

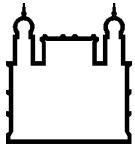
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Resposta imunopatológica em macrófagos RAW 264.7 e  
camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* ao  
tratamento com CXCL10**

**WEBERTTY MAYK EUFRÁSIO DE FIGUEIRÊDO**

Fortaleza - CE  
Julho de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**WEBERTTY MAYK EUFRÁSIO DE FIGUEIRÊDO**

**Resposta imunopatológica em macrófagos RAW 264.7 e camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* ao tratamento com CXCL10**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical

**Orientadoras:** Profa. Dra. Helene Santos Barbosa  
Profa. Dra. Maria Jania Teixeira

Fortaleza - CE  
Julho de 2017

**Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca Central de Manguinhos/ICICT/FIOCRUZ-RJ**

Figueirêdo, Weberty Mayk Eufrásio de .

Resposta imunopatológica em macrófagos RAW 264.7 e em camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* ao tratamento com CXCL10 / Weberty Mayk Eufrásio de Figueirêdo. - Rio de Janeiro, 2017.

115 f.; il.

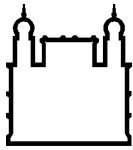
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Helene Santos Barbosa.

Co-orientadora: Maria Jania Teixeira.

Bibliografia: f. 64-75

1. *Leishmania infantum*. 2. quimiocina CXCL10. 3. baço. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Webertty Mayk Eufrásio de Figueirêdo**

### **Resposta imunopatológica em macrófagos RAW 264.7 e camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* ao tratamento com CXCL10**

**ORIENTADOR (ES):** Profa. Dra. Helene Santos Barbosa  
Profa. Dra. Maria Jania Teixeira

**Aprovada em: 19/07/2017**

#### **EXAMINADORES:**

Prof. Dr. Filipe Aníbal Carvalho Costa - Instituto Oswaldo Cruz, RJ, Fiocruz.  
(Presidente)

Profa. Dra. Tatiana Rodrigues Moura - Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Antônio Ricardo Khouri Cunha - Fundação Oswaldo Cruz, Bahia

Profa. Dra. Clarissa Romero Teixeira - Fundação Oswaldo Cruz, Piauí

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira - Universidade Federal do Ceará

Suplentes:

Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas- Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Érika Helena Salles de Brito - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, UNILAB, Ceará

Fortaleza, 19 de julho de 2017



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Weberty Mayk Eufrásio de Figueirêdo**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Helene Santos Barbosa e Dr<sup>a</sup>. Maria Jania Teixeira. Ao décimo nono dia do mês de julho de dois mil e dezessete, realizou-se às quatorze horas, no Auditório do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, o exame da tese de doutorado intitulada: **"Resposta imunopatológica em macrófagos RAW 264.7 e em camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* ao tratamento com CXCL10"** no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Relação Parasito - Hospedeiro. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup> Tatiana Rodrigues de Moura - UFS/SE, Dr. Antonio Ricardo Khouri Cunha - IGM/FIOCRUZ, Dr<sup>a</sup>. Clarissa Romero Teixeira - FIOCRUZ/PI, Dr. Edson Holanda Teixeira - UFC/CE e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Conceição Aparecida Domelas - UFC/CE e Dr<sup>a</sup>. Érika Helena Salles de Brito - UNILAB/CE. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APPROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 19 de Julho de 2017.

Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (Presidente da Banca):

Dr<sup>a</sup> Tatiana Rodrigues de Moura (Membro da Banca):

Dr. Antonio Ricardo Khouri Cunha (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Clarissa Romero Teixeira (Membro da Banca):

Dr. Edson Holanda Teixeira (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenadora do Programa):

Av. Brasil 4365 Mangueiras Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360  
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimento@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/ioconline

**Dedico esta tese aos meus amados  
pais Regina Maria Eufrásio de  
Figueirêdo e Floro Bento de  
Figueirêdo.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me fortalecido a todo instante e permitido que eu fosse até o final.

À minha família, em especial aos meus pais, Floro Bento de Figueirêdo e Regina Maria Eufrásio de Figueirêdo, por nunca terem deixado faltar amor e por não medirem esforços para verem seus filhos se desenvolvendo intelectualmente; às minhas irmãs Vanessa Maria Eufrásio de Figueirêdo e Valéria Régis Eufrásio de Figueirêdo, minhas tias Rita Maria Eufrásio e Maria Ilda de Figueirêdo Lacerda.

À Francisca Maria Rodrigues dos Santos, a pessoa mais encantadora que eu já conheci, sempre disposta a me ajudar, ela foi meus braços e minhas pernas durante esses anos, pois estive comigo nos piores e melhores momentos, obrigado por tudo, essa vitória também é sua.

Às minhas orientadoras Dra. Helene Santos Barbosa e Dra. Maria Jania Teixeira, pela dedicação, pelos ensinamentos, pela paciência, pela confiança e pela grande e valiosa ajuda nesses quatro anos de construção deste trabalho.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, em especial aqueles que compõem o Setor de Estudos em Parasitologia Profa. Zilmar Fontenele e Silva: Profa. Dra. Cristina de Souza Chaves, Prof. Dr. Vladmir Michailowsky Leite Ribeiro, Prof. Josias Martins Vale, Profa. Dra. Kelma Maria Souza Bastos, Profa. Dra. Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo, Dr. Allan Rodrigo Soares Maia, Alísio Bandeira Girão e Lucineide de Sousa Barros.

À Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota e ao Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa pelo empenho com que trabalharam à frente da coordenação do DINTER e a todos os professores da Fiocruz-RJ que viajaram para ministrar suas aulas aqui em Fortaleza, um trabalho árduo, cansativo, mas que foi feito com maestria.

À Professora Dra. Andréa Henriques Pons, do Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos, do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz- RJ e ao Professor Dr. Adriano Gomes da Silva, do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas Fiocruz- RJ, pela assessoria científica.

À Dra. Fabiola Fernandes Heredia, que me ajudou imensamente no planejamento e execução das análises laboratoriais no citômetro de fluxo, obrigado por sempre ter ficado ao meu lado, às vezes até de madrugada, valeu pela amizade e por ter contribuído para que tudo fosse mais fácil, obrigado pelos conselhos, pelas dicas na escrita e pelo carinho que sempre me deu mesmo quando eu era só ansiedade.

À Roberta Rocha Braga e Aline Sombra Santos, pelos muitos momentos juntos, tanto no Nurof quanto no DPML, sempre com milhares de coisas pra estudar e executar. A análise histopatológica nos deu um trabalho imensurável, mas nem por isso vocês perderam o bom humor. Nossos lanches sempre de fazerem inveja, nossas conversas variadas, tudo foi muito bom; trabalhar com duas pessoas obstinadas como vocês foi inspirador.

Ao farmacêutico Ramon Róseo responsável pelo citômetro de fluxo da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Departamento de Farmácia, obrigado por ter me salvado, abrindo as portas do laboratório quando nosso aparelho foi para manutenção. Obrigado a Profa. Dra. Lilian e a Camila Fernandes, por também terem me ajudado logo no início com a citometria de fluxo. Naquele tempo até a extração das células do baço era uma dificuldade e sem vocês eu não teria dado os primeiros passos.

A todos os amigos e amigas da pós-graduação, pelo incentivo, pela torcida, pelas experiências divididas, com as quais aprendi bastante. Não deixo de agradecer especialmente também aos alunos graduandos, mestrandos e doutorandos, com os quais pude conviver no Laboratório de Parasitologia durante esses anos. Em especial agradeço ao Francisco Rafael Marciano, Naya Lúcia de Castro Rodrigues, Thially Braga Gonçalves, Pedro Delcy Torres Sindeaux Filho, Kelvia Miranda Sá, Sayonara de Melo Viana, Priscila Nascimento, Carrel Xavier Martins Lima, Rafaele de Paula, Hilmara Hélio de Souza Amaral e Dorotheia Teixeira Alves, pela valiosa amizade.

À Livia Igualza Mangeon, da secretaria acadêmica, pela disponibilidade e competência com que resolveu nossas demandas, mesmo estando no Rio de Janeiro e a Valéria Cordeiro de Oliveira, em Fortaleza, na secretaria do mestrado, principalmente nos períodos de aula e qualificação, obrigado.

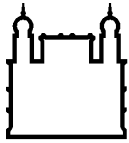
Ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e CAPES-Programa DINTER (Doutorado Interinstitucional) Medicina Tropical 309/2013 pela ajuda financeira.



**Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar. Mas  
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.**

**Madre Teresa de Calcutá.**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Resposta imunopatológica em macrófagos RAW 264.7 e camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* ao tratamento com CXCL10

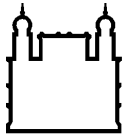
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Webertty Mayk Eufrásio de Figueirêdo

A infecção por *Leishmania infantum* pode ser assintomática ou sintomática (calazar), podendo neste caso, haver manifestação de formas graves e até óbito, mesmo em casos adequadamente tratados com drogas antiparasitárias. Na leishmaniose visceral por *L. infantum*, o hospedeiro não gera uma resposta imunológica eficaz. CXCL10 é uma quimiocina indutora da produção de IFN- $\gamma$  e, portanto, associada à resposta imunológica celular de perfil Th1, considerada necessária para o controle da infecção por *L. infantum*. Com a perspectiva de contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, o trabalho objetivou investigar *in vitro* e *in vivo* se o tratamento com CXCL10 conferiria proteção contra a infecção. *In vitro*, macrófagos RAW 264.7 foram infectados com *L. infantum* e tratados ou não com 20, 50 e 100 ng/mL de CXCL10 para avaliação da carga parasitária, produção de NO, IL-4 e IL-10 após 24 e 48 horas do tratamento. *In vivo*, camundongos BALB/c foram infectados com *L. infantum* e tratados ou não com CXCL10 (5  $\mu$ g/kg; I.P) após 1, 3 e 7 dias. Após 1, 7, 23 e 45 do início do tratamento foi verificado o número de parasitos em baço e fígado, a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, TGF- $\beta$  e IL-10 por esplenócitos, o fenótipo e a frequência das populações de células Treg Foxp3+ e Foxp3- produtoras de IL-10 e o efeito de CXCL10 na polpa branca do baço. *In vitro*, CXCL10 reduziu carga parasitária, não dependente de NO, e inibiu a liberação das citocinas IL-4 e IL-10. *In vivo*, CXCL10 foi capaz de reduzir a carga parasitária tanto no fígado quanto no baço, quatro semanas após a infecção. Também induziu IFN- $\gamma$  após 23 dias de tratamento, correlacionando-se com a redução da carga parasitária, e reduziu IL-10 e TGF- $\beta$ . Após tratamento, houve decréscimo de células Treg produtoras de IL-10 intracelular e observou-se também que CXCL10 foi capaz de controlar a hiperplasia no baço durante a fase aguda da infecção. Este estudo sugere um papel protetor de CXCL10 contra *L. infantum*, mediado por IFN- $\gamma$ , não dependente de NO, com supressão de células Treg IL-10+ e preservação da microarquitetura do baço. Esses dados podem fornecer informações para o desenvolvimento de novas abordagens para futuras intervenções terapêuticas para a leishmaniose visceral.

Palavras-chave: *L. infantum*, CXCL10, BALB/c, citocinas, Foxp3, baço, hiperplasia folicular.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Immunopathological response in RAW 264.7 macrophages and BALB / c mice infected with *Leishmania infantum* when treated with CXCL10

#### ABSTRACT

PhD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Webertty Mayk Eufrásio de Figueirêdo

*Leishmania infantum* infection may be asymptomatic or symptomatic (kala-azar), in which case there may be severe manifestations and even death, even in cases adequately treated with antiparasitic drugs. In visceral leishmaniasis by *L. infantum*, the host does not generate an effective immune response. CXCL10 is a chemokine that induces the production of IFN- $\gamma$  and, therefore, is associated with the Th1 profile cellular immune response considered necessary for the control of *L. infantum* infection. With the prospect of contributing to the development of new therapeutic approaches, the work aimed to investigate *in vitro* and *in vivo* whether treatment with CXCL10 would confer protection against infection. *In vitro*, RAW 264.7 macrophages were infected with *L. infantum* and treated with 20, 50 and 100 ng/mL CXCL10 for parasite load, NO, IL-4 and IL-10 production after 24 and 48 hours of treatment. *In vivo*, BALB/c mice were infected with *L. infantum* and treated or not with CXCL10 (5  $\mu$ g/kg; I.P) after 1, 3 and 7 days. After 1, 7, 23 and 45 days of treatment the number of spleen and liver parasites was determined, the production of the cytokines IFN- $\gamma$ , IL-4, TGF- $\beta$  and IL-10 by splenocytes, phenotype and frequency of IL-10-producing Foxp3<sup>+</sup> and Foxp3<sup>-</sup> cells and the effect of CXCL10 on the white spleen pulp. *In vitro*, CXCL10 reduced parasite load, non-NO dependent, and inhibited the release of IL-4 and IL-10 cytokines. *In vivo*, CXCL10 was able to reduce parasite burden in both liver and spleen four weeks post infection, also induced IFN- $\gamma$  after 23 days of treatment, correlating with the reduction of parasite burden, and reduced IL-10 and TGF- $\beta$ . After treatment, there was also a decrease in intracellular IL-10 producing Treg cells and it was also observed that CXCL10 was able to control spleen follicular hyperplasia during the acute phase of the infection. This study suggests a protective role of non-NO-dependent IFN- $\gamma$  mediated CXCL10 against *L. infantum* with suppression of IL-10 + Treg cells and preservation of spleen microarchitecture. These data may provide information for the development of new approaches for future therapeutic interventions for visceral leishmaniasis.

Key words: *L. infantum*, CXCL10, BALB/c, cytokines, Foxp3, spleen, follicular hyperplasia.

## INDICE

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
INTRODUÇÃO .....	17
Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral.....	17
Agente etiológico e aspectos clínicos .....	19
Aspectos imunopatológicos no modelo experimental murino .....	21
Quimiocinas e seus receptores .....	28
A quimiocina CXCL10 .....	30
Imunologia das células T regulatórias em camundongos .....	32
Justificativa.....	35
OBJETIVOS.....	37
Objetivo Geral.....	37
Objetivos Específicos .....	37
MATERIAL E MÉTODOS .....	38
Animais .....	38
Parasitos .....	38
Ensaio <i>in vitro</i> com macrófagos .....	38
Determinação da taxa de infecção dos macrófagos .....	39
Dosagem de óxido nítrico (NO).....	39
Infecção de camundongos BALB/c e tratamento com CXCL10.....	39
Determinação do número de parasitos no baço e fígado.....	40
Cultura de esplenócitos.....	40
Dosagem de citocinas .....	41
Avaliação de células T regulatórias (T reg) em camundongos BALB/c .....	41
Análise de citometria de fluxo.....	42

<b>Análise histopatológica do baço .....</b>	<b>42</b>
<b>Análise estatística .....</b>	<b>43</b>
<b>Desenho experimental .....</b>	<b>43</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>Carga parasitária em macrófagos.....</b>	<b>44</b>
<b>Produção de óxido nítrico por macrófagos .....</b>	<b>44</b>
<b>Produção de citocinas <i>in vitro</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>Peso relativo do baço e fígado.....</b>	<b>46</b>
<b>Número de parasitos no baço e fígado .....</b>	<b>47</b>
<b>Produção de citocinas <i>in vitro</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>Produção de CXCL10 na frequência de células Treg CD4+CD25+FOXP3+IL-10+ em camundongos BALB/C infectados com <i>L. infantum</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>Efeito de CXCL10 na frequência de células Treg CD4+CD25-FOXP3-IL-10+ em camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>Efeito de CXCL10 na área de polpa branca, no numero de folículos linfoides e no índice de peso do baço de camundongos BALB/C infectados com <i>L. infantum</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>76</b>
<b>Apêndice 1: Aprovação do projeto no comitê de ética .....</b>	<b>76</b>
<b>Apêndice 2: Manuscrito 1 (publicado na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz) .....</b>	<b>77</b>
<b>Apêndice 3: Manuscrito 2 (submetido à revista Parasites &amp; Vectors) .....</b>	<b>86</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1:Carga parasitária em macrófagos infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados com CXCL10. ....	66
Figura 2:Produção de óxido nítrico por macrófagos infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados ou não com CXCL10. ....	45
Figura 3:Produção de IL-4 e IL-10 por macrófagos infectados com <i>leishmania infantum</i> e tratados ou não com CXCL10. ....	46
Figura 4:Peso relativo do baço (A) e no fígado (B) de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados ou não com CXCL10 .....	47
Figura 5:Carga parasitária no baço (A) e fígado (B) de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados ou não com CXCL10 .....	48
Figura 6:Produção de IFN- $\gamma$ (A), IL-4 (B), IL-10 (C) E TGF-B (D) por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados ou não com <i>Leishmania infantum</i> e tratados e não com CXCL10.....	49
Figura 7:Estratégia de “gating” da proporção (A, B e C) e frequência (D) de células Treg CD4 + CD25 + Foxp3 + IL-10 + em esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados ou não com CXCL10 .....	51
Figura 8:Estratégia de “gating” da proporção (A, B e C) e frequência (D) de células Treg Tr1 CD4 + CD25 - Foxp3 - IL-10 + em esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> e tratados ou não com CXCL10 .....	52
Figura 9A e B:Número de folículos de polpa branca do baço (A), índice de peso de baço (B) de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> tratados ou não com CXCL10 .....	54
Figura 9C:Seções histológicas coradas com coloração hematoxilina-eosina (C) de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania infantum</i> tratados ou não com CXCL10.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS** - *Acquired Immunodeficiency Syndrome*
- APC** - Célula Apresentadora de Antígeno
- CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CDFs** - Células Dendríticas Foliculares
- CG** - Centro Germinativo
- CNPq** - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- ELISA** - Ensaio Imunoenzimático ligado a enzima
- HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana
- IFN** - Interferon
- IL** - Interleucina
- iNOS** - Óxido Nítrico Sintase induzida
- LT** - Linfotoxina
- LV** - Leishmaniose visceral
- MMM** - Macrófagos Metalofílicos
- MS** - Ministério da Saúde
- MZM** - Macrófago da Zona Marginal
- NK** - *Natural Killer*
- NO** - Óxido nítrico
- OMS** - Organização Mundial da Saúde
- PAHO/WHO** - Pan American Health Organization/World Health Organization
- PALS** - Bainha Linfocítica Periarteriolar
- PBS** - Solução de tampão fosfato
- PD-L1** - Programmed Death-Ligand 1
- PMN** - Polimorfonucleares
- ROI** - Reativos Intermediários do Oxigênio
- SBF** - Soro Fetal Bovino
- SFM** - Sistema Fagocítico Mononuclear
- SOD** - Superóxido Desmutase
- TGF** - Fator Transformador de Crescimento
- Th** - *T helper*
- TNF** - Fator de Necrose Tumoral

**TRL** - Receptor *toll-like*

**WHO** - World Health Organization



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses encontram-se amplamente distribuídas pelo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do Oriente Médio, Sul da Ásia, África e América Latina. As leishmanioses podem acometer pele, mucosas ou vísceras. Elas são infecções causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e sua transmissão ocorre envolvendo mais de 20 espécies de insetos flebotomíneos fêmeas. Reconhecidas como doenças negligenciadas, as leishmanioses estão presentes, endemicamente, em 98 países e territórios, onde mais de 350 milhões de pessoas correm risco de contraí-las. Esse quadro resulta, anualmente, em cerca de 700.000 a 1.000.000 de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes (PAHO-WHO, 2014, WHO, 2017).

Dentre as leishmanioses, a forma mais grave é a visceral que quando não tratada pode evoluir para óbito em mais de 95% dos casos. Estima-se que, em todo o mundo, ocorram entre 50.000 e 90.000 novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) anualmente. Em 2015, mais de 90% desses casos novos ocorreram em 7 países: Brasil, Etiópia, Índia, Kenya, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017). Sendo que 90% dos casos registrados na América Latina ocorrem no Brasil onde a doença é endêmica e apresenta surtos frequentes, sendo considerada de grande importância para a Saúde Pública (Brasil, 2017).

É importante observar que, no ano de 2015, a Região Nordeste do Brasil foi responsável pelo maior número de casos confirmados de LV (1806 casos) em relação às demais regiões do país, o que correspondeu a 55% dos casos confirmados. Entre os estados membros da Região Nordeste, o Ceará foi o responsável pelo segundo maior número de casos confirmados de LV (419 casos), o que representou 23% dos casos confirmados. Neste “ranking” aparecem em primeiro e terceiro lugares os estados do Maranhão (539 casos) e da Bahia (320 casos) com 30% e 17% dos casos confirmados, respectivamente. Em 2015, na Região Nordeste

foram 138 mortes, das quais 19 ocorreram na Bahia, 37 no Ceará e 39 no Maranhão (Brasil, 2017).

Casos de LV associados à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) foram relatados em 35 países, inclusive no Brasil (Chappuis et al., 2007), com altas taxas desta co-infecção ao lado da Etiópia e do estado de Bihar na Índia (WHO, 2017). A leishmaniose é considerada uma infecção oportunista em indivíduos imunocomprometidos, pois se instala ou se exacerba facilmente no indivíduo HIV positivo, acelerando o curso clínico da infecção pelo vírus e prejudicando a resposta ao tratamento (Paredes et al., 2003). O tratamento anti-retroviral reduz o desenvolvimento da doença, atrasa as recidivas e aumenta a sobrevida dos pacientes coinfectados (WHO, 2017). A ruralização do HIV/AIDS e a urbanização da LV têm promovido um aumento na incidência desta co-infecção (Alves & Bevilacqua, 2004).

Em busca de melhores condições de vida, ocorreu uma ampla migração de pessoas da zona rural para a periferia das grandes cidades, promovendo a urbanização da LV (Desjeux, 2001; Souza et al., 2017). O desmatamento dessas áreas para habitação facilitou o contato direto dos humanos com habitats naturais de criação de vetores, reservatórios selvagens e animais domésticos, agravado pela presença de condições sanitárias precárias, gerando um excelente ambiente para o vetor *Lutzomyia longipalpis* (Borges et al., 2009). Estudos publicados em 2009 mostraram que a LV vem urbanizando-se rapidamente em Fortaleza. Dos 1.636 casos confirmados entre 2001 e 2006, a capital cearense foi responsável por 60% deles (Albuquerque et al., 2009).

No Brasil, a LV tinha ocorrência principalmente na região Nordeste, mas desde a década de 1990 se espalhou para os centros urbanos das regiões Centro-Oeste e Sudeste (Costa, 2008; Romero & Boelaert, 2010). No estado de São Paulo a doença tem se dispersado, porém, surpreendentemente, fatores econômicos não mostraram influência perceptível neste processo. Na verdade, a presença de vetores competentes, a presença de cães infectados e fatores climáticos foram preponderantes para a dispersão da LV humana (Sevá et al., 2017)

Os vetores da LV são insetos denominados flebotomíneos e dependendo da região que se encontram, são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, dentre outros (Brasil, 2017). Duas espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* relacionam-se com a transmissão da LV no Brasil: *Lu. longipalpis*

*Lu. cruzi*. A espécie *Lu. longipalpis* é encontrada nas cinco regiões do país (Brazil, 2013), adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variação da temperatura, sendo considerada a principal transmissora da forma visceral no país (Rangel & Vilela, 2008), enquanto a espécie *Lu. cruzi* parece ter uma contribuição menor, sendo identificada até agora somente nos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Santos et al., 1998; de Pita-Pereira et al., 2008; Missawa et al., 2011; de Oliveira et al., 2017).

## 1.2. Agente etiológico e aspectos clínicos

A atual classificação taxonômica proposta por Adl e colaboradores (2005), por meio de estudos ultraestruturais e moleculares, coloca os protozoários parasitos causadores das leishmanioses no supergrupo Excavata, táxon Euglenozoa, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Esses parasitos têm um ciclo de vida heteroxênico, ocorrendo sob duas formas evolutivas: a forma extracelular, denominada promastigota, encontrada no trato digestivo dos vetores flebotomíneos (Lainson et al., 1987) e a forma amastigota, encontrada parasitando células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) dos hospedeiros mamíferos (Chappuis et al., 2007).

Durante muito tempo, pensou-se que a LV era causada principalmente por três espécies: *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, essa última presente no Brasil. No entanto, nos últimos anos, *L. chagasi* e *L. infantum* têm sido consideradas como uma única espécie, devido à falta de variações genotípicas suficientes entre as duas espécies (Mauricio et al., 2000).

O curso clínico da doença pode depender tanto de fatores relacionados à natureza da resposta imunológica e da genética do hospedeiro, do seu estado nutricional e da baixa idade, como também da espécie de *Leishmania*, da quantidade de parasitos inoculados, da infectividade e patogenicidade do parasito (Badaro et al., 1986; Pearson & Souza, 1996; Murray et al., 2005).

Na LV, o tempo de incubação do protozoário costuma variar de 3 a 8 meses, mas pode durar apenas 10 dias em alguns casos, ou ainda se estender por um período muito longo, de 34 meses em outros casos. A doença também tem sido diagnosticada em pessoas que se tornam imunocomprometidas anos após terem se

mudado de áreas endêmicas (Pearson & Souza, 1996). A forma assintomática da LV é caracterizada por sorologia positiva para *Leishmania* e exame físico normal. O aparecimento dos sintomas geralmente é gradual, mas podem se manifestar abruptamente, levando a um desfecho fatal em poucas semanas. Os sintomas clássicos são febre irregular e mal-estar, perda de peso progressiva, caquexia, hepatoesplenomegalia, anemia e pancitopenia, podendo levar à morte dentro de 2 a 3 anos, se não houver tratamento (Ferreira et al., 2008).

As manifestações clínicas da LV são divididas em três períodos: período inicial, período de estado e período final. O primeiro deles, também conhecido como fase aguda, representa o início da sintomatologia que, mesmo podendo variar de paciente para paciente, na maioria das vezes corresponde a sintomas como hepatoesplenomegalia, palidez cutâneo-mucosa e febre com duração de no máximo quatro semanas (Brasil, 2006). Em regiões endêmicas, é possível encontrarmos a forma da doença denominada oligossintomática, nesse caso, a infecção frequentemente evolui para a cura clínica aparente dentro de no máximo 15 dias. O paciente oligossintomático, geralmente criança, apresenta um quadro clínico discreto com presença de febre baixa, diarreia, leve palidez cutâneo-mucosa, tosse não produtiva e discreta hepatoesplenomegalia (Evans et al., 1992).

O período de estado da doença caracteriza-se por febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. O quadro clínico é arrastado e prossegue por mais de dois meses de evolução, o que compromete bastante o estado geral do indivíduo. Caso não seja feito o diagnóstico e tratamento, a doença evolui progressivamente para o terceiro e último estágio, o período final. Nesse momento, o paciente apresenta febre contínua, além de um comprometimento mais intenso do estado geral. Instala-se a desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca), há edema dos membros inferiores, podendo evoluir para anasarca. Outras manifestações importantes incluem hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite. Indivíduos não tratados podem apresentar com o tempo caquexia e maior susceptibilidade a infecções bacterianas devido à imunossupressão (Nylén & Sacks, 2007). O óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos (Costa et al., 2010).

### 1.3 Aspectos imunopatológicos no modelo experimental murino

Modelos experimentais em camundongos têm sido extensivamente usados no estudo da LV e, apesar da dificuldade de reproduzir todos os aspectos da infecção natural em laboratório (Kaye & Beattie, 2016). A correlação dos resultados obtidos nesses animais com observações clínicas em pacientes humanos (Sukumaran & Madhubala, 2004), têm se mostrado muito importantes, porque permitem investigar os mecanismos imunológicos e os aspectos histopatológicos da doença (Wilson et al., 2005; Nieto et al., 2011).

Um dos tipos de roedores susceptíveis a infecção por *Leishmania* mais utilizados como modelo experimental de LV é o camundongo BALB/c. Nesses animais, mutações no gene *Slc11a1* causam a sua susceptibilidade ao protozoário no início da infecção. O fenômeno altera a capacidade do gene de codificar uma bomba transportadora de prótons, que fica localizada no vacúolo parasitóforo de macrófagos teciduais e tem como função levar íons para o citosol. O defeito nessa bomba faz com que o vacúolo que antes era pobre em  $Fe^{2+}$  passe a ficar repleto desse íon. O  $Fe^{2+}$  é um cofator indispensável para a produção da enzima superóxido dismutase (SOD), deixando o vacúolo parasitóforo menos hostil, e, dessa forma, permitindo a sobrevivência e multiplicação do parasito (Huynh & Andrews, 2008).

Na LV, observa-se que o parasito tem tropismo principalmente pela medula óssea, fígado e baço (Lang et al., 2009). A doença tem características diferentes no fígado e baço, os dois principais órgãos-alvo. No baço, a doença caracteriza-se pela persistência, chegando a atingir um estágio crônico se não tratada, enquanto no fígado, a infecção pode ser controlada ainda no início com posterior imunidade para re-infecções (Stanley & Engwerda, 2007; Engwerda & Kaye, 2000).

No fígado, a LV caracteriza-se por duas fases conhecidas como inicial e tardia. A fase inicial, também chamada de aguda, começa com a chegada da *Leishmania* ao fígado e conseqüente persistência do parasito durante as duas primeiras semanas após a infecção. É nesse período que a forma amastigota do parasito infecta as células de Kupffer, ocorrendo um rápido aumento da carga parasitária dentro dessas células, devido aos baixos níveis de citocinas e de células T que são insuficientes para conter a multiplicação hepática das amastigotas (Nieto et al., 2011).

Imediatamente após a chegada das amastigotas nos sinusóides hepáticos, os neutrófilos parecem fazer pouco contato com elas e, raramente, as fagocitam, o que pode demonstrar pouco estímulo inflamatório por parte das amastigotas, dificultando a sua eliminação sob essas condições. No entanto, o oposto acontece com a *Leishmania* quando sua forma promastigota é inoculada no animal por via endovenosa, pois, uma vez dentro dos vasos, elas mostram uma capacidade de estímulo inflamatório muito maior que a amastigota e são rapidamente fagocitadas pelos neutrófilos (Kaye & Beattie, 2016).

Nas primeiras 2 horas da fase aguda, a infecção parasitária das células de Kupffer estimula nessas células uma rápida produção das quimiocinas CCL2, CCL3 e CXCL10, mas a quantidade produzida não consegue atingir e nem manter um nível suficiente que garanta inflamação por muito tempo, já que os níveis caem após as primeiras 24 horas, dessa forma, não há ambiente para a destruição expressiva da *Leishmania* no camundongo nesse momento. As células T residentes no fígado também não têm capacidade de produção que impeça a multiplicação do protozoário no fígado ainda, no entanto, conseguem ao menos elevar os níveis de CXCL10 que haviam caído e logo mantê-los em quantidade capaz de fornecer o estímulo quimiotático necessário para que a montagem da resposta mais efetiva se inicie (Cotterell et al., 1999).

Recentemente, foi demonstrado que as quimiocinas reguladas por IFN- $\gamma$  exercem diversos efeitos no recrutamento de células mononucleares em infecções hepáticas precoces. Assim, a depender da quimiocina em questão, podemos ver desde nenhum efeito no recrutamento, o que foi o caso das quimiocinas CXCL13 e CXCL16, a uma ação de contenção inesperada na migração das células no caso da quimiocina CXCL9, ou ainda, a uma promoção antecipada da quimiotaxia promovida pela CXCL10, CCL2 e CCL5 (Murray et al., 2016).

Células NKT invariantes são indispensáveis na regulação de CXCL10 e há duas possibilidades de explicar essa dependência entre essas células e a quimiocina. Uma possibilidade é que a interação entre as células NKT invariantes e as células que produzem CXCL10 seja necessária para uma alta produção de IFN- $\gamma$  nas primeiras 24 horas após a infecção, o que desencadearia a produção da quimiocina. Alternativamente, pode ser que, além da alta produção de IFN- $\gamma$  no início da fase aguda, seja necessária também uma interação maior entre as células NKT

invariantes e as produtoras de CXCL10, por meio de segundos sinais, como CD40L (Svensson et al., 2005).

Entre 2 e 3 semanas de infecção, as quimiocinas reguladas por IFN- $\gamma$  também exercem uma variedade de efeitos no controle da replicação da *Leishmania*. CXCL9, CXCL13 e CXCL16, por exemplo, não têm nenhuma ação efetora sobre o parasito, CXCL10, por sua vez, parece promover paradoxalmente infecção hepática e CCL2 e CCL5 parecem aumentar claramente o controle da infecção. Na semana 3, as cargas de parasitos hepáticos em camundongos CCL2<sup>-/-</sup> e CCL5<sup>-/-</sup> estavam quase ao nível daqueles observados em camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  (Murray et al., 2016).

A fase da doença no fígado é considerada tardia após a segunda semana de infecção. É nesse momento que a resposta imunológica inicia uma etapa determinante, caracterizada pela chegada ao fígado de linfócitos T ativados na bainha linfóide periarteriolar do baço (PALS) (Engwerda & Kaye, 2000; Engwerda et al., 2004; Kaye et al., 2004). Uma vez no fígado, ocorre interação dessas células T ativadas com células dendríticas e macrófagos infectados, mas somente as células dendríticas são capazes de produzir IL-12, ativando células T CD4<sup>+</sup> antígeno específicas (Soong, 2008). São as células dendríticas, num mecanismo envolvendo receptor *toll-like* (TLR) e IL-12, as responsáveis pela ativação de células *natural killer* (NK), gerando citotoxicidade contra o parasito e liberação de IFN- $\gamma$  (Schleicher et al., 2007).

Análises histopatológicas do fígado de camundongos BALB/c desafiados com *L. donovani* mostraram a formação de uma estrutura capaz de conter a infecção, denominada de granuloma. Essa estrutura começa a ser formada através da ação de células mononucleares de defesa, que cercam gradualmente as células de Kupffer parasitadas, formando uma espécie de manta de contenção em torno delas. As primeiras células a aparecerem ao redor das células de Kupffer são granulócitos e monócitos, sendo possível identificar neutrófilos e eosinófilos nessa etapa inicial. A chegada dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> é iniciada após 14 dias da inoculação de *Leishmania*, porém somente depois da quarta semana é que a estrutura está completamente formada. Nesse momento, a resposta imunológica no fígado é capaz de induzir uma eficiente e progressiva redução na quantidade de amastigotas no interior das células de Kupffer, o que começa a ser visualizado com o surgimento

cada vez maior de granulomas estéreis. Até o final da doença, células T CD8<sup>+</sup> irão predominar, sendo possível identificar ainda, embora em pequena quantidade, a presença de linfócitos B (Mc Elrath et al., 1988; Murray, 2001).

A resposta granulomatosa pode ser, num primeiro estágio, apenas uma célula de Kupffer infectada sem associação com infiltrado celular e sem muita expressividade. Já em um segundo estágio um pouco mais evoluído, é possível perceber um granuloma imaturo em que a célula de Kupffer está envolvida por um pequeno número de células inflamatórias e linfócitos, mas sem organização ainda. Na terceira fase, o granuloma é chamado de maduro e encontra-se bem organizado e visivelmente organizado em camadas de células. Na quarta e última fase, o granuloma é classificado como estéril, uma estrutura livre de amastigotas, como resultado de um processo de imunidade contra o parasito (Stager et al., 2003). A resistência hepática é efetivada à medida que mais granulomas maduros vão sendo formados. Essas estruturas são eficientes na destruição dos invasores, fazendo com que o número deles dentro do granuloma esteja próximo a zero na oitava semana de infecção (Nieto et al., 2011).

A falha na quimiotaxia de células dendríticas da zona marginal do baço para a área de células T motivada pela privação de CCL19 e CCL21 diminui a migração dos linfócitos esplênicos para o fígado, retardando a montagem da resposta granulomatosa contra *Leishmania* (Ato et al., 2004). No fígado infectado, as quimiocinas CCL2 e CCL5 otimizam a conversão inicial de granulomas em desenvolvimento para estruturas histologicamente maduras, um processo que não envolve quimiocinas CXC reguladas por IFN- $\gamma$ , incluindo CXCL10 (Murray et al., 2016).

Após a infecção de *L. infantum* pela via intraperitoneal de camundongos BALB/c, as promastigotas caem na circulação sanguínea e chegam ao baço por meio da artéria esplênica, sendo rapidamente removidas da circulação por macrófagos da zona marginal. Estima-se que mais de 95% de *L. infantum* que chega ao baço levada pelo sangue é fagocitada por esses macrófagos, sendo que mais de 50% do inóculo inicial são mortos nas primeiras 24 horas (Gorak et al., 1998). As células dendríticas da zona marginal adquirem antígenos de *Leishmania* tanto pela fagocitose de macrófagos infectados, como também de antígenos remanescentes, mas somente em raros casos podem ser infectadas (Mebius & Kraal, 2005).



Ainda na fase aguda, é iniciada no baço a migração de células dendríticas parasitadas da zona marginal para dentro da zona de células T, onde há uma rápida e transitória explosão na secreção de IL-12. Essa elevada produção da citocina acontece nas primeiras 5 horas pós-infecção e diminui logo depois. Observa-se alta afinidade dos receptores de IL-2 nas células T CD4<sup>+</sup> nesse momento. IL-12 é a citocina responsável pela importante ativação de células NK, T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (Engwerda et al., 2004).

Respostas protetoras no baço são iniciadas por células dendríticas expostas aos produtos das *Leishmanias*, mas não efetivamente infectadas por elas. Chamamos esse grupo de células dendríticas de expectadoras (de Trez et al., 2004) e sua principal característica é a capacidade de combater a infecção, o que as coloca em uma posição contrária a outro grupo de células dendríticas chamadas de infectadas (Resende et al., 2013), onde os parasitos seqüestram as células dendríticas impedindo-as de iniciar a resposta protetora. Células dendríticas expectadoras uma vez ativadas passam a produzir as citocinas IL-12 ou IL-23, resultando na consequente diferenciação em Th1 ou Th17, respectivamente. Após a diferenciação, células Th1 produzem IFN- $\gamma$  e TNF, ao passo que as células Th17 produzem IL-17, o que maximiza a capacidade de macrófagos infectados produzirem NO e ROS contra os parasitos. Em paralelo, células T CD8 virgens são ativadas por células dendríticas expectadoras na presença de IL-12 e IFN do tipo I e diferenciam-se em células efetoras que contribuem ainda mais para a resposta protetora, produzindo IFN- $\gamma$  e TNF. As células T CD8 efetoras também podem degranular perforina e granzimas e matar células infectadas, embora permaneça pouco claro se os mediadores citotóxicos desempenham qualquer papel protetor durante a LV (Rodrigues et al., 2016).

No entanto, apesar da ativação, ocorre uma falha na resposta imunológica no baço, permitindo que a infecção atinja um estágio crônico. Têm sido consideradas duas hipóteses para explicar porque as células T e NK ativadas na região periarteriolar do baço (PALS) não conseguem ativar de forma eficiente os macrófagos da zona marginal: a primeira delas é que, como a PALS, onde estão células T e NK ativadas, é segregada anatomicamente da zona marginal, os macrófagos falhariam na produção de quimiocinas capazes de trazer essas células efetoras para sua vizinhança; e a segunda hipótese é que essas células infectadas seriam incapazes de ativar mecanismos microbicidas intrínsecos, como a formação

de derivados reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (NO) após estímulo por IFN- $\gamma$ , ou ainda, seriam capazes de inativar células T e outros macrófagos através de fatores solúveis supressores como TGF- $\beta$ , além de diminuir a expressão de CD80 e MHC II (Engwerda & Kaye, 2000).

A principal característica da fase crônica no baço é a mudança da sua arquitetura. Para que ela ocorra, o órgão sofre alterações na zona marginal, na função das células do estroma e na migração de células dendríticas (Engwerda et al., 2004). Mais notavelmente, a infecção induz uma perda rápida e seletiva de macrófagos da zona marginal (MZM) localizados no limite adjacente à polpa vermelha no baço, enquanto o dano para os macrófagos metalofílicos (MMM) e o seio marginal é menos pronunciada. Este processo de remodelamento da zona marginal (ZM) é mediado por altas concentrações de TNF- $\alpha$  e não depende de citotoxicidade de linfócitos T ou apoptose mediada por CD95. Como consequência há grave diminuição no tráfego de linfócitos para a polpa branca (Engwerda et al., 2002).

A distribuição de MZM é regulada por CCL21 e, em menor extensão, por CCL19. O estudo da infecção crônica por *L. donovani* mostrou que a perda ou expressão aberrante dessas quimiocinas em camundongos infectados sustentam a extensa remodelação do tecido linfóide. A diminuição na migração de MZM compromete o funcionamento do órgão, resultando em falha na captura de agentes patogênicos transmitidos pelo sangue, na regulação do tráfego de linfócitos na polpa branca e na geração de respostas de células B contra antígenos, o que inviabiliza a resposta contra o parasito no órgão (Ato et al., 2004).

Células dendríticas (CDs) de camundongos com LV por *L. donovani* vindas da ZM também falham em migrar para a região periarteriolar no baço (PALS). Apesar de um maior número dessas células ter sido identificado na fase crônica da infecção, defeitos no seu receptor CCR7 prejudicaram a quimiotaxia feita por CCL21 e CCL19 das células estromais gp38<sup>+</sup> do PALS, impedindo o encontro essencial entre CDs e as células T e, conseqüentemente, a construção da imunidade celular contra a *Leishmania*. O principal mecanismo subjacente à localização defeituosa de DCs foi TNF- $\alpha$  dependente e funcionou por meio da inibição mediada por IL10 na expressão de CCR7 (Ato et al., 2002). Foi descrito ainda que a migração de CD é feita ao longo do gradiente de concentração das quimiocinas CCL21 e CCL19 e a ausência delas é fator regulador da resposta efetora contra a *Leishmania* (Ato et al., 2004).

As células dendríticas foliculares (CDFs) desempenham um papel central na resposta do centro germinativo (CG) e no desenvolvimento e regulação de linfócitos B, processo que resulta em anticorpos de alta afinidade. No entanto, em camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* isso não acontece, permitindo a persistência dos parasitos no baço com esplenomegalia associada por longos períodos. Nesses animais, a partir de 4 semanas após a infecção, a destruição de CDFs e uma perda concomitante de CGs são notáveis. A partir de 8 semanas de infecção, a perda é muito maior e as CDFs são quase indetectáveis. Nesse momento, observa-se a infiltração de macrófagos fortemente parasitados para o CG, um dos efeitos patológicos característicos relacionados à LV crônica em camundongos BALB/c (Smelt et al., 1997).

Células estromais nos folículos e na zona de células T esplênicas dependem das citocinas TNF e linfotoxinas (LT)  $\alpha/\beta$  para expressarem quimiocinas cuja função é atrair linfócitos B e T, respectivamente, para essas regiões. TNF e LT  $\alpha/\beta$  são, portanto, determinantes para o sucesso no processo de compartimentalização normal desses linfócitos no baço e suas deficiências promovem perda de folículos esplênicos e desorganização da polpa branca (Ngo et al., 1999).

Em camundongos infectados com *L. donovani*, à medida que a infecção progride e a estimulação das células T CD8 pelos antígenos continua, ocorre a perdadas funções efectoras dessas células, promovendo um estágio de exaustão. Na terceira semana após a infecção, células T CD8 esplênicas começam a apresentar sinais do exaurimento, e um comprometimento funcional grave é evidente após a quarta semana, com produção anulada de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2 e granzima B. Tipicamente, há também um aumento na quantidade e diversidade de receptores inibitórios expressos em células T CD8 incluindo PD-1 e CTLA4, além da expressão de PD-L1 em células dendríticas infectadas (Joshi et al., 2009; Rodrigues et al., 2016).

Em contraste com a riqueza de evidências que demonstram a exaustão de células T CD8, o fenômeno da exaustão em células T CD4 tem sido muito menos estudado e é bem incompreendido ainda. Em cães, no entanto, já se sabe que a interação PD-1/PD-L1 promoveu uma exaustão de células T CD4 que, apesar de menor se comparada as células T CD8, foi caracterizada por redução na proliferação e na produção de IFN- $\gamma$  mediada por APCs aderentes (Esch et al., 2013). Recentemente, foi demonstrado também que células B regulatórias expressando

altos níveis de IgD aumentam três vezes em quantidade durante progressiva LV canina, o que as tornam capazes de exaurirem a função efetora de linfócitos T CD4, induzindo outras células B e T a produzirem IL-10 e suprimindo IFN- $\gamma$  por meio da ligação PD-1/PD-L1 (Schaut et al., 2016).

#### **1.4. Quimiocinas e seus receptores**

As quimiocinas são pequenas proteínas quimiotáticas (8 a 17 kDa) que recrutam distintos subtipos de leucócitos em condições fisiológicas e patológicas (Rossi & Zlotnik, 2000; Rot & Von Andrian, 2004). A produção dessas proteínas é estimulada por uma variedade de agentes como lipopolissacarídeos (LPS), vírus, bactérias, patógenos e algumas citocinas como IL-4, IL-13, IL-1 e IFN- $\gamma$ . As quimiocinas são secretadas por células epiteliais, endoteliais e leucócitos, dentre outros tipos celulares (Rot & Von Andrian, 2004; Moser et al., 2004). As quimiocinas desempenham papéis importantes na resposta inflamatória por desencadear a ativação de integrinas durante a adesão das células ao endotélio, induzir o recrutamento de linfócitos antígeno-específico para os tecidos periféricos e liberar enzimas de estoques celulares (Springer, 1994).

Essas proteínas são classificadas em famílias com base no número e na localização dos resíduos de cisteína amino terminais. As duas maiores famílias de quimiocinas são as CXC e as CC. As quimiocinas da família CC possuem duas cisteínas em posições adjacentes, são proinflamatórias, induzindo tipicamente inflamações crônicas e alérgicas, enquanto as da família CXC possuem em sua estrutura dois resíduos de cisteína separados por um aminoácido, apresentam características proinflamatórias em sua maioria, além de quimiotaxia dependente dos receptores a que se ligam (Ritter & Korner, 2002).

As quimiocinas CXC são divididas ainda em dois subgrupos, dependendo da presença ou ausência do segmento formado por ácido glutâmico, leucina e arginina (ELR), que fica próximo ao domínio amino terminal. O subgrupo CXC ELR+ é aquele em que o segmento está presente, sendo representado, por exemplo, pelas quimiocinas CXCL1 e CXCL8, enquanto o subgrupo CXC ELR- não possui o segmento e é neste subgrupo que estão agrupadas as quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 (Mantovani et al., 2006). As outras duas famílias de quimiocinas são C,

que possui uma cisteína apenas, e CX3C, que possui duas cisteínas separadas por três aminoácidos. A família C é representada pela linfotactina, quimiotática para linfócitos T e células dendríticas, e a família CX3C é representada pela fractalcina, quimiotática para linfócitos T (Baggiolini, 2001).

As ações das quimiocinas são específicas para grupos de células particulares. Membros da classe CXC agem principalmente em células polimorfonucleares (PMN), enquanto membros da classe CC agem em um grupo maior de células, incluindo monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos, mas não em PMN (Ritter & Korner, 2002). As ligações sulfeto, que participam da estabilização da estrutura da molécula em todas as famílias de quimiocinas, são fornecidas por resíduos de cisteínas conservados (Saunders & Tarby, 1999).

Os receptores de quimiocinas pertencem à superfamília dos receptores de sinalização intracelular acoplados a proteína G, formados por cerca de 350 aminoácidos, compostos por um curto domínio NH<sub>2</sub>-terminal, sete domínios  $\alpha$ -helicoidais transmembranares, sendo três alças na porção intracelular, mais três na porção extracelular, somados a um domínio carboxi (COOH) terminal intracelular (Murdoch & Finn, 2000). A interação entre a quimiocina e seu receptor é caracterizada pela possibilidade de cada quimiocina poder se ligar a vários receptores e cada receptor se ligar a várias quimiocinas (Teixeira et al., 2006).

São descritos 21 tipos de receptores de quimiocinas. As quatro famílias de receptores de quimiocinas são: CXCR, CCR, XCR e CX3CR. Os receptores CXCR1 e CXCR2, agrupados na família CXCR e expressos em células PMN, estão envolvidos na inflamação aguda, enquanto CXCR3, expresso em linfócitos T ativados, monócitos e células NK, está envolvido na inflamação crônica. Proteínas induzidas por IFN- $\gamma$  como CXCL10, conhecida anteriormente como IP-10 (Proteína 10 induzida por IFN- $\gamma$ ), CXCL9 e CXCL11, ligam-se a CXCR3, desencadeando tipicamente este tipo de inflamação (Thelen, 2001).

Os estudos utilizando animais deficientes de quimiocinas e/ou de seus receptores vêm se tornando uma importante ferramenta para entender o papel de várias quimiocinas na leishmaniose. Dentre eles, os estudos de Sato e colaboradores (2000) mostraram que camundongos deficientes de CCR2, CCR5 ou CCL3, infectados com *L. donovani*, apresentaram uma baixa produção de IFN- $\gamma$  durante a fase inicial da infecção, entretanto, durante a fase crônica da doença, as

concentrações de IFN- $\gamma$  aumentaram nos camundongos deficientes de CCR5 e CCL3, e o aumento desta citocina se correlacionou com a diminuição da carga parasitária. Os autores sugerem que CCR2, CCR5 e CCL3 têm um papel importante na geração de IFN- $\gamma$  por células T. Os dados também indicam que CCL3 e os receptores CCR2 e CCR5 participam da defesa do hospedeiro contra *L. donovani*. Adicionalmente, outro estudo mostrou que a ausência do receptor CCR2 em camundongos infectados com *L. donovani* estava associada com uma migração diminuída de células de Langerhans para o linfonodo, resultando em uma deficiência de células dendríticas CD8 $\alpha$ + e deficiência na sensibilização de linfócitos Th1 (Sato et al., 2000).

Receptores da família CCR são divididos em 9 subtipos (CCR1-9), estão envolvidos essencialmente na inflamação (CCR1,2,3,5,8) e na regulação do trânsito celular (CCR4,6,7,9), enquanto os da família CX3CR atuam na ancoragem dos leucócitos ao endotélio. Os pertencentes à família XCR participam no recrutamento de células T (Murdoch & Finn, 2000).

### 1.5. A quimiocina CXCL10

CXCL10 é uma quimiocina do grupo CXC secretada principalmente por monócitos, fibroblastos e células endoteliais em resposta a diferentes estímulos, como infecção viral, LPS e IL-1 (Dufour et al., 2002; Lee et al., 2009). Ao contrário de outras quimiocinas do grupo CXC que induzem a migração de neutrófilos, CXCL10 estimula a quimiotaxia direcional de células T e monócitos para sítios de inflamação, além de potencializar a adesão de células T ao endotélio (Taub et al., 1993). É um potente inibidor da angiogênese *in vivo* (Angiolillo et al., 1995) e da formação de colônias de progenitores hematopoiéticos (Sarris et al., 1993), mobiliza cálcio intracelular em células NK, além de promover a quimiotaxia dessas células (Maghazachi et al., 1997).

Acredita-se que sua produção seja induzida principalmente por IFN- $\gamma$ , visto que camundongos “knockout” para o gene dessa citocina não expressam RNAm de CXCL10 (Amichay et al., 1996). A ligação ao receptor CXCR3 é de alta afinidade (Chen et al., 2004), e vários tipos de células tais como células T CD4+ e T CD8+ ativadas e de memória, células NK, algumas populações de células dendríticas e

macrófagos ativados expressam esse receptor (Vester et al., 1999; Ritter & Moll, 2000; Mohan et al., 2005). Na ausência de CXCR3, camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* são capazes de montar uma resposta Th1 eficiente, mas falham em controlar a infecção, apresentando uma diminuição na produção de IFN- $\gamma$  (Rosas et al., 2005).

Alguns trabalhos mostraram que a injeção de CXCL10 em camundongos BALB/c infectados com *L. major* tem promovido um forte recrutamento e ativação de células NK (Vester et al., 1999; Muller et al., 2001). Outro estudo demonstrou que o tamanho da lesão e a carga parasitária podem diminuir em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados com essa quimiocina, e isso é mediado por IFN- $\gamma$ , IL-12 e NO (Vasquez & Soong, 2006). Outros estudos têm mostrado que CXCL10 também atua na resposta protetora contra *L. donovani*, induzindo uma resposta celular tipo Th1, por meio da regulação da via de mediadores inflamatórios, como NO e citocinas pró-inflamatórias (Gupta et al., 2009).

Não é somente nas leishmanioses que as ações das quimiocinas vêm sendo estudadas, há relatos na literatura de trabalhos avaliando também o papel das quimiocinas em infecções causadas por outros protozoários. Na malária cerebral, CXCL10 liga-se ao seu receptor na superfície de células T CD8<sup>+</sup> recrutando-as, e esse fato é imprescindível para o desenvolvimento da doença (Campanella et al., 2008).

Estudos realizados com pacientes co-infectados com HIV e *Cryptosporidium sp.* mostraram que, apesar de células epiteliais produzirem a quimiocina, sua presença no intestino não ajuda no combate ao parasito. Isso ocorre porque o vírus diminui a população de células T CD4<sup>+</sup>, impedindo que CXCL10 atraia os linfócitos para o sítio da infecção (Wang et al., 2007). Na toxoplasmose ocular crônica, CXCL10 age de maneira determinante, induzindo uma resposta mediada por células T que controla de forma eficiente a ação do protozoário. Estudos mostram que pacientes portadores de doenças autoimunes, como esclerose múltipla, que fizeram uso de bloqueadores da quimiocina tiveram o comprometimento dessa resposta celular. Nesses pacientes, houve desenvolvimento de toxoplasmose ocular crônica após o bloqueio de CXCL10 (Zecca et al., 2009).

Até o momento, não há nenhum trabalho mostrando o efeito das quimiocinas na LV causada por *L. infantum chagasi*. A maioria dos estudos envolvendo quimiocinas e leishmaniose, desenvolvido no modelo murino, tem utilizado *L. major*

(que causa leishmaniose cutânea no Velho Mundo), *L. donovani* ou *L. infantum* (causadoras de leishmaniose visceral no Velho Mundo), *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (que causam leishmaniose cutânea no Novo Mundo) (Teixeira et al., 2006, Oghumu et al., 2010).

Coletivamente, os trabalhos publicados até agora sugerem que as quimiocinas desempenham importantes papéis na infecção por *Leishmania*, incluindo funções de defesa do hospedeiro, tais como: recrutamento de leucócitos e ativação celular, participação na imunidade mediada por células e atividade leishmanicida, indicando que essas proteínas podem ser relevantes para o controle e/ou progressão da doença (Teixeira et al., 2006; Oghumu et al., 2010).

### **1.6. Imunologia das células T regulatórias em camundongos**

Ainda no início da década dos anos 1990, uma população de células T CD4<sup>+</sup> expressando em sua superfície grandes quantidades da molécula CD25, receptora da citocina IL-2, capazes de controlar autoimunidade, foram encontradas e começaram a ser chamadas de células T regulatórias (Sakaguchi et al., 1995). Com o passar dos anos e após muito trabalho, o estudo dessas células permitiu a identificação do gene FoxP3, um dos genes chave da regulação celular no organismo, pois codifica a informação para o fator de transcrição de mesmo nome, responsável por garantir a diferenciação e função daquelas células T regulatórias (T regs) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (Hori et al., 2003).

Células T regs Foxp3<sup>+</sup> podem ser ou derivadas do timo (intratímicas) ou geradas periféricamente fora dele (extratímicas). No primeiro caso, células T regs Foxp3<sup>+</sup> são denominadas T regs naturais e, no outro caso, quando geradas fora do timo, são chamadas de T regs adaptativas ou induzidas. Células T regs naturais diferenciam-se no timo e, em seguida, migram para a periferia, por outro lado, células T regs adaptativas diferenciam-se em tecidos e órgãos linfóides como o baço e o linfonodo, por exemplo. Dessa forma, a população de células T regs Foxp3<sup>+</sup> encontradas na periferia são constituídas por ambas as populações de células T naturais e induzidas (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009).

Em adição às células Treg Foxp3<sup>+</sup>, há outro tipo de células T CD4<sup>+</sup> regulatórias chamadas de células Treg Foxp3<sup>-</sup> ou, simplesmente, células



regulatórias do tipo 1 (Tr1). Elas são induzidas na periferia e em seu nome tem sido atribuído a um papel importantíssimo na promoção e manutenção da tolerância. As moléculas marcadoras de superfície CD49b e LAG-3 (gene de ativação de linfócitos 3) foram identificadas como sendo coexpressas de forma estável e seletivas em células Tr1 de camundongos e humanos (Gangliani et al., 2013). Recentemente, foram também usadas para a identificação dessa população regulatória Tr1 em camundongos BALB / c (Yao et al., 2015).

Existe ainda outra linhagem de células T regs não totalmente compreendida, denominada Th3, cuja identificação original foi feita em camundongos após indução de tolerância oral à proteína básica de mielina (MBP). Desse modo, a maioria das células T CD4+ específicas para PBM liberaram TGF- $\beta$  e suprimiram a indução de uma encefalite autoimune experimental (EAE) específica de MBP para pesquisa de esclerose múltipla (Chen et al., 1994).

Após estimulação antigênica promovida por células apresentadoras de antígenos (APC), células T CD4+ virgens (Th0) podem se expandir e se diferenciar em variadas subpopulações de linfócitos (Th1, Th2, Th9, Th17, Thf, Tr1 e Treg). Dentre essas linhagens, as células efetoras do tipo Th1 são caracterizadas pela presença dos fatores de transcrição T-bet, STAT1 e STAT4, sendo induzidas por um padrão de citocinas inflamatórias representadas por IL-12, IL-27 e IFN- $\gamma$  e reconhecidamente reguladas por outro grupo de citocinas, dentre as quais podemos citar: IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4. Células Th1 podem mediar ativação de macrófagos e hipersensibilidade do tipo tardia (DHT), ou seja, aquela mediada por células capazes de matar patógenos intracelulares como a *Leishmania*. A linhagem regulatória de linfócitos T, em alguns casos, pode exibir Foxp3 como seu fator de transcrição e sempre tem a capacidade de poder regular a resposta Th1. Essas células são estimuladas por citocinas como IL-2, TGF- $\beta$  e vit A e reguladas por outras citocinas, entre as quais se destacam IL-6, IL-17 e IL-23 (Zhu, Yamane, Paul, 2010; Nascimento et al., 2015; Belizário et al., 2016).

Várias moléculas de superfície celular participam no mecanismo da regulação imunológica. CD25, uma subunidade do receptor de IL-2 (IL-2R), é uma dessas moléculas. A atividade de células T CD4+ efetoras é suprimida através da apoptose induzida por privação de citocina IL-2, pois, embora haja altos níveis de IL-2R

consumindo IL-2 na superfície das células T regs, não há produção dessa citocina por essas células, o que impede a sobrevivência das células T CD4+ efetoras (Pandiyan et al., 2007).

CTLA4 também é uma das moléculas de superfície do linfócito que tem um papel regulador no sistema imunológico do camundongo. A molécula age através de um mecanismo que inibe a co-estimulação de CD28 pelas células apresentadoras de antígenos, uma vez que promove a depleção das moléculas ligantes CD80 e CD86 localizadas na superfície dessas células, fazendo com que o segundo sinal necessário para a ativação e proliferação dos linfócitos T efetores não seja transmitido, o que impede as células T CD4+ de realizarem seu papel efetor contra o parasito (Qureshi et al., 2011).

CD73, uma 5-ectonucleotidase que pode converter 5'-AMP em adenosina, um mediador antiinflamatório, é também, por sua vez, uma molécula de superfície com função reguladora. CD73 foi encontrada expressa em células T regs CD25+Foxp3+ de camundongos BALB/c ea infiltração dessas células em sítios inflamatórios, como o baço, suprime a proliferação de células efetoras Th1 e inibe sua produção de citocinas, atenuando, portanto, as reações imunológicas excessivas (Kobie et al., 2006). Em adição à molécula CD73, CD39 pode também regular a resposta efetora, pois, ao hidrolisar ATP/UTP e ADP/UDP em nucleosídeos como o AMP, fornece à molécula CD73 um substrato para a produção de adenosina. Assim, a coordenada expressão de CD39/CD73 em células T regs gera imunossupressão (Deaglio et al., 2007).

GITR é um receptor membro da superfamília TNFR induzido por glicocorticóides, é constitutivamente expresso em altos níveis em células T regs. GITR não é uma molécula efetora mediando supressão, ao contrário de CD25 e CTLA4, por exemplo, pode desempenhar um papel imunoregulador pela modulação da atividade supressora das células T reguladoras CD25 + CD4 +, aumentando assim as respostas imunes (Shimizu et al., 2002).

No estudo da infecção por *Leishmania* em camundongos BALB/c, células T regs apresentam diferentes papéis de acordo com as variadas espécies de *Leishmania* envolvidas, contribuindo ou para a patologia e persistência do parasito

ou para a resolução da doença. No caso da espécie *L. donovani*, evidências indicam que a indução de células T regs resulta em agravamento da infecção (Martin et al., 2010). Em contraste, no caso da *L. (Viannia) panamensis*, foi encontrado que Tregs tem o efeito oposto, pois a depleção experimental adicional de Tregs durante a infecção leva à exacerbação da doença, enquanto o aumento temporal das células T regs (por meio da transferência celular ou da terapia com o anticorpo rIL-2 / anti-IL-2) conduz à melhora da doença (Ehrlich et al., 2014).

Usando o mesmo modelo de camundongo Balb/c, no entanto, com protozoários parasitos pertencentes ao gênero *Trypanosoma cruzi*, é possível identificar que as células T CD4 (+) CD25 (+) Foxp3 (+) reguladoras desempenham um papel positivo no desenvolvimento da infecção aguda por este parasito. A infecção então provoca atividade imunossupressora controlando a inflamação cardíaca precoce durante a doença de Chagas aguda, prolongando a sobrevivência e, ao mesmo tempo, promovendo o crescimento do parasito (Flores-García et al., 2013).

O papel das células Treg também foi avaliado em outras doenças parasitárias causadas por protozoários em camundongos Balb/c, tais como toxoplasmose e malária, causadas, respectivamente, pelos patógenos *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium yoelii*. Oldenhove e colaboradores (2009) estudando o impacto da manipulação de células Foxp3+ sobre as defesas do hospedeiro com toxoplasmose observaram um colapso natural das células Treg Foxp3+ após a infecção resultando em infecção fatal que foi invertida por células Treg usando IL-2 (Oldenhove et al., 2009). Na malária, entretanto, as Tregs controlam a resposta imunológica efetora permitindo a expansão descontrolada do parasito que leva à morte. A remoção de Tregs evita a morte, aumentando as respostas imunológicas efetoras (Hisaeda et al., 2004).

## **1.7. Justificativa**

Até o momento não há vacina eficaz contra as leishmanioses, mas há fármacos disponíveis para tratar essas doenças, e dentre os mais comumente usados estão: os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina e

recentemente, miltefosina. Entretanto, todos esses medicamentos estão associados ao aparecimento de cepas resistentes, significativa toxicidade, e, além disso, apresentam um curso de tratamento muito longo. Novos tratamentos contra LV ou estratégias para melhorar a segurança e eficácia das drogas correntes continuam extremamente necessárias.

No fígado infectado por *L. donovani*, várias quimiocinas são secretadas, tais como, CCL3, CCL2 e CXCL10, que vão desempenhar um importante papel na quimioatração e consequente ativação de células de defesa. Estudos recentes mostraram que em camundongos BALB/c, cepa de *L. braziliensis* mais patogênica causa lesões, que apesar de pequenas e não ulceradas, demoram mais tempo para curar, sendo que a cura coincide com o aumento da produção de IFN- $\gamma$  e a expressão de CXCL10 nas lesões, sugerindo que o controle mais precoce da infecção possa ser dependente, em parte, dessas proteínas.

Há alguns estudos mostrando o uso de citocinas pró-inflamatórias para tratar ou reforçar de maneira eficaz a resposta imunológica contra várias espécies de *Leishmania*. As citocinas IL-12 ou IL-1 $\alpha$  recombinante, quando administradas em camundongos BALB/c antes da infecção com *L. major*, torna esses animais, que são naturalmente susceptíveis à infecção, resistentes. Há estudos mostrando que CXCL10 é capaz de induzir proteção em camundongos infectados com *L. amazonensis* com produção de citocinas multifuncionais, tais como, IFN- $\gamma$ , IL-3, IL-6, IL-17 e CXCL2.

A administração exógena de quimiocinas tem mostrado resultados promissores no tratamento da LV. Há evidências de que o tratamento com quimiocinas da família CC leva a uma forte resposta imunológica do tipo Th1 na LV experimental. Entretanto, o papel das quimiocinas da família CXC, como CXCL10, precisa ser melhor estudado na infecção por *L. infantum*, além dos mecanismos protetores induzidos por essa quimiocina.

CXCL10 é uma potente candidata para imunoterapia na LV, uma vez que é uma quimiocina conhecida por favorecer o recrutamento e a ativação de células polarizadas para Th1, além de recrutar e ativar células NK, células que também são produtoras de IFN- $\gamma$ . Este estudo, portanto, poderá agregar novos conhecimentos sobre os mecanismos associados com a patogênese da infecção por *L. infantum*, o que potencialmente poderá fornecer subsídios para a elaboração de novas abordagens de intervenção terapêutica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar se o tratamento com CXCL10 confere proteção contra a infecção por *Leishmania infantum in vitro* e em camundongos BALB/c, dependente da redução de células T regulatórias, e se previne também a quebra da microarquitetura do baço.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a carga parasitária em macrófagos RAW 264 infectados por *L. infantum*, tratados ou não com CXCL10;
- Quantificar os níveis de NO, IL-4 e IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos RAW 264 infectados por *L. infantum*, tratados ou não com CXCL10;
- Determinar o número de parasitos no baço e no fígado de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*, tratados ou não com CXCL10;
- Quantificar os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*, tratados ou não com CXCL10 e re-estimulados *in vitro*;
- Avaliar a frequência de populações de células T regulatórias produtoras de IL-10 presentes no baço de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*, tratados ou não com CXCL10;
- Avaliar os aspectos histopatológicos do baço de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*, tratados ou não com CXCL10.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Um total de 180 camundongos BALB/c, machos, 6-8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML/UFC) foram utilizados nos experimentos. Os animais foram mantidos a 22-24°C com ração comercial apropriada e água *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará, com o número de registro 52/2014.

#### **3.2. Parasitos**

Promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/BA-262) foram cultivadas a 25°C em meio N.N.N., com fase líquida constituída por meio Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A virulência da cepa foi mantida através de passagem regular em hamster dourado. Após serem recuperados do baço do animal através de maceração, os parasitos foram cultivados a 25°C em meio N.N.N, contendo meio Schneider (Sigma-Aldrich) suplementado com 20% de SBF (Sigma-Aldrich), urina humana estéril a 2% e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) (todos Sigma-Aldrich). Para a infecção, os parasitos foram utilizados até a 5ª passagem, *in vitro*.

#### **3.3. Ensaios *in vitro* com macrófagos**

Macrófagos RAW 264.7 foram centrifugados a 400g, durante 15 min, a 5°C e a suspensão celular foi ajustada em meio RPMI 1640 suplementado com 10mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina (todos Sigma-Aldrich). Em seguida, as células foram distribuídas em placas de 24 poços, cada poço contendo uma lamínula de vidro redonda de 23 mm, na concentração de  $1 \times 10^6$  células/lamínula. Os macrófagos foram incubados durante 24 h em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e 95% de umidade. As células não aderidas foram removidas por lavagem com RPMI morno (37°C, 3 vezes) e cultivadas com RPMI suplementado com ou sem promastigotas de *L. infantum*, numa proporção de 10 parasitos para 1 célula (10:1) durante 12 horas. Os parasitas extracelulares foram

removidos por lavagem (3 vezes) com RPMI morno (37°C) (Karmakar et al., 2011). Após este período, as células foram tratadas com 16 mg/mL de antimônio pentavalente (Glucantime), CXCL10 (25, 50 e 100 ng/mL) e LPS (20 ng/mL, controle positivo) e depois foram cultivadas durante 24 e 48 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Os sobrenadantes de cultura foram recolhidos com 24 e 48 h para a dosagem de citocinas e NO.

### **3.4. Determinação da taxa de infecção dos macrófagos**

Para quantificar o nível de infecção dos macrófagos, as lamínulas contendo as células foram lavadas com salina, e em seguida, fixadas e coradas com corante Giemsa (Sigma-Aldrich). As lamínulas coradas foram montadas em lâminas e examinadas por microscopia óptica a uma ampliação de 100x em óleo de imersão. Três áreas (cada uma com 50 células) foram examinadas e o número de macrófagos infectados/50 células foi determinado.

### **3.5. Dosagem de óxido nítrico (NO)**

Sobrenadantes da cultura de macrófagos foram testados para detectar a liberação de NO sob a forma de nitrito pela reação de Griess (Green et al., 1990). Os sobrenadantes foram incubados com o reagente de Griess (1:1 v/v), recém preparado, por 10 min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração de NO<sub>2</sub> determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio e expressa como µmol/mL. Para evitar interferência por NO<sub>2</sub>, possivelmente presente no meio, foi adicionado um branco para cada experimento, utilizando RPMI suplementado, meio utilizado na cultura das células.

### **3.6. Infecção de camundongos BALB/c e tratamento com CXCL10**

Promastigotas metacíclicas de *L. infantum*, na fase estacionária, foram inoculadas por via intraperitoneal em camundongos BALB/c (n=36) na concentração de 2 x 10<sup>7</sup> parasitos em 20µL de salina. Os animais foram divididos em dois grupos, cada um com 18 animais. Um grupo recebeu CXCL10 (5 µg/kg) (Thermo Scientific Inc, Waltham, MA,USA) e o outro recebeu salina (grupo Controle), por via

intraperitoneal, após 1, 3 e 7 dias da infecção segundo Gupta e colaboradores (2009). Os animais foram eutanasiados após 1, 7, 23 e 45 dias de tratamento, através da inalação de Halotano (Sigma-Aldrich). Em cada tempo foram eutanasiados 6 animais por grupo, em um total de 3 ensaios.

### **3.7. Determinação do número de parasitos no baço e fígado**

O número de parasitos no fígado e baço foi quantificado através da técnica de diluição limitante, como previamente descrito (Titus et al., 1985). Brevemente, 14 animais foram eutanasiados através de inalação com halotano (Sigma-Aldrich) e mergulhados em álcool-iodado a 3% por até 3 minutos a fim de permitir a descontaminação dos mesmos. Em seguida, o baço e o fígado foram retirados assepticamente, pesados, e um fragmento de cada órgão (baço: entre 0,0671 a 0,0700 g; fígado: entre 0,26 a 0,30 g) foi macerado em 1mL de meio Schneider e deixado em repouso por 5 min. A partir dessa suspensão de células, foram feitas 8 diluições (10, 50, 100, 500,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ) em Schneider suplementado com 20% de SBF (Sigma-Aldrich), urina humana estéril a 2% e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Cem microlitros destas diluições foram distribuídos em placas de 96 poços, fundo chato, 6 poços/diluição. As placas foram seladas e incubadas a 25°C, por 3 semanas. Os poços foram observados em microscópio óptico invertido (Nikon) de 3 em 3 dias para o registro das diluições que continham promastigotas. O número final de parasitos foi determinado utilizando-se o programa ELIDA (Taswell, 1984).

### **3.8. Cultura de esplenócitos**

Células do baço de animais tratados ou não com CXCL10 (3 animais por grupo) foram separadas por centrifugação com Ficoll, 800g por 30 min a 25°C, após 1, 7 e 23 dias de infecção. As células foram lavadas com RPMI, 1.000g por 15 min a 5°C, e depois cultivadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^6$  células/mL) em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 50 µM de 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina) para infecção ou não (controle) com promastigotas de *L. infantum*, na concentração de  $1 \times 10^7$  /mL, em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes



foram coletados com 48h e conservados a -20°C para a dosagem posterior de citocinas.

### **3.9. Dosagem de citocinas**

Determinaram-se os níveis de citocinas obtidas tanto da cultura de macrófagos (apenas IL-4 e IL-10) quanto da cultura de esplenócitos (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ ) utilizando a técnica ELISA como recomendado por fabricante do kit (BD Biosciences). Brevemente, placas de 96 poços, fundo chato (Nunc), foram sensibilizadas por 12 a 18 h (dependendo da citocina testada) com o anticorpo de captura anti-citocina purificado na concentração determinada, a 4°C. A placa foi lavada, utilizando-se solução de lavagem (PBS com Tween 20 a 0,05%), em seguida foi realizado bloqueio com PBS e soro bovino fetal (SBF 10%) e incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS + Tween 20 foram adicionados o padrão e as amostras em duplicata e, em seguida, a placa foi incubada novamente por 2 h ou por uma noite à temperatura ambiente (dependendo da citocina testada). Após lavagem com PBS + Tween 20, a placa foi incubada por mais 1h com o anticorpo de detecção conjugado à enzima peroxidase. Após esse procedimento, a placa foi lavada e o substrato foi adicionado. A placa foi incubada por 30 min, temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi finalizada com ácido fosfórico (1:20) e a leitura realizada em leitor de ELISA (Molecular Devices Corp; Sunnyvale, CA, USA), usando filtro de 450nm. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Softmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### **3.10. Avaliação de células T regulatórias (Treg) em camundongos Balb/c**

Células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> de camundongos Balb/c foram identificadas por anti-CD4 PerCP rato anti-camundongo (Ref: 553052), anti-CD25 FITC rato anti-camundongo (Ref: 553071), anti-IL-10 APC rato anti-camundongo (REF: 554468) (todos BD Biosciences) e anti-Foxp3 PE rato anti-camundongo (Ref: 12-5773) (eBioscience). Suspensões celulares foram obtidas do baço de cada animal após 7, 23 e 45 dias de tratamento. Células ( $1 \times 10^7$  cels/mL) foram marcadas com anti-CD4 (0,2 $\mu$ g/teste; clone RM4-5), anti-CD25 (0,5 $\mu$ g/teste; clone

7DA) e anti-Foxp3 (0,2 µg/teste;clone FJK-16s) em conformidade com o protocolo do fabricante. As células foram então mensuradas e analisadas por citometria de fluxo.

### **3.11. Análise de citometria de fluxo**

Para análise de citocinas intracelulares, realizou-se citometria de fluxo para a determinação de IL-10 produzida por células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> em cada um dos animais nos diferentes grupos. Para isso, os esplenócitos extraídos de cada camundongo foram ajustados para a concentração final de 1 x 10<sup>6</sup> cels/mL, e foram então sujeitos a contato com a solução GolgiStop (Ref: 554724; BD Bioscience) por 6 h a 4°C e protegidos da luz. Após esse passo, a marcação foi feita primeiro com os anticorpos de superfície anti-CD4, anti-CD25 e seus isotipos, em seguida as membranas foram permeabilizadas através da solução FIX/PERM do kit Foxp3 (Ref: 005523-00; eBioscience), permitindo a ligação dos anticorpos intracelulares (Foxp3 e IL-10) e seus isotipos. PFA 1% preservou as células, além de armazenamento a 4°C no escuro até o momento da aquisição em até 12 horas. Os esplenócitos foram analisados em citômetro de fluxo (FACS Calibur) utilizando o programa Cell Quest em pelo menos 30.000 eventos.

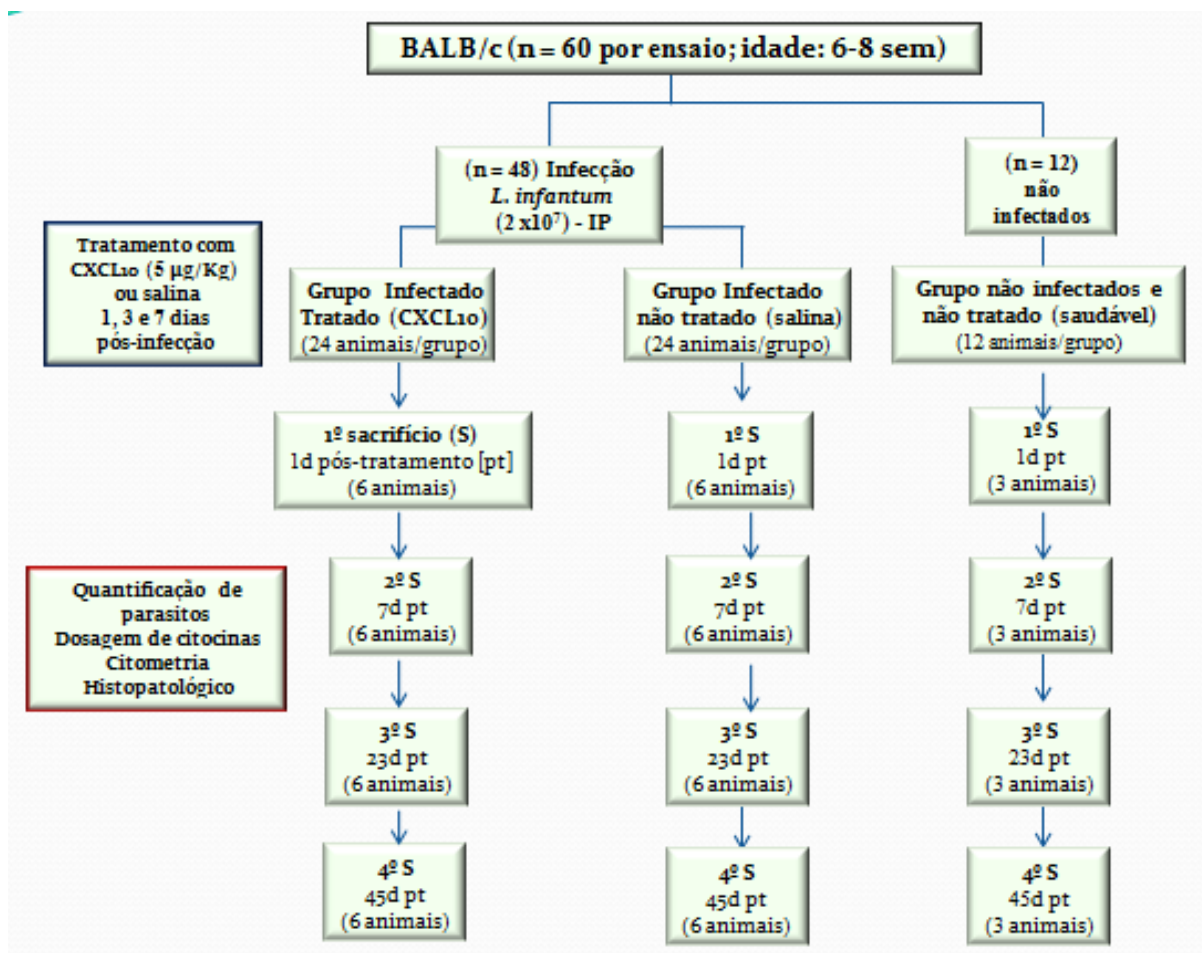
### **3.12. Análise Histopatológica do baço**

Os animais foram eutanaziados por inalação de halotano (Sigma-Aldrich) em câmara hermética após 7, 23 e 45 dias de tratamento, 6 animais em cada tempo e por cada grupo. Imediatamente após a eutanásia, os camundongos foram submetidos à laparotomia para coleta do baço. Cada baço foi pesado separadamente para calcular o peso relativo (peso do baço / peso corporal). Os baços foram fixados em formaldeído tamponado a 10%, cortados transversalmente, colocados em cassetes histológicos, desidratados, diafanizados, embebidos em parafina, cortados a 5 µm e depois corados com hematoxilina e eosina (H & E) e reticulina (impregnação pela AgNO<sub>3</sub>). Para a análise da polpa branca fotomicrografias de 10 campos do baço foram feitas em uma ampliação de 40x. Folicúlos linfóides foram contados e a área total da polpa branca em cada lâmina foi medida digitalmente por meio do programa de licença aberta ImageJ® v.1.44 (NIH, 2012).

### 3.13. Análise estatística

Para verificar a significância estatística entre o grupo tratado e o grupo controle foi aplicado o teste t de Student. Para comparação entre os múltiplos grupos foi usado o teste one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni. Os testes foram realizados no programa GraphPad Prism versão 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os resultados são apresentados como média aritmética  $\pm$  erro padrão da média. Em todos os testes utilizados, a significância mínima foi aceita quando  $P < 0,05$ .

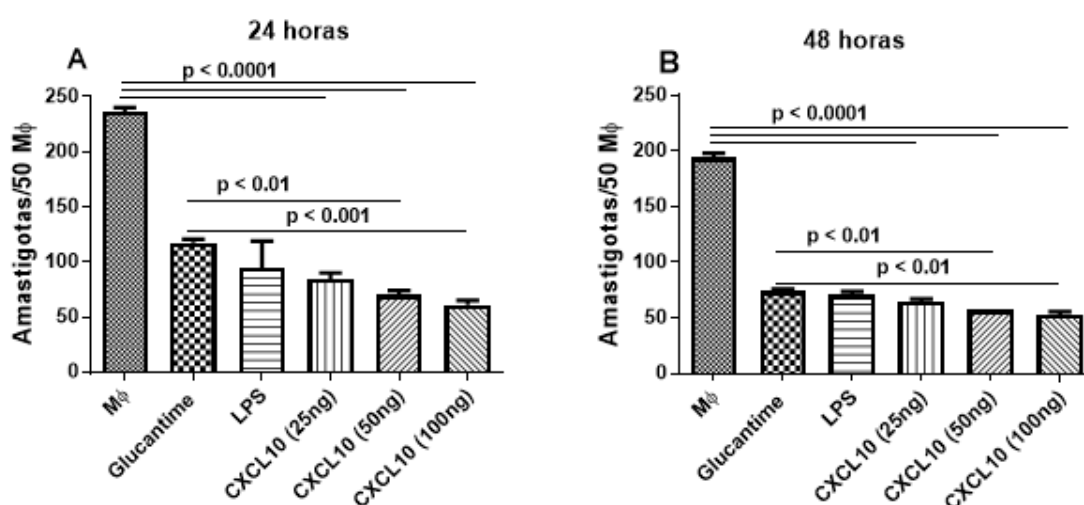
### 3.14. Desenho Experimental



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Carga Parasitária em macrófagos

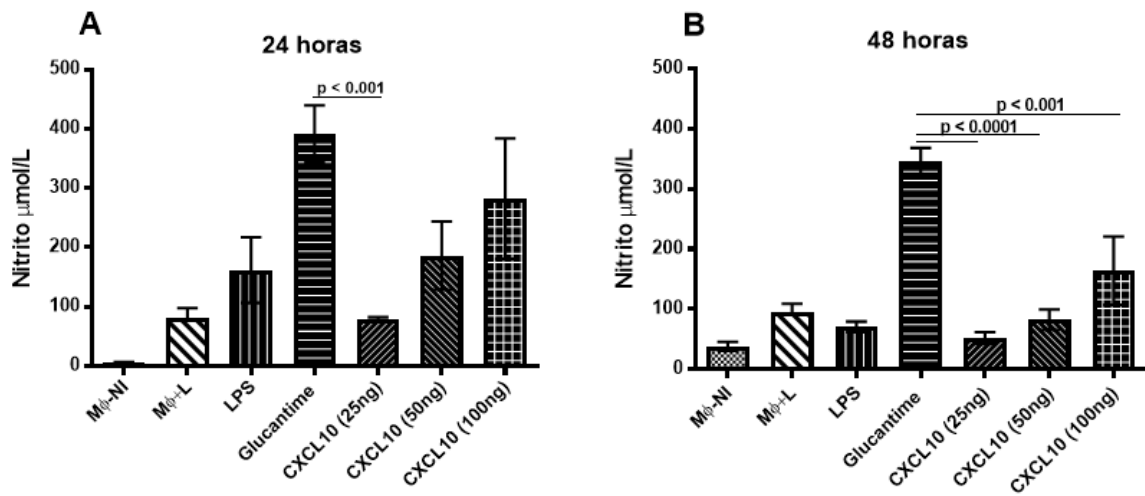
Após 24 horas, o tratamento com CXCL10 resultou em uma redução significativa da carga parasitária nas concentrações de 50 ng/mL (70,3%) e 100 ng/mL (74,0%) em comparação com Glucantime (50,4%) e animais não tratados (Fig.1A). Após 48 horas, o tratamento com CXCL10 manteve a redução do número de parasitos intracelulares em concentrações de 50 ng/mL (70%) e 100 ng/mL (72,6%) quando comparado ao Glucantime (61,8%) e não tratado (Fig. 1B).



**Figura 1: Carga parasitária em macrófagos infectados com *Leishmania infantum* e tratados ou não com CXCL10.** Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com promastigotas de *L. infantum* (10 parasitos: 1 macrófago) e após 12 horas de infecção as células foram tratadas *in vitro* com CXCL10 (25, 50 e 100 ng/mL), LPS (20ng/mL) e Glucantime (16mg/mL). Após 24 (A) e 48 (B) horas de incubação, o número de amastigotas por 50 macrófagos foi determinado por meio da microscopia óptica. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e são representativos de 3 experimentos independentes.

### 4.2. Produção de Óxido Nítrico por macrófagos

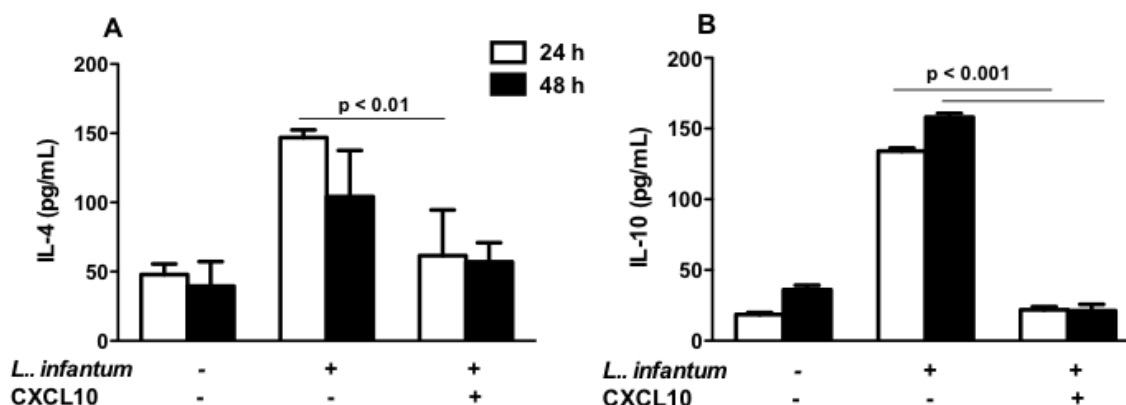
Após 24 horas, a produção de NO comportou-se de modo dose dependente em amostras que foram tratadas com CXCL10, com uma média de produção de 79  $\mu$ mol/L a 282  $\mu$ mol/L (Fig. 2A). Após 48 horas, houve uma redução na produção de NO, CXCL10 induziu uma média de produção variando de 52 $\mu$ mol/L a 164 $\mu$ mol/L; Mostrando ainda uma dependência da dose (Fig. 2B).



**Figura 2: Produção de óxido nítrico por macrófagos infectados com *Leishmania infantum* e tratados ou não com CXCL10.** Macrófagos RAW 264.7 foram infectados e tratados como descrito na Figura 1. Sobrenadantes de cultura de células foram coletados com 24 (A) e 48 (B) horas para medição de NO na forma de nitrito (NO<sub>2</sub>). Os dados representam a média aritmética ± erro padrão da média e são representativos de 3 experimentos independentes. MΦ + NI = macrófagos não infectados; MΦ + L = macrófagos infectados com *L. infantum*.

### 4.3. Produção de Citocinas *in vitro*

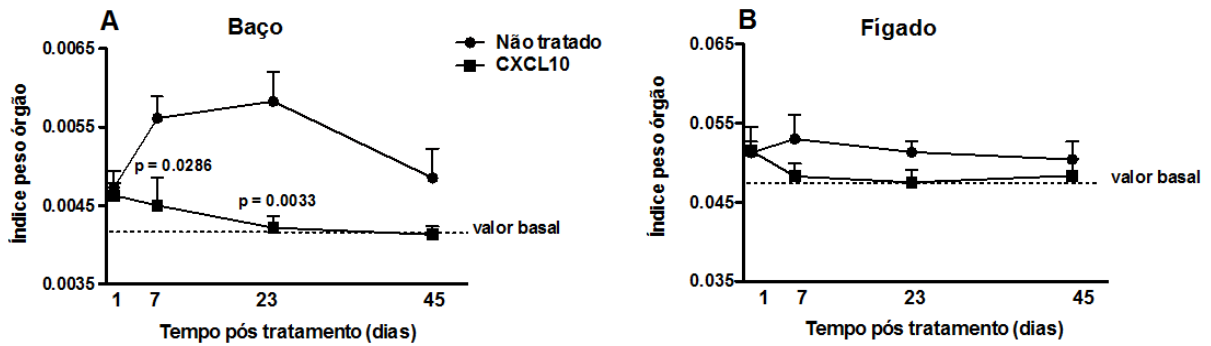
Tratamento com CXCL10 (100 ng/mL) em macrófagos infectados por *L. infantum* inibiu a produção de IL-4 (significativa às 24 horas pós-infecção <0,01) e IL-10 (p < 0,001) nos dois períodos de tempo (Fig. 3A e B). Às 48 horas pós-infecção, os resultados foram semelhantes para IL-4 e IL-10 (Fig. 3A e B).



**Figura 3: Produção de IL-4 e IL-10 por macrófagos infectados com *Leishmania infantum* e tratados ou não com CXCL10.** Os macrófagos RAW 264.7 foram infectados com *L. infantum* e, após 12 horas, tratados *in vitro* com CXCL10 (100 ng/mL). Os sobrenadantes da cultura foram recolhidos com 24 (A) e 48 (B) horas para a quantificação de citocinas. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e são representativos de 3 experimentos independentes.

#### 4.4. Peso relativo do baço e fígado

A análise do peso relativo do baço e fígado foi realizada em 1, 7, 23 e 45 dias após tratamento com CXCL10 (100 ng/mL). Observou-se que no 1º dia pós-tratamento, o grupo tratado e o não tratado não apresentaram diferenças no peso do baço, embora o peso do baço de ambos os grupos (não tratado:  $0,0056 \pm 0,003$ , tratado:  $0,0045 \pm 0,0004$ ) fosse ligeiramente superiores aos encontrados em animais saudáveis ( $0,0042 \pm 0,0002$ ) (Fig. 4A). Houve uma diminuição no peso do baço dos animais tratados após o 7º dia, ao contrário do que ocorreu com o grupo não tratado, cujos pesos apenas diminuíram após 45 dias de tratamento, e contudo estavam acima do peso do baço de animais saudáveis. Quando os grupos foram comparados, observou-se que havia diferenças entre eles no dia 7 ( $p = 0,0286$ ) e 23 após o tratamento ( $p = 0,0033$ ) (Fig. 4A). Em relação ao fígado, observou-se que o peso deste órgão diminuiu após o 7º dia de tratamento em animais tratados, quando comparado com animais não tratados. No entanto, não se observou diferença entre os grupos, embora o peso do fígado em animais não tratados apresentasse uma ligeira tendência a aumentar mais do que os animais tratados, quando comparado com o peso do fígado de animais saudáveis (Fig. 4B).

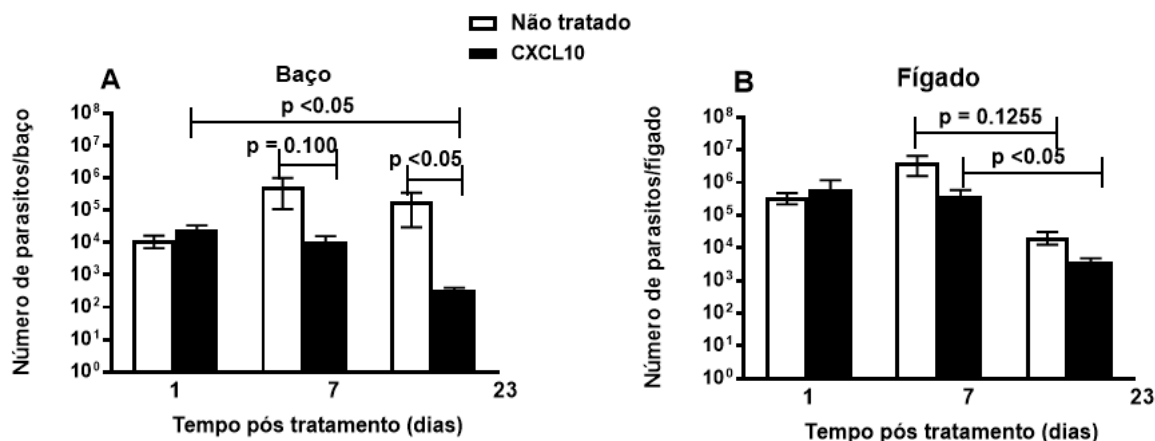


**Figura 4: Peso relativo do baço (A) e fígado (B) de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* e tratados (■) ou não tratados (□) com CXCL10.** Os animais foram tratados com CXCL10, intraperitonealmente (5 µg/kg) ou solução salina aos 1, 3 e 7 dias de infecção. A 1, 7, 23 e 45 dias após o tratamento, os animais foram sacrificados e o baço e o fígado foram removidos. Os dados de 6 animais por grupo foram representados pela média aritmética ± erro padrão da média e são representativos de 3 experimentos independentes. As linhas tracejadas representam a média aritmética do peso relativo de baço (0,0042) e fígado (0,048) de 6 animais saudáveis (valor basal).

#### 4.5. Número de parasitos no baço e fígado

Os resultados mostraram que após o 1º dia de tratamento, os animais tratados com CXCL10 não apresentaram diferença no número de parasitos no baço e no fígado quando comparados aos animais não tratados (Fig. 5A e 5B). Como era esperado, o fígado foi o órgão mais infectado nos primeiros 8 dias de infecção (significa: 1 dia após o tratamento), apresentando em ambos os grupos (tratados e não tratados) um número de parasitos  $10^6$  (Fig. 5B). Por outro lado, foi encontrado no baço aproximadamente metade do inóculo inicial, cerca de  $10^4$  parasitos em ambos os grupos (tratados e não tratados) (Fig. 5A). Após 7 dias de tratamento, o número de parasitos nos animais tratados permaneceu estável tanto no baço (aproximadamente  $10^4$ ) como no fígado (aproximadamente  $10^6$ ) (Fig. 5A e 5B). Após 23 dias de tratamento, houve um declínio no número de parasitos nos órgãos alvo nos grupos tratado e não tratado. No entanto, verificou-se que esta diminuição na carga parasitária era significativa apenas no baço do grupo tratado ( $p = 0,0272$ ), quando comparada com o grupo não tratado (Fig. 5A). Após 23 dias de tratamento observou-se também que no grupo tratado, em ambos os órgãos, o número de parasitos atingiu os valores mais baixos (aproximadamente  $10^2$  no baço e  $10^3$  no fígado) (Fig. 5A e 5B). O grupo que recebeu CXCL10 em diferentes períodos mostrou que no baço houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre 1 e 23 dias após o tratamento

(Fig. 5A). No fígado, houve também uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do dia 7 ao dia 23 pós-tratamento no grupo tratado, mostrando uma redução na carga parasitária equivalente à encontrada no baço. Embora exista uma redução similarmente semelhante na taxa hepática entre os grupos não tratados do dia 7 ao dia 23 após o tratamento, de fato, não houve significância estatística (Fig. 5B).



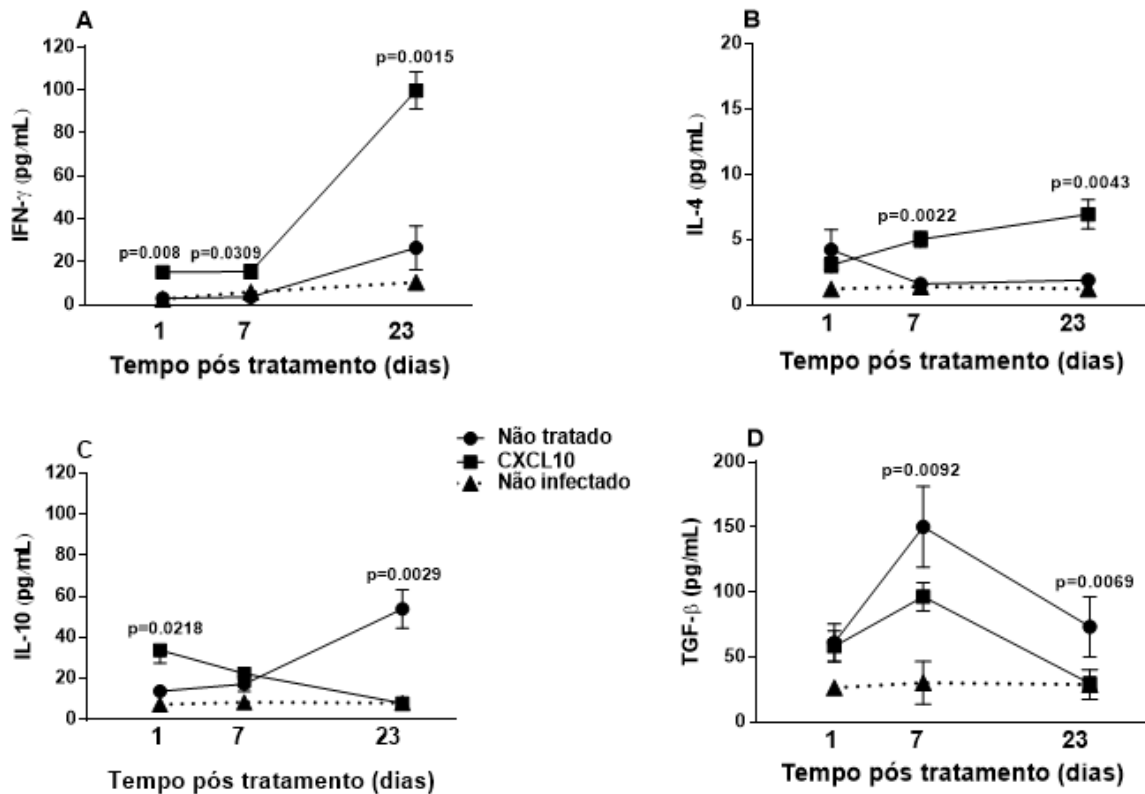
**Figura 5: Carga parasitária no baço (A) e fígado (B) de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* e tratados ou não tratados com CXCL10.** Os animais foram tratados como descrito na Figura 4. Após 1, 7 e 23 dias de tratamento, os animais foram sacrificados; o baço e o fígado foram removidos e utilizados para avaliar a carga parasitária. Os dados de 6 animais por grupo foram representados pela média aritmética  $\pm$  erro padrão da média e são representativos de 3 experiências independentes.

#### 4.6. Produção de citocinas *in vivo*

O IFN- $\gamma$  foi produzido de forma mais destacada pelos esplenócitos dos animais tratados do que dos animais não tratados, nos 3 períodos de tempo avaliados (após 1 dia,  $p = 0,0218$ ; 7 dias,  $p = 0,0309$  e após 23 dias de tratamento,  $p = 0,0015$ ). Nos animais tratados com CXCL10, a produção de IFN- $\gamma$  atingiu o seu valor máximo de 100 pg/mL ao dia 23 após o tratamento, o que foi equivalente a um aumento de 5 vezes em relação à concentração inicial de 20 pg/mL ( $p < 0,05$ ) (Fig. 6A). Em ambos os grupos, a produção de IL-4 permaneceu sempre abaixo de 10 pg/mL, nos três períodos de tempo avaliados (Fig. 6B). No entanto, nos dois últimos dias do estudo observou-se que os animais tratados com CXCL10 induziram uma maior produção de IL-4, em comparação com os não tratados (7 dias após o



tratamento,  $P = 0,0022$ ; 23 dias após o tratamento,  $p = 0,0043$ ) (Fig.6B). Nos animais tratados com CXCL10, a produção de IL-10 foi duas vezes superior à do IFN- $\gamma$  após 1 dia do tratamento, atingindo uma concentração de aproximadamente 40 pg/mL, também significativamente superior à dos animais não tratados ( $p = 0,0218$ ) no mesmo período de tempo (Fig. 6C).



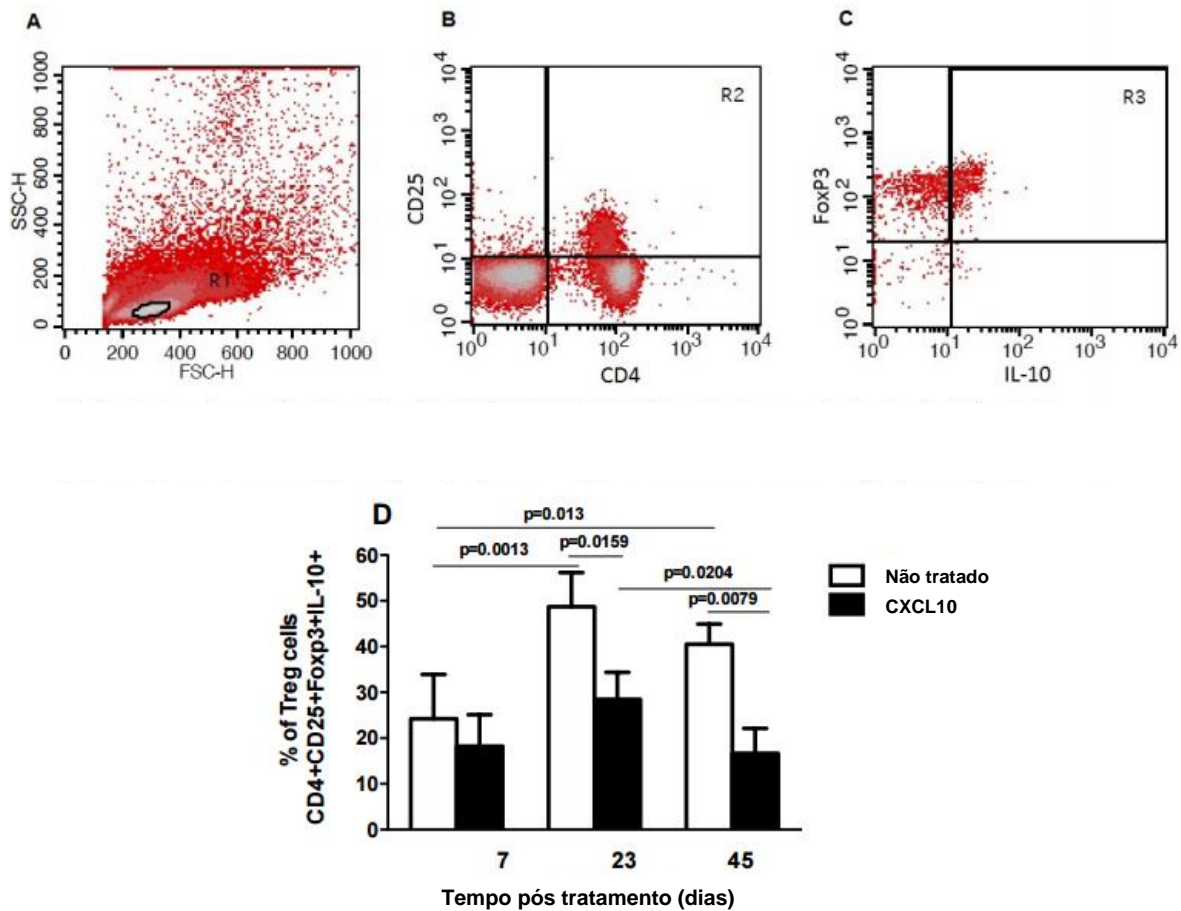
**Figura 6: Produção de IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TGF- $\beta$  (D) por esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* e tratados (■) e não tratados (●) com CXCL10 ou não infectado (NI) (▲). Os animais foram tratados como descrito na Figura 4. Após 1, 7 e 23 dias de tratamento, os animais foram sacrificados para obter os esplenócitos. Os sobrenadantes destas células foram recolhidos às 48 horas para a medição das citocinas. Os dados de 6 animais por grupo foram apresentados como a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média e são representativos de 3 experimentos independentes.**

Após 7 dias de tratamento, não houve diferença na IL-10 entre animais tratados com CXCL10 e não tratados, no entanto, após 23 dias, caiu significativamente nos animais tratados ( $p = 0,0029$ ) (Fig. 6C). Em contraste, no grupo não tratado, a produção de IL-10 permaneceu crescendo, sendo detectados cerca de 60 pg/mL após 23 dias de tratamento (Fig. 6C). Em relação ao TGF- $\beta$ , observou-se que os níveis desta citocina foram sempre muito mais elevados quando comparados com as

outras citocinas avaliadas. Após o 1º dia de tratamento, tanto o grupo não tratado quanto o tratado apresentaram níveis semelhantes de TGF- $\beta$ , cerca de 50 pg/mL (Fig.6D). Após 7 dias de tratamento, a produção de TGF- $\beta$  foi menor no grupo tratado, cerca de 100 pg/mL, menor que a produzida pelo grupo não tratado (150 pg/mL,  $p = 0,0092$ ) (Fig.6D). Após 23 dias de tratamento, a produção desta citocina diminuiu em ambos os grupos (tratados e não tratados) (Fig. 6D).

#### **4.7. Efeito de CXCL10 na frequência de células Treg CD4+ CD25+ Foxp3+ IL-10+ em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum***

A estratégia de “gate” da proporção de células Treg CD4+ CD25+ Foxp3+ e os seus níveis de expressão da citocina IL-10 podem ser vistos na Fig.7A, B e C. Após 7 dias de tratamento, não houve diferença na frequência de células Treg CD25+ Foxp3+ IL-10+ entre os animais tratados com CXCL10 e os animais não tratados. No entanto, nos últimos dois dias pós-tratamento (23 e 45 dias) observou-se que os animais tratados com CXCL10 induziram uma frequência mais baixa de células Treg CD25+ Foxp3+ IL-10+, em comparação com animais não tratados (23 dias,  $p = 0,0159$ ; 45 dias,  $p = 0,0079$ ) (Fig. 7D). Nos animais tratados com CXCL10, a frequência de células Treg CD25+ Foxp3+ IL-10+ atingiu seu menor valor (aproximadamente 15%) 45 dias após tratamento, o que equivale a uma redução de aproximadamente metade, quando comparada com a frequência no dia 23 pós-tratamento que foi de 30% ( $p = 0,0204$ ) (Fig. 7D). Pelo contrário, no grupo não tratado, a frequência celular aumentou entre os dias 7 e 23 após o tratamento ( $p = 0,0013$ ), sendo então mantida sem diminuição significativa entre 23 e 45 dias após o tratamento (Fig. 7D).



**Figura 7: Estratégia de “gating” da proporção (A, B e C) e frequência (D) de células Treg CD4+ CD25+ Foxp3+ IL-10+ em esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* e tratados (■) ou não tratados (□) com CXCL10. Os animais foram tratados como descrito na Figura 4. Após 7, 23 e 45 dias de tratamento, os animais foram sacrificados para obter os esplenócitos. Estas células foram marcadas com anticorpos e submetidas a citometria de fluxo. Os dados de pelo menos 6 animais por grupo foram apresentados como a média aritmética ± erro padrão da média e são representativos de 3 experimentos independentes.**

#### **4.8. Efeito de CXCL10 na frequência de células Treg CD4+ CD25- Foxp3- IL-10+ em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum***

Após 7 dias de tratamento, observou-se que a frequência das células Treg CD4+ CD25- Foxp3- IL-10+ nos animais tratados com CXCL10 era inferior quando comparada com os animais não tratados ( $p = 0,0195$ ). Além disso, após 23 dias de tratamento, observou-se que no grupo tratado com CXCL10 a frequência de células Treg CD4+ CD25-Foxp3-IL-10+ era muito mais baixa, no entanto, em comparação com o tempo 7 dias após o tratamento a diminuição na frequência no dia 23 após o tratamento foi ainda mais significativa ( $p = 0,0079$ ) (Fig.8D). Após 45 dias de

tratamento, não houve diferença na frequência de células Treg CD4+ CD25+ Foxp3+ IL-10+ entre animais tratados com CXCL10 e animais não tratados (Fig.8D).

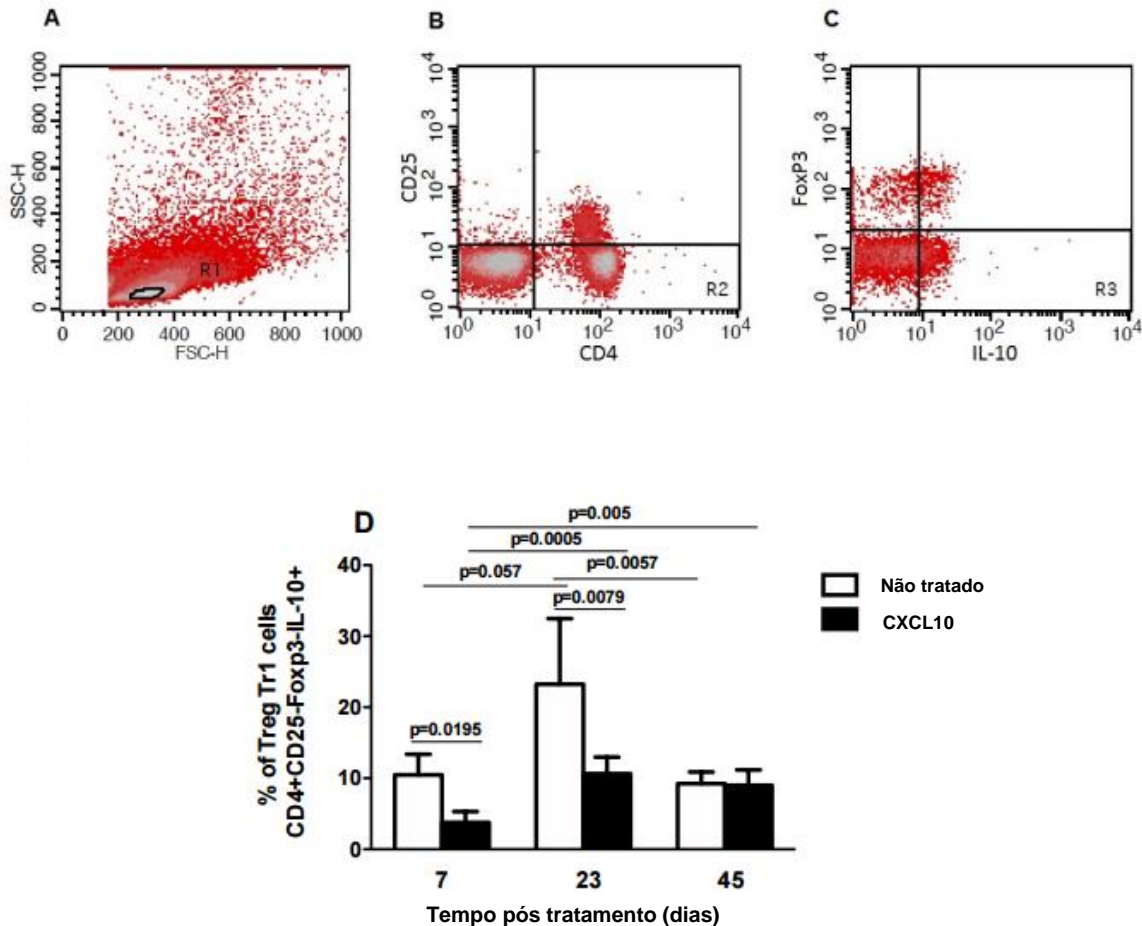


Figura 8: Estratégia de “gating” da proporção (A, B e C) e frequência (D) de células Treg Tr1 CD4+ CD25- Foxp3- IL-10+ em esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* e tratados (■) ou não tratados (□) com CXCL10. Os animais foram tratados como descrito na Figura 4. Após 7, 23 e 45 dias de tratamento, os animais foram sacrificados para obter os esplenócitos. Estas células foram marcadas com anticorpos e submetidas a citometria de fluxo. Os dados de pelo menos 6 animais por grupo foram apresentados como a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média e são representativos de 3 experimentos independentes.

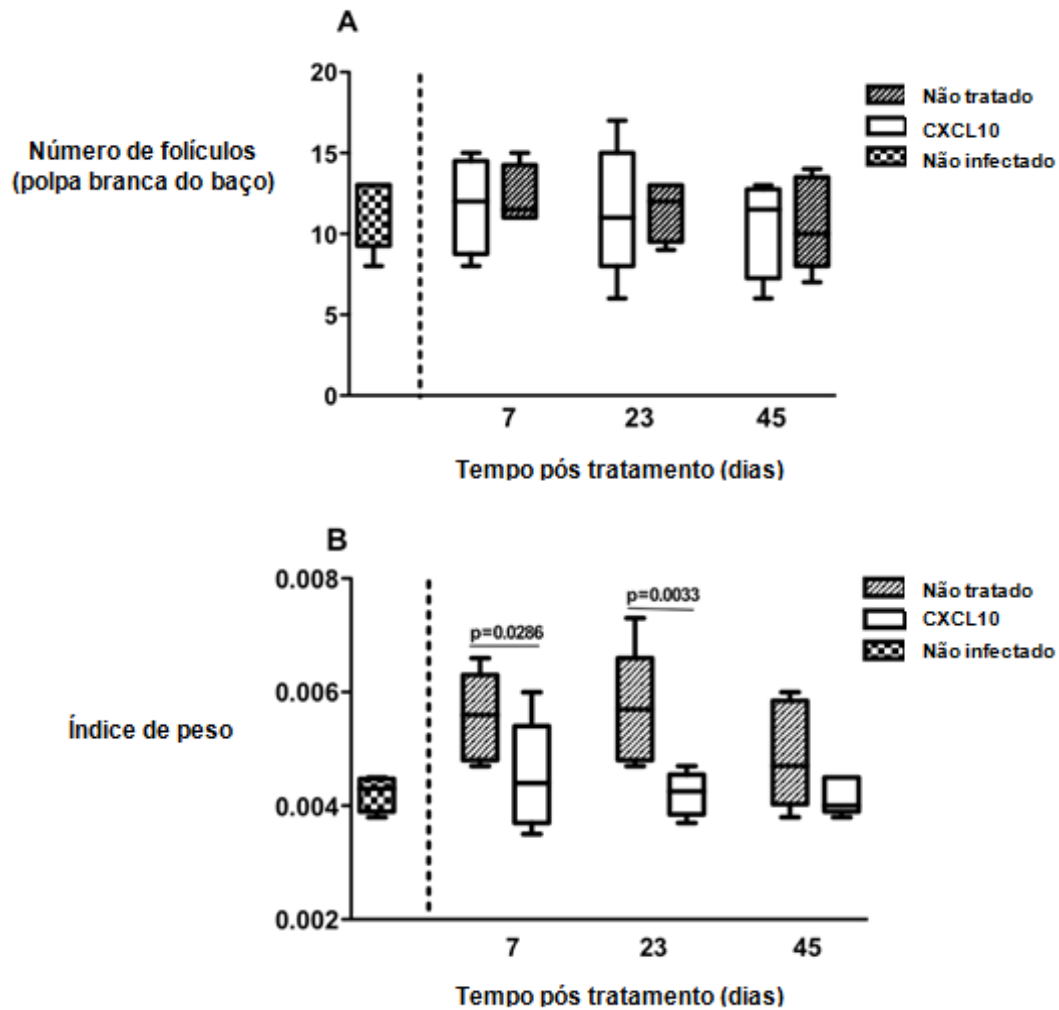
#### 4.9. Efeito de CXCL10 na área de polpa branca, no número de folículos linfóides e no índice de peso do baço de camundongos BALB/c infectados com *L. Infantum*

Na contagem dos folículos linfóides por 10 campos, não foi observada diferença significativa entre os grupos (não infectados, tratados e não tratados) ou na área relativa de polpa branca (Fig. 9A, 9C e Tabela 1). No entanto, a hiperplasia de polpa branca observada nos animais tratados com CXCL10 foi inferior a observada nos animais não tratados, ambos aos 7 dias ( $p= 0,0286$ ) e aos 23 dias após o tratamento ( $p = 0,0033$ ) (Fig. 9B e 9C).

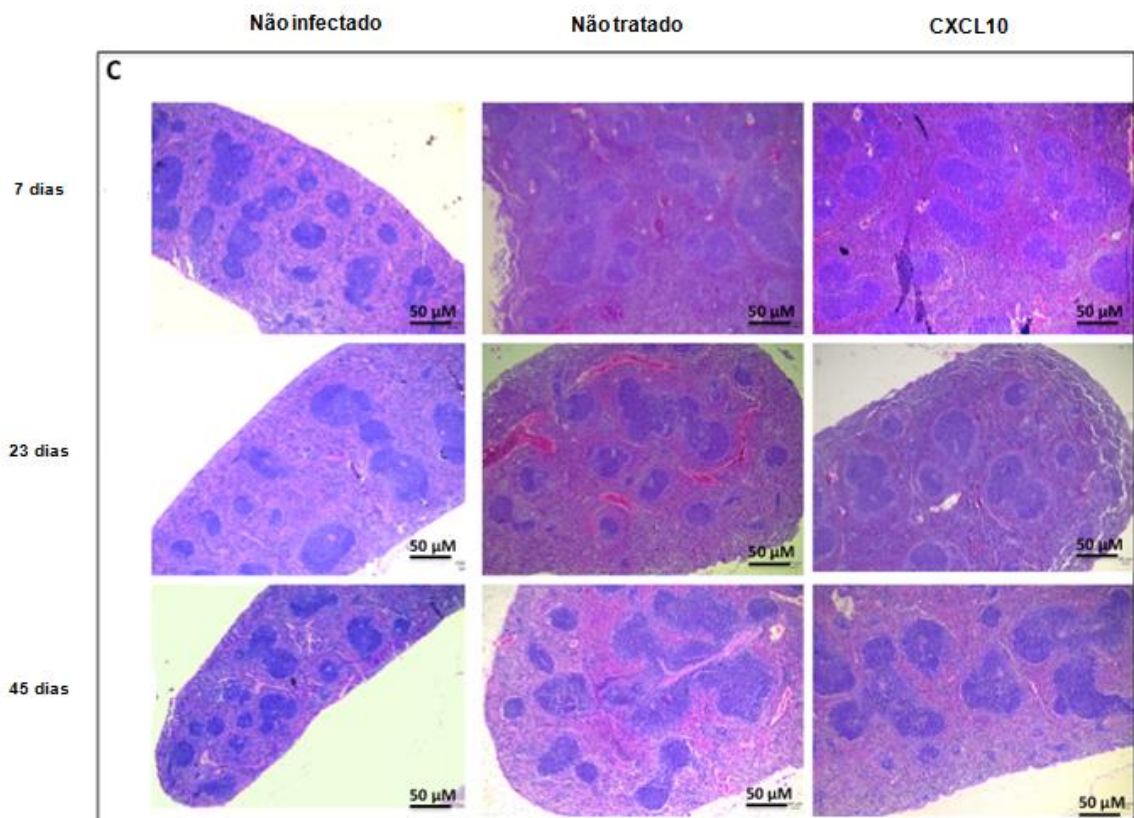
Tabela 1: Área de polpa branca em relação à área total do baço (%)

Tempo (dias pós tratamento)	Infectado		p
	CXCL10	Não tratado	
7	7.62	8.08	ns
23	7.02	9.80	ns
45	12.04	12.01	ns

Abreviação: ns, não significante



**Figura 9 A e B: Número de folículos de polpa branca do baço (A), índice de peso de baço (B).** Os animais foram tratados como descrito na Figura 4. Após 7, 23 e 45 dias de tratamento, os animais foram sacrificados para obter o baço. Fotomicrografias e leitura das lâminas foram feitas de acordo com o material e os métodos. Dados de pelo menos 6 animais por grupo são apresentados como 10-90 percentil e são representativos de 3 experimentos independentes.



**Figura 9C:** Seções histológicas coradas com coloração hematoxilina-eosina (C) de camundongos BALB / c infectados com *Leishmania infantum* tratados ou não tratados com CXCL10. Os animais foram tratados como descrito na Figura 4. Após 7, 23 e 45 dias de tratamento, os animais foram sacrificados para obter o baço. Fotomicrografias e leitura das lâminas foram feitas de acordo com o material e os métodos. Dados de pelo menos 6 animais por grupo são apresentados como 10-90 percentil e são representativos de 3 experimentos independentes. Seções histológicas: ampliação original x40.

## 5. DISCUSSÃO

CXCL10, quimiocina indutora de IFN- $\gamma$ , é uma citocina que nos últimos anos tem sido explorada no campo da imunoterapia como um potencial fármaco para o tratamento da leishmaniose visceral. Seus mecanismos de ação, tais como ativação de leucócitos, equilíbrio entre as células T reguladoras e efetoras, quimiotaxia, hematopoiese e aumento da citotoxicidade das células NK (Gupta et al., 2011) podem ser importantes no contexto do tratamento das leishmanioses. Este estudo avaliou o potencial de CXCL10 no controle da infecção causada por *L. infantum* utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* de leishmaniose visceral.

*In vitro*, CXCL10 (100 ng/mL) foi capaz de reduzir em 74% a carga parasitária intracelular em comparação com macrófagos infectados e não tratados. *In vivo*, observou-se também que o tratamento com CXCL10 foi capaz de reduzir a carga parasitária tanto no fígado quanto no baço, quatro semanas após a infecção. Essa diminuição no número de parasitos no baço correlacionou-se com a diminuição do tamanho desse órgão em animais tratados com CXCL10 em comparação com animais não tratados. Tem sido relatado que durante a infecção por *L. infantum* em camundongos, as amastigotas multiplicam-se rapidamente durante as primeiras 2 semanas no fígado e desaparecem espontaneamente em torno da 8ª semana de infecção, enquanto no baço os parasitos crescem mais lentamente, levando a uma infecção crônica nesse órgão (Nieto et al., 2011). Os resultados da carga parasitária encontrados no presente estudo corroboram os achados da literatura. De destaque, sugerem um papel protetor de CXCL10 na infecção por *L. infantum*, uma vez que essa quimioquina foi capaz de induzir uma grande redução no número de parasitos nos dois órgãos alvo, o que não foi observado no grupo não tratado.

O provável mecanismo efetor dessa redução parasitária está relacionado à ativação de macrófagos induzida por CXCL10, uma vez que tem sido relatado que algumas quimiocinas como CCL2 e CXCL10 podem ativar macrófagos para participarem na redução do número de parasitos (Ritter & Moll, 2000). Os macrófagos medeiam a destruição de *Leishmania* principalmente por meio de derivados reativos de oxigênio e produção de NO (Vouldoukis et al., 1997). Além disso, foi demonstrado que um fenótipo de *L. infantum* era resistente à morte por apoptose mediada por NO (Holzmüller et al., 2005). No presente trabalho, a redução



de parasitos *in vitro* não parece depender exclusivamente de NO, uma vez que sua produção diminuiu significativamente nos macrófagos infectados e tratados com CXCL10 quando comparados com os infectados e não tratados com a quimiocina. Algumas espécies de *Leishmania* são resistentes à ação microbicida de NO, como alguns isolados de *L. braziliensis*, que apresentaram maior crescimento intracelular mesmo na presença de LPS e IFN- $\gamma$  (Souza et al., 2010). Há relatos de que outros produtos do metabolismo do oxigênio estão envolvidos na explosão respiratória em macrófagos de murinos ativados, como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e assim, também estarão envolvidos na eliminação de *Leishmania* (Van Assche et al., 2011), o que corrobora a hipótese sugerida no presente trabalho.

Em modelos murinos de leishmaniose visceral utilizando camundongos BALB/c, o controle da doença depende da magnitude da resposta das células Th1, conduzindo à produção de IFN- $\gamma$ , à ativação de macrófagos (Kaye et al., 2004), à formação de granulomas hepáticos maduros, bem como à produção de espécies reativas de nitrogênio e intermediários de oxigênio, que são essenciais para a eliminação de parasitos dentro das células de Kupffer e células dendríticas (Murray, 2001; Stanley & Engwerda, 2007). O início da doença está associado a uma diminuição da resposta a esses fatores, o que ajuda o parasito a viver e se reproduzir no fagolisossomo de macrófagos (Melby et al., 2001). Verificou-se que a produção de IFN- $\gamma$  no grupo tratado com CXCL10 estava aumentada no baço quando comparada com o grupo não tratado. Essa produção foi significativamente 5 vezes maior que a concentração produzida após o primeiro dia de tratamento, um aumento que coincidiu com a diminuição da carga parasitária após 23 dias do tratamento, reforçando a hipótese do papel protetor de CXCL10. Estudos anteriores demonstraram a importância de IFN- $\gamma$  no controle da infecção visceral. Os monócitos de indivíduos saudáveis previamente tratados com IFN- $\gamma$  produzem, após a infecção com *L. donovani*, uma quantidade maior de TNF- $\alpha$ , citocina importante na resposta do hospedeiro à infecção microbiana (Reiner et al., 1990).

Corroborando os altos níveis de IFN- $\gamma$  e a diminuição da carga parasitária no baço, observou-se que CXCL10 induziu uma redução significativa na produção de IL-10 e TGF- $\beta$ . O tratamento com CXCL10 *in vitro* também induziu uma diminuição significativa de IL-10. Esse dado confirma a resposta protetora induzida pela

quimiocina, representada pela redução da carga parasitária, mesmo com a diminuição da produção de NO. Nos animais que receberam CXCL10, a concentração da citocina IL-10 foi 10 vezes menor do que a concentração de IFN- $\gamma$ . Contudo, apesar de CXCL10 ter induzido a redução da concentração de TGF- $\beta$  somente para uma quantidade próxima à concentração de IFN- $\gamma$ , sugere-se que ocorreu a polarização da resposta para um perfil Th1, com consequente redução da carga parasitária. No modelo de leishmaniose visceral em camundongos, o controle da doença é dependente da produção de IFN- $\gamma$ , cuja ação pró-inflamatória é fundamental (Kaye et al., 2004). IL-10 é uma citocina imunorreguladora presente em altos níveis durante o estágio ativo da doença, e a associação da imunossupressão induzida por IL-10 na leishmaniose visceral humana é bem estabelecida. Pacientes com doença ativa apresentam níveis séricos elevados de IL-10, bem como o aumento da expressão de RNAm de IL-10 nas lesões. IL-10 é induzida também como uma resposta homeostática, que protege os tecidos dos danos colaterais causados por inflamação excessiva (Moore et al., 2001; Mege et al., 2006). Camundongos deficientes de IL-10 ou, por outro lado, que sofreram um bloqueio na sinalização de IL-10 foram altamente resistentes contra *L. donovani* (Murphy et al., 2001; Murray et al., 2003).

Recentemente, outros estudos também mostraram que o tratamento com CXCL10 resulta na proteção *in vivo* contra *L. donovani*, por meio da redução significativa das citocinas imunossupressoras, IL-10 e TGF- $\beta$ , devido à modulação de células T reguladoras (Gupta et al., 2011). No presente estudo, os níveis de TGF- $\beta$  nos animais tratados com CXCL10 foram sempre muito mais elevados do que os de outras citocinas avaliadas. Esses resultados não corroboram completamente outros estudos que sugerem que o papel de TGF- $\beta$  no controle da carga parasitária e resistência do hospedeiro, dependente de IFN- $\gamma$ , durante a infecção por cepas viscerotrópicas como *L. donovani*, parece ser menos importante em comparação com IL-10 (Murray et al., 2005). Estudos com animais deficientes em IL-10 e TGF- $\beta$ , infectados com *L. infantum* e tratados com CXCL10 poderiam talvez ser um bom modelo experimental para esclarecer esta questão.

Ao contrário dos modelos de leishmaniose cutânea murina, nos quais a citocina IL-4 está associada à resposta Th2, no modelo de infecção por *L. donovani*

há estudos que mostram que IL-4 não agrava a doença e pode de fato atuar no combate ao parasito, o que é bastante paradoxal (Mohrs et al., 1999). Esses estudos mostraram que IL-4 poderia atuar positivamente na regulação da imunidade contra *L. donovani* aumentando o número de granulomas maduros e, conseqüentemente, promovendo a redução da carga parasitária no fígado (Stager et al., 2003). Aqui, a concentração de IL-4 em ambos os grupos permaneceu sempre muito baixa em todos os três períodos de tempo analisados. No entanto, nos animais tratados foi observada uma maior produção de IL-4 em comparação com o grupo não tratado.

Em estudo avaliando os fígados infectados por *L. donovani* de camundongos C57BL/6 deficientes (CXCL10<sup>-/-</sup> e CXCR3<sup>-/-</sup>) foi mostrado que CXCL10 pode promover a montagem antecipada de granuloma. No entanto, CXCL10 é capaz de dificultar o controle precoce de parasitos e não ter qualquer papel na conversão de granulomas em desenvolvimento para estruturas histologicamente maduras. Portanto, CXCL10 parece paradoxalmente promover também infecção hepática (Murray et al., 2016).

Mais recentemente, tem sido mostrado que o tratamento com CXCL10 foi capaz de induzir, em modelo murino, alta produção de citocinas do tipo Th1 como IFN- $\gamma$  e IL-12 e reduzir os níveis de citocinas supressoras como IL-10 e TGF- $\beta$  (Gupta et al., 2011). IL-10 e TGF- $\beta$  são produzidas por células Th2 e Treg e atuam na imunossupressão, o que agrava a leishmaniose visceral (Gupta et al., 2011). Em adição, o fato de IL-10 ter tido uma redução de 10 vezes no grupo tratado com CXCL10, o presente estudo nos levou a hipotetizar que a redução de IL-10 poderia estar relacionada com células Treg. Dessa forma, resolveu-se investigar se a redução nos níveis de IL-10 induzidos por CXCL10 estava também relacionada com o decréscimo na população de células Tregs.

O tratamento com CXCL10 demonstrou que a frequência de células Treg CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> produtoras de IL-10 foi significativamente menor nos últimos dois dias após tratamento (23 e 45 dias) quando comparada com o grupo não tratado. Esse resultado corrobora um recente estudo, que mostrou que o tratamento com CXCL10 resultou em proteção *in vivo* contra *L. donovani*, através da significativa redução da citocina imunossupressora IL-10, devido à modulação de células T regulatórias (Gupta et al., 2011). Ao contrário dos resultados do presente estudo, há

relatos mostrando que células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* foram capazes de secretar alguma quantidade de IL-10, mas nada muito expressivo, sugerindo um menor papel das células Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> durante infecção visceral por *L. infantum* (Rodrigues et al., 2009). Por outro lado, o mesmo estudo mostrou que células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-10 induzidas por antígeno, CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup>, chamadas de células Tr1, mostraram ser uma importante fonte de IL-10, uma vez que eram, de fato, capazes de produzir especificamente maiores quantidades dessa citocina, no início e durante a infecção experimental (Rodrigues et al., 2009).

No presente estudo, foi observado que a frequência de células Treg do tipo Tr1 nos animais tratados com CXCL10 foi menor quando comparada com os animais não tratados após 7 dias de tratamento. Esses dados sugerem que CXCL10 foi capaz de agir mais cedo sobre esta população Tr1 quando comparado com células Treg CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>. No entanto, após 23 dias de tratamento, foi observado também que no grupo tratado por CXCL10 a baixa frequência de células Treg CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> IL-10<sup>+</sup> foi ainda mais significativa. Células Tr1 já podem ser encontradas duas semanas após a infecção, são capazes de produzir ambas as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 e atingem um patamar em um mês, representando 2 a 5% do total de células T CD4<sup>+</sup> esplênicas (Owens et al., 2012; Resende et al., 2013). A polarização para esta população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>, mas Foxp3<sup>-</sup> e CD25<sup>-</sup>, está associada a uma maior suscetibilidade do hospedeiro à *Leishmania* e depende inicialmente da sua ativação apenas por células dendríticas infectadas, conhecidas por possuírem baixos níveis de moléculas co-estimuladoras nas suas superfícies e capacidade de produção de níveis elevados de IL-10 (Resende et al., 2013). É possível que a IL-10, que foi 10 vezes menor que IFN- $\gamma$ , determinada pelo método ELISA após 23 dias de tratamento com CXCL10, tenha sido produzida por qualquer um dos dois fenótipos de células reguladoras encontrados neste estudo por citometria de fluxo. Provavelmente, uma população estaria produzindo IL-10 mais cedo e a outra seria capaz de manter essa produção na fase mais crônica da doença.

A persistência parasitária de *L. infantum* no baço tem imunopatologia complexa e ainda é desconhecida em suas particularidades, uma vez que envolve

várias células do sistema reticuloendotelial, citocinas e quimiocinas (Varma & Naseem, 2010). Esta persistência ocorre devido à incapacidade do hospedeiro para controlar a carga parasitária e para manter o perfil imunológico Th1 pró-inflamatório devido em parte à produção de IL-10 estimulada pelos parasitos (Varma & Naseem, 2010). O baço é um local de infecção ativa e produz várias anormalidades hematológicas no hospedeiro, causando os sintomas típicos de infecção, entre eles, esplenomegalia diretamente relacionada à hiperplasia do folículo linfóide da polpa branca (Engwerda et al., 2002; Varma & Naseem, 2010).

O envolvimento do baço na leishmaniose visceral está relacionado à alteração da fisiologia normal desse órgão através de uma remodelação profunda (Engwerda et al., 2002), causada pela perda da organização celular em sua intrincada microarquitetura. O baço tem várias populações de macrófagos e estruturas (centros germinativos) que permitem a apresentação antigênica para a ativação de células efetoras, linfócitos T e B (Allen et al., 2007). A ZM, que está diretamente relacionada com a apresentação antigênica à célula T, é comprometida durante a infecção por *L. donovani*, gerando a imunossupressão do hospedeiro (Engwerda et al., 2002). Portanto, o próximo passo do presente estudo foi investigar se CXCL10 teria repercussões sobre as alterações no baço que ocorrem na leishmaniose visceral.

Observou-se uma significativa redução da hiperplasia linfóide no baço durante a fase aguda de infecção nos animais tratados com CXCL10, o que pode contribuir para minimizar o padrão de decomposição da microarquitetura esplênica descrita no baço de animais infectados (Santana et al., 2008). O baço manifesta uma notável capacidade inata para matar o parasito em todas as populações de macrófagos. De fato, estima-se que 50% do inóculo inicial do parasito é morto pelo macrófago da zona marginal nas primeiras 24 horas após a infecção (Allen et al., 2007). CXCL10 induz a secreção de IFN- $\gamma$ , produzido pelas células NK, que é a citocina indutorado potencial fagocitário dos macrófagos (Alexander & Bryson 2005; Dey et al., 2007). Outros estudos apontam para o aumento da citotoxicidade de células NK em camundongos BALB/c infectados com *L. major* e tratados com CXCL10 (Dey et al., 2007), então esta citotoxicidade poderia ajudar a manter a estrutura do baço eliminando macrófagos infectados.

As quimiocinas podem atuar como novos promissores agentes terapêuticos para combater *L. donovani*, uma vez que, entre os tipos de resposta mediada por células, algumas quimiocinas podem induzir a polarização da resposta celular do tipo Th1, capaz de combater a infecção (Gupta et al., 2009). O início de uma resposta imunológica adequada é um desafio para controlar a infecção por *Leishmania*. Recentes abordagens de combinação de terapias têm como alvo a utilização de adjuvantes imunológicos como esforço para reduzir a toxicidade das terapias atuais e usar dosagens mais eficazes dos fármacos disponíveis no mercado (Singh et al., 2014). Os dados deste estudo abrem perspectivas para o desenvolvimento de novas formulações como alternativas terapêuticas para a leishmaniose visceral.

## 6. CONCLUSÕES

CXCL10 induziu uma queda na carga parasitária em células RAW 264-7 *in vitro*, provavelmente, não dependente de NO, além de promover uma menor produção de IL-10 nessas células;

CXCL10 foi capaz de reduzir de maneira expressiva o número de parasitos nos dois órgãos-alvo, fígado e baço, em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*;

CXCL10 induziu uma significativa produção de IFN- $\gamma$  e supressão das citocinas imunorreguladoras, IL-10 e TGF- $\beta$  em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*;

CXCL10 promoveu uma diminuição na frequência de células Treg produtoras de IL-10 (foxp3+ e Tr1) em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*;

CXCL10 induziu uma menor hiperplasia linfóide no baço de BALB/c infectados com *L. infantum*

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozleystandridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52(5):399-451.

Albuquerque PL, Silva Júnior GB, Freire CC, Oliveira SB, Almeida DM, Silva HF, Cavalcante MDO S, Sousa AQ 2009. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 26(4):330-3.

Alexander J, Bryson K 2005. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 99(1):17-23.

Allen CD, Okada T, Cyster JG 2007. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27(2):190-202.

Alves WA, Bevilacqua PD 2004. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad Saude Publica* 20(1):259-65.

Amichay D, Gazzinelli RT, Karupiah G, Moench TR, Sher A, Farber JM 1996. Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo. *J Immunol* 157(10):4511-20.

Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G 1995. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182(1):155-62.

Ato M, Nakano H, Kakiuchi T, Kaye PM 2004. Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19. *J Immunol* 173(8):4815-20.

Ato M, Stäger S, Engwerda CR, Kaye PM 2002. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol* 3(12):1185-91.

Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, Rocha H, Teixeira R, Johnson WD Jr 1986. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brasil. *J Infect Dis* 154(4):639-49.

Baggiolini M 2001. Chemokines in pathology and medicine. *Journal of Internal Medicine* 250(2):91-104.



Belizário JE, Brandão W, Rossato C, Peron JP 2016. Thymic and Postthymic Regulation of Naïve CD4(+) T-Cell Lineage Fates in Humans and Mice Models. *Mediators Inflamm* 2016:9523628.

Borges BKA, Silva JÁ, Haddad JPA, Moreira EC, Magalhães DF, Ribeiro LML, Fiúza VOP 2009. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec* 61(5):1035-1043.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral, Brasília, 2006, p.19.

BRASIL, Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11330-descricao-da-doenca>> acesso em: 20 de abr. 2017

BRASIL, Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>> acesso em 20 de abr. 2017

Brazil RP 2013. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban areas. *Rev Soc Bras Med Trop* 46(3):263-4

Campanella GS, Tager AM, EL Khoury JK, Thomas SY, Abrazinski TA, Manice LA, Colvin RA, Luster AD 2008. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(12):4814-9.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5(11):873-82.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265(5176):1237-40.

Chen J, Vistica BP, Takase H, Ham DI, Fariss RN, Wawrousek EF, Chan CC, Demartino JA, Ferber JM, Gery I 2004. A unique pattern of up- and downregulation of chemokine receptor CXCR3 on inflammation-inducing Th1 cells. *European Journal of Immunology* 34(10):2885-94.

Costa CH 2008. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 24(12):2959-63.

Costa CH, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, Cavalcanti JC, Santos LS 2010. IS SEVERE visceral leishmaniasis A SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME? A CASE CONTROL STUDY. Rev Soc Bras Med Trop 43(4):386-92.

Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM 1999. Leishmania donovani infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. Eur J Immunol 29(1):203-14.

Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? Immunity 30(5):626-35.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchoo VK, Strom TB, Robson SC 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med 204(6):1257-65.

De Oliveira EF, Oshiro ET, Fernandes WS, Ferreira AM, de Oliveira AG, Galati EA 2017. Vector Competence of *Lutzomyia cruzi* naturally demonstrated for *Leishmania infantum* and suspected for *Leishmania amazonensis*. Am J Trop Med Hyg 96(1):178-181.

De Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C 2008. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. Acta Trop 107(1):66-9.

Desjeux P 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg 95(3):239-43.

De Trez C, Brait M, Leo O, Aebischer T, Torrentera FA, Carlier Y, Muraille E 2004. Myd88-dependent *in vivo* maturation of splenic dendritic cells induced by *Leishmania donovani* and other Leishmania species. Infect Immun 72(2):824-32.

Dey R, Majumder N, Bhattacharyya Majumdar S, Bhattacharjee S, Banerjee S, Roy S, Majumdar S 2007. Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. Scand J Immunol 66(6):671-83.

Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD 2002. IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. The Journal of Immunology 168(7):3195-204.

Engwerda CR, Ato M, Cotterell SE, Mynott TL, Tschannerl A, Gorak-Stolinska PM, Kaye PM 2002. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. Am J Pathol 161(2):429-37.

Engwerda CR, Ato M, Kaye PM 2004. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. Trends Parasitol 20(11):524-30.

Engwerda CR, Kaye PM 2000. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today* 21(2):73-8.

Ehrlich A, Castilho TM, Goldsmith-Pestana K, Chae WJ, Bothwell AL, Sparwasser T, McMahon-Pratt D 2014. The immunotherapeutic role of regulatory t cells in *Leishmania (viannia) panamensis* infection. *J Immunol* 193(6):2961-70.

Esch KJ, Juelsgaard R, Martinez PA, Jones DE, Petersen CA, Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa A de A, Lima JW, Pearson RD 1992. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 166(5):1124-32.

Ferreira JH, Gentil LG, Dias SS, Fedeli CE, Katz S, Barbiéri CL 2008. Immunization with the cysteine proteinase Ldcccys 1 gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant Ldcccys 1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26(5):677-85.

Figueiredo WME de, Viana SM, Alves DT, Guerra PV, Coêlho ZCB, Barbosa HS, Teixeira MJ. Protection mediated by chemokine CXCL10 in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017; "in press".

Flores-García Y, Rosales-Encina JL, Rosales-García VH, Satoskar AR, Talamás-Rohana P 2013. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T reg cells induced by rSSP4 derived from *T. cruzi* amastigotes increase parasitemia in an experimental chagas disease model. *Biomed Res Int* 2013:632436

Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, Guo B, Herbert DR, Bulfone A, Trentini F, Di Serio C, Bacchetta R, Andreani M, Brockmann I, Gregori S, Flavell RA, Roncarolo MG 2013. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse t regulatory type 1 cells. *Nat med* 19(6):739-46.

Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM 1998. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 28(2):687-95.

Goto H, Prianti Md 2009. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51(5):241-6.

Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA 1990. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 145(12):4290-7.

Gupta G, Bhattacharjee S, Bhattacharyya S, Bhattacharya P, Adhikari A, Mukherjee A, Bhattacharyya Majumdar S, Majumdar S 2009. CXC chemokine-mediated protection against visceral leishmaniasis: involvement of the proinflammatory response. *J Infect Dis* 200(8):1300-10.

Gupta G, Majumdar S, Adhikari A, Bhattacharya P, Mukherjee AK, Majumdar SB, Majumdar S 2011. Treatment with IP-10 induces host-protective immune response by regulating the T regulatory cell functioning in *Leishmania donovani*-infected mice. *Med Microbiol Immunol* 200(4):241-53.

Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, Tsukumo S, Yasutomo K 2004. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Med* 10(1):29-30.

Holzmuller P, Cavaleyra M, Moreaux J, Kovacic R, Vincendeau P, Papierok G, Lemesre JL 2005. Lymphocytes of dogs immunized with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN-gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigotes apoptosis. *Vet Immunol Immunopathol* 106(3-4): 247-57.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299(5609):1057-61.

Huynh C, Andrews NW 2008. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. *Cell Microbiol* 10(2):293-300.

Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, Stäger S 2009. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog* 5(5):e1000431.

Karmakar S, Paul J, De T 2011. *Leishmania donovani* glycosphingolipid facilitates antigen presentation by inducing relocation of CD1d into lipid rafts in infected macrophages. *Eur J Immunol* 41(5):1376-87.

Kaye PM, Beattie L 2016. Lessons from other diseases: granulomatous inflammation in leishmaniasis. *Semin Immunopathol* 38(2):249-60.

kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, Zubairi S, Engwerda CR 2004. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 201:239-53.

Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR 2006. Tregulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4T cell by converting 5'adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 177(10):6780-6.

Lainson R, Ryan L, Shaw JJ 1987. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82(3):421-4.

Lang T, Lecoer H, Prina E 2009. Imaging *Leishmania* development in their host cells. *Trends Parasitol* 25(10):464-73.

Lee EY, Lee ZH, Song YW 2009. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 8(5):379-83.

Maghazachi AA, Skalhegg BS, Rolstad B, Al-Aoukaty A 1997. Interferon-inducible protein-10 and lymphotactin induce the chemotaxis and mobilization of intracellular calcium in natural killer cells through pertussis toxin-sensitive and -insensitive heterotrimeric G-proteins. *FASEB J* 11(10):765-74.

Mantovani A, Bonecchi R, Locati M 2006. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol* 6(12):907-18.

Martin S, Agarwal R, Murugaiyan G, Saha B 2010. CD40 expression levels modulate regulatory T cells in *Leishmania donovani* infection. *J Immunol* 185(1):551-9.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16(5):188-9.

McElrath MJ, Murray HW, Cohn ZA 1988. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. *J Exp Med* 167(6):1927-37.

Mebius RE, Kraal G 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5(8):606-16.

Mege JL, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D 2006. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 6(9):557-69.

Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 166(3):1912-20.

Missawa NA, Veloso MA, Maciel GB, Michalsky EM, Dias ES 2011. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 44(1):76-8.

Mohan K, Cordeiro E, Vaci M, McMaster C, Issekutz TB 2005. CXCR3 is required for migration to dermal inflammation by normal and *in vivo* activated T cells: differential requirements by CD4 and CD8 memory subsets. *Eur J Immunol* 35(6):1702-11.

Mohrs M, Ledermann B, Köhler G, Dorfmueller A, Gessner A, Brombacher F 1999. Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J Immunol* 162(12):7302-8.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'garra A 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.

Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25(2):75-84.

Muller K, Van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, N. Jahnke Solbach W, Laskay T 2001. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 190(1-2):73-6.

Murdoch C, Finn A 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95(10):3032-43.

Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP 2001. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 31(10):2848-56.

Murray HW 2001. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 82(5):249-67.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saraiva NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366(9496):1561-77.

Murray HW, Luster AD, Zheng H, Ma X 2016. Gamma interferon-regulated chemokines in *Leishmania donovani* infection in the liver. *Infect Immun* 85(1).

Murray HW, Moreira AL, Lu CM, Devecchio JL, Matsushashi M, Ma X, Heinzl FP 2003. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 188 (3):458-64.

Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Júnior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS, de Jesus A, de Almeida RP, da Silva JS. Interleukin 17A acts synergistically with interferon  $\gamma$  to promote protection against *Leishmania infantum* infection 2015. *J Infect Dis* 211(6):1015-26.

National Institutes of Health, Rasband WS, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2012, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.

Nieto A, Domínguez-Bernal G, Orden JA, De la Fuente R, Madrid-Elena N, Carrión J 2011. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet Res* 42:39.

Ngo VN, Korner H, Gunn MD, Schmidt KN, Riminton DS, Cooper MD, Browning JL, Sedgwick JD, Cyster JG 1999. Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J Exp Med* 189(2):403-12.

Nylén S, Sacks D 2007. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 28(9):378-84.

Oghumu S, Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Satoskar AR 2010. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp Parasitol* 126(3):389-96.

Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, Dos Santos L, O'Brien S, Blank R, Lamb E, Natarajan S, Kastenmayer R, Hunter C, Grigg ME, Belkaid Y

2009. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 31(5):772-86.

Owens BM, Beattie L, Moore JW, Brown N, Mann JL, Dalton JE, Marrof A, Kaye PM 2012. IL-10 producing Th1 cells and disease progression are regulated by distinct CD11c<sup>+</sup> cell populations during visceral leishmaniasis. *PloS Pathog* 8(7):e1002827.

PAHO-WHO, 2014. Disponível em: <  
[http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6420&Itemid=39347&lang=en](http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420&Itemid=39347&lang=en)> acesso em 21 de abr. de 2017.

Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ 2007. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8(12):1353-62.

Paredes R, Munoz J, Diaz I, Domingo P, Gurgui M, Clotet B 2003. Leishmaniasis in HIV infection. *J Postgrad Med* 49:39-49.

Pearson RD, Sousa AQ 1996. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 22(1):1-13.

Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, Hou TZ, Futter CE, Anderson G, Walker LS, Sansom DM 2011. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332(6029):600-3.

Rangel EF, Vilela ML 2008. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 24(12):2948-52.

Reiner NE, Ng W, Wilson CB, McMaster WR, Burchett SK 1990. Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J Clin Invest* 85(6):1914-24.

Resende M, Moreira D, Augusto J, Cunha J, Neves B, Cruz MT, Estaquier J, Cordeiro-da-Silva A, Silvestre R 2013. *Leishmania*-infected MHC class II high dendritic cells polarize CD4+ T cells toward a nonprotective T-bet+ IFN-γ+ IL-10+ phenotype. *J Immunol* 191(1):262-73.

Ritter U, Korner H 2002. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology* 24(6):295–301.

Ritter U, Moll H 2000. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *Eur J Immunol* 30(11):3111-20.

Rodrigues OR, Marques C, Soares-Clemente M, Ferronha MH, Santos-Gomes GM 2009. Identification of regulatory t cells during experimental *Leishmania infantum* infection. Immunobiology 214(2):101-11.

Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J 2016. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. Parasit Vectors 9:118.

Romero GA, Boelaert M 2010. Control of visceral leishmaniasis in latin America-a systematic review. Plos Negl Trop Dis 4(1):e584.

Rosas LE, Barbi J, Lu B, Fujiwara Y, Gerard C, Sanders VM, Satoskar AR 2005. CXCR3-/- mice mount an efficient Th1 response but fail to control *Leishmania major* infection. Eur J Immunol 35(2):515-23.

Rossi D, Zlotnik A 2000. The biology of chemokines and their receptors. Annual Rev Immunol 18:217-42.

Rot A, Von Andrian UH 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. Ann Rev Immunol 22: 891–928.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 155(3):1151-64

Santana CC, Vassallo J, de Freitas LA, Oliveira GG, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WL 2008. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. Parasite Immunol 30(10):515-24.

Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of american visceral leishmaniasis. Med Vet Entomol 12(3):315-7.

Sarris AH, Broxmeyer HE, Wirthmueller U, Karasavvas N, Cooper S, Lu L, Krueger J, Ravetch JV 1993. Human interferon-inducible protein 10: expression and purification of recombinant protein demonstrate inhibition of early human hematopoietic progenitors. J Exp Med 178(3):1127-32.

Sato N, Kuziel WA, Melby PC, Reddick RL, KostECKI V, Zhao W, Maeda N, Ahuja SK, Ahuja SS 1999. Defects in the generation of IFN- $\gamma$  are overcome to control infection with *Leishmania donovani* in CC chemokine receptor (CCR)5-, macrophage inflammatory protein-1- $\alpha$ , or CCR2-deficient mice. The Journal of Immunology 163:5519-25.

Saunders J, Tarby CM 1999. Opportunities for novel therapeutic agents acting at chemokine receptors. Drug Discovery Today 4(2):80-92.

Schaut RG, Lamb IM, Toepp AJ, Scott B, Mendes-Aguiar CO, Coutinho JF, Jeronimo SM, Wilson ME, Harty JT, Waldschmidt TJ, Petersen CA 2016. Regulatory IgDhi B



Cells Suppress T Cell Function via IL-10 and PD-L1 during Progressive Visceral Leishmaniasis. *J Immunol* 196(10):4100-9.

Schleicher U, Liese J, Knippertz I, Kurzmann c, Hesse A, Heit A, Fischer JA, Weiss S, Kalinke U, Kunz S, Bogdan C 2007. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *J Exp Med* 204(4):893-906.

Sevá AD, Mao I, Galvis-Ovallos F, Tucker Lima JM, Valle D 2017. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo state, Brazil. *Plos Negl Trop Dis* 11(2):e0005353.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S 2002. Stimulation of CD25(+) CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3(2):135-42.

Smelt SC, Engwerda CR, McCrossen M, Kaye PM 1997. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *J Immunol* 158(8):3813-21.

Soong L 2008. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J Immunol* 180(7):4355-60.

Souza AS, Giudice A, Pereira JM, Guimarães LH, de Jesus AR, de Moura TR, Wilson ME, Carvalho EM, Almeida RP 2010. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- $\alpha$  production. *BMC Infect Dis* 10: 209.

Souza APL de, Jesus JR de, Teixeira MC. Estudo retrospectivo da epidemiologia da leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul: revisão de literatura. *Veterinária em Foco*, [S.l.], v. 11, n. 2, p. 112-118, feb. 2014. ISSN 1679-5237. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/vetfoco/article/view/31182/34293>>. Acesso em: 19 apr. 2017.

Springer TA 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell Press* 76(2):301-14.

Stäger S, Alexander J, Carter KC, Brombacher F, Kaye PM 2003. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infect Immun* 71(8):4804-7.

Stanley AC, Engwerda CR 2007. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol* 85(2):138-47.

Sukumaran B, Madhubala R 2004. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Curr Mol Med* 4(6):667-79.

Svensson M, Zubairi S, Maroof A, Kazi F, Taniguchi M, Kaye PM 2005. Invariant NKT cells are essential for the regulation of hepatic CXCL10 gene expression during *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 73(11):7541-7.

Taswell C 1984. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. III. Validity tests for the single-hit Poisson model. *J Immunol Methods* 72(1):2940.

Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ 1993. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 177(6):1809-14.

Teixeira MJ, Teixeira LR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A 2006. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 22(1):32-40.

Thelen M 2001. Dancing to the tune of chemokines. *Nature Immunology* 2(2):129-34.

Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA 1985. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol* 7 (5):545-55.

Van Assche T, Deschacht M, Da Luz RA, Maes L, Cos P 2011. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med* 51(2):337-51.

Varma N, Naseem S 2010. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. *Indian J Hematol Blood Transfus* 26(3):78-82.

Vasquez RE, Soong L 2006. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. *Infection and Immunity* 74(12):6769-77.

Vester B, Muller K, Solbach W, Laskay T 1999. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect Immun* 67(6):3155-9.

Vouldoukis I, Bécherel PA, Riveros-moreno V, Arock M, da Silva O, Debré P, Mazier D, Mossalayi MD 1997. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur J Immunol* 27(4): 860-5.

Wang HC, Dann SM, Okhuysen PC, Lewis DE, Chappell CL, Adler DG, White Jr AC 2007. High levels of CXCL10 are produced by intestinal epithelial cells in AIDS patients with active cryptosporidiosis but not after reconstitution of immunity. *Infect Immun* 75 (1):481-7.

WHO, 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> acesso em 20 de abr. 2017

Wilson ME, Jernimo SM, Pearson RD 2005. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *MicrobPathog* 38(4):147-60.

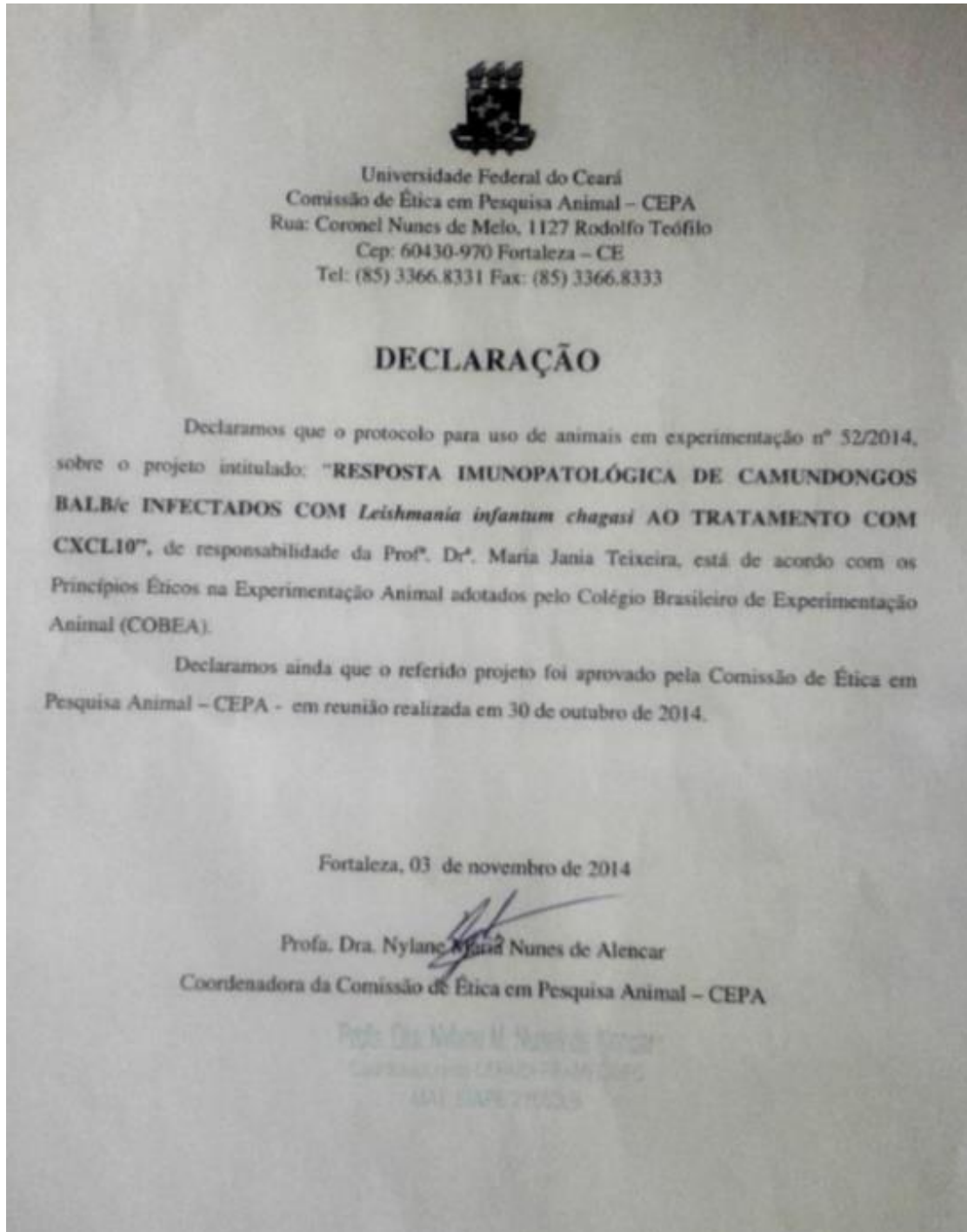
Yao Y, Vent-Schmidt J, McGeough MD, Wong M, Hoffman HM, Steiner TS, Levings MK 2015. Tr1 cells, but not foxp3+ regulatory T cells, suppress NLRP3 inflammasome activation via an IL-10-dependent mechanism. *J Immunol* 195 (2):488-97.

Zecca C, Nessi F, Bernasconi E, Gobbi C 2009. Ocular toxoplasmosis during natalizumab treatment. *Neurology* 73 (17):1418-9.

Zhu J, Yamane H, Paul WE 2010 Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol* 28:445-89.

## 8. APÊNDICES

### APÊNDICE 1: Aprovação do Projeto no Comitê de Ética



**APÊNDICE 2: MANUSCRITO 1 (PUBLICADO NA REVISTA MEMÓRIAS DO  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ)**

## Protection mediated by chemokine CXCL10 in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*

Webertty Mayk Eufrásio Figueiredo<sup>1</sup>, Sayonara de Melo Viana<sup>1</sup>, Dorotheia Teixeira Alves<sup>1</sup>, Priscila Valera Guerra<sup>1</sup>, Zirlane Castelo Branco Coêlho<sup>2</sup>, Helene Santos Barbosa<sup>3</sup>, Maria Jania Teixeira<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Fortaleza, CE, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Departamento de Análise Clínica, Fortaleza, CE, Brasil

<sup>3</sup>Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Estrutural, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**BACKGROUND** Visceral leishmaniasis (VL) caused by *Leishmania infantum* is characterised by the loss of the ability of the host to generate an effective immune response. Chemokines have a direct involvement in the pathogenesis of leishmaniasis, causing a rapid change in the expression of these molecules during infection by *Leishmania*.

**OBJECTIVES** Herein, it was investigated the role of CXCL10 in controlling infection by *L. infantum*.

**METHODS** RAW 264.7 macrophages were infected with *L. infantum* *in vitro* and treated or not with CXCL10 (25, 50 and 100 ng/mL). Parasite load, as well as nitric oxide (NO), IL-4 and IL-10 production were assessed at 24 and 48 h after infection. *In vivo*, BALB/c mice were infected and treated or not with CXCL10 (5 µg/kg) at one, three and seven days of infection. Parasite load, IFN-γ, IL-4, TGF-β and IL-10 were evaluated one, seven and 23 days post treatment.

**FINDINGS** *In vitro*, CXCL10 reduced parasitic load, not dependent on NO, and inhibited IL-10 and IL-4 secretion. *In vivo*, CXCL10 was able to reduce the parasite load in both liver and spleen, four weeks after infection, representing a higher decrease in the number of parasites in these organs, also induced IFN-γ at day 23 after treatment, correlating with the decrease in parasite load, and reduced IL-10 and TGF-β.

**MAIN CONCLUSIONS** This study suggests a partial protective role of CXCL10 against *L. infantum*, mediated by IFN-γ, not dependent on NO, and with suppression of IL-10 and TGF-β. These data may provide information for the development of new approaches for future therapeutic interventions for VL.

Key words: *L. infantum* - CXCL10 - mice - nitric oxide - cytokines - macrophages

Visceral leishmaniasis (VL) is caused by protozoa of the genus *Leishmania*, in the Americas by *L. chagasi* (*L. infantum* synonymy) (Mauricio et al. 2000) and in the Old World by *L. donovani* and *L. infantum* (Piscopo & Mallia 2006). These species, known as viscerotropic, preferably infect macrophages and dendritic cells in the bowels, and parasites are promptly found in the liver, spleen and bone marrow (Wilson et al. 2005). The clinical manifestations of the disease can vary from asymptomatic infection to a progressive visceral disease, which if untreated can lead to death and is characterised by fever, weight loss, hypergammaglobulinemia, hepatosplenomegaly, anemia, thrombocytopenia, leukopenia and immunosuppression (Piscopo & Mallia 2006).

Several experimental models of VL in rodents have been developed, and although none completely reproduced the human disease, the studies using these models have been shown to be very important because they allow investigating the immunological mechanisms and histo-

pathological aspects of the disease (Wilson et al. 2005, Nieto et al. 2011). BALB/c mice, when infected by *L. donovani* or *L. infantum*, can resolve the infection spontaneously after some time. In these animals, the effect of IL-12 is delayed for four weeks after infection, at which occurs the appearance of lymphocytes producing IFN-γ antigen-specific, granuloma formation in the liver, and development of an antigen-specific response of CD4+ and CD8+ cells (Wilson et al. 2005). A remarkable feature of the experimental infection of mice with the viscerotropic species of *Leishmania* is the distinct organ-specific immune response. An acute infection occurs in the liver, which can be resolved between the 4th and 6th week of infection, with subsequent immunity to re-infection, while in the spleen, the parasites may persist (Stanley & Engwerda 2007). The control of liver disease in mice requires a coordinated response of the host, involving the development of granulomas around the infected macrophages (Murray et al. 2002, Nieto et al. 2011). In contrast, spleen and bone marrow become chronically infected by mechanisms that are not well understood. In the spleen, the persistence of the parasite is accompanied by a failure in the formation of granulomas, splenomegaly, and disruption of lymphoid tissue microarchitecture (Wilson et al. 2005, Stanley & Engwerda 2007, Nieto et al. 2011).

Several studies have shown that chemokines have a direct involvement in the pathogenesis of leishmaniasis, causing a rapid change in the expression of these

doi: 10.1590/0074-02760160529

Financial support: CNPq, CAPES, CAPES-Programa DINTER (Doutorado Interinstitucional) Medicina Tropical 309/2013.

+ Corresponding author: mjteixeira601@gmail.com

Received 12 December 2016

Accepted 4 March 2017



molecules during infection by *Leishmania* (Teixeira et al. 2006). In the liver, at the beginning of infection, parasitised Kupffer cells secrete chemokines such as CCL3, CCL2 and CXCL10, which stimulate the recruitment of monocytes and granulocytes (Stanley & Engwerda 2007). CXCL10 belongs to a large subpopulation of cytokines, which are critical mediators to the function of leukocytes, polarisation of Th1 cells, and activation and trafficking of cells involved in inflammatory responses (Teixeira et al. 2006). CXCL10 binds with high affinity to its CXCR3 receptor (Chen et al. 2004), known to be expressed in many cell types, including CD4+, CD8+, memory cells, NK cells and some subpopulations of dendritic cells (Mohan et al. 2005). Injection of CXCL10 in BALB/c mice infected with *L. major* has been shown to induce a strong recruitment and activation of NK cells (Müller et al. 2001). Exogenous CXCL10 is able to reduce the parasitic load of macrophages infected with *L. amazonensis* *in vitro*, and in BALB/c mice infected with *L. amazonensis*, can decrease the size of the lesion and parasite load, followed by an increase in IFN- $\gamma$ , IL-12 and nitric oxide (NO) (Vásquez & Soong 2006). In VL, studies in BALB/c mice have shown that CXCL10 is involved in the protective response of infection by *L. donovani*, inducing a Th1 response through the regulation of the pathway of inflammatory mediators, such as NO and inflammatory cytokines (Gupta et al. 2009). CXCL10 may participate in the protection against *L. donovani* with remarkable decrease of immunoregulatory cytokines, IL-10 and TGF- $\beta$ , secreted by T CD4+ cells (Gupta et al. 2011).

Herein, it was assessed whether treatment with CXCL10 would confer protection against infection by *L. infantum* in macrophages and in BALB/c mice.

#### MATERIALS AND METHODS

**Animals** - A total of 108 BALB/c mice, male, eight weeks old, obtained from the Biotério Central do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, CE, Brazil (DPML/UFC-CE), were used in the experiments. The animals were maintained at 25°C with appropriate commercial ration and water *ad libitum*. The project was approved by Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) at the UFC, under registration number 52/2014.

**Parasites** - Promastigotes of *L. infantum* (MHOM/BR/BA-262) were maintained in a golden hamster. After being recovered from the animal, the parasites were cultured at 25°C in N.N.N. medium, containing Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 20% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 2% sterile human urine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin) (all Sigma-Aldrich). The virulence of the strain was maintained by regular passage in a golden hamster. For infection, the parasites were used until the 5th passage, *in vitro*.

**In vitro assays with macrophages** - RAW 264.7 macrophages culture were centrifuged at 400 x g for 15 min at 5°C, and the cell suspension was adjusted in RPMI 1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine (all from Sigma-Aldrich). Then, the cells were distributed in 24-well plates, each well containing

a round glass coverslip of 23 mm at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/coverslip. Macrophages were incubated for 24 h with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and 95% humidity. Cells not adhered were removed by washing with warm RPMI (37°C; three times) and cultured with RPMI supplemented with or without *L. infantum* live promastigotes, a ratio of 10:1 cell parasites for 12 h. Extracellular parasites were removed by washing (three times) with warm RPMI (37°C). After this period, the cells were treated with 16 mg/mL of pentavalent antimony (Glucantime), CXCL10 (25, 50 and 100 ng/mL) and LPS (20 ng/mL; positive control) and then were cultured for 24 and 48 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. Culture supernatants were collected at 24 and 48 h to the dosage of cytokines and NO.

**Determination of macrophage infection** - To quantify the level of infection of macrophages, coverslips containing the cells were washed with saline, and then fixed and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich). Stained coverslips were mounted on slides and examined under optical microscopy at a magnification of 100 X. The slides were examined to determine the number of amastigotes/50 macrophages.

**NO assay** - Macrophages culture supernatants were tested for NO release in the form of nitrite (NO<sub>2</sub>) by the Griess reaction. The supernatants were incubated with freshly prepared Griess reagent (1:1 v/v) for 10 min at room temperature. The absorbance was measured spectrophotometrically at 540 nm and the NO<sub>2</sub> concentration determined using a standard curve of sodium nitrite and expressed as  $\mu$ mol/mL. To avoid interference from NO<sub>2</sub> possibly present in the medium, a white test was performed for each experiment.

**Infection and treatment with CXCL10 in BALB/c mice** - Metacyclic promastigotes at the stationary phase were inoculated intraperitoneally into BALB/c mice (n = 36) at a concentration of  $2 \times 10^7$  parasites in 20  $\mu$ L of saline. The animals were divided into two groups, with 18 animals each. One group received CXCL10 (5  $\mu$ g/kg) (Thermo Scientific) and the other received saline (Untreated group) intraperitoneally after 1, 3 and 7 days of infection (Gupta et al. 2009). The animals were euthanised after 1, 7 and 23 days of treatment by inhalation of Halothane (Sigma-Aldrich). Six animals per group were euthanised on each period. The animals were weighed before starting treatment and every euthanasia to achieve a weight analysis.

**Determination of parasite numbers in liver and spleen** - The number of parasites in the liver and spleen was quantified using the technique of limiting dilution as previously described (Titus et al. 1985). Briefly, the animals were euthanised and submerged in 3% iodised alcohol up to 3 min to allow decontamination. Then the spleen and liver were removed aseptically, weighed, and one fragment from each organ (spleen: from 0.067 to 0.070 g; liver: from 0.26 to 0.30 g) was homogenised in 1 mL of Schneider medium and left to rest for 5 min. Eight dilutions were made from this cell suspension (10, 50, 100, 500, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup>) in Schneider's medium supplemented with 20% FBS, 2% sterile human urine, and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100

$\mu\text{g/mL}$  streptomycin) (All from Sigma-Aldrich). One hundred microliters of these dilutions were distributed into 96-well plates, flat bottom, and six wells/dilution. The plates were sealed and incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  for three weeks. The wells were observed on an inverted optical microscope (Nikon) every 3 days to record the dilutions containing promastigotes. The final number of parasites was determined using the ELIDA 12c software.

**Culture of splenocytes** - Spleen cells were isolated from animals infected with *L. infantum* promastigotes, treated or untreated with CXCL10 (six animals per group) and separated by centrifugation with Ficoll,  $800 \times g$  for 30 min at  $25^{\circ}\text{C}$ , after one, seven and 23 days after treatment. The cells were washed with RPMI  $400 \times g$  for 15 min at  $5^{\circ}\text{C}$  and then cultured in 96-well plates ( $1 \times 10^6$  cells/mL) in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS),  $50 \mu\text{M}$  2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin) with or without live promastigotes at a concentration of  $1 \times 10^7/\text{mL}$ , at  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . As control, cells were isolated for the spleen of non-infected BALB/c mice. The supernatants were collected after 48 h and preserved at  $-20^{\circ}\text{C}$  for subsequent dosing of cytokines.

**Cytokines assay** - Levels of cytokines obtained from both the culture of macrophages (only IL-4 and IL-10) and culture of splenocytes (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$ ) were determined using the ELISA technique as recommended by the kit manufacturer (BD Biosciences). The results were analysed using the Softmax PRO software (Molecular Devices).

**Statistical analysis** - *t*-Student test was applied to verify the statistical significance between the treated and the untreated group. For comparisons between multiple groups it was used the one-way ANOVA test, followed by Bonferroni post-test. The tests were performed using GraphPad Prism Software version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results are presented as arithmetic mean and standard error of the mean. In all tests, the minimum significance was accepted when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

**Parasite load in macrophages** - Treatment with CXCL10 resulted in a significant reduction of the parasitic load at concentrations of 50 ng/mL (70.3%) and 100 ng/mL (74.0%) compared to Glucantime (50.4%) and untreated animals, after 24 h (Fig. 1A). After 48 h, treatment with CXCL10 maintained reduction in the number of intracellular parasites at concentrations of 50 ng/mL (70%) and 100 ng/mL (72.6%) when compared to Glucantime (61.8%) and untreated (Fig. 1B).

**NO production by macrophages** - After 24 h, NO production behaved in a dose-dependent manner in samples that were treated with CXCL10, with a production average of from  $79 \mu\text{mol/L}$  to  $282 \mu\text{mol/L}$  (Fig. 2A). After 48 h, there was a reduction of NO production, CXCL10 induced average production ranging from  $52 \mu\text{mol/L}$  to  $164 \mu\text{mol/L}$ ; still showing a dose-dependence (Fig. 2B).

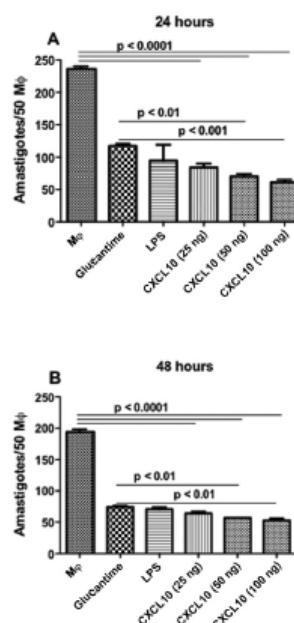


Fig. 1: number of parasites in macrophages infected with *Leishmania infantum* and treated or untreated with CXCL10. RAW 264.7 macrophages were infected with promastigotes of *L. infantum* (10 parasites: 1 macrophage) and after 12 h of infection the cells were treated *in vitro* with CXCL10 (25, 50 and 100 ng/mL), LPS (20 ng/mL) and Glucantime (16 mg/mL). After incubation 24 (A) and 48 h (B), the number of amastigotes per 50 macrophages was determined under an optical microscope. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean, and are representative of three independent experiments.

**Cytokine production in vitro** - Treatment with CXCL10 (100 ng/mL) in macrophages infected by *L. infantum* inhibited IL-4 production (significant at 24 h post-infection;  $p < 0.01$ ) and IL-10 ( $p < 0.001$ ) in two time periods (Fig. 3A-B). At 48 h after infection, the results were similar for both IL-4 and IL-10 (Fig. 3A-B).

**Relative weight of the liver and spleen** - The analysis of the relative weight of the spleen and liver was measured one, seven, 23 and 45 days after treatment. It was observed that on the 1st day after treatment, the treated and the untreated group showed no differences in the weight of the spleen, although the weight of the spleen of both groups (untreated:  $0.0056 \pm 0.003$ ; treated:  $0.0045 \pm 0.0004$ ) was slightly higher than those found in healthy animals ( $0.0042 \pm 0.0002$ ) (Fig. 4A). There was a decrease in spleen weight of the treated animals after the 7th day, unlike what happened with the untreated group, whose weights only decreased after 45 days of treatment, and yet were above the weight of the spleen of healthy animals. When the groups were compared, it was observed that there were differences between them on 7th day ( $p = 0.0286$ ) and 23 after treatment ( $p = 0.0033$ ) (Fig. 4A). Regarding the liver, it was observed that the weight of this organ decreased after the 7th day of treatment in treated animals, when compared



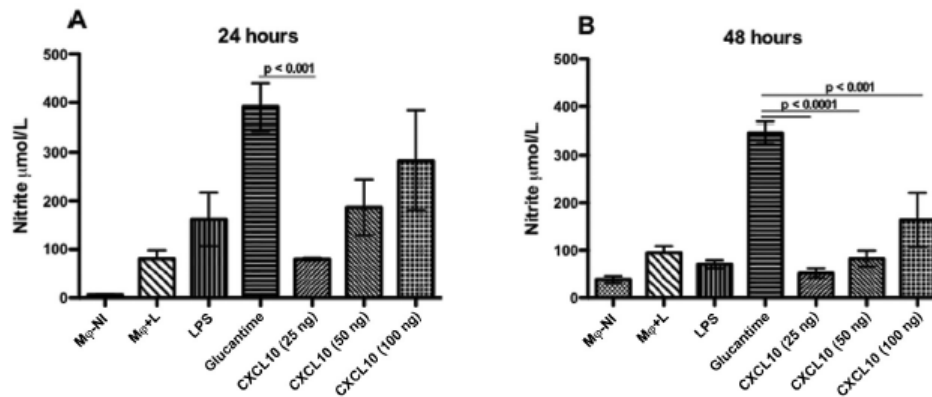


Fig. 2: nitric oxide (NO) by macrophages infected with *Leishmania infantum*, and treated or untreated with CXCL10. RAW 264.7 macrophages were infected and treated as described in Fig. 1. Culture supernatants were collected with 24 h (A) and 48 h (B) for the measurement of NO in the form of nitrite (NO<sub>2</sub>). The data represent the arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean, and are representative of three independent experiments. MØ+NI = macrophage not infected; MØ+L = macrophage infected with *L. infantum*.

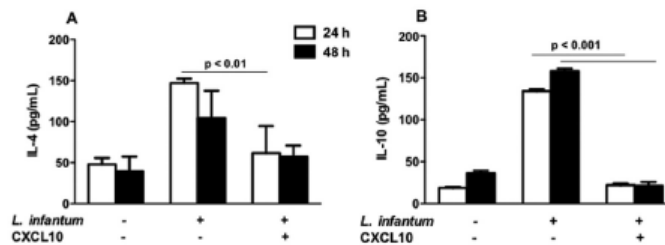


Fig. 3: production of IL-4 and IL-10 by macrophages infected with *Leishmania infantum* and treated or untreated with CXCL10. RAW 264.7 macrophages were infected with *L. infantum* and, after 12 h, treated *in vitro* with CXCL10 (100 ng/mL). Culture supernatants were collected with 24 h (A) and 48 h (B) for the measurement of cytokines. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean, and are representative of three independent experiments.

to untreated animals. Nevertheless, no difference was observed between the groups, although the liver weight in untreated animals showed a slight tendency to increase more than the treated animals, when compared with the liver weight of healthy animals (Fig. 4B).

**Number of parasites in the spleen and liver** - The results showed that after the 1st day of treatment, animals treated with CXCL10 showed no difference in the number of parasites in the spleen and liver when compared to untreated animals (Fig. 5A-B). As expected, the liver was the most infected organ in the early eight days of infection (means: one day after treatment), presenting in both groups (treated and untreated) a number of parasites near the 10<sup>6</sup> (Fig. 5B). On the other hand, it was found in the spleen approximately half of the initial inoculum, about 10<sup>4</sup> parasites in both groups (treated and untreated) (Fig. 5A). After seven days of treatment, the number of parasites in treated animals remained stable in both the spleen (approximately 10<sup>4</sup>) and the liver (approximately 10<sup>6</sup>) (Fig. 5A-B). After 23 days of treatment, there was a decline in the number of parasites in target organs in

both the treated and untreated groups. However, this decrease in parasite load was found to be significant only in the spleen of the treated group ( $p = 0.0272$ ), when compared to the untreated group (Fig. 5A). Even at that time, it was observed that in the treated group, in both organs, the number of parasites reached the lowest values (approximately 10<sup>2</sup> in spleen and 10<sup>3</sup> in the liver) (Fig. 5A-B). The group that received CXCL10 in different time periods showed that in the spleen there was a difference ( $p < 0.05$ ) between 1-23 days post treatment (Fig. 5A). In the liver, there was also a significant decrease ( $p < 0.05$ ) from day seven to day 23 post treatment in the treated group, showing a reduction in parasite load equivalent to that found in the spleen. Although there was an apparently similar reduction in liver rate between treated and untreated groups from day seven to day 23 post treatment, in fact, there was no statistical significance (Fig. 5B).

**Production of cytokine *in vivo*** - IFN- $\gamma$  was produced in a more outstanding way by splenocytes from treated animals than the untreated animals, in the three time periods evaluated (after one day,  $p = 0.0218$ ; seven days,  $p$

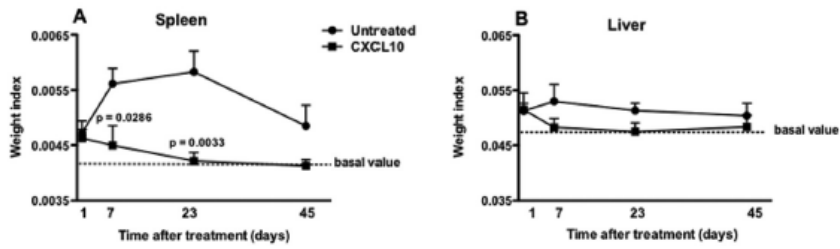


Fig. 4: parasite load in the spleen (A) and liver (B) of BALB/c mice infected with *Leishmania infantum* and treated (■) or untreated (□) with CXCL10. The animals were treated with CXCL10, intraperitoneally (5 µg/kg), or saline at one, three and seven days of infection. At one, seven, 23 and 45 days after the treatment the animals were euthanised and the spleen and liver were removed. Data from six animals per group are represented by arithmetic mean ± standard error of the mean, and are representative of three independent experiments. The dashed lines represent the arithmetic mean of the relative weight of spleen (0.0042) and liver (0.048) of six healthy animals (basal value).

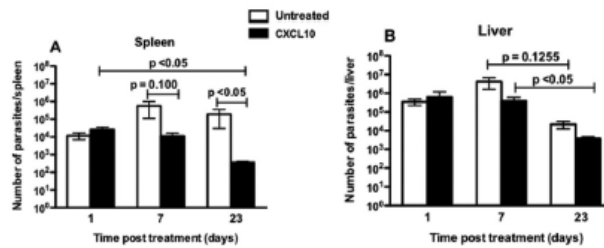


Fig. 5: parasite load in the spleen (A) and liver (B) of BALB/c mice infected with *Leishmania infantum* and treated or untreated with CXCL10. Animals were treated as described in Fig. 4. After one, seven and 23 days of treatment, animals were euthanised; the spleen and liver were removed and used for evaluating the parasite load. Data from six animals per group are represented by the arithmetic mean ± standard error of the mean, and are representative of three independent experiments.

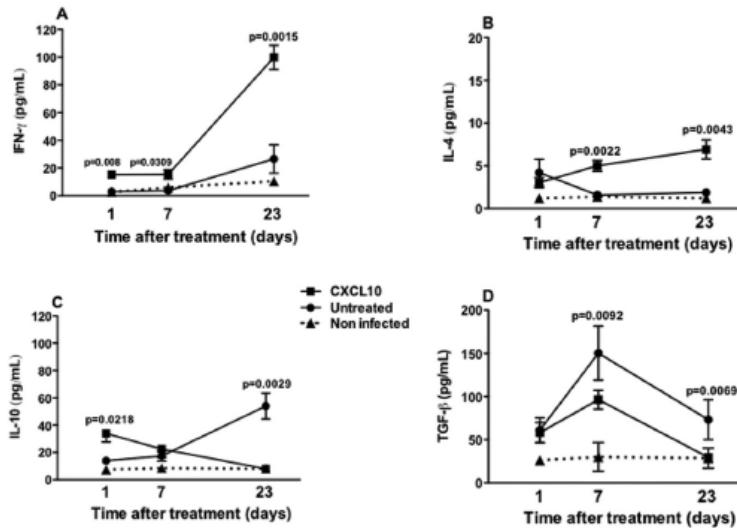


Fig. 6: production of IFN-γ (A), IL-4 (B), IL-10 (C) and TGF-β (D) by splenocytes from BALB/c mice infected with *Leishmania infantum* and treated (■) untreated (○) with CXCL10, or non-infected (NI) (▲). Animals were treated as described in Fig. 4. After one, seven and 23 days of treatment, the animals were euthanised to obtain the splenocytes. The supernatants of these cells were collected at 48 h for the measurement of the cytokines. Data from six animals per group are shown as the arithmetic mean ± standard error of the mean, and are representative of three independent experiments.

= 0.0309; and after 23 days of treatment,  $p = 0.0015$ ). In animals treated with CXCL10, IFN- $\gamma$  production reached its maximum value of 100 pg/mL at day 23 post treatment, which was equivalent to a five-fold increase relative to the initial concentration of 20 pg/mL ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6A). In both groups, IL-4 production remained always below of 10 pg/mL, at all three time periods evaluated (Fig. 6B). After the 1st day of treatment there was no difference between groups, however, in the last two days of the study it was observed that animals treated with CXCL10 induced a higher production of IL-4, compared with those untreated (seven days post treatment,  $p = 0.0022$ ; 23 days post treatment,  $p = 0.0043$ ) (Fig. 6B). In the animals treated with CXCL10, IL-10 production was twice as high as that of IFN- $\gamma$  at one and 23 days after treatment, reaching a concentration of approximately 40 pg/mL, and also significantly higher than that of untreated animals ( $p = 0.0218$ ) in the same time period (Fig. 6C). After seven days of treatment, there was no difference in IL-10 between CXCL10-treated and untreated animals, however, after 23 days, it fell significantly in the treated animals ( $p = 0.0029$ ) (Fig. 6C). By contrast, in the untreated group, the production of IL-10 remained growing, with about 60 pg/mL being detected after 23 days of treatment (Fig. 6C). Regarding TGF- $\beta$ , it was observed that the levels of this cytokine were always much higher when compared with the other cytokines evaluated. After the 1st day of treatment, both the untreated and the treated group had similar levels of TGF- $\beta$ , about 50 pg/mL (Fig. 6D). After seven days of treatment, the production of TGF- $\beta$  was lower in the treated group, about 100 pg/mL, lower than that produced by the untreated group (150 pg/mL;  $p = 0.0092$ ) (Fig. 6D). After 23 days of treatment, the production of this cytokine decreased in both groups (treated and untreated) (Fig. 6D).

#### DISCUSSION

This study evaluated the potential of CXCL10 in controlling infection caused by *L. infantum* using *in vitro* and *in vivo* models of VL. *In vitro*, CXCL10 (100 ng/mL) was able to reduce by 74.0% the intracellular parasite burden compared to infected and untreated macrophages. Also, *in vivo*, it was observed that treatment with CXCL10 was able to reduce the parasite load in both liver and spleen, four weeks after infection, representing a higher decrease in the number of parasites in these organs. This decrease in the number of parasites in the spleen correlated with the decrease in size of this organ in treated animals compared to untreated animals. During infection by *L. infantum* in mice, the amastigotes multiply rapidly during the first two weeks in the liver and disappear spontaneously around the 8th week of infection, whereas in the spleen parasites grow more slowly, leading to a chronic infection in this organ (Nieto et al. 2011). The results of parasite load found in this study corroborate the findings of the literature and more importantly, suggest a protective role of CXCL10 in infection by *L. infantum*, since this chemokine was able to induce a augmented reduction in the number of parasites in the two target organs of the treated animals, which was not observed in the untreated group.

The probable effector mechanism of this parasitic reduction is related to macrophage activation induced by CXCL10, since it has been reported that some chemokines such as CCL2 and CXCL10, can activate macrophages to participate in reducing the number of parasites (Ritter & Moll 2000). Macrophages mediate *Leishmania* destruction mainly via reactive oxygen derivatives and NO production (Vouldoukis et al. 1997). Also, it has been showed that a phenotype of *L. infantum* was resistant to death by apoptosis mediated by NO (Holzmüller et al. 2005). In this present work, the reduction of parasites *in vitro* do not seem to depend exclusively of NO, since NO production decreased significantly in infected macrophages treated with CXCL10 when compared to those infected and not treated with the chemokine. Some species of *Leishmania* are resistant to the microbicidal action of NO, as some isolates of *L. braziliensis*, which exhibited higher intracellular growth even in the presence of LPS and IFN- $\gamma$  (Souza et al. 2010). There are reports that other oxygen metabolism products are involved in the respiratory burst in activated murine macrophages, such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), and thus would also be involved in the elimination of *Leishmania* (Van Assche et al. 2011) which corroborates the hypothesis suggested in the present work.

In murine models of VL, using BALB/c mice, the control of the disease depends on the magnitude of the Th1 cell response, leading to the production of IFN- $\gamma$ , the activation of macrophages (Kaye et al. 2004), the formation of mature hepatic granulomas as well as the production of reactive nitrogen species and oxygen intermediates, which are essential for the elimination of parasites within the Kupffer cells and dendritic cells (Murray 2001, Stanley & Engwerda 2007). The onset of the disease is associated with a decrease in the response to these factors, which helps the parasite to live and reproduce in the macrophage phagolysosome (Melby et al. 2001). It was found that IFN- $\gamma$  production in the group treated with CXCL10 was augmented when compared to the untreated group in the spleen. This production was significantly increased five times than the concentration produced after the first day of treatment, an increase that coincided with the decrease in parasite load after 23 days post treatment, strengthening the hypothesis of the protective role of CXCL10. Previous studies have demonstrated the importance of IFN- $\gamma$  in the control of visceral infection. Monocytes of healthy individuals previously treated with IFN- $\gamma$  produce, after infection with *L. donovani*, a greater amount of TNF- $\alpha$ , important cytokine in the host response to microbial infection (Reiner et al. 1990). Corroborating the high levels of IFN- $\gamma$  and the decrease of the parasite load, it was observed that CXCL10 induced a significant reduction in the production of IL-10 and TGF- $\beta$ , regulatory cytokines, suggesting that CXCL10 induced a important Th1 response in BALB/c mice infected with *L. infantum*.

The treatment with CXCL10 *in vitro* induced a significant decrease of IL-10, anti-inflammatory cytokine and present in high levels during the active stage of the disease. This data confirms the protective response represented by the reduction of the parasitic load, even with decreased



production of NO. On the animals receiving CXCL10, the concentration of IL-10 was 10 times lower than the concentration of IFN- $\gamma$ , however, despite CXCL10 have induced the reduction of TGF- $\beta$  concentration to close proximity to the concentration of IFN- $\gamma$ , the cytokine was still able to promote Th1 polarisation and reduction of parasite load. These data are consistent with other studies showing that IL-10 plays an important role in suppressing the protective immune response in murine VL (Murray et al. 2003). The association of immunosuppression induced by IL-10 in human VL is well established. Patients with active disease present high serum levels of IL-10, as well as increased expression of IL-10 mRNA in lesions. IL-10 is a regulatory cytokine that is induced as a homeostatic response, which protects tissues from collateral damage caused by excessive inflammation (Mege et al. 2006).

Recently, studies have also shown that treatment with CXCL10 results in protection *in vivo* against *L. donovani*, through significant reduction of the immunosuppressive cytokines, IL-10 and TGF- $\beta$ , due to modulation of regulatory T cells (Gupta et al. 2011). In the present study, the levels of TGF- $\beta$  in the animals treated with CXCL10 were always much higher than those of other evaluated cytokines. These results does not fully corroborated other studies suggesting that the role of TGF- $\beta$  in the control of parasite load and the resistance of the host, dependent of IFN- $\gamma$ , during infection by viscerotropic strains such as *L. donovani*, seems to be less important compared to IL-10 (Murray et al. 2005). Studies with animals deficient in IL-10 and TGF- $\beta$ , infected with *L. infantum* and treated with CXCL10 could perhaps clarify this issue.

Unlike the models of murine cutaneous leishmaniasis, in which IL-4 is associated with the Th2 response, in the model of infection by *L. donovani* there are studies showing that IL-4 does not exacerbate the disease and may in fact act in combating the parasite, which is rather paradoxical (Mohrs et al. 1999). These studies showed that IL-4 could act positively regulating immunity against *L. donovani* by increasing the number of mature granulomas and consequent reduction of parasite load in the liver (Stäger et al. 2003). Herein, the concentration of IL-4 in both groups always remained very low at all three time periods analysed. However, in treated animals it was observed greater production of IL-4 compared with the untreated group, concomitant to the earlier presence of mature granulomas in the livers of animals that received the chemokine (data not shown).

More recently, Murray et al. (2016), in experiment performed in the *L. donovani*-infected livers of gene-deficient C57BL/6 mice (CXCL10-/- and CXCR3-/-) showed that CXCL10 may promote anticipated granuloma assembly, however, may hinder early parasite control and may has no role in conversion of developing granulomas to histologically mature-appearing structures. Therefore, CXCL10 appears to paradoxically promote liver infection too.

Chemokines may act as promising new therapeutic agents to combat *L. donovani* because, among the types of cell-mediated response, some may induce polarisation of cell response of the Th1 type, able to fight infection (Gupta et al. 2009). Collectively, data from this study suggest an important protective role of CXCL10

in BALB/c mice infected with *L. infantum* mediated by a significant production of IFN- $\gamma$  and suppression of immunoregulatory cytokines, IL-10 and TGF- $\beta$ , leading to the hypothesis if it is not associated with a decrease in the frequency of regulatory T cells.

The beginning of an appropriate immune response is a challenge to control *Leishmania* infection. Recent approaches to the combination therapy, targeted delivery and use of immunological adjuvants are efforts to reduce the effective dosages of drugs available on the market associated with toxicity (Singh & Sundar 2014). The data from this study open perspectives for the development of new alternative therapeutic formulations for cutaneous leishmaniasis.

#### AUTHORS' CONTRIBUTION

WMEF - Planning and standardisation of assays, done *in vitro* and *in vivo* experiments, co-orientation of students, discussion and interpretation of results and paper write; SMV - done *in vitro* assays with macrophages and splenocytes cultures, dosing nitric oxide (NO) and cytokines from *in vitro* experiments, co-orientation of students, discussion and interpretation of results; DTA - done maintenance and growth curves of *Leishmania* cultures, *in vitro* assays with macrophages and splenocytes cultures, and discussion and interpretation of results; PVG - done infection, treatment and follow-up of the mice, dosing cytokines from *in vivo* experiments, co-orientation of students, discussion and interpretation of results; ZCBC - dosing cytokines from *in vivo* experiments, co-orientation of students, discussion and interpretation of results; HSB - co-orientation of students, discussion and interpretation of results and paper write; MJT - coordinator of work, planning assays, orientation of students, discussion and interpretation of results and paper write.

#### REFERENCES

- Chen J, Vistica BP, Takase H, Ham DI, Fariss RN, Wawrousek EF, et al. A unique pattern of up- and downregulation of chemokine receptor CXCR3 on inflammation-inducing Th1 cells. *Eur J Immunol.* 2004; 34(10): 2885-94.
- Gupta G, Bhattacharjee S, Bhattacharyya S, Bhattacharya P, Adhikari A, Mukherjee A, et al. CXC chemokine-mediated protection against visceral leishmaniasis: involvement of the proinflammatory response. *J Infect Dis.* 2009; 200(8): 1300-10.
- Gupta G, Majumdar S, Adhikari A, Bhattacharya P, Mukherjee AK, Majumdar SB, et al. Treatment with IP-10 induces host-protective immune response by regulating the T regulatory cell functioning in *Leishmania donovani*-infected mice. *Med Microbiol Immunol.* 2011; 200(4): 241-53.
- Holzmueller P, Cavaleyra M, Moreaux J, Kovacic R, Vincendeau P, Papierok G, et al. Lymphocytes of dogs immunized with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN-gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigotes apoptosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 106(3-4): 247-57.
- Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev.* 2004; 201: 239-53.
- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 2000; 16(5): 188-9.
- Mege JL, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6(9): 557-69.

- Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol.* 2001; 166(3): 1912-20.
- Mohan K, Cordeiro E, Vaci M, McMaster C, Issekutz TB. CXCR3 is required for migration to dermal inflammation by normal and in vivo activated T cells: differential requirements by CD4 and CD8 memory subsets. *Eur J Immunol.* 2005; 35(6): 1702-11.
- Mohrs M, Ledermann B, Köhler G, Dorfmueller A, Gessner A, Brombacher F. Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J Immunol.* 1999; 162(12): 7302-8.
- Müller K, van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, Jahnke N, Solbach W, et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol.* 2001; 190(1-2): 73-6.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saraiva NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005; 366(9496): 1561-77.
- Murray HW, Lu CM, Mauze S, Freeman S, Moreira AL, Kaplan G, et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun.* 2002; 70(11): 6284-93.
- Murray HW, Luster AD, Zheng H, Ma X. Gamma interferon-regulated chemokines in *Leishmania donovani* infection in the liver. *Infect Immun.* 2016; 85(1): e00824-16.
- Murray HW, Moreira AL, Lu CM, Devecchio JL, Matsuhashi M, Ma X, et al. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2003; 188(3): 458-64.
- Murray HW. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol.* 2001; 82(5): 249-67.
- Nieto A, Domínguez-Bernal G, Orden JA, de la Fuente R, Madrid-Elena N, Carrión J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet Res.* 2011; 42: 39.
- Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. *Postgrad Med J.* 2006; 82(972): 649-57.
- Reiner NE, Ng W, Wilson CB, McMaster WR, Burchett SK. Modulation of *in vitro* monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J Clin Invest.* 1990; 85(6): 1914-24.
- Ritter U, Moll H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *Eur J Immunol.* 2000; 30(11): 3111-20.
- Singh OP, Sundar S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. *Front Immunol.* 2014; 5: 296.
- Souza AS, Giudice A, Pereira JM, Guimarães LH, de Jesus AR, de Moura TR, et al. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-alpha production. *BMC Infect Dis.* 2010; 10: 209.
- Stäger S, Alexander J, Carter KC, Brombacher F, Kaye PM. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infect Immun.* 2003; 71(8): 4804-7.
- Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85(2): 138-47.
- Teixeira MJ, Teixeira LR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2006; 22(1): 32-40.
- Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol.* 1985; 7(5): 545-55.
- Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(2): 337-51.
- Vásquez RE, Soong L. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. *Infect Immun.* 2006; 74(12): 6769-77.
- Vouldoukis I, Bécherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debré P, et al. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur J Immunol.* 1997; 27(4): 860-5.
- Wilson ME, Jerônimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog.* 2005; 38(4): 147-60.

**APÊNDICE 3: MANUSCRITO 2 (SUBMETIDO PARA A  
REVISTA PARASITE & VECTORS)**

**Exogenous CXCL10 treatment promotes reduction of IL-10<sup>+</sup> regulatory T (Foxp3<sup>+</sup> and Tr1) cells with increased IFN- $\gamma$  in the spleen of BALB/c mice infected by *Leishmania infantum***

Webertty Mayk Eufrásio Figueiredo<sup>1</sup>, Fabiola Fernandes Heredia<sup>1</sup>, Aline Sombra Santos<sup>1</sup>, Robertada Rocha Braga<sup>2</sup>, Thially Braga Gonçalves<sup>3</sup>, Naya Lúcia de Castro Rodrigues<sup>4</sup>, Margarida Maria de Lima Pompeu<sup>1</sup>, Helene Santos Barbosa<sup>5</sup>, Maria Jania Teixeira<sup>1\*</sup>

1. Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Fortaleza, Ceará, Brasil
2. Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia, Fortaleza, Ceará, Brasil
3. Centro Universitário Leão Sampaio-UNILEAO, Faculdade de Biomedicina, Laboratório de Microbiologia, Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil
4. Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Departamento de Farmácia, Fortaleza, Ceará, Brasil
5. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Estrutural, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Corresponding author: Dr. Maria Jania Teixeira, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Alexandre Baraúna, 949, Fortaleza, CE, ZIP Code: 60430-160, Brazil

Phone: +55 (85) 3366-8311. E-mail: mjteixeira601@gmail.com

## Abstract

**Background:** Visceral leishmaniasis is caused by the protozoan *Leishmania infantum*, and when not treated, is fatal in over 95% of cases. The control of the disease depends on the magnitude of the Th1 cell response. Exogenous administration of chemokines has shown promising results in the treatment of visceral leishmaniasis. Herein, we investigated whether CXCL10 chemokine reduces IL-10<sup>+</sup>Treg cells and cytokines in the spleen of BALB/c mice infected by *L. infantum*. We also analyzed the morphological changes of the spleen after CXCL10 treatment.

**Methods:** BALB/c mice were infected and treated or not with CXCL10 (5µg/kg) at 1, 3 and 7 days of infection. IFN-γ and IL-10 were evaluated 1, 7 and 23 days post-treatment by ELISA. Phenotype and frequency of IL-10<sup>+</sup>Treg cells by flow cytometry, as well as analysis of the morphological changes of the spleen were evaluated 7, 23 and 45 days post-treatment by hematoxylin-eosin (H & E) staining.

**Results:** CXCL10 was able to induce IFN-γ and reduce IL-10 production, both significantly, at day 23 after treatment in splenocyte culture supernatant, correlating with the decrease in IL-10<sup>+</sup> regulatory T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> and Tr1) cells in the spleen. It was also observed a significant reduction of lymphoid hyperplasia in the spleen in the CXCL10-treated animals, and this was reflected in the lower spleen weight noticed in the chemokine-treated animals.

**Conclusions:** This study suggests a protective role of CXCL10 against *L. infantum* mediated by IFN-γ with suppression of IL10<sup>+</sup>Treg cells, and a lower lymphoid hyperplasia in the spleen. These data may provide information for the development of future therapeutic interventions, using CXCL10 as adjuvant in visceral leishmaniasis.

**Keywords:** CXCL10, *L. infantum*, mice, Treg cells, IL-10, IFN-γ, follicular hyperplasia, spleen.



## Background

Visceral leishmaniasis (VL) affects 500,000 people directly among ~350 million people at risk [1]. An estimated 200,000 to 400,000 new cases of VL occur worldwide each year, and Brazil is one of the seven countries that concentrate 90% of these cases [2]. In Brazil, the disease is caused by *L. chagasi* (*L. infantum* synonymy) [3]. Treatment of the disease demonstrates some problems, including toxic effects and resistance of strains to the currently used drugs [4, 5].

After stimulation of *Leishmania* antigens by antigen-presenting cells (APC), naive CD4<sup>+</sup> T cells (Th0) can expand and differentiate into Thelper1 (Th1) effector cell subset that is characterized by the presence of the master transcription factors (T-bet, STAT1 and STAT4), and is induced by a signature pattern of cytokines (IL-12, IL-27, and IFN- $\gamma$ ) [6, 7]. Th1 cells can mediate macrophage's leishmanicide mechanisms; in particular, these cells induce the production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), which are highly effective in killing intracellular amastigotes [8-10]. However, VL progresses even in the presence of detectable levels of Th1 cytokines, whose actions are neutralized by immunosuppressive factors, such as IL-10 cytokine [11-13].

Regulatory T (Treg) lineage is a cell subset regulatory that exhibits forkhead boxP3 (foxp3) as its transcription factor and regulates Th1 response. Foxp3<sup>+</sup>Treg cells are stimulated by IL-2, vit A, TGF- $\beta$ , and are regulated by IL-6, IL-17 and IL-23 cytokines [6, 7, 14]. Foxp3<sup>+</sup>Treg cells can be either thymic or extrathymic-derived. In the first case, the cells are named natural (nTreg) and the others are named adaptive (iTreg). Natural Treg cells differentiate in the thymus and then migrate to peripheral tissues, as iTreg cells differentiate in tissues and secondary lymphoid organs like the

spleen. Therefore, the peripheral population of Foxp3<sup>+</sup> Treg cells comprises both nTreg and iTreg cells [15].

In addition to the Foxp3<sup>+</sup>Treg cells, there is another type of CD4<sup>+</sup>Treg cells named Foxp3<sup>-</sup> type 1 regulatory T (Tr1) cells. These cells are induced in the periphery and have a pivotal role in promoting and maintaining tolerance in BALB/c mice [16]. There is still another Treg cell lineage not yet completely understood named Th3 [17].

In previous studies in the BALB/c mice infected with *Leishmania*, Treg cells presented different roles according to the species of *Leishmania* used in the infection, contributing either to the pathology and persistence or to resolution of the disease. In the case of *L. donovani*, evidence indicates that the induction of Treg cells results in aggravated infection [18]. Several cell-surface molecules participate in the mechanisms of immune regulation such as: CD25, CTLA4, CD73, GITR, and the coordinated expression of CD39/CD73 [19-23], among others.

In the spleen, the main characteristic of chronic VL is that the splenic architecture breaks down. In the presence of *Leishmania*, TNF- $\alpha$  starts to be produced in large quantity triggering production of IL-10 and depletion of marginal zone (MZ) macrophages [24]. In T cell areas at the periarteriolar lymphoid sheath (PALS), there is destruction of the gp38<sup>+</sup> stroma, loss of the reticular matrix and decrease in the production of CCL19 and CCL21, chemokines responsible for the recruitment to the PALS of naive T cells and dendritic cells [25]. The deletion of follicular dendritic cells (FDC) and disorganization of germinal centers (GC) prevent the long-term interactions between B cells and T follicular cells necessary for the generation of specific antibodies to frustrate the action of parasite [26].

Exogenous administration of chemokines has shown promising results in the treatment of VL. Studies with BALB/c mice have demonstrated that CXCL10 is involved in the protective response of *L. donovani* infection, inducing a Th1 response, by regulating the pathway of inflammatory mediators such as NO and pro-inflammatory cytokines [27]. CXCL10 may participate in protection against *L. donovani* with marked decrease of immunoregulatory cytokines, IL-10 e TGF- $\beta$ , secreted by Treg cells [11]. However, the influence of CXCL10 on Treg cells needs to be better studied in *L. infantum* infection, as well as its influence on the site of persistence of infection, the spleen.

In the present study, it was assessed whether treatment with CXCL10 would confer protection against *L. infantum* infection by regulating the induction of IL10<sup>+</sup>Treg cell populations and also whether treatment with CXCL10 would have repercussions on spleen changes that occur in visceral leishmaniasis.

## **METHODS**

### **Animals**

Male Balb/c mice (n = 162), at 6-8 weeks of age, with weights of 18-20g, were obtained from the Biotério Central do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML/UFC). The animals were housed under specific pathogen-free conditions (12 h light/12 h dark; temperature, 22–24 °C) with appropriate commercial ration and water ad libitum.

### **Parasites**

Promastigotes of *L. infantum* (MHOM/BR/BA-262) were maintained in a male golden hamster. After being recovered from the animal, the parasites were cultured at 25°C in N.N.N.medium, containing Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 20% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 2% sterile human urine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin) (all Sigma-Aldrich). The virulence of the strain was maintained by regular passage in a male golden hamster. For infection, the parasites were used until the 5<sup>th</sup> passage *in vitro*.

### **Infection and treatment with CXCL10**

Metacyclic promastigotes at the stationary phase were inoculated intraperitoneally into BALB/c mice at a concentration of  $2 \times 10^7$  parasites in 20  $\mu$ L of saline. The animals were divided into two groups, with 48 animals each. One group received CXCL10 (5  $\mu$ g/kg) (Thermo Scientific) and the other received saline (Untreated group) intraperitoneally after 1, 3 and 7 days of infection [27]. The animals were euthanized after 1, 7, 23 and 45 days of treatment by inhalation of Halothane

(Sigma-Aldrich). Six animals per group were euthanized on each period. The animals were weighed before starting treatment and euthanasia to achieve a weight analysis.

### **Culture of splenocytes**

Spleen cells were isolated from animals infected with *L. infantum* promastigotes, treated or untreated with CXCL10 (6 animals per group) and separated by centrifugation with Ficoll, 800 x g for 30 minutes at 25°C, after 1, 7 and 23 days post-treatment. The cells were washed with RPMI 400 x g for 15 minutes at 5°C and then cultured in 96-well plates ( $1 \times 10^6$  cells/mL) in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin) with or without live promastigotes at a concentration of  $1 \times 10^7$ /mL, at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As control, cells were isolated for the spleen of non-infected BALB/c mice (n = 4). The supernatants were collected after 48 hours and preserved at -20°C for subsequent cytokines assay.

### **Cytokines assay**

Levels of cytokines obtained from the culture of splenocytes (IFN- $\gamma$  and IL-10) were determined using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique as recommended by the kit manufacturer (BD Biosciences). The optical density (OD) of the plates was read at 450 nm using an ELISA reader and the concentrations were calculated using standard curves. The results were analyzed using the Softmax PRO software (Molecular Devices).

### **Assessment of regulatory T (Treg) cells in splenocytes**

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Treg cells from Balb/c mice were identified by PerCP Rat Anti-Mouse CD4 (REF: 553052), FITC Rat Anti-mouse CD25 (REF: 553071), APC Rat Anti-Mouse IL-10 (REF: 554468)(all BD Biosciences) and Anti-Mouse/Rat Foxp3 PE (REF: 12-5773)(eBioscience). Single-cell suspensions were obtained from spleens after 7, 23 and 45 days of treatment. Cells ( $1 \times 10^7$  cells/mL) were stained with anti-CD4 (0.2 $\mu$ g/test; clone RM4-5), anti-CD25 (0.5 $\mu$ g/test; clone 7DA) and anti-Foxp3 (0.2 $\mu$ g/test; clone FJK-16s) in accordance with the manufacturer's protocol. The cells were then measured and analyzed by flow cytometry.

### **Flow cytometry analysis**

For intracellular cytokine analysis, flow cytometry was performed for the determination of IL-10 produced by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg cells in differently treated mice at the single-cell level. For this, the splenocytes extracted from each BALB/c mice were adjusted to a final concentration of  $1 \times 10^6$  cell/mL, and were then subjected to contact with the solution GolgiStop (REF: 554724, BD Bioscience) for 6 hours at 4°C and protected from light. After this step, labeling was done first with the surface antibodies CD4, CD25 and their isotypes, right after the membranes were permeabilized through the FIX/PERM solution of FoxP3 Kit (REF:005523-00; eBioscience), allowing the binding of intracellular antibodies (Foxp3 and IL-10) and their isotypes. PFA 1% preserved the cells, in addition to storage at 4°C in the dark up to the time of acquisition 12 hours after. The splenocytes were analyzed on a Flow cytometer (FACS Calibur) using the Cell Quest program on at least 30,000 events.

## **Histopathological analysis**

The animals were euthanized by inhalation of Halothane (Sigma-Aldrich) in a hermetic chamber, after 7, 23 and 45 days of treatment, 6 animals at each time and for each group. Immediately after euthanasia, the mice were submitted to laparotomy for collection of the spleen. Each spleen was separately weighed for calculating the relative weight (spleen weight/body weight). The spleens were fixed in 10% buffered formaldehyde, processed, and then microsections of 5 $\mu$ m of the samples were made, and stained with hematoxylin and eosin (H & E) and reticulin (impregnation by AgNO<sub>3</sub>). For the analysis of the white pulp, photomicrographs of 10 fields of the spleen were taken in a 40x magnification. Lymphoid follicles were counted, and the total area of the white pulp on each slide was measured digitally by ImageJ® v.1.44 software [28].

## **Statistical analysis**

To verify the statistical significance between the treated group and the control group was applied t-Student test. Comparisons in more than two groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni post-test. The tests were performed using GraphPad Prism Software version 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results are presented as arithmetic mean  $\pm$  mean standard error. In all tests, the minimum significance was accepted when  $P < 0.05$ .

## Results

### IFN- $\gamma$ and IL-10 production in splenocytes cultures

The cytokine IFN- $\gamma$  was produced in a more outstanding way by splenocytes from CXCL10-treated animals when compared to untreated animals, in the all times periods evaluated post-treatment (1 day,  $p = 0.0218$ ; 7 days,  $p = 0.0309$ ; 23 days,  $p = 0.0015$ ). In the CXCL10-treated animals, IFN- $\gamma$  production reached its maximum value of 100 pg/mL at day 23 post-treatment, which was equivalent to a 5-fold increase relative to the initial concentration of 20 pg/mL ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1A). CXCL10 induced IL-10 production twice as high as that of IFN- $\gamma$  after 1 and 23 days of treatment, reaching a concentration of approximately 40 pg/mL, and also significantly higher than that of untreated animals ( $p = 0.0218$ ) in the same time period (Fig. 1B). After 7 days of treatment, there was no difference in IL-10 between the CXCL10-treated and untreated animals, however, after 23 days, IL-10 levels fell significantly in the treated animals ( $p = 0.0029$ ). On the contrary, in the untreated group, the production of IL-10 remained higher, and was yet detected after 23 days of treatment (Fig. 1B).

### Frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Treg cells in the spleen

The gating strategy of proportion of Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) and their expression levels of the cytokine IL-10 can be seen in Fig.2 (A, B and C). After 7 days of treatment, there was no difference in the frequency of CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Treg cells between the CXCL10-treated and untreated animals. However, in the last two days post-treatment (23 and 45 days) it was observed that animals treated with CXCL10 induced a lower frequency of CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>Treg cells, compared to untreated animals (23 days,  $p = 0.0159$ ; 45 days,  $p = 0.0079$ ) (Fig. 2D). In the



CXCL10-treated animals, the frequency of CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Treg cells reached its lowest value (approximately 15%) at 45 days post-treatment, which was equivalent to a reduction of approximately half, when compared to frequency at day 23 post-treatment that had been 30% ( $p = 0.0204$ )(Fig. 2D). On the contrary, in the untreated group, the cell frequency increased between days 7 and 23 post-treatment ( $p=0.0013$ ), and then it was maintained without significant decrease between 23 and 45 days post-treatment (Fig. 2D).

### **Frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>Treg (Tr1) cells in the spleen**

The gating strategy of proportion of Treg Tr1 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>) and their expression levels of the cytokine IL-10 can be seen in Fig.3 (A, B and C). After 7 days of treatment, it was observed that the frequency of CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>Treg cells in the CXCL10-treated animals was lower when compared to untreated animals ( $p=0.0195$ ), and after 23 days of treatment, it was observed that in the CXCL10-treated group this frequency was even lower (Fig. 3D). After 45 days of treatment, there was no difference in the frequency of CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>Treg cells between CXCL10-treated and untreated animals (Fig. 3D).

### **Repercussion of CXCL10 treatment in the spleen**

In the lymphoid follicle count/10 fields, no significant difference was observed between the groups (non-infected, treated and untreated) or in the relative area of white pulp (Fig. 4A, 4C and Table 1). However, white pulp hyperplasia in CXCL10-treated animals was lower than that observed in untreated animals, both at 7 days ( $p = 0.0286$ ) and at 23 days post-treatment ( $p = 0.0033$ ) (Fig. 4B and 4C).

### **Discussion**

CXCL10, IFN- $\gamma$ -inducing chemokine, is a cytokine that in the last year has been explored in the field of immunotherapy as a potential drug for visceral leishmaniasis. Its actions, such as leukocyte activation, balance between regulatory and effector T cells, chemotaxis, hematopoiesis and increased NK cell cytotoxicity [11], may be of great benefit for the treatment of leishmaniasis. This study evaluated the potential of CXCL10 in controlling infection caused by *L. infantum* using BALB/c mice model of visceral leishmaniasis, and having as main focus the infection in the spleen, since this is the organ of persistence of the disease.

In this study, CXCL10 was able to induce a significant increase in IFN- $\gamma$  levels and a decrease in IL-10 levels in the culture supernatant of splenocytes of BALB/c mice infected by *L. infantum* at 23 days post-treatment. In mice model of visceral leishmaniasis, the control of the disease depends on the magnitude of the Th1 cell response, leading necessarily to the production of IFN- $\gamma$  whose proinflammatory action is fundamental [29]. IL-10 is an immunoregulatory cytokine present in high levels during the active stage of the disease, and the association of immunosuppression induced by IL-10 in human visceral leishmaniasis is well

established. Patients with active disease present high serum levels of IL-10, as well as increased expression of IL-10 mRNA in lesions. IL-10 is induced as a homeostatic response, which protects tissues from collateral damage caused by excessive inflammation [30, 31]. Mice IL-10-deficient or, on the other hand, mice that experienced a blockade in IL-10 signaling were highly resistant against *L. donovani* [32, 33].

Recently, it has been shown that the CXCL10 treatment was able to induce, in the murine model, a higher production of Th1 cytokines, such as IFN- $\gamma$  and IL-12, and reduction of levels of the suppressor cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  [11, 28]. IL-10 and TGF- $\beta$  are produced by Th2 and Treg cells acting on immunosuppression, which aggravate visceral leishmaniasis [11]. In addition, the fact that IL-10 was reduced 10-fold in the CXCL10-treated group in the present study led us to hypothesize that IL-10 reduction could be related to Treg cells. We therefore decided to investigate whether the reduction in IL-10 levels induced by CXCL10 was also related to the decrease in Treg cells.

CXCL10 treatment demonstrated that the frequency of CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells producing IL-10 was significantly lower in the last two days post-treatment (23 and 45 days) when compared to the untreated group. These results corroborate to recent study, which has shown CXCL10 treatment results in protection *in vivo* against *L. donovani*, through significant reduction of the immunosuppressive cytokines IL-10 due to modulation of regulatory T cells [11]. Unlike our results, there are studies shown that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T cells from *L. infantum*-infected BALB/c mice were competent to secrete some IL-10 levels but nothing very expressive, suggesting a minor role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Treg during visceral *L. infantum* infection [34]. On the other hand, the same study showed that antigen-induced IL-10-producing CD4<sup>+</sup>

T cells arising from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> named to as Tr1 cells showed to be an important source of IL-10, since they were in fact capable of specifically producing larger amounts of this cytokine, early and throughout the experimental period [34].

In this study, it was observed that the frequency of Treg Tr1 cells in the CXCL10-treated animals was lower when compared to untreated animals at 7 days post-treatment. These data suggest CXCL10 was able to act earlier on this regulatory population Tr1 when compared to CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Treg cells. Nevertheless, after 23 days of treatment, it was also observed that in the CXCL10-treated group the low frequency of CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> IL-10<sup>+</sup>Treg cells was still more significant. Tr1 cells can already be found two weeks after infection, producing both IFN- $\gamma$  and IL-10, and reach a plateau in one month, representing 2 to 5% of the total splenic CD4 T cell pool [12, 13]. The polarization for this population of CD4<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> T lymphocytes, but both Foxp3<sup>-</sup> and CD25<sup>-</sup>, is associated with increased host susceptibility to *Leishmania* and initially depends on its activation only by infected dendritic cells known to have low levels of costimulatory molecules on their surfaces and production capacity of high levels of IL-10 [13]. It is possible that IL-10 cytokine, which was 10 times lower than IFN- $\gamma$ , determined by the ELISA method after 23 days of treatment with CXCL10 was produced by either of the two regulatory cell phenotypes found in this study by flow cytometry. Probably, one population would be producing IL-10 earlier and the other would be maintaining that production at the later stage of the disease.

The parasitic persistence of *L. infantum* in the spleen has complex immunopathology and is still unknown in its particularities, since it involves several cells of the reticuloendothelial system, cytokines and chemokines [35]. This persistence occurs due to the inability of the host to control the parasite load and to

maintain the pro-inflammatory Th1 immune profile due in part to the production of IL-10 stimulated by the parasites [35]. The spleen is a site of active infection and produces several hematological abnormalities in the host, causing the typical symptoms of infection, among them, splenomegaly directly related to the lymphoid follicle hyperplasia of the white pulp [24, 35].

Spleen involvement in visceral leishmaniasis is related to alteration of the normal physiology of this organ through a deep remodeling [24], caused by the loss of cellular organization in its intricate microarchitecture. The spleen has several populations of macrophages and structures (germinal centers) that allow the antigenic presentation for the activation of effector cells, T and B lymphocyte [36]. The MZ, which is directly related to the antigenic presentation to the T cell, is compromised during infection by *L. donovani*, generating host immunosuppression [24]. Therefore, the next step of our study was to investigate how CXCL10-treatment would have repercussions on spleen changes that occur in visceral leishmaniasis.

We observed a significant reduction of lymphoid hyperplasia in the spleen in the CXCL10-treated animals, which may contribute to minimize the breakdown standard of the splenic microarchitecture previously described in the spleen of infected animals [37]. It is estimated that 50% of the initial parasite inoculum is killed by macrophage of the MZ within the first 24 hours after infection [36]. CXCL10 induces IFN- $\gamma$  secretion, produced by NK cells, which is an important cytokine that induces macrophage activation [38, 39]. Other studies have pointed to the increased cytotoxicity of NK cells in BALB/c mice infected with *L. major* and treated with CXCL10 [39], then this cytotoxicity could help to maintain spleen structure by eliminating infected macrophages.

## Conclusions

In conclusion, this study suggests a protective role of CXCL10 chemokine mediated by IFN- $\gamma$  with suppression of IL10<sup>+</sup> Treg (Foxp3<sup>+</sup> and Tr1) cells, and a lower lymphoid hyperplasia in the spleen in *L. infantum*-infected BALB/c mice. These data may provide information for the development of future therapeutic interventions, using CXCL10 as adjuvant in visceral leishmaniasis.

## **Acknowledgements**

The authors wish to thank Dr. Andrea Henrique Pons of the laboratory of innovations in therapies, education and bioproducts, Oswaldo Cruz Institute, and Dr. Adriano Gomes da Silva of the EvandroChagas National Institute of Infectology, for their scientific advisory on Treg cells and flow cytometry.

## **Funding**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and CAPES-Programa DINTER (Doutorado Interinstitucional) Medicina Tropical 309/2013.

## **Availability of data and materials**

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

## **Author's contribution**

WMEF – Planning and standardization of assays, performed *in vitro* and *in vivo* experiments, co-orientation of students, discussion and interpretation of results and paper write; FFH – performed experiments related to flow cytometry, analysis and interpretation of results; ASS – performed infection, treatment, follow-up of the mice, and experiments related to histopathological analysis; TBG and NLCR – performed assays with splenocytes cultures, dosing cytokines, analysis and interpretation of results; RRB and MMLP – performed histopathological analysis, discussion and interpretation of results; HSB - co-orientation of students, discussion and

interpretation of results and paper write; MJT – coordinator of work, planning assays, orientation of students, discussion and interpretation of results and paper write. All authors read and approved the final manuscript.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Consent for publication**

Not applicable

### **Ethics approval**

This work was approved by the Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) of the Universidade Federal do Ceará, under registration number 52/2014.



## References

1. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect.* 2014; 69(suppl1):10-8.
2. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis [Internet]. World Health Organization. 2017 [Updated 2017 April]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
3. Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 2000; 16(5):188-9.
4. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1):111-26.
5. Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, et al. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. *Parasitol Res.* 2008; 103(1):1–10.
6. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 2010; 28:445-89.
7. Belizário JE, Brandão W, Rossato C, Peron JP. Thymic and postthymic regulation of naïve CD4 (+) T-cell lineage fates in humans and mice models. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016:9523628.
8. Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1990; 145(12):4290-7.
9. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(8):604-15.
10. Van Assche T, Deschacht M, Da Luz RA, Maes L, Cos P. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(2):337-51.
11. Gupta G, Majumdar S, Adhikari A, Bhattacharya P, Mukherjee AK, Majumdar SB, et al. Treatment with IP-10 induces host-protective immune response by regulating the T regulatory cell functioning in *Leishmania donovani*-infected mice. *Med Microbiol Immunol.* 2011; 200(4):241-53.

12. Owens BM, Beattie L, Moore JW, Brown N, Mann JL, Dalton JE, et al. IL-10 producing Th1 cells and disease progression are regulated by distinct CD11c<sup>+</sup> cell populations during visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog.* 2012; 8(7):e1002827.
13. Resende M, Moreira D, Augusto J, Cunha J, Neves B, Cruz MT, et al. *Leishmania*-infected MHC class II high dendritic cells polarize CD4<sup>+</sup> T cells toward a nonprotective T-bet<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> phenotype. *J Immunol.* 2013; 191(1):262-73.
14. Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Júnior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS, et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon  $\gamma$  to promote protection against *Leishmania infantum* infection. *J Infect Dis.* 2015;211(6):1015-26.
15. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 2009; 30(5):626-35.
16. Yao Y, Vent-Schmidt J, McGeough MD, Wong M, Hoffman HM, Steiner TS, et al. Tr1 cells, but not foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, suppress NLRP3 inflammasome activation via an IL-10-dependent mechanism. *J Immunol.* 2015; 195(2):488-97.
17. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994; 265(5176):1237-40.
18. Martin S, Agarwal R, Murugaiyan G, Saha B. CD40 expression levels modulate regulatory T cells in *Leishmania donovani* infection. *J Immunol.* 2010; 185(1):551-9.
19. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol.* 2007; 8(12):1353-62.
20. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science.* 2011; 332(6029):600-3.
21. Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol.* 2006; 177(10):6780-6.
22. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002; 3(2):135-42.

23. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007; 204(6):1257-65.
24. Engwerda CR, Ato M, Cotterell SE, Mynott TL, Tschannerl A, Gorak-Stolinska PM, et al. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *Am J Pathol*. 2002; 161(2):429-37.
25. Ato M, Stäger S, Engwerda CR, Kaye PM. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol*. 2002; 3(12):1185-91.
26. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*. 2012; 30:429-57.
27. Gupta G, Bhattacharjee S, Bhattacharyya S, Bhattacharya P, Adhikari A, Mukherjee A, et al. CXC chemokine-mediated protection against visceral leishmaniasis: involvement of the proinflammatory response. *J Infect Dis*. 2009; 200(8):1300-10.
28. National Institutes of Health, Rasband WS, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 2012, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.
29. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev*. 2004; 201:239-53.
30. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:683-765.
31. Mege JL, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6(9):557-69.
32. Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol*. 2001; 31(10):2848-56.
33. Murray HW, Moreira AL, Lu CM, Devecchio JL, Matsushashi M, Ma X, et al. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2003; 188(3):458-64.

34. Rodrigues OR, Marques C, Soares-Clemente M, Ferronha MH, Santos-Gomes GM. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. Immunobiology. 2009; 214(2):101-11.
35. Varma N, Naseem S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. Indian J Hematol Blood Transfus. 2010; 26(3):78-82.
36. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. Immunity. 2007; 27(2):190-202.
37. Santana CC, Vassallo J, de Freitas LA, Oliveira GG, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WL. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. Parasite Immunol. 2008; 30(10):515-24.
38. Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. Immunol Lett. 2005; 99(1):17-23.
39. Dey R, Majumder N, Bhattacharyya Majumdar S, Bhattacharjee S, Banerjee S, Roy S, et al. Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. Scand J Immunol. 2007; 66(6):671-83.

## Legends

**Figure 1** -Production of IFN- $\gamma$  (A) and IL-10 (B) by splenocytes from BALB/c mice infected by *Leishmania infantum* and treated or untreated with CXCL10. The animals were treated with CXCL10 (5 $\mu$ g/kg) or saline, intraperitoneally, at 1, 3 and 7 days of infection. After 1, 7 and 23 days of treatment, the animals were euthanized to obtain the splenocytes. The supernatants of these cells were collected at 48 hours for the measurement of the cytokines. Data from 6 animals per group are shown as the arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean, and are representative of 3 independent experiments.

**Figure 2** – Gating strategy of proportion, and frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>Treg cells in splenocytes from BALB/c mice infected with *Leishmania infantum* and treated or untreated with CXCL10. Animals were treated as described in Figure 1. After 7, 23 and 45 days of treatment, the animals were euthanized to obtain the splenocytes. The cells were labeled with antibodies and subjected to flow cytometry. Data from at least 6 animals per group are shown as the arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean, and are representative of 3 independent experiments.

**Figure 3** – Gating strategy of proportion, and frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>TregTr1 cells in splenocytes from BALB/c mice infected with *Leishmania infantum* and treated or untreated with CXCL10. Animals were treated as described in Figure 1. After 7, 23 and 45 days of treatment, the animals were euthanized to obtain the splenocytes. The cells were labeled with antibodies and subjected to flow cytometry. Data from at least 6 animals per group are shown as the arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean, and are representative of 3 independent experiments.

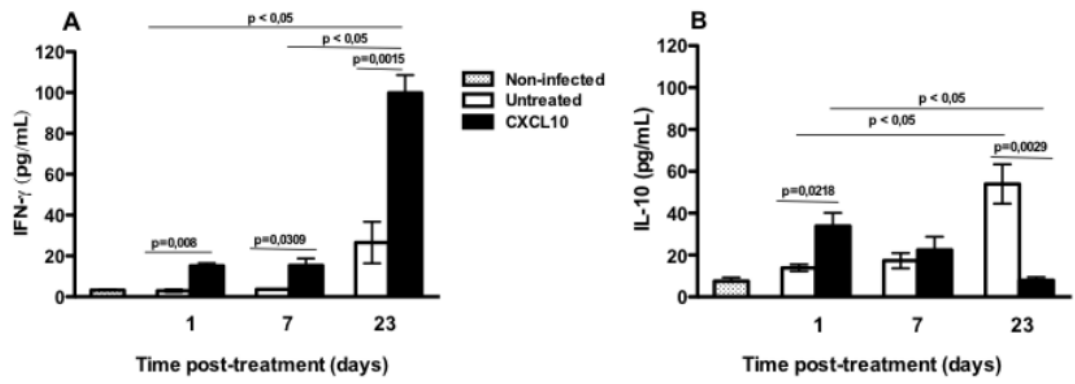
**Figure 4 – Number of follicles of white pulp of the spleen (A), weight index of spleen (B), and histological sections stained with hematoxylin-eosin staining (C) of BALB/c mice infected with *Leishmania infantum* treated or untreated with CXCL10. Animals were treated as described in Figure 1. After 7, 23 and 45 days of treatment, the animals were euthanized to obtain the spleen. Photomicrographs and reading of slides were made according to material and methods. Data from at least 6 animals per group are shown as 10-90 percentile, and are representative of 3 independent experiments. Histological sections: original magnification x40.**

**Tabela 1****Table 1** White pulp area in relation to total spleen area (%)

Time (days post-treatment)	Infected		<i>P</i>
	CXCL10	Untreated	
7	7.62	8.08	ns
23	7.02	9.80	ns
45	12.04	12.01	ns

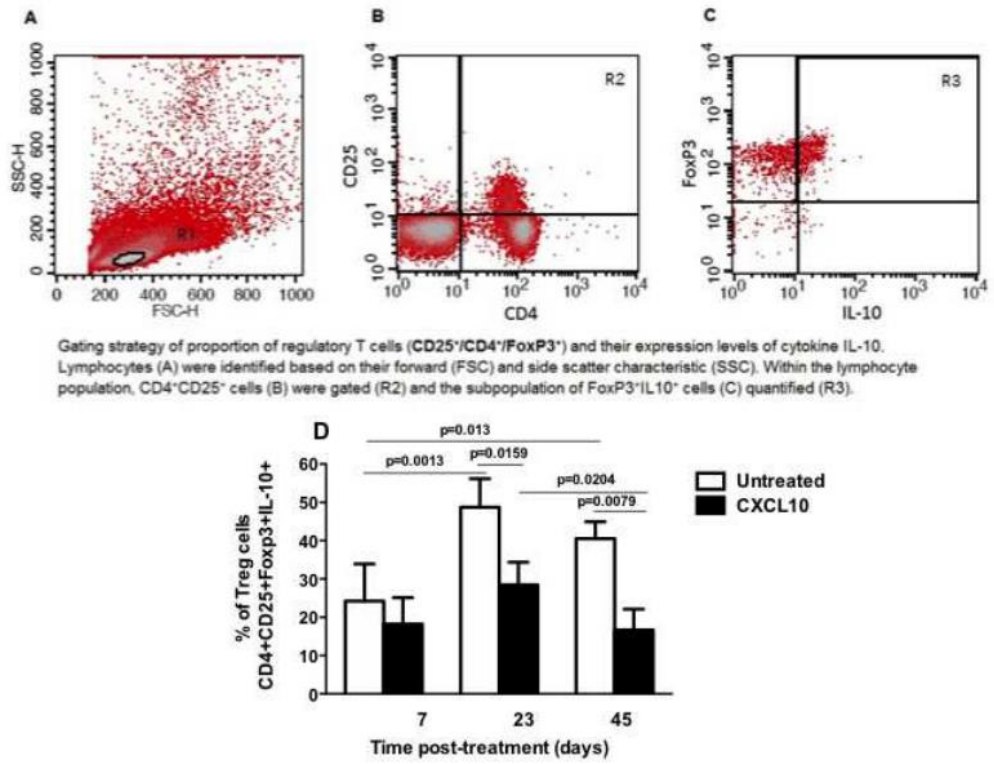
*Abbreviations:* ns, no significant

Figure 1





**Figure 2**



**Figure 3**

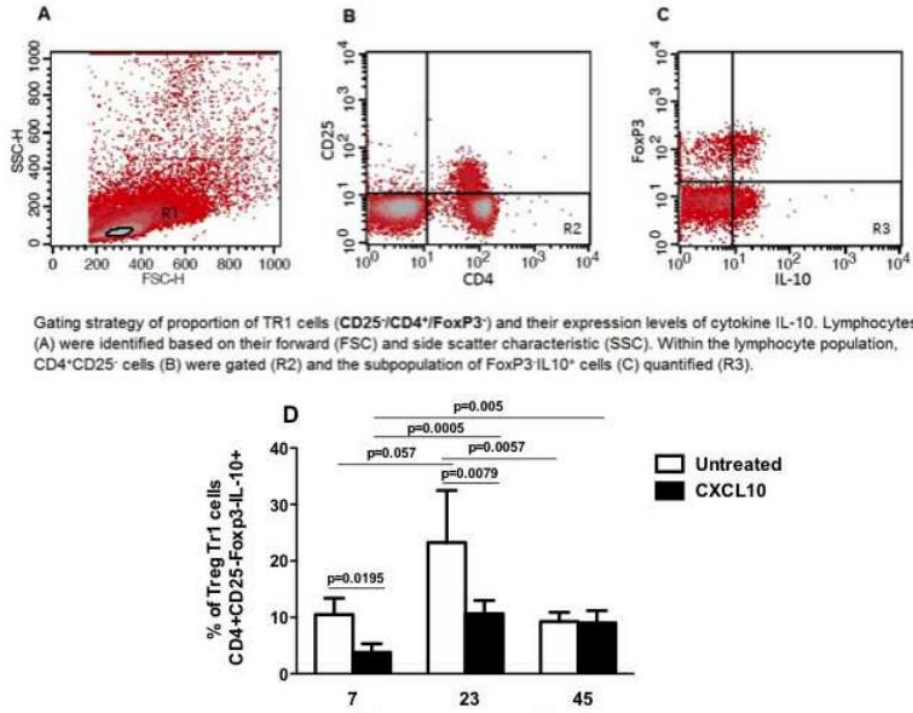


Figure 4A and 4B

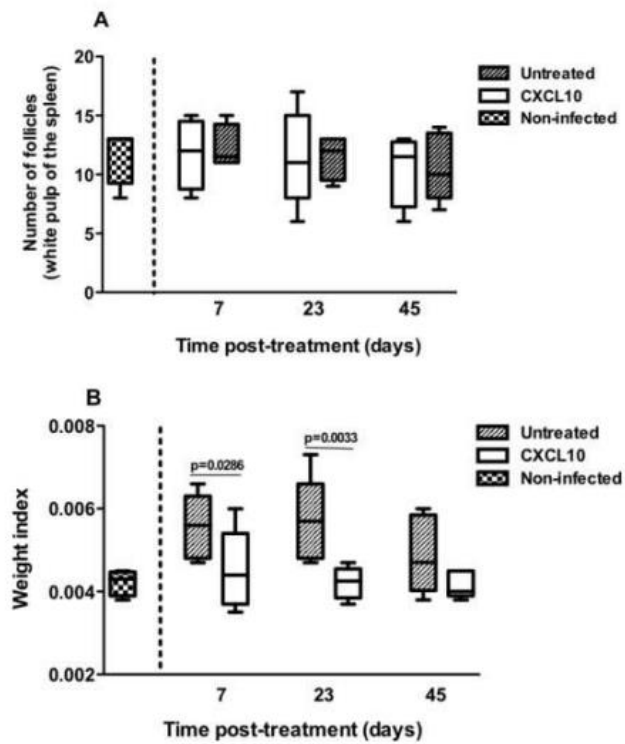


Figure C

