células de longa vida que surgem através da reposta antígeno-específica durante a expansão clonal e diferenciação de linfócitos. Elas são capazes de promover uma resposta mais rápida e eficaz ao entrar em contato com o mesmo antígeno novamente (GASPER; TEJERA; SURESH, 2014). Infecções causadas por patógenos como a *Leishmania infantum* acarretam no aumento da geração de subpopulações de memória (KAYE et al., 2004), fato este corroborado por nossos achados. Entretanto, durante o envelhecimento *pool* de células T de memória também se altera, havendo menores frequências de células T naive com o consequente aumento de células T de memória central (CD44+

CD62L⁺/MC) e efetora (CD44⁺ CD62L⁻/ME) (DUTTON; BRADLEY; SWAIN, 1998). Lesya M Pinchuk e Nikolay M Filipov observaram em camundongos C57BL/6 e BALB/c geram frequências alteradas de populações de memória e células naive em detrimento da idade durante estimulação antigênica, onde se observa o aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória efetora e a redução de células T naive (PINCHUK; FILIPOV, 2008). Os dados apresentados no presente trabalho corroboram parcialmente com o descrito acima, onde pudemos observar frequências de memória efetora semelhantes em camundongos C57BL/6. Entretanto, o mesmo não foi observado em camundongos BALB/c, havendo a maior frequência de memória central.

A infecção por *Leishmania* possui a característica de cronicidade, após condição de cura clínica resultando em uma resposta antigênica persistente (SINGH; SUNDAR, 2012). Conforme observado que camundongos C57BL/6 infectados geram mais células T de memória efetora capazes de produzir maiores quantidades de citocinas, entretanto em detrimento da idade observamos que os animais senescentes produzem menos citocinas, diferindo da literatura. Possivelmente esta condição esteja associada a maior expressão de PD-1, que resulta na regulação negativa de células T de memória, e por consequência uma redução na produção de citocinas (KURTULUS; TRIPATHI; HILDEMAN, 2012). Ademais, a expressão de KLRG1 corrobora parcialmente com o que é descrito na literatura, pois é observado que ocorre o aumento na expressão deste receptores em células de memória central e efetora em indivíduos senescentes durante infecções causadas por vírus e protozoários, além de um marcador de diferenciação celular, entretanto pudemos observar dados semelhantes apenas nas subpopulações de memória efetora (HENSON; AKBAR, 2009; MELIS et al., 2014; TAO et al., 2016).

Haja vista que o envelhecimento não somente impacta na resposta imune adaptativa, estudos sugerem que também ocorrem impactos na atividade de células da imunidade inata, havendo mudanças na depuração de patógeno, através da produção de óxido nítrico e atividade fagocítica prejudicadas (VICENTE et al., 2016). Conforme visto por Costa e colaboradores, macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 velhos tem a sua capacidade fagocítica e produção de oxido nítrico reduzido durante o desafio *in vitro* (COSTA et al., 2011). Em concordância com esse estudo observamos semelhantes resultados em animais C57BL/6, o que sugere que embora

imunidade adaptativa bem como a inata são afetadas durante o envelhecimento em camundongos, resultando na persistência da infecção por *Leishmania infantum*.

Desta forma, através deste estudo inédito pudemos observar que o envelhecimento impacta na resposta imune a leishmaniose visceral e que através desta constatação se possibilita novas perspectivas em estudos de formas profiláticas como vacinas e novos tratamentos para leishmaniose visceral direcionada para a população senescente. Embora ainda hajam dificuldades no desenvolvimento de vacinas e tratamentos eficazes independentemente da idade pudemos vislumbrar os efeitos negativos da idade durante a infecção que podem implicar em novas vias de pesquisa.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A senescência impacta no parasitismo órgão específico de camundongos BALB/c e C57BL/6 de forma distinta.
- A senescência é capaz de alterar o balanço de resposta Th1/Th2, afetando a o perfil de citocinas independente do *background* genético dos animais.
- A presença de PD-1 e KLRG1 em células T CD4+ e TCD8+ são favorecidas pelo processo de infecção, culminando na redução da capacidade de eliminar o patógeno.
- A condição de senescência gera redução de células T naive e aumento na formação de células de memória efetora em camundongos C57BL/6, mas não em camundongos BALB/c
- A capacidade fagocitária e leishmanicida de macrófagos de camundongos C57BL/6 é reduzida em decorrência do envelhecimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. M. COELHO-CASTELO, A. et al. Resposta imune a doenças une a doenças infecciosas. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 42, n. 2, p. 127–42, 2009.
- AKBAR, A. N.; HENSON, S. M.; LANNA, A. Senescence of T Lymphocytes : Implications for Enhancing Human Immunity. **Trends in Immunology**, v. 37, p. 1–11, 2016.
- ALONSO-ARIAS, R. et al. NKG2D expression in CD4+ T lymphocytes as a marker of senescence in the aged immune system. **Age (Dordrecht, Netherlands)**, v. 33, n. 4, p. 591–605, dez. 2011.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ANAM, K. et al. Immunoglobulin Subclass Distribution and Diagnostic Value of Leishmania donovani Antigen-Specific Immunoglobulin G3 in Indian Kala-Azar Patients. **CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY**, v. 6, n. 2, p. 231–235, 1999.
- ANTONELLI, L. R. V et al. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and experimental immunology**, v. 136, n. 2, p. 341–348, maio 2004.
- ARTIS, D.; SPITS, H. The biology of innate lymphoid cells. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 293–301, 2015.
- ATTA, A. M. et al. ANTI-LEISHMANIAL IgE ANTIBODIES : A MARKER OF ACTIVE DISEASE IN VISCERAL LEISHMANIASIS. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 3, p. 426–430, 1998.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. **Indian Journal of Medical Research**, v. 119, n. 6, p. 238–258, 2004.
- BANKOTI, R.; ST, S. Differential Regulation of the Immune Response in the Spleen and Liver of Mice Infected with Leishmania donovani. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1–7, 2012.
- BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, v. 64, p. 12112–12116, 2007.
- BARRAT, F. I.; LOUISE, H. H. A. Quantitative and qualitative changes in CD44 and MEL-14 expression by T cells in C57BL / 6 mice during aging. 1995.
- BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira**

de Medicina Tropical, v. 46, n. 2, p. 128–134, 2013.

BLOS, M. et al. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 5, p. 1224–1234, 2003.

BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 641–654, 2005.

BUXBAUM, L. U. A detrimental role for IgG and FcγR in *Leishmania mexicana* infection. **Immunol Res**, v. 42, p. 197–209, 2008.

C. SHAW, A. et al. Aging of the Innate Immune System. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 4, p. 507–513, 2010.

CARLSEN, E. D. et al. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 182, n. 2, p. 109–118, 2015.

CHARMOY, M. et al. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 2, p. 288–299, 2007.

CHIKU, V. M. et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 221, n. 8, p. 879–888, 2016.

COELHO-CASTELO, A. A. M. et al. Resposta imune a doenças imune infecciosas infecciosas. **Medicina**, v. 42, n. 2, p. 127–142, 2009.

COSTA, E. H. et al. Aging alters the production of iNOS, arginase and cytokines in murine macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 7, p. 671–681, 2011.

COURTENAY, O. et al. Combining epidemiology with basic biology of sand flies, parasites, and hosts to inform leishmaniasis transmission dynamics and control. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 10, p. 1–13, 2017.

CROSBY, E. J. et al. Engagement of NKG2D on Bystander Memory CD8 T Cells Promotes Increased Immunopathology following *Leishmania major* Infection. **PLoS Pathogens**, 2014.

D'ADDA DI FAGAGNA, F. Living on a break : cellular senescence as a DNA-damage response. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. july, p. 512–522, 2008.

DAVALLI, P. et al. ROS , Cell Senescence , and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 3565127., 2016.

DAVIDSON, R. N. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. **Drugs**, v. 56, n. 6, p. 1009–1018, 1998.

- DE OLIVEIRA GOMES, D. C. et al. Peripheral expression of LACK-mRNA induced by intranasal vaccination with PCI-NEO-LACK defines the protection duration against murine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 139, n. 12, p. 1562–1569, 2012.
- DONOVAN, M. J. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induced by Leishmania infection of human dendritic cells. **Parasite Immunol**, v. 34, n. 10, p. 464–472, 2012.
- DUTTON, R. W.; BRADLEY, L. M.; SWAIN, S. L. T CELL MEMORY. **Annu. Rev. Immunol**, v. 16, p. 201–23, 1998.
- EHRCHEN, J. et al. Senescent BALB/c mice are able to develop resistance to Leishmania major infection. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5106–5114, 2004.
- ESCH, K. J. et al. Programmed Death 1 – Mediated T Cell Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Impairs Phagocyte Function. **The Journal of Immunology**, v. 191, p. 5542–5550, 2013.
- ESTHER L, R.; STEPHEN M, B. Leishmania major : Promastigotes Induce Expression of a Subset of Chemokine Genes in Murine Macrophages. **Experimental Parasitology**, v. 295, n. 85, p. 283–295, 1997.
- FALEIRO, R. J. et al. Combined Immune Therapy for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. 1–21, 2016.
- FELIZARDO, A. A. et al. Could age and aging change the host response to systemic parasitic infections? A systematic review of preclinical evidence. **Experimental Gerontology**, v. 104, n. December 2017, p. 17–27, 2018.
- FREITAS, J. DE; PINHEIRO, D. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a Leishmania spp Cellular and molecular aspects of immune response to Leishmania spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 109, n. 55, p. 11–20, 2010.
- FUKUSHIMA, Y.; MINATO, N.; HATTORI, M. The impact of senescence-associated T cells on immunosenescence and age-related disorders. **Inflammation and Regeneration**, n. 38, p. 4–9, 2018.
- GALLO, P.; GONC, R.; MOSSER, D. M. The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. **Immunology Letters**, v. 133, p. 70–77, 2010.
- GANNAVARAM, S. et al. **Modulation of innate immune mechanisms to enhance Leishmania vaccine-induced immunity: Role of coinhibitory molecules** **Frontiers in Immunology**, 2016.
- GARCIA, G. G.; MILLER, R. A. Single-Cell Analyses Reveal Two Defects in Peptide-

- Specific Activation of Naive T Cells from Aged Mice. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 5, p. 3151–3157, 2001.
- GARCIA, G. G.; MILLER, R. A. Age-Dependent Defects in TCR-Triggered Cytoskeletal Rearrangement in CD4+ T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 5021–5027, 2002.
- GARCIA, G. G.; MILLER, R. A. Age-related defects in CD4+ T cell activation reversed by glycoprotein endopeptidase. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 12, p. 3464–3472, 2003.
- GASPER, D. J.; TEJERA, M. M.; SURESH, M. CD4 T-Cell Memory Generation and Maintenance. **Critical Reviews in immunology**, v. 34, n. 2, p. 121–146, 2014.
- GHOSH, A. K.; DASGUPTA, S.; GHOSE, A. C. Immunoglobulin G Subclass-Specific Antileishmanial Antibody Responses in Indian Kala-Azar and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY**, v. 2, n. 3, p. 291–296, 1995.
- GINALDI, L. et al. Immunophenotypical Changes of T Lymphocytes in the Elderly. **Gerontology**, v. 46, p. 242–248, 2000.
- GIORGIONE, J. R. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. October, p. 11634–11639, 1996.
- GLOBERSON, A.; EFFROS, R. B. Lymphocytes in the aged. **Immunology Today**, v. 21, n. 10, p. 515–521, 2000.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010.
- GORONZY, J.; FUJII, H.; WEYAND, C. M. Telomeres , immune aging and autoimmunity. **Experimental Gerontology**, v. 41, p. 246–251, 2006.
- GUILLIAMS, M. et al. The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 95–109, 2014.
- GUPTA, R. K.; KANUNGO, M. Glial molecular alterations with mouse brain development and aging: Up-regulation of the Kir4.1 and aquaporin-4. **Age**, v. 35, n. 1, p. 59–67, 2013.
- HANDMAN, E.; T. SPIRA, D. Growth of *Leishmania Amastigotes* in Macrophages from Normal and Immune Mice. **Z Parasitenkd**, v. 81, p. 75–81, 1977.
- HAWKING, F. Growth of protozoa in tissue culture. V. *Leishmania donovani*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 4,

1948.

HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 37, n. 3, p. 614–636, 1965.

HAYFLICK, L. Biological aging is no longer an unsolved problem. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, p. 1–13, 2007.

HENSON, S. M.; AKBAR, A. N. KLRG1 — more than a marker for T cell senescence. **Age (Dordr)**, v. 31, n. May, p. 285–291, 2009.

HERRERO, C. et al. IFN- γ -dependent transcription of MHC class II IA is impaired in macrophages from aged mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 4, p. 485–493, 2001.

HOTEZ, P. J. et al. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria: A comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing world. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 5, p. 576–584, 2006.

ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. May, p. 1–9, 2012.

JIN, H. et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 1–6, 2010.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, n. 1, p. 26–31, 2000.

KAYE, P. M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 239–253, 2004.

KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. Leishmania vaccines: Progress and problems. **Parasitology**, v. 133, n. SUPPL.2, 2006.

KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: Implications for immunotherapy. **Future Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 901–915, 2014.

KHALIL, E. A. G. et al. Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 140, n. 2, p. 349–353, 2005.

KIRK, C. J.; FREILICH, A. M.; MILLER, R. A. Age-related decline in activation of JNK by TCR- and CD28-mediated signals in murine T-lymphocytes. **Cellular Immunology**, v. 197, n. 2, p. 75–82, 1999.

- KIRKLAND, J. L. Inflammation and Cellular Senescence : Potential Contribution to Chronic Diseases and Disabilities With Aging. **Public Policy & Aging Report**, v. 23, n. 4, p. 2002–2005, 2013.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. v. 3, n. August, p. 1–10, 2012.
- KURASHIMA, C.; UTSUYAMA, M. Age-Related Changes of Cytokine Production by Murine Helper T Cell Subpopulations. **Pathobiology**, v. 65, p. 155–162, 1997.
- KURTULUS, S.; TRIPATHI, P.; HILDEMAN, D. A. Protecting and rescuing the effectors: Roles of differentiation and survival in the control of memory T cell development. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–13, 2012.
- L SACKS, D.; V. PERKINS, P. Identification of an Infective Stage of Leishmania Promastigotes. **Science**, v. 223, n. March, p. 1417–1420, 1984.
- LAGES, C. S. et al. Partial restoration of T cell function in aged mice by in vitro blockade of the PD-1/PD-L1 pathway. **Aging Cell**, v. 9, n. 5, p. 785–798, 2011.
- LARBI, A. et al. Aging of the Immune System as a Prognostic Factor for Human Longevity. **Physiology**, v. 23, n. 2, p. 64–74, 2008.
- LERNER, E. A.; LUGA, A.; REDDY, V. Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies Ethan. **Peptides**, v. 28, n. 9, p. 1651–1654, 2007.
- LESTINOVA, T. et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–26, 2017.
- LIEW, F. Y. Regulation of cell-mediated immunity in leishmaniasis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 155, p. 53–64, 1990.
- LOCKSLEY, R. M. et al. Murine cutaneous leishmaniasis : Susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. **Annales de l'Institut Pasteur - Immunology**, v. 138, n. 5, p. 744–749, 1987.
- M. CAVANAGH, M.; M. WEYAND, C.; J. GORONZY, J. Chronic inflammation and aging: DNA damage tips the balance. **Curr Opin Immunol.**, v. 24, n. 4, p. 488–493, 2012.
- MALAGUARNERA, L. et al. Immunosenescence : a review. v. 32, p. 1–14, 2001.
- MARX, J. Chromosome ends catch fire. **Science**, v. 265, n. 5179, p. 1656 LP-1658, 16 set. 1994.
- MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, 2013.

- MCCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunological Reviews**, v. 201, p. 206–224, 2004.
- MELBY, P. C. et al. Leishmania donovani: Evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 17–25, 2001.
- MELIS, L. et al. Senescence marker killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) contributes to TNF- α production by interaction with its soluble E-cadherin ligand in chronically in flamed joints. v. 1, p. 1223–1231, 2014.
- MILES, S. A. et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 5, p. 1–8, 2005.
- MILLER, R. A. et al. Early activation defects in T lymphocytes from aged mice. **Immunological Reviews**, v. 160, p. 79–90, 1997.
- MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166–6173, 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. [s.l: s.n.].
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, segundo UF de residência. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2017. **Dados**, p. 2008–2008, 2017.
- MULI MUTISO, J. et al. Immunology of leishmaniasis. **Sci Parasitol**, v. 14, n. 2, p. 56–61, 2013.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.
- NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The Leishmania-macrophage interaction: A metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301–308, 2008.
- NATALE, C. C.; SEIXAS, P. M.; ALMEIDA, D. M. DE. THE IMPORTANCE MURINE MODELS IN CHARACTERIZATION OF THE IMMUNE RESPONSE AGAINST LEISHMANIASIS: A REVIEW A IMPORTÂNCIA DOS MODELOS MURINOS NA CARACTERIZAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS ÀS LEISHMANIOSES: UMA. v. 4, p. 35–59, 2016.
- NIKOLICH-ZUGICH, J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 7, p. 512–522,

jul. 2008.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Informe Epidemiológico das Américas. Leishmanioses. **Informe de Leishmanioses Nº 5**, p. 8, 2017a.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, P. Leishmanioses: Informe epidemiológico das américas, fevereiro 2018. **World Health Organization**, p. 7, 2017b.

PAWELEC, G. et al. T CELLS AND AGING. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, n. 4, p. 1056–1183, 2002.

PAWELEC, G. Immunosenescence comes of age. Symposium on aging research in immunology: The impact of genomics. **EMBO Reports**, v. 8, n. 3, p. 220–223, 2007.

PETERS, N. C. et al. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, v. 321, n. December, p. 970–975, 2008.

PIGOTT, D. M. et al. Global distribution maps of the Leishmaniases. **eLife**, v. 2014, n. 3, p. 1–21, 2014.

PINCHUK, L. M.; FILIPOV, N. M. Immunity & Ageing populations in C57BL / 6 and BALB / c male mice. **Immunity & Ageing**, v. 12, p. 1–12, 2008.

POLAND, G. A. et al. A systems biology approach to the effect of aging, immunosenescence and vaccine response. **Current Opinion in Immunology**, v. 29, n. 1, p. 62–68, 2014.

POTESTIO, M. et al. Age-related changes in the expression of CD95 (APO1/FAS) on blood lymphocytes. **Experimental Gerontology**, v. 34, n. 5, p. 659–673, 1999.

QUINN, K. M. et al. Age-Related Decline in Primary CD8+ T Cell Responses Is Associated with the Development of Senescence in Virtual Memory CD8+ T Cells. **Cell Reports**, v. 23, n. 12, p. 3512–3524, 2018.

RAULET, D. H. et al. Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor. **Annu. Rev. Immunol**, v. 31, p. 413–41, 2013.

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

REN, X. et al. PD1 protein expression in tumor infiltrated lymphocytes rather than PDL1 in tumor cells predicts survival in triple-negative breast cancer. **Cancer Biology e Therapy**, v. 19, n. 5, p. 373–380, 2018.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Neutrophils Activate Macrophages for Intracellular

- Killing of *Leishmania major* through Recruitment of TLR4 by Neutrophil Elastase. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 3988–3994, 2007.
- RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, 2012.
- ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, n. 5, p. 495–507, 2002.
- ROMA, E. H. et al. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016.
- ROMÃO, R. P. T. et al. Leishmaniose resposta imune e mecanismos antioxidante de escape. **Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2007.
- RYAN, J. R. et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Soluble Promastigote Antigen Detects Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies in Sera from Cases of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 40, n. 3, p. 1037–1043, 2002.
- SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 1, p. 100–103, 1989.
- SAGIV, A. et al. NKG2D ligands mediate immunosurveillance of senescent cells. **Aging**, v. 8, n. 2, p. 328–344, 2016.
- SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S. J.; HANDMAN, E. The role of host genetics in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. July, p. 383–391, 2009.
- SARAIVA, E. . et al. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, v. 111, n. 3, p. 275–287, 1995.
- SARAIVA, L. et al. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1033–1039, 2010.
- SARKAR, A. et al. Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 202, n. 1, p. 25–35, 2012.
- SAURWEIN-TEISSL, M. et al. Whole virus influenza vaccine activates dendritic cells (DC) and stimulates cytokine production by peripheral blood mononuclear cells

- (PBMC) while subunit vaccines support T cell proliferation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 114, n. 2, p. 271–276, 1998.
- SCHLEICHER, U. et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 4, p. 893–906, 2007.
- SCHULTE, S.; SUKHOVA, G. K.; LIBBY, P. Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 172, n. 6, p. 1500–1508, 2008.
- SIMPSON, R. J. Aging , Persistent Viral Infections , and Immunosenescence : Can Exercise “ Make Space ”? **Exercise and Sports Sciences Review**, p. 23–33, 2011.
- SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis : Vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, v. 30, n. 26, p. 3834–3842, 2012.
- SOLANA, R.; PAWELEC, G. Molecular and cellular basis of immunosenescence. v. 102, p. 115–129, 1998.
- SOLANA, R.; PAWELEC, G.; TARAZONA, R. Commentary Aging and Innate Immunity. **Immunity**, v. 24, n. May, p. 491–494, 2006.
- SOONG, L. Modulation of Dendritic Cell Function by Leishmania Parasites. **J Immunol**, v. 180, n. 7, p. 4355–4360, 2008.
- SPEZIALI, E. et al. Ageing down-modulates liver inflammatory immune responses to schistosome infection in mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 71, n. 4, p. 240–248, 2010.
- STÄGER, S. et al. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor α signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4804–4807, 2003.
- STÄGER, S.; RAFATI, S. CD8 + T cells in Leishmania infections : friends or foes ? **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. January, p. 1–8, 2012.
- STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.
- STERN, J. J. et al. Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 140, n. 11, p. 3971 LP-3977, 1 jun. 1988.
- SURH, C. D.; SPRENT, J. Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands? **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 4, p. F9–F14, 21 ago. 2000.

- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll -Like Receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 335–376, 2003.
- TAKEOKA, Y. et al. The Murine Thymic Microenvironment: Changes with Age. **Allergy and Immunology**, v. 111, p. 5–12, 1996.
- TAO, K. et al. KLRG1 restricts memory T cell antitumor immunity. **Oncotarget**, v. 7, n. 38, 2016.
- THIMME, R. et al. Increased Expression of the NK Cell Receptor KLRG1 by Virus-Specific CD8 T Cells during Persistent Antigen Stimulation. v. 79, n. 18, p. 12112–12116, 2005.
- THOMAS, B. N.; BUXBAUM, L. U. FcγRIII Mediates Immunoglobulin G-Induced Interleukin-10 and Is Required for Chronic *Leishmania mexicana* Lesions. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 76, n. 2, p. 623–631, 2008.
- TIMM, J. A.; THOMAN, M. L. Maturation of CD4 + Lymphocytes in the Aged Microenvironment Results in a Memory-Enriched Population. **J Immunol**, v. 162, p. 711–717, 1999.
- VICENTE, R. et al. Cellular senescence impact on immune cell fate and function. **Aging Cell**, v. 15, n. 3, p. 400–406, 2016.
- VIEW, E. et al. PD-1 inhibits T cell proliferation by upregulating p27 and p15 and suppressing Cdc25A. **Cell Cycle**, n. 11, p. 4305–4309, 2012.
- VOLFOVA, V. et al. Hyaluronidase of Bloodsucking Insects and Its Enhancing Effect on *Leishmania* Infection in Mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. 1–8, 2008.
- WAITE, R. C. et al. Integration of water, sanitation and hygiene for the control of neglected tropical diseases: A review of progress and the way forward. **International Health**, v. 8, n. Suppl 1, p. i22–i27, 2015.
- WANG, X. et al. Pharmacologically blocking p53-dependent apoptosis protects intestinal stem cells and mice from radiation. **Scientific reports**, v. 5, p. 8566, 10 abr. 2015.
- WENSVEEN, F. M.; JELENC, V. NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. March, 2018.
- WHO TECHNICAL REPORT SERIES. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. **World Health Organization technical report series**, v. 949, n. March, p. 202, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. OMS | Leishmaniasis. **WHO**, v. 375, 2015.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1–16, 2003.

ZUGICH, J. N.-; SLIFKA, M. K.; MESSAOUDI, I. THE MANY IMPORTANT FACETS OF T-CELL REPERTOIRE DIVERSITY. **Nature Publishing Group**, v. 4, p. 123–132, 2004.

ZWINGENBERGER, K. et al. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: Evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon- γ production. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 57, n. 2, p. 242–249, 1990.